



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANA RAMOS PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA ÁCIDO LÁTICA DE
LEITE DE CABRA PRODUZIDO NO PARANÁ, E SEU
POTENCIAL ANTAGONISTA**

Londrina
2014

JULIANA RAMOS PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA ÁCIDO LÁTICA DE
LEITE DE CABRA PRODUZIDO NO PARANÁ, E SEU
POTENCIAL ANTAGONISTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanerli Beloti.

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P436c Pereira, Juliana Ramos.

Caracterização da microbiota ácido láctica de leite de cabra produzido no Paraná, e seu potencial antagonista / Juliana Ramos Pereira. – Londrina, 2014.
38 f. : il.

Orientador: Vanerli Beloti

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Leite de cabra – Microbiologia – Teses. 2. Bactérias produtoras de ácido láctico – Teses. 3. Microorganismos patogênicos – Teses. I. Beloti, Vanerli. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 637.1:579

JULIANA RAMOS PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA ÁCIDO LÁTICA DE LEITE DE
CABRA PRODUZIDO NO PARANÁ, E SEU POTENCIAL
ANTAGONISTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra Vanerli Beloti
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Ronaldo Tamanini
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Tereza Cristina R. M. de Oliveria
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 30 de Setembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me presentear com todas as oportunidades que tive, desde decidi que queria ser Médica Veterinária.

Aos meus pais, que sempre me deram todo apoio e amparo financeiro, físico, emocional e amor durante toda essa caminhada, sem vocês nada disso seria possível, obrigado por terem me escolhido!

A minha orientadora, Vanerli, que mais do que conhecimento, nos possibilita compartilhar carinho, amizade e muito respeito, o que fez toda a diferença durante a execução deste trabalho. Ao meu Pai científico, Ronaldo Tamanini, e que foi parte fundamental na concretização deste, jamais teríamos conseguido sem você.

Ao Becos Family, minha família por opção, que me proporcionou alegrias, amizade, muitas risadas e agora lágrimas por termos que nos afastar, mas vou com a certeza que não poderia ter tido amigos melhores aqui. E em especial, ao mais novo integrante, Dalton, que realizou voluntariamente um pacto com o “Projeto Cabra”, obrigado!

A família LIPOA em geral, pela parceria, aprendizado, pelos projetos insanos, pelas comidas gordas nas madrugadas trabalhistas, vou sentir muitas saudades.

A todos de que alguma forma possibilitaram a conquista de mais esse sonho, e que me fazem crer que sou uma pessoa extremamente sortuda e abençoada por ter conhecido e desfrutado da presença de cada um de vocês no meu caminho, obrigado!

PEREIRA, Juliana Ramos. **Caracterização da microbiota ácido láctica de leite de cabra produzido no paraná, e seu potencial antagonista.** 2014. 38 f. Disserta o (Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

A microbiota do leite de cabra apresenta grande interesse industrial e econ mico, além de ser útil para identificar as condi es higi nicas de produ o. As Bactérias  cido Láticas (BAL) são parte desta microbiota. Produzem substâncias com características sensoriais importantes na produ o de derivados, e uma série de substâncias com potencial antimicrobiano, que afetam o crescimento de vários microrganismos, inclusive patog nicos. São escassos os trabalhos estudando o potencial antagonista de BAL isoladas de leite de cabra. O objetivo do presente estudo, foi quantificar BAL em leite de cabra, verificar seu potencial antagonista em rela o aos patógenos *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli*, além *Lactobacillus sakei* que é uma bactéria ácido l tica bastante sensível a bacteriocinas produzidas pelas BAL. Também foi pesquisada a presença *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* nas amostras. Foram coletadas 34 amostras de leite cru de cabra em 9 propriedades leiteiras do Paraná. Para contagem de BAL as amostras foram diluídas em caldo MRS e semeadas em placas de PetrifilmTM AC (3M) em anaerobiose e as colônias obtidas foram caracterizadas utilizando a prova de Gram e catalase. A capacidade antagonista das cepas caracterizadas como BAL, foi determinada pela metodologia *spot-on-the-lawn* modificada. Para tanto foram utilizadas 319 culturas de BAL isoladas das 34 amostras. As contagens obtidas a partir do PetrifilmTM AC (3M), variaram de $1,70 \times 10^4$ UFC/mL a $2,78 \times 10^5$ UFC/mL, com média de $5,02 \times 10^4$ UFC/mL. Das 1017 culturas retiradas do Petrifilm para a classifica o morfo-tintorial e prova da catalase, 515 (56,6%) foram consideradas BAL características. Destas, 289 (56,1%) apresentaram forma de cocos, 117 (22,7%) de cocobacilos e 109 (21,2%) de bacilos. Das 319 culturas que tiveram a capacidade antagonista avaliada, 317 (99,4%), apresentaram antagonismo contra pelo menos um microrganismo testado, e apenas duas colônias (0,6%) não apresentaram atividade antagonista contra qualquer dos microrganismos. O número de colônias com atividade antagonista contra *Lactobacillus sakei* foi de 246 (77,1%), *Listeria monocytogenes* 271 (85,0%), *Staphylococcus aureus* 295 (92,5%), *Salmonella* Enteritidis 290 (90,9%) e *Escherichia coli* 262 (82,1%). *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp não foram detectadas em nenhuma amostra. A alta frequência de BAL com capacidade antagonista a *Listeria monocytogenes* e a *Salmonella* Enteritidis pode estar relacionada com a ausência deste patógeno nas amostras de leite estudadas. O leite cru de cabra mostrou ser importante fonte de BAL, e as cepas isoladas mostraram forte potencial antagonista. Os dados obtidos merecem maiores estudos para esclarecer quais substâncias estão envolvidas no antagonismo, bem como determinar gêneros e espécies que predominam entre as BAL antagonistas. Ainda   desejável o estudo das potencialidades sensoriais destes microrganismos, com vistas ao seu emprego na produ o de derivados, de forma a aliar segurança microbiológica e potencial tecnológico.

Palavras-chave: Leite de cabra. Bactérias  cido láticas. Antagonismo. Microrganismos patogênicos.

PEREIRA, Juliana Ramos. **Characterization of microbiota lactic acid of goat milk produced in Paraná, and its potential antagonist.** 2014. 38 p. Dissertation (Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The microbiota of goat milk has great industrial and economic interests as well as being useful for identifying the hygienic conditions of production. The lactic acid bacteria (LAB) are part of the microflora. They produce substances with important sensory characteristics in the production of derivatives, and a number of potential antimicrobial substances, which affect the growth of various microorganisms, including pathogens. There are few studies studying the potential antagonist BAL isolated from goat's milk. The aim of this study was to quantify BAL in goat milk, check your potential antagonistic to pathogens *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella Enteritidis* in addition *Lactobacillus sakei* that is a lactic acid bacterium very sensitive to bacteriocins produced by BAL . It was also for the presence *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in the sample. They collected 34 samples of raw milk goat dairy farms in 9 of Parana. To count BAL samples were diluted in MRS broth and plated on BC plates Petrifilm (3M) under anaerobic conditions and the obtained colonies were characterized using Gram and catalase test. The ability of antagonist strains characterized as BAL was determined by the spot-on-the-lawn modified methodology. Therefore, we used 319 BAL cultures isolated from 34 samples. The scores obtained from the Petrifilm™ AC (3M), ranged from 1,70x10⁴ CFU / mL to 2,78x10⁵ CFU / mL, averaging 5,02x10⁴UFC / mL. Of 1017 cultures taken from Petrifilm for morpho-dye classification and evidence of catalase, 515 (56, 6%) were considered BAL characteristics. Of these, 289 (56.1%) presented as coco, 117 (22.7%) of coccobacilli and 109 (21.2%) of bacilli. Of the 319 crops that had evaluated the antagonist capacity, 317 (99.4%) showed antagonism at least one microorganism tested, and only two colonies (0.6%) did not show antagonistic activity against any of the microorganisms. The number of colonies with antagonistic activity against *Lactobacillus sakei* was 246 (77.1%), *Listeria monocytogenes* 271 (85.0%), *Staphylococcus aureus* 295 (92.5%) *Salmonella enteritidis* 290 (90.9%) and *Escherichia coli* 262 (82.1%). *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp* were not detected in any sample. The high frequency BAL capable antagonist *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis* can be related to the pathogen in the absence of milk samples studied. Raw milk goat has proven to be an important source of BAL, and the isolated strains showed strong potential antagonist. The data deserve further study to clarify which substances are involved in antagonism, and determine genera and species that predominate among the antagonists BAL. Yet the study of sensory potential of these microorganisms is desirable, with a view to its use in the production of derivatives, in order to combine microbiological safety and technological potential.

