



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MARCOS RODRIGUES DE MATTOS

**QUALIDADE DO LEITE CRU PRODUZIDO NA REGIÃO  
AGRESTE DE PERNAMBUCO E ATIVIDADE  
ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS CONTRA  
*Salmonella Enteritidis* e *Staphylococcus aureus***

---

Londrina  
2008

**MARCOS RODRIGUES DE MATTOS**

**QUALIDADE DO LEITE CRU PRODUZIDO NA REGIÃO  
AGRESTE DE PERNAMBUCO E ATIVIDADE  
ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS CONTRA  
*Salmonella Enteritidis* e *Staphylococcus aureus***

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação,  
em Ciência Animal da Universidade Estadual de  
Londrina como requisito parcial à obtenção do  
título de Doutor em Ciência Animal – Área de  
Concentração: Sanidade Animal.

Orientadora: Prof. Dra. Vanerli Beloti

Londrina  
2008

**MARCOS RODRIGUES DE MATTOS**

**QUALIDADE DO LEITE CRU PRODUZIDO NA REGIÃO  
AGRESTE DE PERNAMBUCO E ATIVIDADE  
ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS CONTRA  
*Salmonella Enteritidis e Staphylococcus aureus***

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Vanerli Beloti – Orientadora  
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva,  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Ernst Eckehardt Muller  
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva,  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Julio César de Freitas  
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva,  
Universidade Estadual de Londrina

---

Prof. Dr. Luís Augusto Nero  
Depto. de Veterinária,  
Universidade Federal de Viçosa

---

Prof. Dr. Éder Paulo Fagan  
Depto. de Veterinária,  
Universidade Estadual do Norte do Paraná

Londrina, 05 de dezembro de 2008.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e depois a meus pais, Pedro e Martha pelo carinho e apoio, sempre.

A minha linda esposa Vanessa, sei que se hoje estou aqui foi para viver seu amor. Te amo,...., impossible!!

A amiga e orientadora Dra.Vanerli Beloti, a Neli. Seus esforços, empenho e conhecimento são inspiradores.

A todos do LIPOA que de forma direta ou indireta contribuíram para realização deste trabalho. Por receio de esquecer de alguém, só vou citar o nome do amigo, residente, depois mestre, hoje doutorando Ronaldo, tenho certeza que todos vão se sentir muito bem representados!

Também não vou me prender a nomes, mas agradeço a todos em Pernambuco que abriram as portas para realização desta pesquisa.

Também não podemos esquecer dos produtores de leite que nos acolheram, as vezes de madrugada, mas sempre bem recebidos.

A todos os professores de graduação, mestrado e doutorado, com certeza levo comigo um pouco de cada um de vocês.

A todos os amigos de ontem e de hoje.

MATTOS, Marcos Rodrigues de. **Qualidade do leite cru produzido na região agreste de Pernambuco e atividade antagonista de bactérias ácido lácticas contra *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus***. 2008. 50f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

## RESUMO

A qualidade do leite é um dos maiores problemas da cadeia do leite no Brasil, interferindo negativamente na produção e rendimento de derivados. Bactérias ácido lácticas (BAL) fazem parte da microbiota desses produtos e são importantes na indústria de alimentos por possuírem propriedades probióticas e apresentarem atividades antimicrobianas em relação à patógenos. Esse estudo teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica e físico-química do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, região na qual foram coletadas 53 amostras de produtores de leite, as quais foram submetidas a enumeração de aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), psicrotróficos (PS), *Escherichia coli* (EC), estafilococos coagulase positiva (ECP), BAL, análises físico químicas, teste do anel no leite e pesquisa de resíduos de praguicidas. Ainda, culturas de BAL selecionadas dessas amostras foram testadas quanto à atividade antagonista em relação a *Salmonella* enteritidis e *S. aureus*. Nas análises microbiológicas, as amostras apresentaram altas contagens de AM, CT, EC, PS e ECP. A média de aeróbios mesófilos foi de  $1,68 \times 10^7$  UFC/mL, sendo 83% acima de  $10^6$ . *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp não foram detectadas, 47% das amostras foram positivas para carbamatos, organofosforados ou ambos. No teste do anel no leite 24,6% das propriedades foram positivas. Bactérias Ácido lácticas foram isoladas de todas as amostras de leite cru, com uma média de  $1,4 \times 10^6$  UFC/mL. das 671 amostras de BAL testadas 445 (66,3%) apresentaram ação antagonista frente a *Salmonella* sp e 80 (11,7%) apresentaram antagonismo a *S. aureus*. A alta atividade antagonista das BAL em relação a *Salmonella* sp deve estar relacionada a ausência do patógeno nas amostras de leite analisadas. Assim, apenas 2 (3,77%) das amostras estariam dentro dos padrões estabelecidos pela Instrução Normativa 51(2002).

**Palavras-chave:** Qualidade do leite. Leite de Pernambuco. Bactérias ácido lácticas. Leite cru. *Salmonella* sp. *Staphylococcus aureus*.

MATTOS, Marcos Rodrigues de. **Quality of raw milk produced in the agreste of Pernambuco state and antagonist activity of the lactic acid bacteria against *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus***. 2008. 50f. Thesis (Ph. D. in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

### ABSTRACT

The milk quality is a major problem in Brazilian milk market, interfering negatively in the production and income from derivatives. Lactic acid bacteria are part of the natural contamination of these products and are important in food industry to have probiotic properties and antagonism activity against pathogens. This objective of this paper is evaluate the microbiological quality and physico-chemistry of the raw milk produced in the agreste region of Pernambuco state, in which 53 samples were collected from milk milk-producing properties, which were submitted to enumeration mesophilic aerobes (MA), total coliforms (TC), psychrotrophic (PS), *Escherichia coli* (EC), coagulase positive staphylococci (CPS), Lactic acid bacteria (LAB), ring test and for residues of pesticides. Also, these selected cultures of BAL samples were tested on the antagonist activity against *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus*. In the microbiological analysis, the samples showed high counts of MA, TC, EC, PS and CPS. The average mesophilic aerobes was  $1.68 \times 10^7$  CFU / mL, and 83% over  $10^6$ . *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* were not detected, 47% of samples were positive for carbamates, organophosphates, or both. Ring test is positive in 24.6% samples. Lactic acid bacteria were isolated from all samples of raw milk, with an average of  $1.4 \times 10^6$  CFU / mL. 445 (66.3%) LAB samples tested showed antagonistic activity against *Salmonella* Enteritidis and 80 (11.7%) showed antagonism to *S. aureus*. Thus, only 2 (3.77%) samples were within the standards established by Normative Instruction 51 (2002).

**Keywords:** Quality of milk. Milk of Pernambuco. Lactic acid bacteria. Raw milk. *Salmonella* sp. *Staphylococcus aureus*.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.1** – Contagens de aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), *Escherichia coli* (EC), Estafilococos coagulase positiva (STX) e psicrotroficos (PS) em leite cru da região agreste de Pernambuco em junho de 2005 ..... 26
- Tabela 1.2** – Análises físico-químicas de 53 amostras do leite cru colhidas em propriedades leiteira da região do Agreste de Pernambuco em junho de 2005 ..... 29
- Tabela 2.1** – Contagens de bactérias ácido láctica e estafilococos coagulase positivos no leite cru produzido na região agreste de Pernambuco, 2005 ..... 43
- Tabela 2.2** – Ação antagonista de BAL isoladas de 45 amostras de leite cru frente coletadas em propriedades do Agreste de Pernambuco em a *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*..... 44

## SUMÁRIO

<b>ESTADO DA ARTE</b> .....	9
<b>BACTÉRIA ÁCIDO LÁTICAS</b> .....	10
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	15
<b>OBJETIVOS</b> .....	18
OBJETIVO GERAL .....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	19
<b>ARTIGO 1 – QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA DO LEITE CRU PRODUZIDO NA REGIÃO AGRESTE DE PERNAMBUCO, BRASIL</b> .....	20
RESUMO .....	21
ABSTRACT .....	22
1.1 INTRODUÇÃO .....	23
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
1.4 CONCLUSÕES .....	31
1.5 REFERÊNCIAS.....	32
<b>ARTIGO 2 – BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL) ISOLADAS DO LEITE CRU DA REGIÃO AGRESTE DE PERNAMBUCO COM AÇÃO ANTAGONISTA CONTRA <i>Salmonella enteritidis</i> E <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	36
RESUMO .....	37
ABSTRACT .....	38
2.1 INTRODUÇÃO .....	39
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43

2.4 CONCLUSÕES .....	46
2.5 REFERÊNCIAS.....	47
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>50</b>

## **ESTADO DA ARTE**

## BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

Bactérias Ácido láticas (BAL) têm sido empregadas em alimentos há séculos, especialmente em derivados de leite e em produtos cárneos. Além da atividade antimicrobiana do ácido, peróxido de hidrogênio e diacetil, esses microrganismos também produzem bacteriocinas, que inibem o desenvolvimento de patógenos alimentares (ROSA; FRANCO, 2002).

O leite cru constitui boa fonte de BAL, e podem ser utilizadas pela indústria de alimentos, especialmente laticínios, pelo fato de estarem adaptadas às condições da matéria- prima. Porém, ainda são necessários maiores estudos sobre suas características individuais e específicas (ALEXANDRE et al., 2002).

Em estudos realizados sobre o efeito e o modo de ação das substâncias com propriedades antimicrobianas presentes nos alimentos ou adicionadas durante o processo de fabricação, pode-se perceber que o comportamento dos microrganismos é, também, determinado pelas características intrínsecas do alimento (atividade de água, temperatura e pH) e, por aquelas inerentes ao efeito bactericida das culturas adicionadas (PORTELLA, 2006).

