



UNIVERSIDADE DOS AÇORES
Departamento de Ciências Agrárias

**ESTUDO DO POTENCIAL BIOACTIVO E TECNOLÓGICO DE
BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO ISOLADAS DE QUEIJO DO
PICO ARTESANAL**

Sandra Paula de Aguiar e Câmara

Dissertação de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar

Orientadora: Professora Doutora Maria de Lurdes Enes Dapkevicius

Co-orientador: Professor Doutor Oldemiro de Aguiar do Rego

Angra do Heroísmo, 2012



*Dedico este trabalho ao meu marido
Fernando, que sempre esteve ao meu
lado e através do seu amor e
compreensão apoiou-me e incentivou-me
nesta caminhada.*



AGRADECIMENTOS

Quero prestar o meu sincero agradecimento a todos aqueles que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho, em especial

À Doutora Maria de Lurdes Enes Dapkevicius, minha orientadora

Ao Doutor Oldemiro de Aguiar do Rego, meu co-orientador

Ao Dr. Airidas, à Berta, à Márcia, ao Isac, à Lucrecia e à Marina

À Guida, à Susana e à Cristina

Aos meus pais e restante família.



ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE QUADROS	VIII
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1. Caracterização geral das bactérias do ácido láctico (BAL)	03
2.2. Potencial bioactivo e tecnológico das BAL	05
2.3. Critérios de segurança das BAL	12
2.4. Biodiversidade de BAL em produtos lácteos tradicionais	14
2.5. O queijo do Pico artesanal	16
2.5.1. Origem	16
2.5.2. Tecnologia de fabrico	17
2.5.3. Características gerais	20
2.5.4. Denominação de origem protegida	21
2.5.5. Principais BAL presentes no queijo do Pico – sua descrição	22
2.5.5.1. Género <i>Lactobacillus</i>	22
2.5.5.2. Género <i>Lactococcus</i>	23
2.5.5.3. Género <i>Enterococcus</i>	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Isolados em estudo	26
3.2. Características das BAL do queijo do Pico com importância em termos de bioactividade e tecnologia	26
3.2.1. Curvas de crescimento microbiano	26
3.2.2. Curvas de acidificação	26
3.2.3. Actividade proteolítica e actividade lipolítica	28
3.2.4. Actividades enzimáticas	28
3.2.5. Produção de diacetilo a partir de citrato	29
3.2.6. Produção de exopolissacáridos	30
3.2.7. Determinação da concentração mínima inibidora de bflis	30
3.2.8. Actividade antimicrobiana	31
3.2.9. Teste de coexistência	32



3.3. Critérios de segurança das BAL do queijo do Pico	32
3.3.1. Actividade hemolítica	32
3.3.2. DNase	33
3.3.3. Gelatinase	33
3.3.4. Produção de histamina	33
3.3.5. Resistência a antibióticos	34
3.4. Análise de dados	35
3.5. Selecção de isolados promissores como potenciais culturas de arranque para queijo	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Características das BAL do queijo do Pico com importância em termos de bioactividade e tecnologia	37
4.1.1. Curvas de crescimento microbiano	37
4.1.2. Curvas de acidificação	41
4.1.3. Actividade proteolítica e actividade lipolítica	46
4.1.4. Actividades enzimáticas	46
4.1.5. Produção de diacetilo a partir de citrato	52
4.1.6. Produção de exopolissacáridos	53
4.1.7. Determinação da concentração mínima inibidora de bífis	53
4.1.8. Actividade antimicrobiana	54
4.2. Critérios de segurança das BAL do queijo do Pico	58
4.2.1. Actividade hemolítica	58
4.2.2. DNase	59
4.2.3. Gelatinase	59
4.2.4. Produção de histamina	60
4.2.5. Resistência a antibióticos	60
4.3. Análise dos dados	66
4.3.1. Curvas de crescimento microbiano	66
4.4. Selecção de isolados promissores como potenciais culturas de arranque para queijo	67
4.5. Teste de coexistência	70
5. CONCLUSÕES	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema representativo das etapas de fabrico do queijo do Pico artesanal (Baseado na Associação de Produtores de Queijo do Pico, 1996 e em Cardoso, 1997).	19
Figura 2	Teste da proteólise. (a) reacção negativa; (b) reacção positiva.	28
Figura 3	Teste da produção de diacetilo a partir de citrato. (a) negativo; (b) nível alto; (c) nível baixo.	30
Figura 4	Actividade antimicrobiana pela técnica de inoculação cruzada.	31
Figura 5	Actividade antimicrobiana pela técnica dos poços.	32
Figura 6	Teste da gelatinase. (a) reacção negativa; (b) reacção positiva .	33
Figura 7	Teste de resistência aos antibióticos pelo método de Kirby-Bauer.	34
Figura 8	Curvas de crescimento em <i>MRS</i> , a 30 °C, em aerobiose, dos isolados do género <i>Lactobacillus</i> obtidos a partir de queijo do Pico.	38
Figura 9	Curvas de crescimento em <i>MRS</i> , a 30 °C, em aerobiose, dos isolados do género <i>Lactococcus</i> obtidos a partir de queijo do Pico.	38
Figura 10	Curvas de crescimento em <i>MRS</i> , a 30 °C, em aerobiose, dos isolados do género <i>Enterococcus</i> obtidos a partir de queijo do Pico.	41
Figura 11	Curvas de crescimento em <i>MRS</i> , a 30 °C, em aerobiose, dos isolados não identificados obtidos a partir de queijo do Pico.	41
Figura 12	Curvas de acidificação em <i>MRS</i> , a 30 °C, em aerobiose, dos isolados do género <i>Lactobacillus</i> obtidos a partir de queijo do Pico.	43
Figura 13	Curvas de acidificação em <i>MRS</i> , a 30 °C, em aerobiose, dos isolados do género <i>Lactococcus</i> obtidos a partir de queijo do Pico.	43
Figura 14	Curvas de acidificação em <i>MRS</i> , a 30 °C, em aerobiose, dos isolados do género <i>Enterococcus</i> obtidos a partir de queijo do Pico.	44
Figura 15	Curvas de acidificação em <i>MRS</i> , a 30 °C, em aerobiose, dos isolados não identificados obtidos a partir de queijo do Pico.	45
Figura 16	Resultados do teste da proteólise efectuado a 37 BAL do queijo do Pico.	46
Figura 17	Resultados do teste da produção de diacetilo a partir de citrato efectuado a 37 BAL isoladas a partir de queijo do Pico.	52