Keywords: Goat milk. Lactic acid bacteria. Antagonism. Pathogenic microorganisms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO

Figura 1 –Halo de inibição (HI) do crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> provocado por bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru de cabra.....	32
---	----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

- Tabela 1** – Média das contagens de BAL de amostras leite de cabra coletadas em 9 propriedades leiteiras do Paraná, e porcentagem de colônias características (Gram Positivas e catalase negativas), entre Outubro de 2013 e Agosto de 2014 29
- Tabela 2** – Atividade antagonista total e parcial de 319 cepas de Bactérias Ácido Láticas, testadas contra *Lactobacillus sakei* (LS), *Listeria monocytogenes* (LM), *Staphylococcus aureus* (SA), *Salmonella* Enteritidis (SE.) e *Escherichia coli* (EC), isoladas de 34 amostras de leite cru de cabra, provenientes de propriedades do Estado do Paraná..... 33

LISTA DE GRÁFICOS

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

- Gráfico 1** – Distribuição dos resultados das contagens de bactérias ácido lácticas de amostras leite de cabra coletadas em 9 propriedades leiteiras do Paraná, entre Outubro de 2013 e Agosto de 2014..... 30
- Gráfico 2** – Morfologia determinada pela coloração de Gram de 515 colônias isoladas leite cru de cabra coletadas em 9 propriedades leiteiras do Paraná, entre Outubro de 2013 e Agosto de 2014..... 31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	ESTADO DA ARTE	12
1.2	PRODUÇÃO	12
1.3	CARACTERÍSTICAS, COMPOSIÇÃO E DIFERENÇAS DO LEITE BOVINO	13
1.4	MICROBIOTA DO LEITE DE CABRA	14
1.4.1	Bactérias Ácido Láticas (BAL)	14
1.4.2	Contaminantes com Potencial Patogênico em Leite de Cabra	15
	REFERÊNCIAS	18
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	23
	POTENCIAL ANTAGONISTA DA MICROBIOTA ÁCIDO LÁTICA ISOLADA DE LEITE DE CABRA PRODUZIDO NO PARANÁ	23
	RESUMO	24
	ABSTRACT	25
1	INTRODUÇÃO	26
2	MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1	MÉTODO DE CONTAGEM DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS	27
2.2	CONFIRMAÇÃO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁTICAS	27
2.3	AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i>	28
2.4	PESQUISA DE <i>SALMONELLA</i> SPP	28
2.5	PESQUISA DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	28
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4	CONCLUSÕES	34
	REFERÊNCIAS	35
5	CONCLUSÕES FINAIS	38

1 INTRODUÇÃO

Segundo Brasil, (2000) o leite de cabra é o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de animais da espécie caprina sadios, bem alimentados e descansados. Possui cor branca, sabor e odor característicos, mas não desagradáveis. A sua composição, como ocorre nas demais espécies, é diretamente influenciada por fatores, como raça, idade, estágio de lactação, quantidade de leite produzido, estado de saúde geral e do úbere, fisiologia, localização da unidade produtora, fatores genéticos e alimentação (PINHEIRO JÚNIOR, 1985).

A microbiota do leite de cabra apresenta grande interesse industrial e econômico; além de ser útil para identificar as condições higiênicas de produção. O estudo da microbiota autóctone pode ser explorado visando a produção de derivados e a segurança alimentar. Com esse intuito, vários estudos foram publicados em diversos países, objetivando a caracterização desta microbiota com potencial tecnológico e com potencial antagonista a patógenos (HERREROS et al., 2005; COCOLIN et al., 2007; ASTERI et al., 2010).

A caracterização de Bactérias Ácido Láticas, naturalmente presentes em leite crus e derivados, que apresentam atividade antimicrobiana contra os patógenos veiculados pelo leite, é de extrema importância para que as interações microbianas sejam elucidadas. BAL com potencial antagonista podem ser utilizadas na indústria de alimentos, auxiliando a conferir segurança microbiológica.

ESTADO DA ARTE

1.1 ESTADO DA ARTE

1.2 PRODUÇÃO

A caprinocultura leiteira é uma das atividades que mais se desenvolve no cenário agropecuário mundial. Segundo a *Food Agriculture Organization* (FAO), entre os anos de 1997 e 2007 essa atividade cresceu 18%, a segunda que mais se desenvolve (FAOSTAT, 2010). Em 2013, a FAO estimou um rebanho caprino de 9 milhões de cabeças em todo território brasileiro e uma produção nacional de 150 mil toneladas de leite.

Com cerca de 90% de todo rebanho caprino nacional, a região nordeste se coloca como a maior criadora de caprinos no Brasil, e foi nessa região onde se iniciou o sistema organizado de aquisição, industrialização e distribuição de leite com os programas institucionais de governos estaduais. A região Sudeste detém 65% de todo leite caprino produzido no Brasil, possui uma cadeia de produção mais organizada e tecnificada, tornando-se assim o grande polo nacional da atividade (CORDEIRO; CORDEIRO, 2009). O Paraná possui um rebanho caprino com cerca de 125 mil cabeças, sendo que 1300 cabras são ordenhadas, gerando uma produção de leite ao redor de 358 toneladas de leite por ano. Porém, somente 130 mil litros foram processados formalmente (IBGE, 2006).

Vários fatores dentro e fora da propriedade limitam o aumento da produtividade e da oferta de leite: o potencial genético dos rebanhos, a sazonalidade da produção, a qualidade das forrageiras tropicais, o clima, o manejo, o intervalo de partos, a idade ao primeiro parto, o controle das enfermidades, o gerenciamento dos rebanhos, a nutrição e a alimentação dos rebanhos, entre outros (GONÇALVES, A. L.; LANA, R. P.; VIEIRA., 2008).

A industrialização no Brasil ainda é restrita por razões como: pequena produção, hábito alimentar da população, desconhecimento dos valores nutricionais, preconceito e alto preço comparado aos similares bovino (RESENDE; TOSETTO, 2004). Entretanto, há possibilidade de mercado para leites (*in natura*, UHT, em pó), queijos, iogurtes, doces, sorvetes e cosméticos (MARTINS et al., 2007). Todavia, a falta de pesquisa, o baixo conhecimento científico relacionado à caprinocultura e mesmo a falta de técnicos capacitados, dificulta a transmissão de informações para o campo (BORGES et al., 2012).

1.3 CARACTERÍSTICAS, COMPOSIÇÃO E DIFERENÇAS DO LEITE BOVINO

No Brasil, a Instrução Normativa 37 do MAPA (BRASIL, 2000) regulamenta as condições de produção, a identidade e os requisitos mínimos de qualidade do leite de cabra destinado ao consumo humano, esta instrução estabelece padrões mínimos, tais como, 2,8% de proteína bruta, 4,3% de lactose, 8,2% de sólidos não gordurosos e 0,7% de cinzas.

O leite de cabra apresenta pH 6,4; densidade de 1,028 a 1,034g/L; ponto de congelamento entre -0,550H a -0,585° Horvet. A capacidade tampão é superior ao leite bovino, e devido a reação alcalina o leite caprino pode amenizar alguns problemas digestivos como úlcera e gastrite (COSTA, 2002; BRASIL, 2000).

O teor de lactose do leite caprino é semelhante ao leite bovino (4,4 a 4,7 g/100g), mas contém geralmente 250 a 300 mg/L de oligossacarídeos, ou seja, de 4-5 vezes mais que no leite bovino, o que facilita sua absorção (SILANIKOVE et al., 2010).

Possui de 2,0 a 8,0 g/100g de gordura, composta por glóbulos menores e mais dispersos que no leite bovino, e estas características conferem uma maior superfície específica, tornando mais rápida a ação das lipases o que confere a alta digestibilidade. Ainda, apresenta 18% de ácidos graxos de cadeia curta (4 a 10 carbonos), sendo o dobro do leite bovino, representado pelos ácidos graxos voláteis capríco, caprílico e cáprico, que são responsáveis pelo sabor e aroma típicos e fornecem energia diretamente ao invés de ser depositada em tecido adiposo (FURTADO, 1988; HAENLEIN, 2004).

Os dois tipos de leite apresentam proporções similares de k-caseína, mas o leite caprino possui nível superior de β -caseína (53% contra 37,5%) e nível inferior de α -s1 caseína (15% contra 38%) quando comparado ao leite bovino (CLARK; SHERBON, 2000), o que o torna um produto mais digerível (PARK et al., 2007). A α -s1 é encontrada em maior quantidade no leite bovino, e é considerado o responsável pela alergia ao leite (LOWRY, 2002).

O conteúdo mineral do leite caprino é superior ao do leite bovino quanto ao cálcio, fósforo, potássio e magnésio. O maior teor de íons de K e Na favorecem o aparecimento do sabor ligeiramente salgado do leite caprino. O leite de cabra apresenta menor estabilidade térmica, devido à própria constituição de suas micelas, com maiores concentrações de cálcio e fósforo inorgânicos em relação às de origem bovina. Desta forma, o tratamento térmico deve ser controlado adequadamente para não haver prejuízos à qualidade final do leite (JENNESS, 1980).

Quanto às vitaminas, apresenta alto teor das vitaminas A e B, suprimindo adequadamente a necessidade de vitamina A e niacina, e excede a tiamina, riboflavina e ácido pantotênico. Apesar de conter vitamina A, não tem caroteno, conferindo ao leite de cabra a cor branca (PARK et al., 2007).

Por todas as suas características, é uma importante opção de substituição ao leite bovino podendo ser consumido pelos idosos e crianças, devido à sua alta digestibilidade, e por alérgicos ao leite bovino (SILVA et al., 2007).

1.4 MICROBIOTA DO LEITE DE CABRA

1.4.1 Bactérias Ácido Láticas

As bactérias ácido láticas (BAL) representam um grande grupo de microrganismos naturalmente encontrado em alimentos, inclusive leite e derivados, que incluem os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Microbacterium*. (HOLZAPFEL et al., 2001). Apresentam várias características morfológicas, metabólicas e fisiológicas em comum: Gram positivas, não formadoras de esporos, catalase negativas, anaeróbicas, aerotolerantes e ácidotolerantes, além de possuírem metabolismo fermentativo, sendo o ácido láctico o principal produto final (DE MARTINIS, 2003). O processo de fermentação pode ser homo ou heterofermentativo: no primeiro caso são geradas moléculas de lactato, e no segundo são produzidos além do ácido láctico, substâncias como o etanol e o dióxido de carbono (PARADA et al., 2007).

Além de estarem naturalmente presentes em vários alimentos, BAL podem ser encontradas em solo, água, esterco, esgoto e silagem. Ainda, podem ser isoladas de cavidade oral, trato digestório e vagina, onde exercem influência benéfica nos ecossistemas microbianos de seres humanos e animais (HOLZAPFEL et al., 2001).

As BAL são muito estudadas por produzirem substâncias bioconservadoras, que inibem a multiplicação de microrganismos indesejados, deteriorantes ou nocivos à saúde. Podem interferir com a multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas por meio de vários mecanismos: competição por oxigênio, competição por sítios de ligação e produção de substâncias antagonistas, especialmente bacteriocinas.

A habilidade de BAL por meio de bacteriocinas e outras substâncias antimicrobianas, pode promover uma maior segurança microbiológica de alimentos processados. (DE MARTINIS et al., 2003).