BAL são exemplos destas culturas que, além de possuírem características sensoriais, permitem uma maior conservação dos alimentos podendo, ainda, serem usadas como probióticos, bactérias vivas contidas nos alimentos e que, após a ingestão, exercem efeitos benéficos ao hospedeiro. Os microrganismos mais comuns encontrados nos alimentos como probióticos são os lactobacilos e as bifidobactérias (CEBECI; GUARAKAN, 2003). Para que o probiótico produza benefícios terapêuticos, é recomendado que o alimento tenha, aproximadamente,  $10^6$  microrganismos vivos por g ou mL do produto no momento do consumo (SHAH, 2000).

Com isso, BAL têm grande importância econômica, já que de forma natural ou adicionada intencionalmente, desempenham importante papel na fermentação de grande variedade de alimentos. Suas atividades metabólicas não apenas contribuem para o desenvolvimento de características sensoriais desejáveis como também permitem conservar ou aumentar o valor nutritivo da matéria-prima (MAGRO et al., 2000).

O fato das BAL proporcionarem efeitos benéficos à saúde fortaleceu o *marketing* de muitos alimentos contendo culturas vivas, incluindo leite não fermentado, leite fermentado, iogurte, culturas secas, bebidas e doces (RICHARDSON, 1996).

Muitos gêneros de BAL (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*) são utilizadas na produção de alimentos fermentados, e têm apresentado antagonismo a outras bactérias, incluindo outras espécies do mesmo gênero e/ou patógenos. (McMULLEN; STILES, 1996).

O termo probiótico deriva do grego e significa “pró-vida” sendo o antônimo de antibiótico, que significa “contra a vida”. Ao longo do tempo, esta denominação teve diferentes acepções. Lilly e Stillwel (1965) usaram-na para denominar substâncias secretadas por um protozoário que estimulavam o crescimento de outros e Parker (1974), para denominar suplementos alimentares destinados a animais, incluindo microrganismos e substâncias que afetam o equilíbrio da microbiota intestinal.

Os principais microrganismos com propriedades probióticas são BAL que apresentam algumas características comuns, a saber: são Gram positivas, normalmente catalase negativa, asporogênicas, desprovidas de flagelos, possuindo forma bacilar ou cocobacilar, e produtoras de ácido láctico (FERREIRA, 2003; GOMES; MALCATA., 1999). As BAL, por intermédio da fermentação, transformam alguns açúcares, especialmente, a lactose, em ácidos orgânicos tais como os ácidos láctico e acético.

De acordo com Ferreira (2003) o termo “bactéria ácido láctica” inclui, atualmente, 15 gêneros: *Aerococcus*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*. Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são correntemente utilizados em preparações probióticas em grau tecnológico sendo não-patogênicas e consideradas como seguras (GOMES et al., 1999).

Algumas BAL se destacam: *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*) foi isolado pela primeira vez a partir das fezes de lactentes amamentados ao peito materno; atribuíram-lhes o nome de *Bacillus acidophilus*, designação genérica dos lactobacilos intestinais. Estes microrganismos são, geralmente, caracterizados na forma de células livres, aos pares ou em cadeias curtas, com tamanho típico de 0,6 a 0,9 µm de largura e 1,5 a 6,0 µm de comprimento. Esta espécie tem a particularidade de ser pouco tolerante à salinidade do meio, e ser microaerófila, com o crescimento em meios sólidos favorecido por anaerobiose ou pressão reduzida de oxigênio (PORTELLA, 2006).

A capacidade de produzir grande quantidade de ácidos orgânicos (principalmente ácido láctico), por fermentarem os carboidratos presentes nos alimentos e conseqüentemente reduzirem o pH, é o fator primário em que se baseia a atividade antimicrobiana de BAL (MAGRO et al., 2000). Além disso, as BAL têm capacidade de

produzir outras substâncias inibitórias, tais como: peróxido de hidrogênio, diacetil, metabólitos de oxigênio, entre outras (PIARD; DESMAZEAUD, 1991).

Nos últimos anos, além da utilização de BAL como probióticos, estuda-se também sua aplicação como conservantes em alimentos. Contudo, devido à sua grande importância econômica para a indústria de fermentação, os estudos sobre a fisiologia, bioquímica, genética e biologia molecular desses microrganismos tiveram um avanço significativo, o que levou à detecção de outros compostos que ocasionam a ação antagonista, como as bacteriocinas (DAVIDSON; HOOVER, 1993). A importância econômica das BAL na preservação de alimentos continua estimulando a exploração de bacteriocinas para o uso como conservantes de alimentos (LEWUS et al., 1991; BAREFOOT; NETTLES, 1993).

Mais de 100 bacteriocinas de BAL foram identificadas (CHEN et al., 1997). Elas são, em geral, pequenas proteínas catiônicas, heterogêneas e hidrofóbicas, que apresentam de 20 a 60 resíduos de aminoácidos, ponto isoelétrico elevado, características anfipáticas; variam consideravelmente quanto ao microrganismo produtor, ao espectro de ação, ao peso molecular e às suas propriedades bioquímicas (KAISER; MONTVILLE, 1996; VERHEUL et al., 1997).

Segundo Bruno e Montville (1993) e Eijsink et al. (1996), as bacteriocinas são proteínas biologicamente ativas e exibem propriedades antimicrobianas contra espécies intimamente relacionadas com o organismo produtor. Os mesmos autores mencionam algumas dessas propriedades: podem apresentar efeito bactericida ou bacteriostático, dependendo da concentração; apresentam pequeno ou amplo espectro de atuação; têm sua produção mediada por plasmídeo ou cromossomo; reagem com sítios específicos ou inespecíficos de ligação na bactéria sensível; e apresentam modo de ação similar, desestabilizando a força protônica da membrana da célula sensível.

Tradicionalmente, as bacteriocinas produzidas pelas BAL são divididas em três grupos: Classe I: Lantibióticos – que são peptídeos pequenos, caracterizados pela presença de aminoácidos pouco comuns como lantionina, U-metil alanina e V, U aminoácidos não saturados como dehidroalanina e dehidrobutirina; Classe II: compreende um grande número de peptídeos não modificados e que são estáveis ao calor. Nesta classe incluem-se a pediocina, bacteriocina ativa contra *Listeria* sp, as plantaricinas, bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum*, entre outras (SULLIVAN et al., 2002); Classe III: encontram-se as helveticinas, produzidas por *Lactobacillus helveticus* (RODRÍGUEZ et al., 2003).

As bacteriocinas são sintetizadas, primeiramente, na forma de pré-peptídios ou pré- bacteriocinas biologicamente inativos. Esses pré-peptídios contêm uma sequência de

18 a 27 aminoácidos, apresentando 2 glicinas na região N-terminal. As funções dessa seqüência de aminoácidos são: evitar que a bacteriocina seja biologicamente ativa dentro da célula produtora e servir como sinal de reconhecimento para o sistema de transporte que envolve as proteínas do transporte e uma proteína acessório (NES et al, 1996). Segundo MOLL et al. (1999), as duas glicinas presentes na seqüência de aminoácidos são as responsáveis pelo reconhecimento da pré-bacteriocina no sistema de transporte. Após o reconhecimento do pré-peptídeo, a seqüência de aminoácidos é removida, e a bacteriocina, excretada da célula. (ENNAHAR et al., 2000).

A nisina, produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis*, é a bacteriocina mais bem caracterizada atualmente. Descoberta nos anos 20 e classificada como um antibiótico (apresenta aminoácidos modificados como lantionina e b lantionina) de 34 aminoácidos e peso molecular de 3500 Da (monômero), ela inibe a multiplicação de bactérias Gram-positivas, incluindo patógenos como *Listeria monocytogenes*. É a única bacteriocina produzida comercialmente e legalizada para utilização em alimentos (STEVENS et al., 1991; GARCERÁ et al., 1993; VERHEUL et al., 1997).

Graças a seu uso como conservantes de produtos fermentados, as bacteriocinas produzidas por BAL têm atraído muito a atenção de pesquisadores nos últimos anos. O motivo principal é o uso comercial do antibiótico nisina produzido por algumas cepas de *Lactococcus lactis* (ROSA; FRANCO, 2002).

Estudos toxicológicos realizados com nisina demonstraram que a sua ingestão não tem efeitos tóxicos para o organismo humano, sendo reportada uma DL50 de 6950 mg/Kg similar ao sal, quando administrada oralmente. A nisina é a única bacteriocina considerada pelo comitê do *Codex Alimentarius* da FAO (Food and Agriculture Organization) como GRAS (Generally Regarded As Safe), e de uso liberado como aditivo alimentar para controle antimicrobiano na inibição do desenvolvimento pós-germinativo de esporos e formação de toxina por *Clostridium botulinum* em queijos fundidos pasteurizados. Seu uso foi aprovado em 47 países (MORENO, 1995).

No Brasil, a nisina está aprovada para uso em queijos fundidos desde 1990, em requeijão desde 1992 e em queijos pasteurizados desde 1996. Em 1998, a Divisão de Operações Industriais do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, pertencente ao Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento, aprovou o uso de nisina em solução de 200 ppm (0,02%) para o emprego em superfícies externas de embutidos, mais especificamente de salsichas de todo tipo (ROSA; FRANCO, 2002).

Nos Estados Unidos, a nisina tem sido utilizada na produção de queijos, não

só inibindo o desenvolvimento de esporos de *Clostridium* e possível produção de toxina, mas também intimidando microrganismos termorresistentes deteriorantes em alimentos enlatados e aumentando o tempo de vida em prateleira do leite e seus derivados (STEVENS et al., 1991).

As BAL estão amplamente distribuídas na natureza, particularmente no leite. Usando culturas produtoras de bacteriocinas, ou adicionando bacteriocinas purificadas aos alimentos, é possível reprimir o crescimento de alguns patógenos ou deteriorantes alimentares e, assim, aumentar a segurança microbiológica e o tempo de vida útil do produtos. Por ocorrem naturalmente em muitos alimentos fermentados, suas bacteriocinas podem ser facilmente aceitas como bioconservantes pelas autoridades da saúde e pelos consumidores (ROSA; FRANCO, 2002).