Figura 18	Concentração mínima inibidora (CMI) de bÍlis apresentada por 37 BAL obtidas a partir de queijo do Pico.	53
Figura 19	Resultados do teste da hemólise efectuado a 37 BAL isoladas a partir de queijo do Pico.	58
Figura 20	Resultados do teste da gelatinase efectuado a 37 BAL isoladas a partir de queijo do Pico.	60
Figura 21	Padrões de sensibilidade/resistência a 22 antibióticos de isolados do género <i>Lactobacillus</i> provenientes de queijo do Pico.	62
Figura 22	Padrões de sensibilidade/resistência a 22 antibióticos de isolados do género <i>Lactococcus</i> provenientes de queijo do Pico.	63
Figura 23	Padrões de sensibilidade/resistência a 22 antibióticos de isolados do género <i>Enterococcus</i> provenientes de queijo do Pico.	64
Figura 24	Padrões de sensibilidade/resistência a 22 antibióticos de isolados não identificados provenientes de queijo do Pico.	65
Figura 25	Dendrograma da análise dos parâmetros das curvas de crescimento (OD_0 , $OD_{máx}$, $\mu_{máx}$, t-lag e t-d) de 37 isolados de BAL provenientes de queijo do Pico obtido através do programa <i>Community Analysis Package 4 Version 4.0</i> . A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança dado pela análise de <i>clusters</i> . Neste programa, quanto mais próximo de 0, maior o grau de similaridade entre os isolados.	68
Figura 26	Culturas lácticas seleccionadas para futuros testes de fabrico de queijos modelo, obtidas a partir de 37 isolados de BAL do queijo do Pico e justificação da sua escolha.	69



ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1	Características gerais do queijo do Pico artesanal (Retirado de Associação de Produtores de Queijo do Pico, 1996).	20
Quadro 2	Identificação fenotípica por API 50CHL (bioMérieux S.A., França), grau de certeza da identificação (% ID) e o Índice T (T) das estirpes isoladas nas unidades de produção A, B e C do queijo do Pico em dois dias de maturação distintos.	27
Quadro 3	Enzimas utilizadas no <i>Kit</i> APIZYM (Bio-Merieux SA) e respectivos substratos.	29
Quadro 4	Lista de antibióticos utilizados no estudo da resistência aos mesmos por parte das BAL do queijo do Pico e respectivos diâmetros críticos (Adaptado de CLSI, 2010, 2011 e CSFM, 2010).	35
Quadro 5	Valores médios de absorvância (OD) em <i>MRS</i> inoculado com 37 isolados de BAL obtidos a partir de queijo do Pico, durante incubação aeróbia a 30 °C.	38
Quadro 6	Valores médios de pH em <i>MRS</i> inoculado com 37 isolados de BAL obtidos a partir de queijo do Pico, durante incubação aeróbia a 30 °C.	42
Quadro 7	Quantidade de substrato hidrolisado (nanomoles) através da utilização do <i>Kit</i> APIZYM (Bio-Merieux SA) por isolados do género <i>Lactobacillus</i> obtidos a partir de queijo do Pico.	50
Quadro 8	Quantidade de substrato hidrolisado (nanomoles) através da utilização do <i>Kit</i> APIZYM (Bio-Merieux SA) dos isolados do género <i>Lactococcus</i> obtidos a partir de queijo do Pico.	50
Quadro 9	Quantidade de substrato hidrolisado (nanomoles) através da utilização do <i>Kit</i> APIZYM (Bio-Merieux SA) dos isolados do género <i>Enterococcus</i> obtidos a partir de queijo do Pico.	51
Quadro 10	Quantidade de substrato hidrolisado (nanomoles) através da utilização do <i>Kit</i> APIZYM (Bio-Merieux SA) de isolados não identificados obtidos a partir de queijo do Pico.	51
Quadro 11	Médias \pm desvios padrão dos diâmetros dos halos de inibição (cm) obtidos no estudo da actividade antimicrobiana (técnica dos poços) em culturas inteiras e sobrenadantes de isolados do género <i>Lactobacillus</i> provenientes de queijo do Pico.	56
Quadro 12	Médias \pm desvios padrão dos diâmetros dos halos de inibição (cm) obtidos no estudo da actividade antimicrobiana (técnica dos poços) em culturas inteiras e sobrenadantes de isolados do género <i>Lactococcus</i> provenientes de queijo do Pico.	56