Dentre as diversas bacteriocinas já isoladas e identificadas, somente a nisina é considerada GRAS (Generally Recognized as Safe - usualmente reconhecido como seguro) e utilizada comercialmente em indústrias de alimentos (COOTER et al., 2005; CHEN; HOOVER, 2003). A Nisina é produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis subsp. Lactis* e é a bacteriocina mais estudada e melhor caracterizada. (SOBRINO-LÓPEZ et al., 2008). Essa bacteriocina foi comercializada pela primeira vez na Inglaterra em 1953, e atualmente é aprovada como aditivo alimentar em mais de 50 países. Em 1983, foi adicionada na lista dos aditivos europeus e em 1988 foi aprovada pelo Food and Drug Administration nos Estados Unidos para o uso em queijos pasteurizados (SOBRINO-LÓPEZ ET AL., 2008; COTTER et al., 2005; CHEN & HOOVER, 2003). No Brasil, é aprovada pelo Ministério da Agricultura para ser utilizada em todos os tipos de queijos, numa dose máxima de 12,5 mg/kg de produto (BRASIL, 1996).

1.4.2 Contaminantes com Potencial Patogênico no Leite de Cabra

Os elementos nutricionais, sobretudo carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais contidos no leite de cabra, o tornam um excelente substrato para o crescimento de microrganismos. Por este motivo, o leite deve ser obtido com máxima higiene e mantido em baixa temperatura, desde a ordenha até a ocasião de seu beneficiamento, visando garantir as características físicas, químicas e nutricionais do produto final (OLIVEIRA, 2008).

Durante a ordenha, microrganismos patogênicos podem contaminar o leite por meio de fontes ambientais, manipuladores e dos próprios animais. Vários patógenos podem estar presentes no ambiente de ordenha, como *Listeria monocytogenes* (OLIVER et al., 2005). A água e as fezes dos animais podem contaminar todo este ambiente e o leite, com microrganismos como *Salmonella* spp. e cepas patogênicas de *Escherichia coli* (KAYLEGIAN et al., 2008). Mastites também são consideradas como importantes fontes de contaminação durante produção, principalmente por *Staphylococcus aureus*, que é um potencial causador de enfermidades em humanos devido a produção de enterotoxinas termoestáveis, e este ainda pode contaminar o leite por práticas incorretas dos manipuladores (CREMONESI et al., 2007; OLIVER et al., 2005). Estes são os principais patógenos associados a intoxicações e toxinfecções veiculadas pelo leite (JAY, 1995).

Listeria spp. é um cocobacilo Gram positivo, não esporulado, não produtor de ácidos, anaeróbio facultativo e de ampla distribuição ambiental, isolado de águas superficiais, de esgotos domésticos, águas residuais de indústrias de laticínios e de abatedouros, de solos, silagens, de insetos, de adubo orgânico e em fezes de animais e humanos (KONEMAN, E. K.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M., 1997). É um importante patógeno de origem alimentar, uma vez que a presença desse microrganismo em alimentos pode causar listeriose doença caracterizada por quadros de gastroenterite e, em casos mais graves, septicemia, meningite e meningoencefalite. Surto de listeriose, embora relativamente raros, sempre envolvem mortalidade, sobretudo em grupos de risco bem definidos (idosos, neonatos, gestantes e imunodeprimidos) (BORGES et. al, 2009). Este conjunto de características faz com que *Listeria monocytogenes*, seja um patógeno emergente de grande interesse na área de alimentos e explica o destaque que estes microrganismos vêm ocupando nos últimos anos no controle de qualidade na indústria de alimentos.

As toxinfecções alimentares causadas por *Salmonella* spp. são frequentemente associadas à ingestão de carnes, aves, ovos, leite e derivados sem tratamento térmico. As enfermidades veiculadas por alimentos contaminados com este patógeno, são consideradas um dos mais importantes problemas de Saúde Pública, tanto nos países em desenvolvimento como nos países desenvolvidos (JAKABI et al., 1999). A taxonomia atual do gênero *Salmonella* é baseada em características bioquímicas, antigênicas (antígenos somáticos, flagelares e de cápsula) e em técnicas moleculares de análise genética, que divide o gênero em duas espécies nominadas *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (LIBBY et al., 2004; CAMPOS, 1999). A importância desse microrganismo para a saúde pública reside em sua habilidade para causar desde uma simples gastroenterite auto-limitante até, em casos mais extremos, a febre tifóide causada pelo sorotipo *Salmonella* Typhi (BIBEK, 2005). É um bastonete Gram negativo, móvel e não formador de esporos, permanece viável por longos períodos em alimentos, até mesmo nos congelados, tornando seu controle de grande importância no ambiente industrial.

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae*, são cocos Gram positivos, imóveis, não encapsulados e não esporulados. São fermentadores de manitol e produzem as enzimas coagulase, termonuclease e hemolisina. Sua importância está na habilidade de produzir enterotoxinas estáveis aos tratamentos térmicos (MHONE et al., 2011). Assim, mesmo o microrganismo sendo destruído pelos tratamentos térmicos como a pasteurização, as suas toxinas podem permanecer ativas nos alimentos. Além disso, é o principal agente da mastite bovina e também a causa mais frequente de mastite em cabras

(BIBEK, 2005; MHONE et al., 2011). A presença de altas contagens de *Staphylococcus aureus*, além de indicar condições de preparo e manipulação do alimento inadequadas, alerta para a possível produção de toxinas (MHONE et al., 2011).

Considerada o melhor indicador de contaminação de origem fecal para água e alimentos (SILVA et al. 2007), a *Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa na forma de bastonete, e anaeróbia facultativa. Seu habitat primário é o trato gastrointestinal de humanos e outros animais endotérmicos. Cepas enteropatogênicas podem causar diarreia e vômito em crianças e cepas toxigênicas, como a *E. coli* O157:H7, podem causar síndrome urêmica hemolítica (JAY, 1995; MHONE et al., 2011).

Essas enfermidades são reportadas principalmente em países desenvolvidos, onde a higiene durante a produção de leite é rigorosamente controlada, resultando em uma matéria prima de boa qualidade microbiológica (DE BUYSER et al., 2001; GUERRA et al., 2001). Entretanto, quando esses alimentos apresentam baixa qualidade, o isolamento de patógenos tende a ser menor (NERO et al., 2008; JAY, 1995). Este paradoxo sugere que a microbiota autóctone do leite cru pode determinar alguma interferência no desenvolvimento de patógenos, principalmente quando presente em altas concentrações (NERO et al., 2008). As Bactérias Ácido Lácticas, pertencentes a esta microbiota autóctone, são tidas como uma das principais responsáveis por estas interações (NERO et al., 2008), vários estudos já comprovaram sua capacidade antagonista a patógenos (HERREROS et al., 2005; COCOLIN et al., 2007; MARTÍN; PLATERO et al., 2009; ASTERI et al., 2010), tornando sua presença desejável em leite e derivados.

São poucos os estudos que caracterizam as BAL autóctones do leite de cabras, bem como pouco se sabe sobre seu potencial antagonista a patógenos.

REFERÊNCIAS

- ASTERI, I.A.; KITTAKI, N.; TSAKALIDOU, E.; The effect of wild lactic acid bacteria on the production of goat's milk soft cheese. **International Journal of Dairy Technology**. v.63, p.234-242, 2010.
- BIBEK, R.; **Fundamental Food Microbiology**. 3.ed., 2005. 625 p.
- BORGES, G.D.S.; MACEDO, V.P.; ATOJI, K.; BAIFFUS, F.S.B. Desenvolvimento ponderal de cabritos lactentes com acesso ao creep feeding em diferentes idades. **Synergismus Scientifica**, n. 7, v. 1, 2012.
- BORGES, M.F.; ANDRADE, A.N.C.; ARCURI, E.F.; KABUKI, D.Y.; KUAYE, A.Y. *Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos, **Embrapa Agroindústria Tropical**, 2009. 31p.
- BRASIL. Instrução Normativa nº37 de 31 de outubro de 2000. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite de Cabra. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, Nov. 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Revisão n.6 do compendio da legislação de alimentos: atos do Ministério da Saúde: **ABIA**, n. 1, p. 3-31, 1996.
- CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R., **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu. 1999. p. 229 – 238.
- CHEN, H.; HOOVER, D.G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Technology**, n. 2, p. 82-100, 2003.
- CLARK, S.; SHERBON, J. W. Alphas1-casein, milk composition and coagulation properties of goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 38, p. 123-34, 2000.
- COCOLIN, L.; FOSCHINO, R.; COMI, G.; FORTINA, M. G. Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. **Food Microbiology**. v.24, p.752-758, 2007.
- CORDEIRO, P.R.C.; CORDEIRO, A.G.P.C. **A Produção de leite de Cabra no Brasil e seu mercado. Leite de Cabra no Brasil, seu mercado, comercialização e produção**. In: X Encontro de Caprinocultores do Sul de Minas e Media Mogiana Espírito Santo do Pinhal. 2009.
- COTTER, P. C.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews- Microbiology**, n. 3, p. 777-788, 2005.
- COSTA, A. Leite caprino: Um novo enfoque de pesquisa, 2002. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br> Acesso 10 Agos.. 2014.
- CREMONESI, P.; PEREZ, G.; PISONI, G.; MORONI, P.; MORANDI, S.; LUZZANA, M.; BRASCA M.; CASTIGLIONI B. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. **Letters in Applied Microbiology**, n. 45, p. 586-591, 2007.

DE BUYSER, M. L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk-products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. **International Journal of Microbiology**, v. 67, p. 1-17, 2001.

DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Bioconservação de alimentos: Aplicação de bactérias lácticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. **Biociência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 114-119, 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION of The United Nations- FAO 2013. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>>. Acesso em: 21 Ago. 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION of The United Nations- FAO 2010. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>>. Acesso em: 21 Ago. 2014.

FURTADO, M. M. **Fabricação de queijo de leite de cabra**. 6 ed. São Paulo: Nobel, 1988. 126 p.

GONÇALVES, A. L.; LANA, R. P.; VIEIRA, R. A. M. Avaliação de sistemas de produção de caprinos leiteiros na Região Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.2, p.366-376, 2008.

GUERRA, M. M. M.; BERNARDO, F. M. A. Caracterização de efeitos inibidores de *Listeria monocytogenes* Scott A, produzidos pela microflora de maturação de queijos do Alentejo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v. 96, p. 65-69, 2001.

HAENLEIN, G. F. W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 155-63, 2004.