Neste contexto, o estudo das BAL e de sua atuação na conservação de leite, seus derivados e em outros alimentos e o desenvolvimento de tecnologias envolvendo o emprego destas culturas é promissor e requer estudos, afim de que se possa estabelecer definitivamente o mecanismo de ação dessas culturas e os veículos apropriados para que elas exerçam o seu efeito apropriadamente (OLIVEIRA et al., 2002)

Em geral, pode-se dizer que o processamento de alimentos funcionais contendo BAL, principalmente sua incorporação em leites fermentados e queijos, vem resultando em produtos com alto grau de aceitabilidade, nos quais a sua viabilidade e funcionalidade são mantidas.

## REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE D.P.; SILVA M.R.; SOUZA M.R.; SANTOS W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* vol.54 no.4 Belo Horizonte July/Aug. 2002.
- BAREFOOT, S. F.; NETTLES, C.G. Antibiosis revisited: bacteriocins produced by dairy starter cultures. *J Dairy Sci.* v.76, n.8, p.2366-79, 1993.
- BRUNO, M.E.C.; MONTVILLE, T.J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.59, n.9, p. 3003-3010, 1993.
- CEBECI, A.; GUARAKAN, C. Properties of potencial probiotic *Lactobacillus lantarum* strains, *Food Microbiology*, v.20, p.511-518, 2003.
- CHEN, Y.; LUDESCHER, R.D.; MONTVILLE, T.J. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.63, n.12, p.4770- 4777, 1997.
- DAVIDSON, P.M.; HOOVER, D.G. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: SALMINEN, S., VON WRIGHT, A. *Lactic acid bacteria*. New York: Marcel Dekker, 1993. p.127-159.
- EIJSSINK, V.G.H.; BRURBERG, M.B.; MIDDELLHOVEN, P.H.; NES, I.F. Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. *J. Bacteriol.*, Baltimore, v.178, n.8, p.2232-2237, 1996.
- ENNAHAR S.; SASHIHARA T.; SONOMOTO K.; ISHIZAKI A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis. Structure and activity. *FEMS Microbiol. Rev.* v.24, n.1. p.85-106, 2000.
- FERREIRA, C.L.F. Grupo de Bactérias Lácticas – Caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: FERREIRA, C.L.F, Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003, p. 7-34.
- GARCERÁ, M.J.G.; ELFERINK, M.G.L.; DRIESSEN, A.J.M.; KONINGS, W.N. *In vitro* pore-forming activity of the lantibiotic nisin role of proton motive force and lipid composition. *Eur. J. Biochem.*, Berlin, v.212, p.417-422, 1993.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X.; Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. *Biocologia Alimentar*. v. 64, p. 12-22, 1999.

LEWUS, C.B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T.J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.57, n.6, p.1683-1688, 1991.

LILLY, D.M.; STILLWEL, R.H. Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, Washington, v.147, n.3659, p.747-748, 1965.

KAISER, A. L. ; MONTVILLE, T.J. Purification of the bacteriocin MN and characterization of its Mode of Action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipids Vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(12):4529-4535, 1996.

MAGRO, M.L.M.; CORBACHO, J. M. M.; SORRIBES, C.H. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas 1: Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. *Alimentaria*, v.37, p.59-66, 2000.

McMULLEN, L.M.; STILES, M.E. Potencial for use of bacteriocin producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *J. Food Prot.*, Ames, suppl., p.64-71, 1996.

MOLL, G.N.; KONINGS, W. N.; DRIESSEN, A. J. M. Bacteriocins mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek*, Dordrecht, v.76, p.185-198, 1999.

MORENO, I. Ocorrência e caracterização de bacteriocinas de *Lactococcus* e sua utilização no procedimento de queijo Minas Frescal. São Paulo, 1995. (dissertação de Mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas- USP).

NES, I.F.; DIEP, D.P.; HAVARSTEIN, L.S.; BRURBERG, M.B.; EIJSINK, V.; HOLO, H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, Dordrecht, v.60, p.113- 128, 1996.

OLIVEIRA, M. N., SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 38, n. 1, jan./mar., 2002.

PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition Health*, n.29, p.4-8, 1974.

PIARD, J.C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1-Oxygen metabolites and products from catabolism. *Lait*, v.71, p. 525-541, 1991.

PORTELLA, A. C. F. Modelagem do efeito antagônico de *lac tobacillus* sobre *escherichia coli*, *listeria monocytogenes* e *staphylococcus aureus* pela análise de sobrevivência com enfoque bayesiano Dissertação (Mestrado em processos biológicos) Universidade federal do Paraná. Curitiba, 2006.

RICHARDSON, D. Probiotics and products innovation. *Nutrition and Food Science*. London, n.4, p.27-33, 1996.

RODRÍGUEZ, J.M.; MARTÍNEZ, M.I.; HORN, N.; DODD, H.M. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria, *International Journal of Food microbiology*, v.80, p.101– 116, 2003.

ROSA, C. M.; FRANCO, B.D.G.M. , Bacteriocinas de bactérias lácticas. On *SCIENTIAE SAÚDE*. Rev. Cient., UNINOVE - São Paulo.2002.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *Dairy Science Journal*, v.83, p.894-907, 2000.

STEVENS, K.A.; SHELDON, B.W.; KLAPES, N.A.; KLAENHAMMER, T.R. Nisin treatment for inactivation of Salmonella and others Gram negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.57, n.12, p.3613-3615, 1991.

SULLIVAN, L.O.; ROSS, R.P.; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, v.84, p.593-604, 2002.

VERHEUL, A.; RUSSELL, N.J.; HOF, R.V.; ROMBOOTS, F.M.; ABEE, T. Modifications of membrane phospholipid composition in nisinresistant *Listeria monocytogenes* Scott A. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.63, n.9, p.3451- 3457, 1997.

WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H.; The lactic acid bacteria in Health & Disease. New York: Elsevier Applied Science, London, 1992, 485p.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade do leite cru produzido na região Agreste de Pernambuco e atividade inibitória de Bactérias Ácido Láticas isoladas deste leite contra *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a qualidade microbiológica e físico-química do leite cru produzido na região Agreste de Pernambuco;
- Detectar *Salmonella* sp, quantificar Estafilococos Coagulase Positiva e Bactérias Ácido Láticas no leite cru produzido na região Agreste de Pernambuco;
- Avaliar a atividade inibitória de Bactérias Ácido Láticas isoladas destas mesmas amostras de leite cru da região Agreste de Pernambuco frente aos microrganismos *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus*;
- Detectar a presença de resíduos de antibióticos e praguicidas neste leite.

## **ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO**

## **ARTIGO 1**

Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru produzido na região agreste de Pernambuco, Brasil

Qualidade microbiológica e físico-química do leite cru produzido na região agreste de Pernambuco, Brasil.

## RESUMO

Mesmo depois da implantação das especificações descritas na Instrução Normativa 51 de 2002, o leite ainda apresenta qualidade inferior à determinada pela legislação. A qualidade do leite é um dos maiores problemas para produtores e indústrias de beneficiamento, interferindo negativamente na produção e rendimento de derivados. O Agreste de Pernambuco compreende a região entre a Zona da Mata e o Sertão do estado com uma produção de leite diária de 980 mil litros e um crescimento nos últimos dois anos de 23%. Com o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica e físico-química do leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco foram coletadas amostras de leite cru em 53 propriedades rurais, distribuídas nos municípios de Saloá, Águas Belas, São Bento do Uma e Bom Conselho. As amostras foram diluídas e semeadas conforme as instruções do fabricante, sendo utilizadas para enumeração de aeróbios mesófilos placas Petrifilm™ AC (3M do Brasil Ltda.), coliformes totais e *Escherichia coli* placas Petrifilm™ EC (3M do Brasil Ltda.) e estafilococos em placas de Petrifilm™ STX (3M do Brasil Ltda.), para detecção de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp foram utilizados os sistemas VIDAS listeria e VIDAS Salmonella (BioMerieux®), organofosforados e carbamatos foram pesquisados pela técnica de Cromatografia em Camada Delgada, e o teor de gordura, sólidos totais, sólidos não gordurosos, a densidade, proteína e lactose foram obtidas por espectroscopia de em analisador ultra-sônico (US), calibrado para a análise de leite de vaca, além da realização de California mastite teste (CMT) para detecção de mastite subclínica e ring test para monitoramento da presença de *Brucella* no rebanho. Nas análises microbiológicas as amostras apresentaram altas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, coliformes totais, *Escherichia coli*, psicrotróficos e estafilococos coagulase positiva, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp não foram detectadas em nenhuma amostra, 47% das amostras foram positivas para carbamatos, organofosforados ou ambos, pouca variação nos padrões físico-químicos foram detectadas, sendo destacadas 26,4% no teste do anel do leite. A qualidade microbiológica do leite produzido na região do agreste de Pernambuco não atende aos padrões estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp não tem condições de crescimento nas amostras de leite cru destas regiões. Deve-se dar atenção a presença de carbamatos, organofosforados e a ocorrência de mastite sub-clínica e brucelose nos rebanhos estudados.

**Palavras-chave:** Leite cru. Microbiologia. Físico-química. Leite de Pernambuco. Qualidade.

Microbiological and physical-chemical quality of raw milk produced in Agreste region of Pernambuco state, Brazil

### ABSTRACT

The poor quality of raw milk is the main problem in dairy industries, once it can directly interfere in the productivity and quality of dairy products. The Pernambuco is not different. located between the Zona da Mata and the Sertão regions, is responsible for a daily milk production of 980,000 liters, and presented an increase of 23% in the last two years. This study aimed the evaluation of the microbiological and physical-chemical quality of raw milk produced in the Agreste region of Pernambuco. Raw milk samples were collected from 53 dairy farms located at the following cities: Saloá, Águas Belas, São Bento do Una and Bom Conselho. For microbiological analysis, all samples were plated for mesophilic aerobes, total coliforms, *Escherichia coli* and DNase positive staphylococci in specific Petrifilm™ (3M Microbiology, St. Paul, USA). *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. were detected using VIDAS system (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France). Organophosphorade and carbamates were detected by thin layer chromatography. Fat, protein, and lactose contents, total and non-fat solids, and density were obtained by ultrasound method using an automatic milk analyzer (Boecolac-60, Boeco, Hamburg, Germany). In addition, the raw milk samples were evaluated to cryoscopic, California Mastitis Test (CMT), peroxidase, Dornic acidity and Ring-test to brucellosis status of herds. In microbiological analysis, all samples presented high counts of the researched indicators microorganisms. The average of mesophilic aerobes was  $1.68 \times 10^7$  UFC/mL with 83% of samples over  $10^6$  UFC/mL. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp were not found, 47% of the samples were positive for organophosphates and/or carbamates, 67.9% of the samples were positive for CMT and 26.4% for ring test. Thus, only 2 (3.77%) samples were accordance with the established parameters of Instrução Normativa 51.