Quadro 13	Médias \pm desvios padrão dos diâmetros dos halos de inibição (cm) obtidos no estudo da actividade antimicrobiana (técnica dos poços) em culturas inteiras e sobrenadantes de isolados do género <i>Enterococcus</i> provenientes de queijo do Pico.	57
Quadro 14	Médias \pm desvios padrão dos diâmetros dos halos de inibição (cm) obtidos no estudo da actividade antimicrobiana (técnica dos poços) em culturas inteiras e sobrenadantes de isolados não identificados provenientes de queijo do Pico.	57
Quadro 15	Padrões de resistência/sensibilidade a 22 antibióticos de BAL isoladas a partir de queijo do Pico. S – sensível; I – sensibilidade intermédia e R – resistente.	61
Quadro 16	Parâmetros de OD ₀ (absorvância inicial), OD _{máx} (absorvância máxima), $\mu_{máx}$ (taxa específica de crescimento máximo), t-lag (duração da fase de latência) e t-d (tempo de duplicação) estimados segundo o modelo de Baranyi (<i>Software MicroFit Version 1.0.</i>) para 37 isolados de BAL provenientes de queijo do Pico.	67



RESUMO

O estudo da microflora natural dos queijos artesanais pode contribuir para evitar a perda da sua biodiversidade e o desaparecimento de uma variedade de lacticínios manufacturados por métodos tradicionais e permitir a obtenção de isolados com características tecnológicas promissoras que poderão ser utilizados como culturas adjuntas ou culturas de arranque. O queijo do Pico é um dos dois queijos açorianos com estatuto DOP. É um queijo artesanal produzido a partir de leite de vaca cru, que apesar de ser um produto com elevada procura no mercado local e muito apreciado pelos consumidores, atravessa presentemente dificuldades relacionadas com a necessidade de conciliar metodologias artesanais de produção com as exigências e a competitividade do mercado actual.

Um total de 37 isolados de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (18), *Lactobacillus plantarum* (2), *Lactococcus lactis* spp. *lactis* (4), *Enterococcus faecium* (3), *Enterococcus faecalis* (5) e isolados não identificados (5) do Queijo do Pico foram sujeitos a um conjunto de metodologias e análises, no que se refere às características bioactivas e tecnológicas (curvas de crescimento microbiano, acidificação, proteólise, lipólise, actividades enzimáticas, produção de diacetilo a partir de citrato, produção de exopolissacáridos, actividade antimicrobiana, capacidade de coexistência e resistência à bÍlis) e critérios de segurança (hemólise, DNase, gelatinase, produção de histamina e resistência a antibióticos) e teste de coexistência.

O estudo da cinética de crescimento e acidificação demonstrou a existência de 2 grupos distintos de isolados de lactobacilos. A totalidade dos isolados apresentou ausência de actividade lipolítica e apenas isolados de lactobacilos e lactococos demonstraram possuir capacidade proteolítica. Alguns isolados apresentaram actividades enzimáticas promissoras do ponto de vista da formação de aroma em queijos. Todos os géneros produziram diacetilo a partir de citrato. No entanto, nenhum isolado conseguiu produzir exopolissacáridos. O estudo da capacidade de inibição das BAL face a bactérias alvo de referência (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. perfringens*) demonstrou que as culturas inteiras apresentam capacidade inibitória para com estes agentes. No entanto, nenhum dos sobrenadantes neutralizados e sobrenadantes tratados com catalase mantiveram esse comportamento. No que concerne o estudo dos critérios de segurança, todos os isolados foram DNase e histidina descarboxilase negativos, embora alguns fossem gelatinase positivos e existisse mesmo um isolado β -hemolítico. Relativamente à resistência a antibióticos, constatou-se uma elevada percentagem de isolados resistentes aos 22 antibióticos testados. Contudo, o método usado não permite distinguir entre resistência inata e resistência adquirida, pelo que não deve ser excluída a sua utilização em produtos lácteos sem proceder a testagem genotípica. Nenhum dos isolados em estudo demonstrou resistência 0.3 % de bÍlis. Com base nos caracteres estudados, seleccionaram-se três isolados *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* (L1B1E3), *Lb. plantarum* (L1C1E6) e *Lc. lactis* ssp. *lactis* (L1C1R5) que são promissores como culturas de arranque para ensaios futuros em queijos modelo.