HERREROS, M.A.; SANDOVAL, H.; GONZÁLEZ, J.M.; FRESNO, J.M.; TORNADIJO, M.E. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). **Food Microbiology**. v. 22, p.455-459, 2005.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.365S-373S, 2001.

IBGE. **IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/pesquisa/pesquisa_google.shtm?cx=009791019813784313549%3Aonz63jzsr68&cof=FORID%3A9&ie=ISO-88591&q=leite+de+cabra+parana&sa=Pesquisar&siteurl=www.ibge.gov.br%2Fhome%2Festatistica%2Feconomia%2Fagropecuaria%2Fcensoagro%2F2006%2Fdefaulttab_censoagro.shtm&ref=www.ibge.gov.br%2Fhome%2Festatistica%2Feconomia%2Fagropecuaria%2Fcensoagro%2F2006%2Fdefault.shtm&ss=5043j1483933j25>. Acesso em: 2 set. 2014.

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 and Environmental Sanitation**, n.15, v. 11, p. 674-677, 1995.

JAKABI, M.; BUZZO, A. A.; RISTORI, C. A. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella spp.*, ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n.1, p. 47-51, 1999.

JENNESS, R. Composition and characteristics of goat milk: review. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 10, p. 1605-30, 1980.

LE JAOUEN, J. C. Milking and the technology of milk and milk products. In: GALL, C. (Ed.). **Goat production**. London: Academic Press, 1981. p. 345-77.

LIBBY, S. J.; HALSEY, T. A.; ALTIER, C. et al. *Salmonella*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G. et al. **Pathogeneses of Bacterial Infections in Animals**, 3 ed., 2004. Blackwell Publishing: Ames, Iowa.

LOWRY, D. **Research puts scientific seal of approval on goat milk**, 2002. Disponível em: <www.pirineus.ind.br/leitedecabra/pagina23>. Acesso em 30 de agosto de 2014.

KAYLEGIAN, K. E.; MOAG, R.; GALTON, D. M.; BOOR, K. J. Raw milk consumption beliefs and practices among new york state dairy producers. **Food Protection Trends**, n. 28, v.3, p. 184-191, 2008.

KONEMAN, E. K.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5 ed. 1997. Lippincott, NY, 1395 p.

MARTINS, E. C.. O mercado e as potencialidades do leite de cabra na cidade de Sobral: a visão do consumidor. In: CONG. BRAS. DE SISTEMAS DE PRODUÇÃO, 7. 2007. Agricultura familiar, políticas públicas e inclusão social: **Anais**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 15 f. 1 CD-ROM.

MHONE, T.A.; MATOPE, G.; SAIDI, P.T. Aerobic bacterial, coliform, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* counts of raw and processed milk from selected small holder dairy farms of Zimbabwe. **International Journal of Food Microbiology**. v. 151, p. 223-228, 2011.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; ORTOLANI, M. B. T.; BARROS, M. A. F.; 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 and Public Health**, v. 55, p. 299-305, 2008.

OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M.; ALMEIDA, R. A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. **Foodborne Pathogens and Disease**, n. 2, v. 2, p. 115-129, 2005.

OLIVEIRA C.A.F. Qualidade do leite no processamento de derivados. In: Germano P.M.L. & Germano M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3 ed. Editora Varela, São Paulo. 2008. p.115- 129.

PARADA, J. L.; CARON, C. R.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, n. 50, v. 3, p. 521-542, 2007.

PARK, Y. Rheological characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**. V. 68, n. 1, p. 73-87, 2007.

PINHEIRO JÚNIOR, G. C. **Caprinos no Brasil**. Belo Horizonte: Itatiaia, 1985, 177p.

SILANIKOVE, N. et al. Recent advances in exploiting goat's milk: Quality, safety and production aspects. **Small Ruminant Res.**, v. 89, p. 110-24, 2010.

SILVA, P. BEZERRA, M.F., PEDRINI, M., MAGALHÃES, M., CORREIA, R. Leite de cabra: aspectos nutricionais e produtivos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 354, n. 62, p. 32-35, 2007.

SOBRINO-LÓPEZ, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. **International Dairy Journal**, n. 18, p. 329-343, 2008.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Quantificar as bactérias ácido lácticas naturalmente presentes de amostras de leite de cabra, coletadas em propriedades leiteiras do Paraná, bem como avaliar a capacidade antagonista das cepas isoladas e pesquisar microrganismos patogênicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar e determinar as características morfo-tintoriais de BAL isoladas de amostras de leite de cabra, coletadas em propriedades leiteiras do Paraná.

- Avaliar a capacidade antagonista das cepas de BAL isoladas, contra os principais microrganismos com potencial patogênico de importância em leite que são: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli*, além de *Lactobacillus sakei*, que é uma bactéria ácido láctica bastante sensível as bacteriocinas produzidas pelas BAL.

- Pesquisar *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. nas amostras de leite de cabra, coletadas em propriedades leiteiras do Paraná.

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

**POTENCIAL ANTAGONISTA DA MICROBIOTA ÁCIDO LÁTICA ISOLADA DE
LEITE DE CABRA PRODUZIDO NO PARANÁ.**

POTENCIAL ANTAGONISTA DA MICROBIOTA ÁCIDO LÁTICA ISOLADA DE LEITE DE CABRA PRODUZIDO NO PARANÁ.

RESUMO

Bactérias Ácido Láticas (BAL) são microrganismos naturalmente encontrados em vários alimentos, inclusive no leite e derivados conhecidas por seu potencial tecnológico e antimicrobiano. BAL produzem uma série de substâncias que afetam o crescimento de microrganismos, inclusive patógenos. Enquanto a microbiota ácido lática do leite bovino é bastante conhecida, são escassos os trabalhos sobre o potencial antagonista de BAL isoladas de leite de cabra. O objetivo do presente estudo, foi quantificar BAL em leite de cabra, e verificar seu potencial antagonista, em relação a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* patógenos de grande importância no leite e derivados e *Lactobacillus sakei*, importante bactéria lática, além de detectar a presença de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* nas amostras. Foram coletadas 34 amostras de leite cru de cabra em 9 propriedades leiteiras do Paraná. Para contagem de BAL as amostras foram diluídas em caldo MRS e semeadas em placas de PetrifilmTM AC (3M), com incubação a 30°C por 48 horas em anaerobiose. A caracterização das colônias de BAL, foi realizada utilizando a prova de Gram e catalase. Foram consideradas BAL, as cepas Gram positivas e catalase negativas. A capacidade antagonista das BAL, foi determinada pela metodologia *spot-on-the-lawn* modificada, um total de 319 culturas de BAL isoladas das 34 amostras de leite de cabra foram avaliadas. A pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizada segundo o protocolo ISO 6579 (2002), e a pesquisa de *Listeria monocytogenes* segundo o protocolo *Bacterial Analytical Manual/Food and Drug Administration*. As contagens obtidas a partir do PetrifilmTM AC (3M), variaram de $1,70 \times 10^4$ UFC/mL a $2,78 \times 10^5$ UFC/mL, com média de $5,02 \times 10^4$ UFC/mL. Foram colhidas diretamente do Petrifilm 1017 colônias, das quais 515 (56,6%) foram consideradas BAL características. Destas 289 (56,1%) apresentaram forma de cocos, 117 (22,7%) de cocobacilos e 109 (21,2%) de bacilos. *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* não foram detectadas em nenhuma das amostras analisadas. Das 319 culturas testadas que tiveram a capacidade antagonista avaliada, 317 (99,4%), apresentaram antagonismo contra pelo menos um microrganismo testado, e apenas duas colônias (0,6%) não apresentaram atividade antagonista contra qualquer dos microrganismos. O número de colônias com atividade antagonista contra *Lactobacillus sakei* foi de 246 (77,1%), *Listeria monocytogenes* 271 (85,0%), *Staphylococcus aureus* 295 (92,5%), *Salmonella* Enteritidis 290 (90,9%) e *Escherichia coli* 262 (82,1%). A ausência de *Listeria monocytogenes* e a *Salmonella* Enteritidis pode estar relacionada à grande quantidade de BAL com capacidade antagonista a estes patógenos, isoladas das mesmas amostras de leite. A frequência de BAL isoladas de leite de cabra com capacidade antagonista aos microrganismos testados foi bastante superior a relatada por outros autores, em relação às cepas de BAL isoladas de leite bovino. Este forte potencial antagonista detectado indica que as cepas podem auxiliar na segurança microbiológica de alimentos.

Palavras-chave: Leite de cabra. Bactérias láticas. Antagonismo. *Listeria monocytogenes*. *Staphylococcus aureus*. *Salmonella* enteritidis. *Escherichia coli*.

ANTAGONIC POTENCIAL OF LACTIC ACID MICROBIOTA ISOLATED FROM GOAT'S MILK PRODUCED IN STATE OF PARANÁ

ABSTRACT

Lactic Acid Bacteria (LAB) are microorganisms naturally found in several foods including milk and dairy products. LAB are able to produce numerous substances with antimicrobial antagonistic potential that affect microorganisms such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli*. There are few reports of LAB antagonistic capacity isolated from goat milk. The objective of this research was to identify LAB in raw goat milk and verify the antagonistic activity against *Lactobacillus sakei*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli*. 34 samples of raw goat milk were collected from nine dairy farms in Paraná. To count LAB samples were diluted in MRS broth and plated on AC Petrifilm (3M), incubated at 30 °C for 48 hours under anaerobic conditions. The classification of colonies was achieved through Gram and catalase test. Were considered LAB colonies those who was Gram-positive and catalase-negative. The antagonism was determined by the method *spot-on-the-lawn* modified using strains of *Lactobacillus sakei* ATCC 15521, *E. coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 and *Staphylococcus aureus* ATCC 222 25923. In order to do that 319 LAB cultures isolated from the 34 samples were selected. LAB counting varied from $1,70 \times 10^4$ to $2,78 \times 10^5$ CFU / mL with an average of $5,02 \times 10^4$. In classifying the morphologic, Gram and catalase method, 515 (56, 6%) were considered BAL characteristics (Gram positive and catalase negative), of these 289 (56.1%) had the form of cocci, 117 (22.7%) of coccobacilli and 109 (21.2%) of bacilli. No evidence was found of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in any of the samples. From the 319 cultures tested for antagonistic capacity, 317 colonies (99, 4%) showed antagonistic capacity against at least one of the microorganisms tested, and only two colonies (0, 6%) did not show any antagonistic capacity of all microorganisms. The number of colonies with antagonistic capacity against *Lactobacillus sakei* was 246 (77, 1%), *Listeria monocytogenes* 271 (85.0%), *Staphylococcus aureus* 295 (92, 5%) *Salmonella* Enteritidis 290 (90, 9%) and *Escherichia coli* 262 (82, 1%). The high frequency of LAB with antagonistic capacity against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis may be responsible for the absence of this pathogen in studied milk samples. The frequency of LAB isolated from goat's milk with an antagonistic capacity against microorganisms tested was quite greater than reported by other authors, in relation to the strains of LAB isolated from cow's milk. This strong antagonist potential detected indicates that the strains may assist in the microbiological safety of food.