**Keywords:** Milk quality. Microbiology of milk. Physical chemistry. Milk from Pernambuco.

## 1.1. Introdução

A qualidade do leite é um dos maiores problemas da cadeia do leite no Brasil, interferindo negativamente na produção e rendimento de derivados (SANTOS, 2007). No Estado de Pernambuco, não é diferente. Pernambuco o segundo maior produtor do Nordeste e décimo do país, e tem sua maior produção de leite localizada na Região Agreste do estado, que fica entre a Zona da Mata e o Sertão. A produção de leite no Agreste cresceu 23% nos últimos dois anos, chegando a 980 mil litros/dia e correspondendo a 73% do leite do estado (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2008; FIGUEIROA, 2006). No ano 2000, o Governo Federal em parceria com o Governo do Estado de Pernambuco, lançou o Programa Leite de Pernambuco que, entre outros benefícios, contribuiu para o desenvolvimento da produção leiteira no estado, dando destaque para as regiões do Agreste, Zona da Mata e Metropolitana de Recife (SECRETÁRIA DE PRODUÇÃO RURAL E REFORMA AGRÁRIA, 2006).

O Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do leite, implantado no país pela Instrução Normativa nº 51 - IN51 (BRASIL, 2002), começou a vigorar no Sul, Sudeste e Centro Oeste a partir de 2005 e no Norte e Nordeste em 2007. A IN 51 determina, dentre outros aspectos, parâmetros físico-químicos e microbiológicos para o leite cru. Entretanto, o leite produzido em varias regiões do país ainda não atende os padrões determinados. Entre as principais causas dessa situação, estão as inadequadas condições de higiene de ordenha, procedimentos inadequados de limpeza de utensílios e equipamentos, e problemas ligados ao armazenamento do leite cru refrigerado e o seu transporte (NERO et al., 2008). Para a região Nordeste, a IN 51 determina que o leite cru deve ser refrigerado já na propriedade e possuir uma contagem de aeróbios mesófilos máxima de  $10^6$  UFC/mL, devendo se limitar a um máximo de  $7,5 \times 10^5$  UFC/mL a partir de julho de 2010.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica e físico-química,

e detectar *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp e resíduos de antibióticos e praguicidas (carbamatos e organofosforados) no leite cru produzido na região agreste de Pernambuco.

## 1.2. Material e Métodos

Com o intuito de representar o perfil de produção das unidades produtoras de leite da região do Agreste de Pernambuco, foram selecionadas, por indicação da Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária (SPRRA) do Estado de Pernambuco e da Cooperativa dos Produtores de Leite e Derivados de Pernambuco (COOPROL), 53 propriedades rurais, distribuídas nos municípios de Saloá, Águas Belas, São Bento do Una e Bom Conselho.

No mês de junho de 2005, foram coletados aproximadamente 500 mL de leite cru de cada propriedade em *bags* estéreis (NASCO®, EUA). As amostras foram coletadas diretamente nas propriedades, em tanques de expansão ou latões, dependendo da tecnificação de cada uma delas. Depois de coletadas, as amostras foram acondicionadas em ambiente isotérmico com gelo reciclável e encaminhadas para o Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos (LEAAL) da Universidade Federal de Pernambuco para a realização das análises laboratoriais.

Para pesquisa dos microrganismos indicadores, foram feitas diluições decimais seriadas em solução salina estéril 0,85% de cada amostra, sendo posteriormente semeadas e incubadas conforme orientações do fabricante em placas Petrifilm™ AC para pesquisa de Aeróbios mesófilos (AM), e Petrifilm™ EC para coliformes totais (CT) e *Escherichia coli* (EC) e Petrifilm™ STX para Estafilococos termonuclease positivos, que apresentam alta correlação com os coagulase positivos (ECP). Para enumeração de psicrotróficos (PS) as amostras foram semeados superficialmente em duplicata em ágar padrão para contagem

(PCA) e incubados a 21°C por 25 horas (OLIVERIA; PARMELEE, 1976; SILVA et al., 1997). Os resultados das contagens foram corrigidos de acordo com as diluições utilizadas e expressos em UFC/mL.

Para detecção de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* ssp foram utilizados os sistemas VIDAS Listeria e VIDAS Salmonella (BioMeriex®), respectivamente.

Realizou-se: Peroxidase (BRASIL, 2003), acidez Dornic (BRASIL, 2003), lactofermentação e Ring test (BRASIL, 2004). A crioscopia foi realizada utilizando-se crioscopio digital Laktron. LK- 7000 (LAKTRON, BRASIL). O teor de gordura, sólidos totais, sólidos não gordurosos, a densidade, proteína e lactose foram obtidos por espectroscopia de em analisador ultra-sônico (US) BOECOLAC 60 (BOECO, Alemanha), calibrado para a análise de leite de vaca.

A pesquisa de antibióticos beta-lactâmicos foi realizada com o kit Charm MRL Test (CHARM, Estados Unidos), conforme recomendações do fabricante. A presença de organofosforados e carbamatos nas amostras de leite cru foi pesquisada pela técnica de Cromatografia em Camada Delgada, no laboratório de toxicologia da Universidade Estadual de Londrina, conforme metodologia AOAC (AOAC, 1995).

Os resultados foram analisados e comparados com os parâmetros determinados pela legislação e determinou-se a frequência de amostras em desacordo com estes padrões.

### 1.3. Resultados e discussão

Nas análises microbiológicas as amostras apresentaram altas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, coliformes totais, *Escherichia coli*, psicrotóxicos e estafilococos coagulase positivos, conforme demonstrado na tabela 1.1. Estas análises

também revelaram a ausência de *Salmonella* spp e de *Listeria monocytogenes* em todas as amostras.

**Tabela 1.1** – Contagens de aeróbios mesófilos (AM), coliformes totais (CT), *Escherichia coli* (EC), estafilococos coagulase positivos (ECP) e psicrotróficos (PS) em 53 amostras de leite cru colhidas em propriedades leiteiras da região agreste de Pernambuco em 2005.

Contagens (UFC/mL)	AM		CT		EC		ECP		PS	
	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%
Até 10 <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0	2	3,8	0	0
10 <sup>2</sup> - 10 <sup>3</sup>	0	0	0	0	24	45,3	23	43,4	0	0
10 <sup>3</sup> - 10 <sup>4</sup>	0	0	0	0	16	30,2	7	13,2	0	0
10 <sup>4</sup> - 10 <sup>5</sup>	1	1,9	1	1,9	10	18,9	13	24,5	5	9,5
10 <sup>5</sup> - 10 <sup>6</sup>	8	15,1	13	24,5	3	5,6	8	15,1	16	30,2
10 <sup>6</sup> - 10 <sup>7</sup>	30	56,6	32	60,4	0	0	0	0	23	43,4
10 <sup>7</sup> - 10 <sup>8</sup>	13	24,5	7	13,2	0	0	0	0	5	9,4
maior 10 <sup>8</sup>	1	1,9	0	0	0	0	0	0	4	7,6
Total	53	100	53	100	53	100	53	100	53	100

Os resultados das contagens de AM apresentaram 44 (83%) amostras com contagens acima de  $1,0 \times 10^6$  UFC/mL, limite estabelecido pela IN 51. A média das propriedades foi  $1,68 \times 10^7$  UFC/mL, revelando que a maioria das propriedades apresentava alta contaminação durante a ordenha e que as contagens estão acima dos padrões antes mesmo do leite sair da propriedade.

As altas temperaturas ambientais e dificuldades de escoamento da produção acabam induzindo a praticas como a adição de conservantes no leite. A adição de peróxido de hidrogênio foi identificada, embora não tenha sido realizada por prova específica, na prova da peroxidase que revela positividade com a adição da água oxigenada, várias amostras se mostraram positivas antes da adição deste reagente. Assim, sem a presença de água oxigenada, as contagens médias seriam ainda maiores.

NERO et al. (2005) também demonstraram a má qualidade do leite cru produzido em quatro estados do Brasil onde 48,6% de 210 amostras estudadas em diferentes regiões

apresentaram contagens acima de  $10^6$  UFC/mL, sendo 21,3% na região de Viçosa (MG), 56,0% na região de Pelotas (RS), 47,6% na região de Londrina (PR) e 68,0% na região de Botucatu (SP).

Também MORAES et al. (2005) analisaram amostras provenientes de 12 propriedades leiteiras localizadas no Rio Grande do Sul e encontram 9 (75%) fora padrões determinados para AM. ROSA e QUEIROZ (2007) analisaram 20 amostras de leite cru provenientes do município de Canguçu (RS) e encontraram que 80,0% das amostras apresentam contagens de microrganismos AM acima do limite estabelecido.

Neste trabalho as amostras analisadas apresentaram contagens de CT entre  $1,5 \times 10^3$  FC/mL e  $2,4 \times 10^7$  UFC/mL, sendo que 52 (98%) com contagens acima de 105 UFC/ml. Esses resultados indicam que as condições higiênicas de obtenção do leite foram insatisfatórias. Contagens de coliformes acima de 100 UFC/mL em leite indicam condições insatisfatórias de higiene (CHAMBERS, 2002).

As contagens de *Escherichia coli* variaram entre  $3,6 \times 10^3$  UFC/mL e  $1,1 \times 10^5$  UFC/mL, e sua presença tem significado importante, por ser um indicador de contaminação fecal e eventual presença de outros enteropatógenos, além disso, existem linhagens patogênicas para homens e animais.

NERO et al. (2004) encontram contagens de CT acima de 100 UFC/mL em 80,4% das 210 amostras de leite cru que estudaram em quatro regiões de diferentes estados do Brasil, e a presença da *E. coli* em 36,8%. ARCURI et al. (2006) analisaram amostras de 24 propriedades situadas nas regiões Sudeste de Minas Gerais e Norte do Rio de Janeiro, e encontram contagens de coliformes totais entre 5 e  $2,3 \times 10^3$  UFC/mL sendo que em 19 (79,2%) rebanhos as contagens foram superiores a 100 UFC/mL. MORAES et al. (2005) analisaram amostras provenientes de 42 propriedades leiteiras, localizadas no Rio Grande do Sul, encontraram contagens de coliformes totais entre  $2,3 \times 10^3$  e  $3,0 \times 10^5$ , e isolaram EC em leite

cru em 19,0% das amostras. CATÃO e CEBALLOS (2001) relataram altas contagens CT e EC em 45 amostras de leite cru da região de Campina Grande-PB. CAMPOS et al. (2006) analisaram 24 amostras de leite cru coletadas em um laticínio em Goiás e encontraram a presença de *E. coli* em 19 (79,2%).

ECP foram detectados em todas as amostras, sendo que as maiores contagens alcançaram  $5,6 \times 10^5$  UFC/mL. As intoxicações estafilocócicas ocorrem devido à ingestão de toxina pré formada no alimento, e são frequentemente associadas à ingestão mínima de 100 ng de enterotoxina (EE) e contagens entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC de estafilococos/ g ou mL de alimento (WONG; BERGDOLL, 2002; LANCETTE; TATINI, 1992; PARK; AKTAR; RAYMAN, 1992). Além disso, a presença de ECP pode estar ligada à sanidade da glândula mamaria uma vez que o *S. Aureus* é um dos principais agentes da mastite bovina (SANTOS; FONSECA, 2007). SANTANA et al. (2006) detectou ECP em 101 amostras de leite cru das regiões de Pelotas/RS e Londrina/PR, sendo que 19 (18,8%) apresentaram contagens acima de  $10^5$ UFC/mL. Também LAMAITA et al. (2005) observaram ocorrência de estafilococos em 100% das oitenta amostras de leite cru refrigerado estudadas na região metropolitana de Belo Horizonte, sendo a média das contagens igual a  $3,99 \times 10^5$  UFC/mL. Já ARAUJO (1998) estudou 100 amostras de leite das quais cinquenta foram positivas para *Staphylococcus* sp.

As contagens de bactérias psicrotóxicas variaram entre  $3,0 \times 10^4$  e  $14,0 \times 10^8$  UFC/mL. ZOCHE et al. (2002) afirmam que partir da implantação de sistemas de refrigeração do leite, esse grupo de bactérias ganhou destaque, uma vez que são capazes de crescerem e se multiplicarem bem em temperatura de refrigeração. Produtoras de proteases e lípases termoestáveis, contagens a partir de  $1 \times 10^6$  UFC/mL causam alterações significativas o leite, devido a quantidade de enzimas proteolíticas e lipolíticas termoestáveis acumuladas, mesmo depois do tratamento térmico. Os resultados do presente trabalho concordam com os achados

por MORAES et al. (2005) que encontraram valores acima de  $10^4$  UFC/mL em todas as amostras de 42 propriedades de cinco municípios do Rio Grande do Sul.

*L. monocytogenes* e *Salmonella* spp não foram detectadas em nenhuma amostra. Esses resultados concordam com os achados por NERO et al. (2004) que também não detectaram estes patógenos em 210 amostras nos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Rio Grande do Sul. ARCURI et al. (2006) não detectaram nenhuma *L. monocytogenes* em amostras de leite cru nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais. PADILHA et al. (2001) também não encontraram este mesmo patógeno em 50 amostras de leite cru na região metropolitana de Recife-PE. Entretanto CATÃO e CEBALLOS (2001) detectaram *L. monocytogenes* em 73% das 45 amostras de leite pesquisadas nos estados da Paraíba e Pernambuco.

Os resultados das análises físico-químicas estão expressos na tabela 1.2.

**Tabela 1.2** – Análises físico-químicas de 53 amostras do leite cru colhidas em propriedades leiteira da região do Agreste de Pernambuco em junho de 2005.

Análise	Média	Mínima	Máxima	Fera do padrão (n)	Padrão*
Densidade (15/15°C g/mL)	1,031	1,027	1,034	1	1,028 -1,0 34
Acidez Dornic (g ác. láctico/100mL)	18,06	15	26	6	14-18
Gordura (g /100 g)	3,74	1,44	5,19	3	Mín. 3%
EST (g/100 g)	12,49	10,5	14,43	7	Mín. 11,4
ESD (g/100 g)	8,74	7,63	9,27	7	Mín. 8,4
Proteína (g/100 g)	3,18	2,78	3,4	1	Mín. 2,9
Lactose (g/100 g)	4,77	4,16	5,13		

\* De acordo com Instrução Normativa 51 de 2002

Os valores de acidez apresentaram média de 18° Dornic, no limite superior permitido.

No entanto, a prova do álcool alizarol indicou a possível presença de neutralizantes em 17 amostras. Os resultados da prova de lactofermentação também demonstram má qualidade do leite cru, indicando predominância de uma microbiota proteolítica em coágulos caseosos e

coliformes em coágulos esfacelados. O valor de índice crioscópico médio foi de  $-0,540^{\circ}\text{H}$ , sendo que em 6 amostras (3,18%) o índice estava acima de  $-0,530^{\circ}\text{H}$ , indicando fraude por adição de água.

O teste do anel do leite identificou 14 propriedades positivas (26,4%) demonstrando possibilidade da presença de brucelose entre os animais, e tornando perigoso o consumo deste leite sem tratamento térmico.

A presença de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos foi detectada em apenas uma (1,89%) amostra, o que indica utilização correta de medicamentos, com respeito ao período de carência, ou baixa frequência de tratamento dos animais ou ainda utilização de outros princípios ativos. ALMEIDA et al. (2003) pesquisando resíduos de  $\beta$ -lactâmicos em 158 propriedades de Minas Gerais encontraram a presença em 8,19%. NERO et al. (2007a) encontraram resíduos de antibióticos em 24 (11,4%) das amostras, sendo 13 (20,6%) da região de Londrina - PR, 4 (8,0%) da região de Botucatu - SP, 4 (8,50%) da região de Viçosa - MG, e 3 (6,0%) da região de Pelotas - RS.

Para presença de carbamatos, das 53 amostras, nove foram positivas, em 14 detectou-se organofosforados e duas foram positivas na detecção simultânea de carbamatos e organofosforados, o que representa 47% das amostras positivas para pelo menos um dos pesticidas. CAVALETTI et al. (2007) pesquisando resíduos de praguicidas em 30 propriedades leiteiras nos municípios de Rolândia (8), Londrina (12) e Tamarana (4), no Estado do Paraná e Presidente Prudente (6) em São Paulo encontrou 12 (40%) amostras positivas para organofosforados e 15 (50%) para carbamatos. NERO et al. (2007b) detectaram a presença de pelo menos um dos princípios em 93,8% das 209 amostras de leite cru analisadas. Estes princípios são frequentemente utilizados como praguicidas na lavoura e constituem componentes de medicamentos para animais, sendo estas suas possíveis origens.

A exposição crônica a esses compostos pode ser relacionada ao câncer, efeitos teratogênicos, toxicidade reprodutiva, deficiência cognitiva e alterações comportamentais e funcionais (ECOBICHON, 1996).

#### 1.4. Conclusões

O leite cru produzido na região do Agreste de Pernambuco utilizado neste estudo apresenta qualidade microbiológica e físico-química ruim, estando em desacordo com padrões estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp não foram encontradas nas amostras de leite cru estudadas. Brucelose está presente nos rebanhos estudados.

Quanto aos resíduos químicos, deve-se dar atenção a presença de carbamatos, organofosforados, buscando sua origem.

### 1.5. Referências

- ALMEIDA, L. P.; VIEIRA, L; R.; ROSSI, D. A.; CARNEIRO, A. L.; ROCHA, M. L. Resíduos de antibióticos em leites de propriedades rurais da região de Uberlândia-MG. *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 19, n.3, p.83-87, set./dec. 2003.
- AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16 ed, v.1. AOAC International, Gaithersburg, 1995.
- ARAUJO, W. P. Phage typing of *Staphylococcus aureus* resistant to antibiotics, isolated from milk. *Bras. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v.35, n. 4 p. 161-165, 1998.
- ARCURI, E. F.; BRITO, J. R. F.; PINTO, S. M.; ÂNGELO, F. F.; SOUZA, G. N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v.58, n.3, p.440-446, jun. 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 29 set. 2002, p.13, Seção 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 6 de 8 de janeiro de 2004. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico- Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 2 maio 2003, p. 3, Seção 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 22 de 14 de abril de 2003. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 12 jan. 2004, p. 6, Seção 1.
- CAMPOS, M. R, H.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; CARLA ATAVILA DA SILVA VIEIRA; JAYME, L. B.; SANTOS, P. S.; SERAFINI, A. B. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.36, n.4, p.1221-1227, jul./ago. 2006.
- CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp. coliformes totais e fecais e *E.Coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). *Ciência e Tecnologia de alimentos*, Campinas, v.21, n.3, p.281-287, set./dez. 2001.
- CAVALETTI, L. C. S.; PONTES NETTO, D.; FAGNANI, R.; TAMANINI, R.; BATTAGLINI, A. P. P. ; MONTEIRO, A. A. ; ANGELA, H L ; BELOTI, V. ; SASSAHARA, M. ; TAJIRI, Al. N. ; ROMÃO, G. O. ; FUJIKAWA, A. M. ; ARRUDA, C. ; RODRIGUES, M. . Análise qualitativa e caracterização de resíduos de organoclorados, organofosforados e carbamatos em leite cru e rastreamento da contaminação nas propriedades leiteiras no Estado do Paraná. In: CONGRESSO NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA VETERINÁRIA, 2., 2007, Fortaleza. Cd-rom... Fortaleza: 2007.