Key words: Goat milk. Lactic bacteria. Antagonism. *Listeria monocytogenes*. *Staphylococcus aureus*. *Salmonella* enteritidis. *Escherichia coli*.

1 INTRODUÇÃO

Em 2013, a FAO estimou o rebanho caprino brasileiro em 9 milhões de cabeças, bem como uma produção de 150 mil toneladas de leite. A região nordeste destaca-se como a maior criadora de caprinos no Brasil. No entanto, a região Sudeste por possuir maior tecnificação e organização da cadeia, é responsável por 65% do leite caprino produzido no país, tornando-se assim, o grande polo nacional da atividade (CORDEIRO; CORDEIRO, 2009). O Paraná possui um rebanho caprino com cerca de 125 mil cabeças, sendo que 1300 cabras são ordenhadas, gerando uma produção de leite ao redor de 358 toneladas de leite ao ano. Porém, somente 130 mil litros foram processados formalmente. (IBGE, 2006).

O leite de cabra e seus derivados possuem um inegável apelo comercial devido ao seu status de “alimento saudável”. Esta classificação é justificada pelos seus componentes nutricionais, pelo seu potencial hipoalergênico quando comparado ao leite bovino, como também a facilidade de digestão dos seus glóbulos de gordura, que se apresentam em tamanho menor do que no leite bovino (FURTADO, 1988; HAENLEIN, 2004).

Os elementos nutricionais, sobretudo carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais, tornam o leite de cabra um excelente substrato para o crescimento de microrganismos (OLIVEIRA, 2008), podendo ser contaminando por diversos microrganismos, inclusive com potencial patogênico, como a *Listeria monocytogenes* que é frequente no ambiente de ordenha (OLIVER et al., 2005); *Staphylococcus aureus*, que é o principal causador da mastite caprina e também de enfermidades em humanos devido a produção de enterotoxinas termoestáveis (CREMONESI et al., 2007; OLIVER et al., 2005); *Salmonella spp* importante causadora de toxinfecções e *Escherichia coli* que é o principal indicador de contaminação fecal com cepas que podem apresentar patogenicidade (KAYLEGIAN et al., 2008).

A microbiota ácido láctica do leite apresenta grande interesse industrial e econômico. As bactérias ácido lácticas (BAL) são responsáveis pelo desenvolvimento de sabor, aroma e textura em alimentos que envolvem fermentação. As BAL também são importantes produtoras de substâncias antimicrobianas que auxiliam na segurança microbiológica dos alimentos.

Bactérias Ácido Lácticas (BAL), constituem um grande grupo de microrganismos que incluem os gêneros de bactérias Gram positivas: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus* e *Weissella*. Apresentam características morfológicas, metabólicas e fisiológicas em comum: são Gram positivas, não formadoras de esporos, catalase negativas, anaeróbicas, aerotolerantes e ácidotolerantes, além de possuírem metabolismo fermentativo, sendo o ácido láctico o principal produto final (DE MARTINIS, 2003; MOGENSEN et al., 2003).

São conhecidas pela produção de várias substâncias antimicrobianas, como ácidos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, potencialmente utilizadas na bioconservação de alimentos e apontadas como as principais responsáveis pela inibição e destruição de outros microrganismos, incluindo patógenos.

Vários estudos, em diversos países, objetivaram a caracterização da microbiota ácido láctica com potencial tecnológico, e com potencial antagonista a patógenos, sobretudo em leite bovino (HERREROS et al., 2005; COCOLIN et al., 2007; MARTÍN; PLATERO et al., 2009; ASTERI et al., 2010; JONES et al., 2008; TAMANINI et al., 2012; NERO et al., 2008; ORTOLANI, 2009; SCHILLINGER; LUCKE, 1989), porém o estudo de BAL autóctones do leite de cabra é escasso. O objetivo deste estudo foi quantificar bactérias ácido lácticas de amostras de leite de cabra, coletadas em propriedades leiteiras do Paraná, avaliar a capacidade

antagonista das cepas isoladas, bem como detectar a presença de *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes* nas amostras estudadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Entre os meses de Outubro de 2013 e Agosto de 2014, foram coletadas 34 amostras de leite de cabra, oriundas de 9 propriedades localizadas no Paraná (Arapoti, Arapongas, Campo Largo, Contenda, Balsa Nova, Floraí, Londrina, Maringá, Tibagi). Foram coletadas 4 amostras de cada propriedade, com intervalos de 3 meses, correspondendo às estações do ano. Apenas na propriedade I, foram realizadas duas coletas, pois as matrizes produtoras pertenciam a um experimento científico, e este foi encerrado após a segunda coleta, totalizando assim 34 amostras.

Nas propriedades foram observadas, raça dos animais, sistema de ordenha, volume produzido e sistema de estocagem do leite. Amostras de 1 litro foram coletadas logo após o término da ordenha, de forma asséptica, armazenadas em embalagens estéreis. Em seguida, foram encaminhadas, sob refrigeração, em caixa isotérmica com gelo reciclável, ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Estadual de Londrina, onde realizaram-se as análises.

2.1 MÉTODO DE CONTAGEM DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

A população de BAL em cada uma das amostras foi quantificada utilizando a metodologia proposta por MORAES et al. (2010). As amostras foram homogeneizadas por agitação e diluídas em escala decimal seriada em caldo de Man Rogosa Sharpe – MRS estéril. Em seguida foram semeadas em placas Petrifilm™ AC (3M, Estados Unidos) e acondicionadas em jarra de anaerobiose com o gerador de anaerobiose (Anaerobac, Probac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) e incubadas a 30°C por 48 horas. Assim, como indica a metodologia, as colônias vermelhas foram enumeradas e a contagem obtida, multiplicada pelo inverso da diluição considerada. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia de BAL por mililitro (UFC de BAL/mL).

2.2 CONFIRMAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

Após a enumeração das BAL, todas as colônias foram recuperadas das placas de Petrifilm™ AC, a partir da diluição utilizada para contagem. Em seguida, foram repicadas individualmente para caldo MRS (OXOID®, Inglaterra), com incubação a 30°C por 48h. Após turvação do caldo, as culturas obtidas foram semeadas em ágar MRS (OXOID®, Inglaterra) e incubadas a 30°C por 48h. Colônias das culturas consideradas puras, foram classificadas de acordo com a coloração de Gram e produção de catalase, a fim de se identificar características típicas de BAL (cocos, bacilos ou cocobacilos Gram positivos e catalase negativos) e a avaliar a frequência de cada morfologia. As colônias caracterizadas como BAL, foram estocadas em tubos criogênicos, em caldo MRS com glicerol (20%), em freezer -20°C.

2.3 AVALIAÇÃO DO ANTAGONISMO *IN VITRO*

Para verificar a atividade antagonista foi empregada a metodologia *spot-on-the-lawn*, com modificações (MORAES et al, 2010). As culturas foram recuperadas em Caldo Man, Rogose e Sharpe (MRS) overnight e estriadas em ágar (MRS) para avaliação da pureza.

As culturas puras de BAL foram semeadas pontualmente em placas contendo ágar (MRS). Foram semeadas 8 colônias de BAL por placa, em duplicata, e incubadas a 25°C por 24 a 48 horas. Após o crescimento, as placas receberam aproximadamente uma sobrecamada de 8 mL de ágar infusão cérebro e coração (BHI), semi sólido contendo 0,1 mL de um dos seguintes microrganismos na concentração aproximada de 3×10^8 UFC/mL (escala 1 de Mc Farland): *Lactobacillus sakei* ATCC 15521, *E. coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Para o preparo da sobrecamada, a cultura estocada de *Lactobacillus sakei* foi recuperada em caldo Man Rogosa Sharpe – MRS e incubada a 30°C, e as demais culturas estocadas, foram recuperadas em caldo Brain heart infusion (BHI), incubadas a 37°C.

Após solidificação da sobrecamada, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação, foi observada a formação de halos ao redor das colônias de BAL, halos bem definidos foram classificados como inibição total e halos difusos, foram classificados como inibição parcial (NERO, 2005).

2.4 PESQUISA DE *SALMONELLA* SPP.

Foi realizada a pesquisa de *Salmonella* spp. segundo o protocolo ISO 6579 (2002). Para detecção de *Salmonella* spp. uma alíquota de 25mL de leite foi diluída em 225mL de água peptonada tamponada e incubada a 37°C por 18h. Após esse período alíquotas foram transferidas para dois caldos de enriquecimento seletivo, 0,1mL para 10mL Rappaport-Vassiliadis (Oxoid, Inglaterra) com incubação a 42°C e 1 mL para o caldo Muller-Kauffmann tetrionato/novobiocina (MKTTn) com incubação 37°C por 24h. Para o preparo do caldo MKTTn foi usado a base do caldo MKTTn (Oxoid, Inglaterra) mais 40mg/L de novobiocina (Oxoid, Inglaterra) e 20mL/L de lugol (Laborclin, Brasil) adicionados ao caldo base previamente ao inóculo. Após o enriquecimento o conteúdo foi estriado em ágares diferenciais xilose-lisina-desoxicolato (XLD) (Oxoid, Inglaterra) e Ágar Manitol, Lisina, Cristal Violeta, Verde Brilhante Agar (MLCB) (Oxoid, Inglaterra) com incubação a 37°C por 24h. Pelo menos 5 colônias suspeitas de *Salmonella* spp. foram submetidas a testes bioquímicos em ágar inclinado tríplex açúcar e ferro (TSI) (Oxoid, Inglaterra) e lisina descarboxilase (LIA) (Oxoid, Inglaterra), com incubação a 37°C por 24h. As colônias com reações típicas de *Salmonella* spp. passaram por prova sorológica onde foram empregados antissoros polivalentes flagelar (H) e somático (O) (Probac, Brasil).