CHAMBERS, J. V. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. Dairy microbiology Handbook: The microbiology of milk and milk products. 3. ed. New York: *John Wiley and Sons*, 2002. p.39-90.

ECOBICHON D. J. Toxic effects of pesticides. In: AMDUR M. O.; DOULL J.; KLAASSEN C. D. Casarett and Doll's toxicology: the basic science of poisons. 4 ed. New York: Mc Graw Hill; 1996. p. 565-622.

FIGUEIROA, J. G. O sinal verde para a reestruturação da agroindústria do leite no agreste. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigos.php?id=240>>. Acesso em: 18 fev. 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sistema IBGE de recuperação de automática: SIDRA. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 08 ago. 2008.

LAMAITA H.C.; CERQUEIRA M.M.O.P.; CARMO L.S.; SANTOS D.A.; PENNA C.F.A.M.; SOUZA M.R.. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v.57, n.5, p.702-709, oct. 2005.

LANCETTE, G. A; TATINI, S. R. *Staphylococcus aureus*. In: VANDRZANT, C. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3.ed. Washington: *American Public Health Association*, 1992.

MORAES, C. R.; FUERTEFRIA, A. M.; ZAFFARI, C. B.; CONTE, M.; ROCHA, J. P. A. V.; SPANAMBERG, A.; VALENTE, P.; CORÇÃO, G.; COSTA, M. Qualidade microbiológica de leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*.Porto Alegre, v.33, n.3, p.259-265,2005.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V.; BARROS. M. A. F.; PONTES NETTO, D.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE, N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D. G. M. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in Brazil: prevalence of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and chemical residues. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.35, n.3, p. 211-215, jul./set. 2004.

NERO, L.A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V, BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE5, N. J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B. D. G. M. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela instrução normativa 51. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v.25, n.1, p.191-195, jan./mar. 2005.

NERO, L.A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V, BARROS, M. A. F.; PINTO, J. P. A. N.; ANDRADE5, N. J.; SILVA, W.P.; FRANCO, B. D. G. M.. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 27, n.2, p. 391-393, abr./jun. 2007a.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BELOTI, V., BARROS, M. A. F.; NETTO, D. P.; FRANCO, B. D. G. M. Organofosforados e carbamatos no leite produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e ação sobre *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. *Ciênc.*

Tecnol. Aliment., Campinas, v.27, n.1, p.201-204, jan.-mar. 2007b.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BARROS, M. A. F.; ORTOLANI, M. B. T.; BELOTI, V., FRANCO, B. D. G. M. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Raw Milk Produced in Brazil: Occurrence and Interference of Indigenous Microbiota in their Isolation and Development. *Zoonoses Public Health*, v.55, n.6, p.299-305, ago. 2008.

OLIVEIRA, J. S.; PARMELLE, C. E. Rapid enumeration of psychrotrophic bacteria in raw and pasteurized milk. *Journal Milk of Food and Technology*, v. 39, n. 4 p. 269- 276, 1976.

PADILHA, M. R. F.; FERNANDES, Z. F. F.; LEAL, T. C. A. L.; LEAL, N. C.; ALMEIDA, A. M. P. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v.34, n.2, p.161-171, mar./abr., 2001.

PARK, C. E.; AKTAR, M.; RAYMAN, K. Nonspecific reactions of a commercial enzyme-linked immunoabsorbent assay kit (Tecra) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.58, n.8, p.2509-2512, 1992.

ROSA, L. D.; QUEIROZ, M. I. Avaliação da qualidade do leite cru e resfriado mediante a aplicação de princípios do APPCC. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.27, n.2, p.422-430, abr./jun. 2007.

SANTANA, E. W.; BELOTI, V.; OLIVEIRA, C. R. M.; MORAES, L. B.; TAMANINI, R.; SILVA, W. P. Estafilococos: morfologia das colônias, produção de coagulase e enterotoxina a, em amostras Isoladas de leite cru refrigerado *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 27, n. 4, p. 639-646, out./dez. 2006.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. Estratégias para controle da mastite e melhoria da qualidade do leite. São Paulo: Manole, 2007.

SANTOS, M. V. Diagnóstico da qualidade microbiológica do leite em fazendas leiteiras. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/?actA=7&scacaoID=180noticia>. Acesso em 27/06/2007.

SCHALM, O. W.; NOORLANDER, D. O. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 30, n.5, p.199-207, mar. 1957.

SECRETARIA DE PRODUÇÃO RURAL E REFORMA AGRÁRIA. Programa leite de Pernambuco. Disponível em: [http://www.producaorural.pe.gov.br/leite/o\\_programa.htm](http://www.producaorural.pe.gov.br/leite/o_programa.htm). Acesso em: 7 nov. 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N.F. A. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. São Paulo: Varela, 1997.

WONG, A. C. L.; BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning. 2.ed. London: Elsevier, 2002.

ZOCHE, F.; BESSOT, L. S.; VARCELLOS, V.C.; PARANHOS, J. K.; ROSA, S. T. M.; RAYMUNDO, N. K. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. *Archives of Veterinary Science*, v.7, n.2, p. 59-67, 2002.

## ARTIGO 2

BACTÉRIAS ÁCIDO LATICAS (BAL) ISOLADAS DO LEITE CRU PRODUZIDO NA REGIÃO AGRESTE DE PERNAMBUCO COM AÇÃO ANTAGONISTA CONTRA *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus*

Bactérias ácido láticas (BAL) isoladas do leite cru produzido na região agreste de Pernambuco com ação antagonista contra *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus*.

## RESUMO

Bactérias Ácido Lácticas (BAL) fazem parte da microbiota natural de leite. Além de inibir o crescimento de patógenos nos alimentos acredita-se que as bactérias lácticas proporcionem efeitos benéficos à saúde. O objetivo deste trabalho foi quantificar as bactérias ácido lácticas (BAL) presentes no leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, e avaliar sua ação antagonista diante de *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus*. Foram coletadas amostras de leite cru em 45 propriedades do Agreste de Pernambuco e foram enumeradas bactérias ácido lácticas. Para isso realizou-se diluição decimal seriada em caldo MRS, seguida de semeadura em Petrifilm™ AC e incubação em jarra de anaerobiose por 72 horas a 30°C. As culturas obtidas foram testadas quanto ao seu antagonismo através da metodologia *spot-on-the-lawn* modificada utilizando as cepas *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *S. aureus* ATCC 25923. BAL foram isoladas de todas as amostras de leite cru, com uma média de  $1,4 \times 10^6$  UFC/mL. Das 671 culturas de BAL testadas 445 (66,3 %) apresentaram ação antagonista frente à *Salmonella* sp e 80 (11,7%) apresentaram antagonismo a *S. aureus*. A atividade antagonista destas BAL pode ter relação com a ausência de *Salmonella* sp nas amostras estudadas. A Frequência de BAL com ação antagonista a *S. aureus* foi menor que a obtida contra *Salmonella*.

**Palavras chave:** Bactérias Ácido Lácticas. Leite cru. *Salmonella* Enteritidis. *Staphylococcus aureus*.

Acid lactic bacteria isolated from raw milk produced in the agreste region of Pernambuco state with antagonist action against *Salmonella enteritidis* and *staphylococcus aureus*.

### ABSTRACT

Lactic acid bacteria are part of the natural contamination of milk. Besides inhibiting the growth of pathogens in food it is believed that the lactic acid bacteria provide beneficial effects to health. The objective of this study was to quantify the lactic acid bacteria (LAB) present in raw milk produced in the agreste region of Pernambuco state, and assess their antagonist action against *Salmonella Enteritidis* and *Staphylococcus aureus*. Were collected 45 samples of raw milk from properties in Agreste region of Pernambuco and lactic acid bacteria were enumerated. For that took place decimal serial dilution in MRS broth, followed by seeding in Petrifilm™ AC and incubation in the anaerobic jar for 72 hours at 30 ° C. The cultures obtained were tested as to its antagonism of the methodology through spot-on-the-lawn using the modified strains *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076, *S. aureus* ATCC 25923. LAB were isolated from all samples of raw milk, with an average of  $1.4 \times 10^6$  CFU / mL. 671 cultures of LAB tested 445 (66.3%) showed antagonistic activity against *Salmonella Enteritidis* and 80 (11.7%) showed antagonism to *S. aureus*. A Frequency antagonist action with the *S. aureus* was lower than that obtained against *Salmonella Enteritidis*.

**Key words:** Lactic acid bacteria. Raw milk. *Salmonella Enteritidis*. *Staphylococcus aureus*.

## 2.1. Introdução

Bactérias ácido lácticas (BAL) fazem parte da microbiota natural de leite e derivados, carnes e subprodutos e algumas hortaliças (RAMÍREZ et al.,2005). Compreendem um grupo heterogêneo de microrganismos Gram positivos, não esporulados, na forma de cocos ou bastonetes em sua maioria, com características fisiológicas e metabólicas semelhantes, principalmente a capacidade de fermentar açúcares produzindo ácido láctico, peróxidos e peptídeos de baixo peso molecular (AXELSSON, 1993; DURLU-OZKAYA et al., 2001).

Muitas espécies de BAL (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*), utilizadas na produção de alimentos fermentados, têm apresentado antagonismo a outras bactérias, incluindo as do mesmo gênero e/ou patógenos. (McMULLEN e STILES, 1996).