2.5 PESQUISA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*.

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* segundo o protocolo *Bacterial Analytical Manual/Food and Drug Administration* (BAM/FDA) (HITCHINS, 2003). Para detecção de *Listeria monocytogenes* uma alíquota de 25mL de leite foi inoculada em 225mL de caldo de enriquecimento para *Listeria* (LEB) (Oxoid, Inglaterra) tamponado com 1,35g/L de fosfato monopotássico anidro (KH₂PO₄) e 9,6g/L de fosfato dissódico anidro (Na₂HPO₄) sendo

incubado a 30°C por 4 horas e depois suplementado com enriquecimento seletivo de *Listeria* (SRO 141E) (Oxoid, Inglaterra) e incubado por mais 44 horas. Após o período de incubação o conteúdo de enriquecimento seletivo foi estriado em ágar Oxford (Oxoid, Inglaterra) e ágar Palcam (Oxoid, Inglaterra) e as placas foram incubadas por 48 horas a 35°C. Foram selecionadas pelo menos 5 colônias características e estriadas em ágar tripticase de soja (Acumedia, Inglaterra) com 0,6% de extrato de levedura (Acumedia, Inglaterra) (TSA-YE). A análise dos dados estatísticos foi realizada com o programa Microsoft Excel® 2010, para a realização do Teste “T”.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As propriedades tinham como característica comum, a utilização do leite caprino para venda, seja na forma fluida ou de derivados. A raça predominante foi Saanen. Das nove propriedades estudadas, cinco possuíam sistema de ordenha manual e quatro, sistema mecânico. A média de leite produzido nas nove propriedades ao longo do período estudado, foi de aproximadamente 83.951 litros, o que corresponde a 23,45% da produção do Paraná.

A média das contagens de colônias de BAL, considerando as 34 amostras estudadas foi de $5,02 \times 10^4$ UFC/mL, com variação de $2,66 \times 10^3$ a $2,78 \times 10^5$ UFC/mL (Tabela 1). Nossos resultados foram superiores aos encontrados por outros autores no Brasil. Perin e Nero (2014) analisaram 22 amostras de leite de cabra coletadas na cidade de Viçosa-MG, e encontraram contagens variando de $1,17 \times 10^3$ a $7,94 \times 10^3$ UFC/mL. De Pádua (2013) estudando 10 amostras de leite de cabra coletadas no Distrito Federal, observou contagens que foram de 10 UFC/mL a $4,0 \times 10^4$ UFC/mL com média de $7,8 \times 10^3$ UFC/mL. Tamanini et al. (2012), analisando 45 amostras de leite bovino, coletadas em Pernambuco, obtiveram contagens de BAL que variaram de $1,1 \times 10^4$ UFC/mL a $9,9 \times 10^6$ UFC/mL. Ortolani et al. (2010) avaliando 36 amostras de leite bovino, coletadas em Viçosa-MG, verificaram contagens variando de $1,4 \times 10^3$ a $9,34 \times 10^3$ UFC/mL.

Tabela 1 – Média das contagens de bactérias ácido lácticas de amostras leite de cabra coletadas em 9 propriedades leiteiras do Paraná, e porcentagem de colônias características (Gram positivas e catalase negativas), entre Outubro de 2013 e Agosto de 2014.

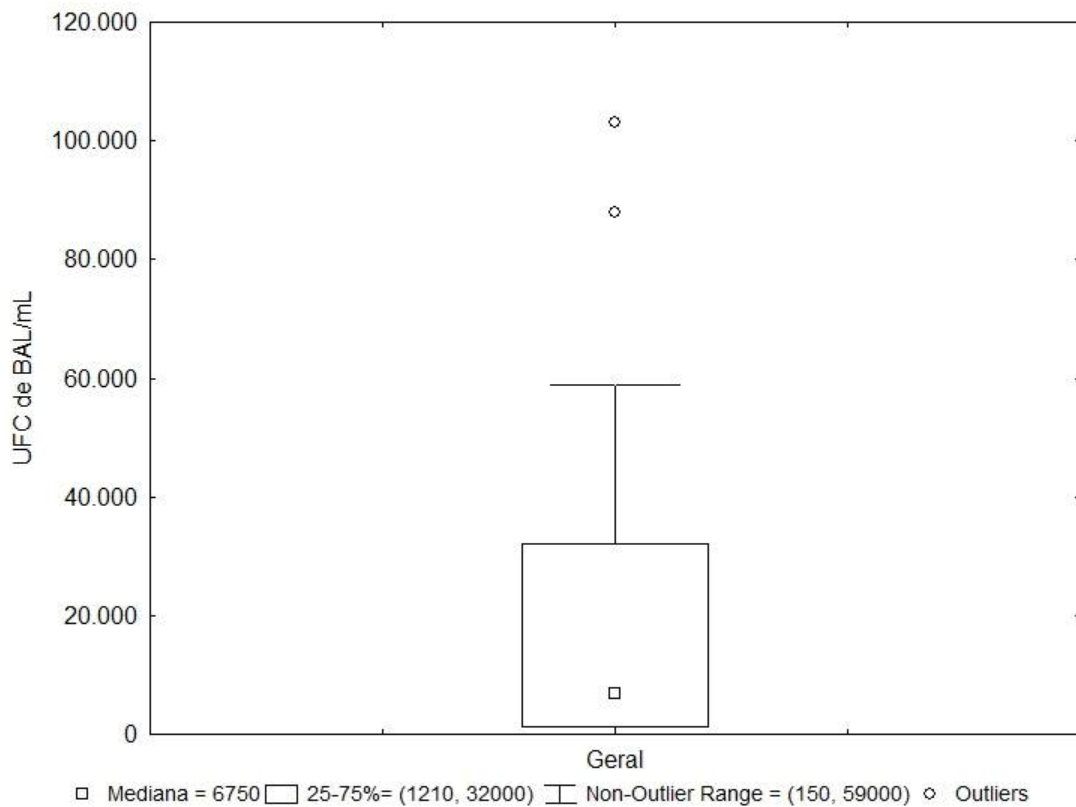
Propriedades	Número de coletas	Média (UFC/mL)	% de colônias características
A	4	$5,96 \times 10^3$	12,6
B	4	$5,70 \times 10^4$	20,0
C	4	$2,78 \times 10^5$	91,4
D	4	$4,84 \times 10^4$	57,3
E	4	$2,66 \times 10^3$	1,9
F	4	$5,47 \times 10^3$	30,6
G	4	$1,70 \times 10^4$	50,7
H	4	$3,88 \times 10^3$	20,7
I	2	$1,63 \times 10^4$	91,6

Fonte: Elaboração do autor.

A média das contagem de BAL, foi maior no período da primavera $1,27 \times 10^5$ UFC/mL, mas não houveram diferenças significativas nas análises estatísticas e não foram encontrados outros estudos sobre a frequência de BAL e a sazonalidade, não permitindo comparações.

O gráfico 1 demonstra a distribuição das contagens de BAL das 34 amostras de leite estudadas. Pode-se observar assimetria positiva e mediana próxima a 10.000 UFC/mL., o gráfico ainda possui dois outliers, que representam os valores atípicos, com contagens muito acima da mediana.

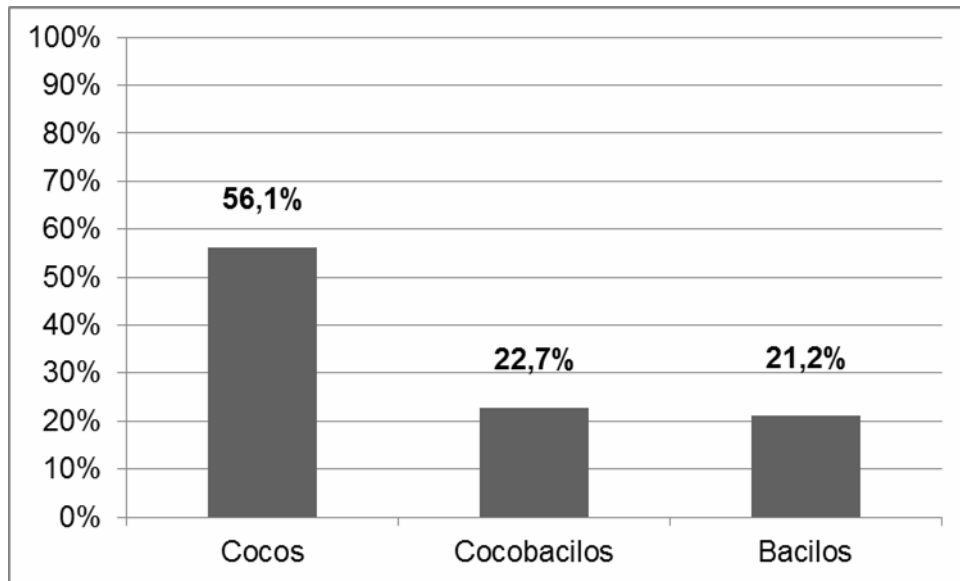
Gráfico 1 – Distribuição dos resultados das contagens de bactérias ácido lácticas de 34 amostras leite de cabra coletadas em 9 propriedades leiteiras do Paraná, entre Outubro de 2013 e Agosto de 2014.



Fonte: Elaboração do autor.

Cada colônia recuperada do Petrifilm gerou uma cultura. A partir das 34 amostras de leite de cabra cru obteve-se 1017 culturas. Após a classificação morfo-tintorial e prova da catalase, 515 (56,6%) foram consideradas BAL características, apresentando-se positivas a coloração de Gram e catalase negativas. Destas 289 (56,1%) apresentaram forma de cocos, 117 (22,7%) de cocobacilos e 109 (21,2%) de bacilos (GRÁFICO 2). A metodologia de seleção de BAL utilizada neste trabalho, como a metodologia tradicional para o isolamento de BAL, apresenta baixa seletividade, o que fica demonstrado na Tabela 1, onde a proporção de colônias caracterizadas como BAL foi de 56,6%.

Gráfico 2 – Morfologia determinada pela coloração de Gram de 515 colônias de BAL isoladas leite cru de cabra coletadas em 9 propriedades leiteiras do Paraná, entre Outubro de 2013 e Agosto de 2014.

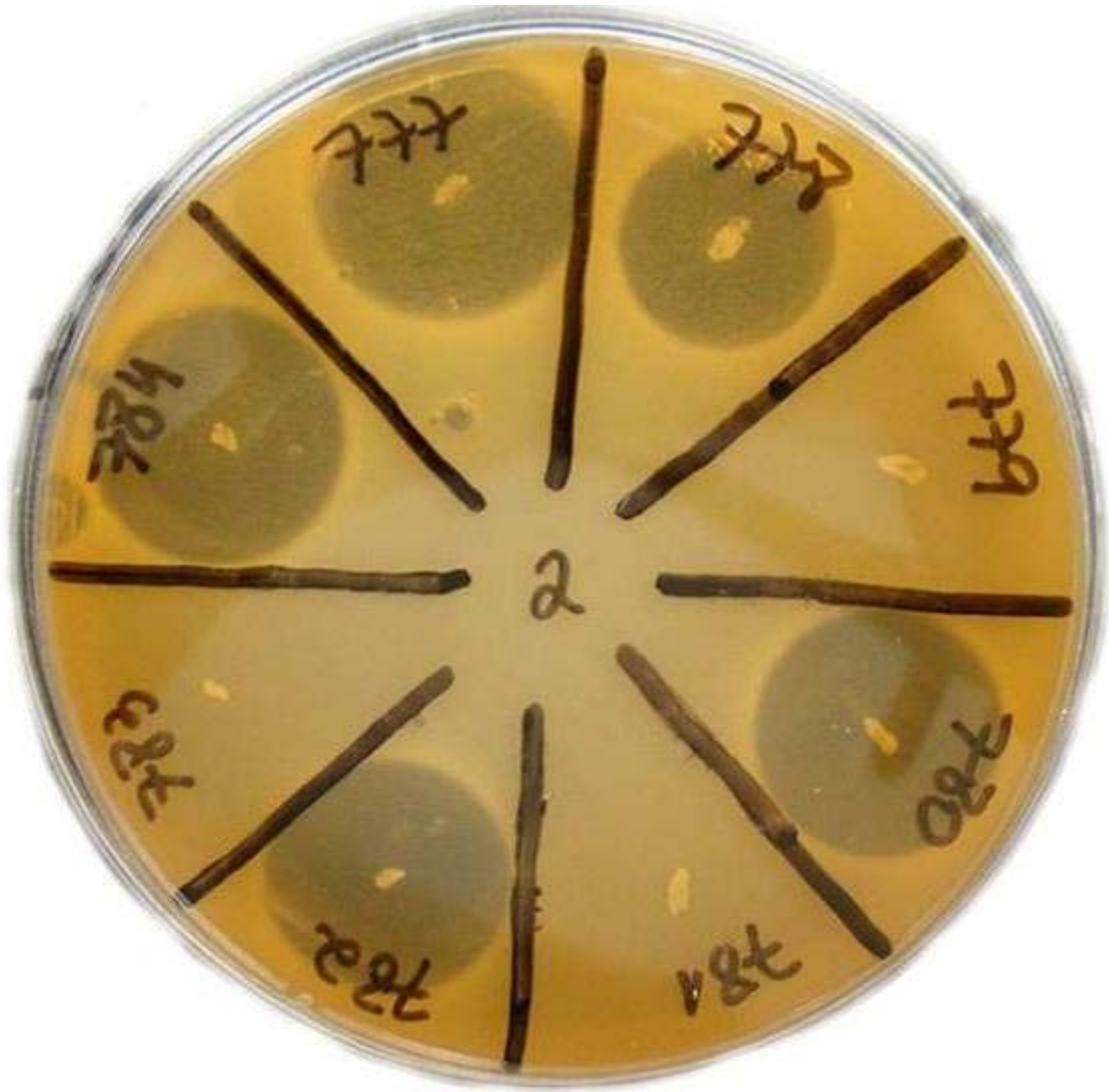


Fonte: Elaboração do autor

PERIN (2014), estudando 22 amostras de leite de cabra, utilizando esta mesma metodologia, isolou 682 colônias e destas, 423 eram BAL características (62,02%). O grupo mais encontrado pelo autor, também foi o de cocos Gram positivos (89,12%). Cocos Gram positivos também predominaram entre as BAL do leite cru bovino no estudo de Ortolani (2009) e WOUTERS et al. (2002). De fato, a maioria dos gêneros que compõem as BAL, apresentam morfologia de cocos: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus* e *Weissella*.

Das 515 colônias de Bactérias Ácido Láticas características, 319 foram submetidas ao teste de antagonismo a *Lactobacillus sakei*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli*. Foram consideradas antagonistas as colônias em torno das quais se formou um halo translúcido, resultante da inibição de crescimento do patógeno semeado na sobrecamada (Figura 1).

Figura 1 – Halo de inibição (HI) do crescimento de *Lactobacillus sakei*, provocado por bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru de cabra.



Os resultados em relação a atividade antagonista total e parcial de 319 cepas de bactérias ácido lácticas isoladas de 34 amostras de leite cru de cabra, obtidos, são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Atividade antagonista total e parcial de 319 cepas de bactérias ácido lácticas isoladas de 34 amostras de leite cru de cabra, provenientes de propriedades do Estado do Paraná e testadas contra *Lactobacillus sakei* (LS), *Listeria monocytogenes* (LM), *Staphylococcus aureus* (SA), *Salmonella* Enteritidis (SE.) e *Escherichia coli* (EC).

Atividade antagonista em relação a										
	LS		LM		AS		SE		EC	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Culturas antagonistas	246	77,1	271	85,0	295	92,5	290	90,9	262	82,1
Total	107	33,5	172	53,9	207	64,9	230	72,1	164	51,4
Parcial	139	43,6	99	31,0	88	27,6	60	18,8	98	30,7
Culturas não antagonistas	73	22,9	48	15,0	24	7,5	29	9,1	57	17,9
Total	319	100	319	100	319	100	319	100	319	100

Fonte: Elaboração do autor

Considerando o antagonismo contra os cinco microrganismos, das 319 culturas de BAL testadas, 317 (99,4%), apresentaram antagonismo contra pelo menos um dos microrganismos. Apenas duas colônias (0,6%), não apresentaram atividade antagonista para qualquer dos microrganismos testados. As cepas de BAL apresentaram atividade antagonista mais frequente contra *Staphylococcus aureus*, seguidos de *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Lactobacillus sakei*,

Os estudos de ação antagonista de BAL nativas do leite de cabra são escassos, porém em isolados do leite bovino, sua atividade antagônica foi descrita por diversos autores (JONES et al., 2008; NERO et al., 2008; ORTOLANI, 2009; SCHILLINGER; LUCKE, 1989), principalmente em relação a bactérias Gram positivas. Porém, outros trabalhos demonstram a existência de BAL com potencial antagônico também contra bactérias Gram negativas (MEIRA et al, 2010; NERO et al, 2008). No presente estudo 90,9% das cepas de BAL estudadas, apresentaram atividade antagônica contra *Salmonella* Enteritidis, e 82,1% contra *Escherichia coli*, que são bactérias Gram negativas.

A atividade antagonista contra *Staphylococcus aureus* foi observada em 295 (92,5%) das cepas de BAL estudadas, porcentagem bastante superior à encontrada em estudos com leite bovino. Mattos (2008), testando 443 colônias de BAL isoladas de leite cru bovino, observou 81 (12,1%) colônias com atividade antagonista frente a *S. aureus*, Coventry et al. (1997), encontraram (25%) de colônias originárias de produtos lácteos com capacidade antagonistas. Já Ortolani et al. (2010), encontrou (61,1%) de colônias com ação antagonista a *S. aureus*.

Das cepas de BAL estudadas, 246 (77,1%) apresentaram ação antagonista diante de *Lactobacillus sakei*. Isso era esperado uma vez que, este microrganismo é bastante sensível as bacteriocinas produzidas pelas BAL (ORTOLANI et al, 2010).

A ação antagônica contra *Salmonella* Enteritidis, foi observada em 290 (90,9%), das cepas de BAL isoladas do leite de cabra, porcentagem também superior a relatada por outros autores em leite bovino. Nero et al. (2009) encontraram (9,1%) das colônias de BAL isoladas de leite bovino com atividade antagonista a *Salmonella* Enteritidis. Em um segundo estudo, Nero et al. (2008), ainda em leite bovino, obtiveram (9,2%) de colônias com essa capacidade. Já Mattos (2008), também estudando BAL isoladas de leite bovino, obteve um melhor resultado, (66,3%) de colônias antagonistas a este patógeno.

Para *Listeria monocytogenes* 271 cepas (85,0%) das cepas testadas apresentaram antagonismo. A atividade antagonista à *Listeria monocytogenes*, é bastante desejável, uma vez que o leite e seus derivados tem grande importância na veiculação deste patógeno e a presença de BAL antagonistas pode colaborar com a segurança destes alimentos. Neste caso também, a frequência de cepas antagonistas isoladas de leite de cabra, foi superior a encontrada por outros autores em leite bovino.

Nero et al. (2008) verificando o potencial antagônico de 360 colônias de BAL isoladas de leite cru bovino frente a *Listeria monocytogenes*, observou que 25,3% colônias, mostraram atividade antimicrobiana frente a esse patógeno. Já Ortolani et al. (2010) estudando as BAL isoladas de leite cru bovino e queijo fabricado com leite cru, encontraram 44,4% de BAL antagonista a *Listeria monocytogenes*, Tamanini et al. (2012) também em leite bovino, verificou que 54,1% das colônias testadas também apresentaram atividade antagonista a este microrganismo.