Além de inibir o crescimento de patógenos nos alimentos como *Salmonella*, *Shigella* e *Helicobacter* (BERNET-CAMARD et al., 1997; HUDAULT, et al., 1997; AIBA et al., 1998; HAMMILTON-MILLER, 2003; SGOURAS et al., 2004), linhagens de BAL também determinam efeitos benéficos à saúde. Isso fortaleceu o *marketing* de muitos alimentos contendo culturas vivas de BAL, incluindo leite não fermentado, leite fermentado, iogurte, culturas secas, bebidas e doces. Esses alimentos com bactérias promotoras de benefícios à saúde são denominados probióticos (RICHARDSON, 1996).

Somado a utilização de bactérias lácticas como probióticos, estuda-se também sua aplicação como conservantes em alimentos. Para isso, o estudo da bioquímica, genética e biologia molecular desses microrganismos tiveram um avanço significativo, o que levou à detecção de outros compostos que ocasionam o fenômeno da antibiose, como as bacteriocinas (DAVIDSON e HOOVER, 1993). A importância econômica das BAL na preservação de alimentos continua estimulando a exploração de bacteriocinas para o uso como conservantes

de alimentos (LEWUS *et al.*, 1991; BAREFOOT e NETTLES, 1993).

O potencial antimicrobiano de BAL estimula a sua utilização para o controle efetivo de patógenos em alimentos, em especial os causadores de toxinfecções alimentares. Em leite e derivados estafilococos assumem significativa importância por serem constituintes naturais da pele dos animais de produção e potenciais causadores de mastite. As intoxicações estafilocócicas, causadas na maioria das vezes por *S. aureus*, ocorrem devido à ingestão de toxina pré formada no alimento, e são frequentemente associadas à ingestão de, no mínimo, 100 ng de enterotoxina e contagens entre  $10^5$  –  $10^6$  UFC de estafilococos/ g ou mL de alimento (WONG; BERGDOLL, 2002).

Outro patógeno relevante em leite e derivados é a *Salmonella* spp, que são frequentemente descrito como o patógeno mais envolvido em surtos de toxinfecções alimentares, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (AVILA e GALLO, 1997). Estima-se que US\$ 6 milhões sejam gastos anualmente nos EUA no tratamento por intoxicações associadas a este patógeno (VILLAR *et al.*,2008).

O teste de atividade inibitória direta constitui o primeiro passo na avaliação do potencial antimicrobiano de BAL. Diante do exposto, propõe-se quantificar BAL e Estafilococos coagulase positivos e detectar *Salmonella* sp, presentes no leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco, e avaliar a atividade inibitória das BAL isoladas destas amostras de leite frente aos microrganismos patogênicos *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus*.

## 2.2. Material e métodos

Foram coletados em 2005 aproximadamente 500 mL de leite cru em bags estéreis (NASCO®, EUA) de 45 propriedades leiteiras dos municípios de Saloá, Águas Belas, São Bento do Una e Bom Conselho, região agreste do estado de Pernambuco. As propriedades foram indicadas pela Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária (SPRRA) do Estado de Pernambuco e da Cooperativa dos Produtores de Leite e Derivados de Pernambuco (COOPROL) e representavam o perfil das propriedades de leite da região Agreste de Pernambuco, pequenas, com poucos animais, baixa produtividade e baixo nível de tecnificação.

As amostras foram coletadas diretamente nas propriedades, em tanques de expansão ou latões. Foram, então, acondicionadas em ambiente isotérmico com gelo reciclável e encaminhadas para o Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos (LEAAL) da Universidade Federal de Pernambuco para a realização das análises laboratoriais.

Para quantificação de estafilococos coagulase positivos utilizou-se a semeadura em Petrifilm™ STX (3M do Brasil Ltda) das amostras de leite previamente diluídas. Os resultados das contagens foram corrigidos de acordo com as diluições utilizadas e expressos em UFC/mL. Para a detecção de *Salmonella sp* utilizou-se o sistema VIDAS Salmonella (BioMeriex®).

BAL foram enumeradas a partir de diluições seriadas em escala decimal em caldo MRS e semeadura em Petrifilm™ AC (3M do Brasil Ltda). Após formação do gel as placas foram incubadas por 72 horas a 30°C em microfilia (NERO, 2006). O valor obtido foi corrigido multiplicando-se pelo inverso da diluição. Após a contagem, as placas foram congeladas.

O antagonismo das BAL a *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus* foi realizado no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Estadual de Londrina através da metodologia *spot-on-the-lawn* modificada (LEWUS; MONTIVILLE, 1991). As cepas utilizadas: *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *S. aureus* ATCC 25923.

Para isso, foram selecionadas 671 colônias de BAL isoladas de 45 amostras recuperadas das placas de Petrifilm com as amostras congeladas. Cada cultura de BAL recuperada foi semeada pontualmente em quatro placas contendo PCA (Acumedia®, Estados Unidos). Foram semeadas oito culturas por placa e incubadas a 30°C por 48 horas. Duas placas se destinaram à avaliação de atividade antagonista com relação à *Salmonella* Enteritidis e duas para *S. aureus*.

Após o crescimento as placas receberam aproximadamente 7 mL de uma sobre-camada contendo o patógeno na concentração aproximada de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL (escala 0,5 de Mc Farland). Para a formação da sobre-camada foi retirado 0,1 ml de cada cultura do patógeno em TSB-YE e adicionado ao TSA semi-sólido, preparado com metade da proporção indicada pelo fabricante e adicionado como sobre-camada às placas contendo as cepas de BAL.

Considerou-se antagonistas as colônias em torno das quais se formou um halo translúcido, provocado pela inibição de crescimento do patógeno semeado na sobre-camada. Halos bem definidos foram classificados como inibição total e halos difusos, foram classificados como inibição parcial (NERO, 2005).

Os dados finais foram obtidos pela observação da porcentagem de culturas de BAL com capacidade antagonista aos patógenos estudados.

### 2.3. Resultados e discussão

BAL foram isoladas de todas as amostras de leite cru, com uma média de  $1,4 \times 10^6$  UFC/mL, sendo que esses valores variaram entre 11 mil e 9,9 milhões (tabela 2.1). O leite cru constitui boa fonte de BAL passíveis de serem utilizadas pela indústria de laticínios nacional, especialmente pelo fato de estarem adaptadas a matéria-prima, sendo ainda necessários maiores estudos sobre suas características individuais e específicas (ALEXANDRE et al., 2002).

Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp em nenhuma das amostras estudadas. Esse resultado concorda com os achados por Moraes *et al.* (2005) que também não detectou o patógeno no leite cru de 42 propriedades leiteiras com diferentes tipos de ordenha em cinco regiões do Rio Grande do Sul. Também NERO *et al.* (2004) também não detectaram a presença de *Salmonella* spp em 210 amostras de leite cru pesquisadas nas regiões de Londrina/PR, Viçosa/MG, Pelotas/RS e Botucatu/SP.

As contagens de estafilococos coagulase positivos estão expressas na tabela 2.1.

**Tabela 2.1** – Contagens de bactérias ácido lácticas e estafilococos coagulase positivos em 45 amostras de leite cru produzido na região agreste de Pernambuco, 2005.

Faixa de Contagem em UFC/mL	Estafilococos coagulase positivos	Bactérias ácido lácticas
	n (%)	n (%)
< 1000	16 (35,6)	0 (0,0)
1.000   10.000	11 (24,4)	0 (0,0)
10.000   100.000	12 (26,7)	13 (28,9)
100.000   1.000.000	6 (13,3)	13 (28,9)
$\geq 1.000.000$	0 (0,0)	19 (42,2)
<b>Total</b>	<b>45 (100,0)</b>	<b>45 (100,0)</b>

Estafilococos coagulase positivos foram isolados em todas as amostras estudadas, sendo a média  $4,1 \times 10^4$  UFC/ml e uma variação entre  $10^2$  a  $5,6 \times 10^5$  UFC/ml. Esses resultados são similares aos encontrados por SANTANA *et al.* (2006) onde 101 amostras de leite cru foram analisadas, sendo 51 da região de Londrina/PR e 50 da região de Pelotas/RS, todas apresentaram contagens de estafilococos coagulase positivos (ECP). Destas, 19 (18,8%) apresentaram contagem de ECP acima de  $10^5$  UFC/mL no leite cru refrigerado. Na região de Londrina, 13 (25,5%) amostras apresentaram contagens entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL e duas acima de  $10^6$  (3,9%). Em Pelotas foram 04 (8,0%) as amostras com contagens entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL.

O resultado da ação antagonista das colônias isoladas de BAL frente à *S. Enteritidis* e *Staphylococcus aureus* estão na expressos na tabela 2.2.

**Tabela 2.2** – Ação antagonista de BAL isoladas de 45 amostras de leite cru frente a *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus* coletadas em propriedades do Agreste de Pernambuco em 2005.

	Atividade antagonista em relação a			
	<i>Salmonella</i> Enteritidis		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	n	%	n	%
Culturas antagonistas	445	66,3	80	11,9
Inibição Total	2	0,3	1	0,1
Inibição Parcial	443	66,0	79	11,8
Culturas não antagonistas	226	33,7	591	88,1
<b>Total</b>	<b>671</b>	<b>100</b>	<b>671</b>	<b>100</b>

Apresentaram inibição parcial de *Salmonella* Enteritidis 443 culturas de BAL (66%) e de *S. aureus* 79 (11,8%). Apenas duas (0,3%) culturas inibiram totalmente *S. Enteritidis* e uma (0,1%) *S. aureus*.

A presença de ação antagonista das BAL diante de *Salmonella* Enteritidis em leite cru também foi relatada por NERO *et al.* (2007) que detectou ação antagonista em 33 (9,16%) de 360 amostras testadas, resultado inferior ao do presente trabalho.

O antagonismo de BAL diante deste patógeno pode ser um dos fatores relacionados à ausência de *Salmonella* spp. Nas amostras de leite cru encontradas neste trabalho e em acordo com ÁVILA & GALLO (1996), GARRIDO *et al.* (2001) e NERO *et al.* (2004).