Frente a *E. coli* 262 (82,1%) das cepas de BAL isoladas de leite de cabra, apresentaram atividade antagonista. Tamanini et al. (2012) verificaram apenas 10,7% de atividade antagonista frente a este patógeno. Especialmente contra *E. coli* a frequência de BAL antagonista foi muito superior a encontrada em BAL isoladas de leite bovino.

Salmonella spp. e *Listeria monocytogenes* não foram detectadas em nenhuma das amostras analisadas, resultado semelhante ao encontrado em estudos em leite de cabra realizados na Grécia, Portugal e França (MORGAN et al., 2003). Embora não existam muitos estudos sobre a presença de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em leite cru de cabra no Brasil, Oliveira et al. (2011) encontraram *Salmonella enterica* em 2/96 amostras (2,08%) e não detectaram *Listeria monocytogenes*. Em leite de vaca, está bem demonstrado que a ausência de patógenos em leite cru está relacionada à competição microbiana, principalmente promovida por bactérias ácido láticas. A ausência de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. no presente trabalho pode estar relacionada à alta frequência de BAL com potencial antagônico a estes patógenos, identificada nas amostras de leite de cabra estudadas.

4 CONCLUSÕES

O leite de cabra apresenta grande quantidade de bactérias ácido láticas. Cocos é a morfologia predominante entre as BAL de leite de cabra, nas condições estudadas.

As BAL isoladas de leite de cabra, apresentam atividade antagonista mais frequente do que as isoladas de leite bovino, e a um maior número de patógenos simultaneamente.

Os resultados obtidos demonstram que *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp parece não serem patógenos frequentes no leite de cabra, nas condições estudadas.

A alta frequência de BAL com capacidade antagonista a *Listeria monocytogenes* e a *Salmonella* Enteritidis pode estar relacionada com a ausência destes patógenos nas amostras de leite estudadas.

O intenso potencial antagonista verificado nas BAL isoladas de leite de cabra, indica que outros estudos são necessários para determinar quais substâncias estão envolvidas com o antagonismo observado e se há predominância de gêneros e espécies específicas que possam ser utilizadas comercialmente.

REFERÊNCIAS

- ASTERI, I.A.; KITTAKI, N.; TSAKALIDOU, E.; The effect of wild lactic acid bacteria on the production of goat's milk soft cheese. **International Journal of Dairy Technology**. v. 63, p. 234-242, 2010.
- COCOLIN, L.; FOSCHINO, R.; COMI, G.; FORTINA, M. G. Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. **Food Microbiology**. v. 24, p. 752-758, 2007.
- CORDEIRO, P.R.C.; CORDEIRO, A.G.P.C. **A Produção de leite de Cabra no Brasil e seu mercado. Leite de Cabra no Brasil, seu mercado, comercialização e produção**. In: X Encontro de Caprinocultores do Sul de Minas e Media Mogiana Espírito Santo do Pinhal. 2009.
- COVENTRY, M. J.; GORDON, J. B.; WILCOCK, A.; HARMARK, K.; DAVIDSON, B. E.; HICKEY, M.W.; HILLIER, A. J.; WAN, J..Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. *Journal of Applied Microbiology*, 83, p. 248-258, 1997.
- CREMONESI, P.; PEREZ, G.; PISONI, G.; MORONI, P.; MORANDI, S.; LUZZANA, M.; BRASCA M.; CASTIGLIONI B. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. **Letters in Applied Microbiology**, n. 45, p. 586-591, 2007.
- DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Bioconservação de alimentos: Aplicação de bactérias lácticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 114-119, 2003.
- DE PÁDUA, F. S. **Qualidade, segurança microbiológica e enumeração da microbiota láctica autóctone do leite de cabra produzido na região centro-oeste**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Universidade de Brasília, Brasília.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO 2014. Banco de dados FAOSTAT. Disponível em: <<http://apps.fao.org>> Acesso em: 21 de Ago de 2014.
- FURTADO, M. M. **Fabricação de queijo de leite de cabra**. 6 ed. São Paulo: Nobel, 1988. 126 p.
- HAENLEIN, G. F. W. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 155-63, 2004.
- HERREROS, M.A.; SANDOVAL, H.; GONZÁLEZ, J.M.; FRESNO, J.M.; TORNADIJO, M.E. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). **Food Microbiology**. v. 22, p. 455-459, 2005.
- HITCHINS, A. D. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. In: **Bacteriological analytical manual**. 8 ed. [S.l.]: FDA, 2003.
- IBGE. **IBGE : Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/pesquisa/pesquisa_google.shtm?cx=009791019813784313549>

%3Aonz63jzsr68&cof=FORID%3A9&ie=ISO-8859
 1&q=leite+de+cabra+parana&sa=Pesquisar&siteurl=www.ibge.gov.br%2Fhome%2Festatistica%2Feconomia%2Fagropecuaria%2Fcensoagro%2F2006%2Fdefaulttab_censoagro.shtm&ref=www.ibge.gov.br%2Fhome%2Festatistica%2Feconomia%2Fagropecuaria%2Fcensoagro%2F2006%2Fdefault.shtm&ss=5043j1483933j25>. Acesso em: 2 set. 2014.

ISO. ISO 6579- **Microbiology of food and animal feeding stuffs**- Horizontas method for the detection of *Salmonella* spp. Geneva: International Standardisation Organization, 2002.

JONES, R. J.; HUSSEIN, H. M.; ZAGOREC, M.; BRIGHTWELL, G.; TAGG, J. R. Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. **Food Microbiology**, v. 25, p. 228-234, 2008.

KAYLEGIAN, K. E.; MOAG, R.; GALTON, D. M.; BOOR, K. J. Raw milk consumption beliefs and practices among new york state dairy producers. **Food Protection Trends**, n. 28, v. 3, p. 184-191, 2008.

MATTOS, M. R. **Qualidade do leite cru produzido na região Agreste de Pernambuco e atividade antagonista de bactérias ácido lácticas contra *Salmonella Enteritidis* e *Staphylococcus aureus***. 2008. Dissertação (Doutorado em Ciência animal), Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MARTÍN-PLATERO, A.M.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M.; MARTÍNEZ-BUENO, M. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses, **International Journal of Food Microbiology**. v. 132, n. 1, p. 24-32, 2009.

MEIRA, S. M. M.; HELFER, V. E.; MEDINA, L. F. C.; BRANDELLI, A. Atividade antagonística de *Lactobacillus* frente a bactérias de importância em alimentos. In: 3º Simpósio de Segurança Alimentar, 2010, Florianópolis. **Anais do 3º Simpósio de Segurança Alimentar**. Florianópolis: SBCTA, 2010.

MOGENSEN, G.; SALMINEN, S.; O'BRIEN, J. et al. Food microorganisms – health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. **Bull. International Dairy Federal**. n. 377, p. 4-9, 2003.

MORAES, P.M.; PERIN, L.M.; TASSINARI ORTOLANI, M.B.; YAMAZI, A.K.; VIÇOSA, G.N.; NERO, L.A. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. **LWT - Food Science and Technology**. v. 43, n. 9, p. 1320-1324, 2010.

MORGAN, F. et al. Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. **Small Ruminant Research**, v. 47, n. 1, p. 39–49, jan. 2003.

NERO, L.A.; De MATTOS, M.; BARROS, M. A.; BELOTI, V. Interference of raw milk autochthonous microbiota on the performance of conventional methodologies for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. detection. **Microbiological Research**, 164, 529-535, 2009.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; ORTOLANI, M. B. T.; BARROS, M. A. F.; BELOTI, V.; FRANCO, B. D. G. M. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella sp.* in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, p. 299-305, 2008.

- NERO, L. A. ***Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção.** 2005. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M.; ALMEIDA, R. A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. **Foodborne Pathogens and Disease**, n. 2, v. 2, p. 115-129, 2005.
- OLIVEIRA, C. J. B. et al. On farm risk factors associated with goat milk quality in Northeast Brazil. *Small Ruminant Research*, v. 98, n. 1-3, p. 64–69, jun. 2011.
- OLIVEIRA C.A.F. Qualidade do leite no processamento de derivados. In: Germano P.M.L. & Germano M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3 ed. Editora Varela, São Paulo. 2008. p.115- 129.
- ORTOLANI, M.B.T.; YAMAZI, A.K.; MORAES, P.M.; VIÇOSA, G.N.; NERO, L.A. Microbiological Quality and Safety of Raw Milk and Soft Cheese and Detection of Autochthonous Lactic Acid Bacteria with Antagonistic Activity Against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Spp., and *Staphylococcus aureus*. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 7, n. 2, p. 175-180, 2010.
- ORTOLANI, M. B. T. **Bactérias ácido-láticas autóctones de leite cru e queijo minas frescal: Isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular.** 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- PERIN, L.M., NERO, L.A., 2014. Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. **BMC Microbiol.** n. 14, v. 36, p. 1-9, 2014.
- PERIN, M. P. **Diversidade molecular da microbiota láctica bacteriocinogênica de leite de cabra e caracterização de seu potencial tecnológico e bioconservador para a produção de queijos.** 2013. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- SCHILLINGER, U.; LUCKE, F. K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from Meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 1901-1906, 1989.
- TAMANINI, R.; BELOTI, V.; SILVA, L. C. C.; ANGELA, H. L.; YAMADA, A. K.; BATTAGLINI, A. P. P.; FAGNANI, R.; MONTEIRO, A. A. Antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* from lactic acid bacteria isolated from raw milk. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, p. 1877-1888, 2012.
- WOUTERS, J.T.M.; AYAD, E.H.E.; HUGENHOLTZ, J.; SMIT, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**. v. 12, p. 91-109, 2002.

5 CONCLUSÕES FINAIS

O leite cru de cabra mostrou ser importante fonte de Bactérias ácido lácticas, e as cepas isoladas mostraram forte potencial antagonista. Os dados obtidos merecem maiores estudos para esclarecer quais substâncias estão envolvidas no antagonismo, bem como determinar gêneros e espécies que predominam entre as BAL antagonistas. Ainda, é desejável o estudo das potencialidades sensoriais destes microrganismos, com vistas ao seu emprego na produção de derivados, de forma a aliar segurança microbiológica e potencial tecnológico.