PRADO *et al.* (2000), ao testarem a atividade inibitória direta de cepas de bactérias lácticas isoladas de embutidos cárneos, observaram que, das 330 cepas isoladas, 40 (11,9%) inibiram cepas de *Staphylococcus aureus*. Valores semelhantes foram encontrados por ALEXANDRE *et al.* (2002), no qual 15,6% (30 cepas) foram capazes de inibir esse mesmo microrganismo. DABÉS *et al.* (2001) encontraram resultados semelhantes, 13,5%, enquanto que COVENTRY *et al.* (1997) observaram que 13% das cepas isoladas de produtos cárneos inibiram o crescimento do *S. aureus* e 25% das cepas originárias de produtos lácteos conseguiram essa inibição.

JAY (1995, 1996) sugerem que elevados níveis de contaminação pelos microrganismos endógenos dos alimentos interferem diretamente na sobrevivência e desenvolvimento de patógenos, que precisam de condições muito específicas para crescer. Por isso, baixos níveis de agentes patogênicos presentes nos alimentos está associado a elevados níveis de contaminação endógena. Vários são os estudos que relacionam produtos de origem animal com má qualidade microbiológica e que apresentam baixa incidência de patógenos (KOZAK *et al.*, 1996; LOPEZ e SANCHEZ, 2000; CORDANO e ROCOURT, 2001; DHANASHREE *et al.*, 2003).

## 2.4. Conclusões

Bactérias Ácido Láticas foram isoladas nas amostras de leite cru produzido na região do agreste de Pernambuco. Estafilococos Coagulase Positivos foram isolados de todas as amostras estudadas, contudo, *Salmonella* sp não foi detectada em nenhuma amostra.

Grande parte das culturas de BAL isoladas das amostras de leite cru coletadas na região apresentam atividade antagonista a *Salmonella* Enteritidis e a *Staphylococcus aureus*.

O antagonismo das BAL a *Salmonella* enteritidis foi mais frequentemente verificado do que em relação ao *Staphylococcus aureus*.

## 2.5. Referências

ALEXANDRE D.P.; SILVA M.R.; SOUZA M.R.; SANTOS W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* vol.54 no.4 Belo Horizonte July/Aug. 2002

AIBA, Y.; SUZUKI, N.; KABIR, A. M. A.; TAGAKI, A.; KOGA, Y. Lactic acid mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *American Journal of Gastroenterology*, 93, 2097–2101. 1998.

AVILA, C.R.; GALLO, C.R. Pesquisa de *salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo "minas frescal" comercializados no município de Piracicaba - SP. *Sci. agric.*, vol.53, no.1, p.159-163, Jan./Apr. 1996.

AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S., Von Wright, A. (eds) *Lactic acid bacteria*. New York: Marcel Dekker, p.1-63, 1993.

BAREFOOT, S. F.; NETTLES, C.G. Antibiosis revisited: bacteriocins produced by dairy starter cultures. *J Dairy Sci.* v.76, n.8, p.2366-79, 1993.

BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; SOUZA, J. A.; NERO, L. A.; SANTANA, E. H. W.; ALARIN, O.; CURIKI, Y.. Avaliação da qualidade do leite cru comercializado em Cornélio Procopio, Paraná. Controle do consumo e da comercialização. *Semina: Ciências Agrárias*, v.20, n.1, p.12-15, 1999.

BERNET-CAMARD, M. F.; LIEVIN, V.; BRASSART, D.; NEESER, J. R.; SERVIN, A. L.; HUDAULT, S. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. *Applied Environmental Microbiology*, 63, 2747–2753. 1997.

CORDANO, A. M.; AND J. ROCOURT, Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. *Int. J. Food Microbiol.* 70, 175–178. 2001.

COVENTRY, M.J.; GORDON, J.B.; WILCOCK, A. Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. *J. Appl. Microbiol.*, v.83, p.248-258, 1997.

DABES, A.C.;SANTOS, W.L.M.; PEREIRA, E.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, , vol.53, no.1, p.136-140 Feb. 2001.

DAVIDSON, P.M.; HOOVER, D.G. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: SALMINEN, S., VON WRIGHT, A. *Lactic acid bacteria*. New York:Marcel Dekker,. p.127-159. 1993.

DHANASHREE, B.; S. K. OTTA; I. KARUNASAGAR, W.; GOEBEL, ; I. KARUNASAGAR. Incidence of *Listeria* spp. in clinical and food samples in Mangalore, India. *Food Microbiol.* 20, 447–453. 2003.

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

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 1996.

FRANCO, R. M.; CAVALCANTI, R. M. S.; WOOD, P. C. B.; LORETTI, V. P.; GONÇALVES, P. M. R.; OLIVEIRA, L. A. T. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. *Higiene Alimentar*, v.14, n.68/69, p.70-77, 2000.

GARRIDO N.S.; MORAIS J.M.; BRIGANTI R.C.; OLIVEIRA M.A.; BERGAMINI S.A.V.; FÁVARO R.M.D. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto/SP. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 2: 141-146. 2001.

HAYES M. C, RALYEA R. D., MURPHY S. C., CAREY N. R., SCARLETT J. M., BOOR K. J. Identification and Characterization of Elevated Microbial Counts in Bulk Tank Raw Milk, *J. Dairy Sci.* 84:292–298, 2002.

HAMMILTON-MILLER, J. M. T. The role of probiotics in the treatment and prevention of *H. pylori* infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22, 360–366, 2003.

HUDAULT, S.; LIEVIN, V.; BERNET-CAMARD, M. F.; SERVIN, A. L. Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (Strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 513–518, 1997.

JAY, J. M. Foods with low numbers of microorganisms may not be the safest foods OR, why did human listeriosis and hemorrhagic colitis become foodborne diseases? *Dairy Food Environ. San.* 15, 674–677. 1995.

JAY, J. M.,: Microorganisms in fresh ground meats: the relative safety of products with low versus high numbers. *Meat Sci.* 43, S59–S66. 1996.

KOZAK, J.; BALMER, T.; BYRNE, R.; FISHER, K. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in food: incidence in dairy products. *Food Control* 7, 215–221. 1996.

LEWUS, C.B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T.J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v.57, n.6, p.1683-1688, 1991.

LOURENÇO, L. F. H.; SILVA, M. S. S. Análises físico química e microbiológica como indicadores da qualidade do leite cru comercializado no município de Castanhal/Pará. ANAIS XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, CE, 8 a 10 de agosto de 2000.

LOPEZ, C. S.; AND H. H. SANCHEZ, Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Manchego and Chihuahua Mexican cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 62, 149–153. 2000.

McMULLEN, L.M.; STILES, M.E. Potencial for use of bacteriocin producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. *J. Food Prot.*, Ames, suppl., p.64-71, 1996.

MOURA, S. M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, v.19, p.229-237, 1993.

NERO, L.A.; MATTOS M.R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; NETTO, D.P; PINTO J.P. A.N.; ANDRADE N. J.; SILVA, W. P.; FRANCO, B. D.G.M.. Hazards in non-pasteurized milk on retail sale in brazil: prevalence of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and chemical residues, *Brazilian Journal of Microbiology* 35:211-215, 2004.

NERO, L. A.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; ORTOLANI, M. B. T.; TAMANINI, R.; FRANCO, B. D. G. M. Comparison of petrifilm aerobic count plates and Man- Rogosa- Sharpe Agar for enumeration of lactic acid bacteria. *Journal of Rapid Methods and Automation in microbiology*, trumbull, v.14, n.3, p.249-257, set., 2006.

PRADO, C.S.; SANTOS, W.L.M.; CARVALHO, C.R. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de embutidos cárneos frente a *Listeria monocytogenes*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, p.417-423, 2000.

RAMÍREZ L. A. G.; CAMPUZANO O. I.M.; VILLADIEGO O. S. R. Evaluación del potencial bactericida de los extractos de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento *in vitro* de *E. coli*, *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, Vol. 36, No. Especial, 2005.

RICHARDSON, D. Probiotics and products innovation. *Nutrition and Food Science.*, London, n.4, p.27- 33, 1996.

SANTANA E.H.W.; BELOTI, V.; OLIVEIRA T.C.R. M.; MORAES, L.B.; TAMANINI, R.; SILVA, W.P. Estafilococos: morfologia das colônias, produção de coagulase e enterotoxina a, em amostras isoladas de leite cru refrigerado *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 27, n. 4, p. 639-646, out./dez. 2006.

SGOURAS, D.; MARAGKOUidakis, P. A.; PETRAKI, K.; MARTINEZ-GONZALEZ, B.; ERIOTOU, E.; MICHOPoulos, S.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E.; MENTIS, A. In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 518–526. 2004.

VILLAR R. G; MACEK M. D. Investigation of Multidrug-Resistant *Salmonella* Serotype Typhimurium DT104 Infections Linked to Raw-Milk Cheese in Washington State *JAMA*. 1999;281(19):1811-1816, 2008.

WONG, A. C. L.; BERGDOLL, M. S. *Staphylococcal food poisoning*. 2.ed. London: Elsevier, 2002.

## CONCLUSÕES

O leite cru produzido na região do Agreste de Pernambuco apresentou má qualidade do ponto de vista microbiológico e físico-químico.

Estafilococos coagulase positivos estão amplamente disseminados no leite cru utilizado neste estudo. Entretanto, *Salmonella* sp não representa um risco associado ao leite cru desta região.

Em se tratando de Resíduos químicos, de praguicidas representaram um importante risco químico associado ao leite cru e  $\beta$ -lactâmicos não teve relevância.

Grandes quantidades de BAL foram isoladas das amostras de leite cru desta região, sendo que a maioria destas BAL apresentaram atividade antagonista a *Salmonella* Enteritidis e a *Staphylococcus aureus*. Bactérias Ácido Láticas são importantes microrganismos isolados no leite cru, uma vez que apresenta atividade antagonista frente a patógenos, como a salmonelas.