Este trabalho permite-nos concluir que, dentro deste grupo de 37 BAL, existem efectivamente algumas com potencial bioactivo e tecnológico para possível aplicação em queijos.

PALAVRAS CHAVE: Bactérias do ácido lático, queijo do Pico, potencial bioactivo, potencial tecnológico, critérios de segurança.



ABSTRACT

Pico cheese is an artisanal cheese made from raw cow's milk and one of two Azorean cheeses with PDO status. It is a product with high demand in the local market and greatly appreciated by the consumers. The need to reconcile artisanal methods of production with the competitiveness of the current market makes this cheese of great technological value. The study of the natural microflora of artisanal cheeses allows obtaining isolates with promising technological features that can be used as starter or non starter cultures.

The study of growth kinetics and acidifying activity revealed the existence of two distinct groups within the isolates of *Lactobacillus*. Proteolytic capacity was observed in strains of *Lactobacili* and *Lactococci*. No isolate showed lipolytic activity. Some of the studied isolates displayed enzymatic activities with potential impact on cheese flavour. All isolates were found to produce diacetyl from citrate. The *Lactobacili* isolates were the ones that registered the highest levels of diacetyl production. None of the isolates was found to produce exopolysaccharides. Antimicrobial activity relative to five indicator strains (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. perfringens*) showed that only whole cultures have inhibitory effects. Neutralized supernatants and supernatants treated with catalase showed no antimicrobial capacity. DNase and histamine production were absent among the studied LAB. Some of the isolates were positive for gelatinase production and one isolate displayed β -hemolysis. A high percentage of resistance to the 22 antibiotics tested was observed among the isolates studied. However, the used methodology does not allow to distinguish between innate and acquired resistance. Thus, their utilization in dairy products should not be excluded before carrying out genetic testing for resistance markers. None of the isolates under study showed resistance to 0.3 % bile. On the basis of the studied characteristics, three promising isolates were selected for future testing in model cheeses *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* (L1B1E3), *Lb. plantarum* (L1C1E6) e *Lc. lactis* ssp. *lactis* (L1C1R5).

The present work leads to the conclusion that, within the group of 37 LAB under study, some have bioactive and technological potential as cheese starters.

KEYWORDS: Lactic acid bacteria, Pico cheese, bioactive potential, technological potential, virulence factors.



1. INTRODUÇÃO

As bactérias do ácido láctico (BAL) apresentam grande importância económica, uma vez que, de forma natural ou adicionadas intencionalmente, desempenham um papel importante quer no controlo do processo fermentativo na produção de alimentos fermentados, quer na sua utilização como probióticos na saúde humana e animal (Konings *et al.*, 2000). As suas propriedades metabólicas não apenas contribuem para o desenvolvimento de características sensoriais desejáveis como também permitem conservar ou aumentar o valor nutritivo da matéria-prima (Cogan *et al.*, 2007).

Estudos recentes evidenciam a diversidade das BAL em produtos lácteos tradicionais, assim como a sua influência nas características sensoriais do produto final (Garabal, 2007; Randazzo *et al.*, 2009; Kongo *et al.*, 2007).

De uma forma geral, os lacticínios tradicionais encontram-se ameaçados enquanto reservatórios de biodiversidade microbiana (Licitra, 2010). O estudo da sua microflora natural pode por um lado ajudar a evitar a perda desta biodiversidade e o desaparecimento dum amplo leque de lacticínios manufacturados por métodos tradicionais, por outro permitir a obtenção de isolados com características tecnológicas promissoras que poderão ser utilizados como culturas de arranque ou culturas adjuntas (Dapkevicius, 2007).

O queijo do Pico é um dos dois queijos açorianos com estatuto DOP. É um queijo artesanal produzido a partir de leite de vaca cru, que apesar de ser um produto com elevada procura no mercado local e muito apreciado pelos consumidores, atravessa presentemente dificuldades relacionadas com a necessidade de conciliar metodologias artesanais de produção com as exigências e a competitividade do mercado actual. Tratando-se dum elemento emblemático da cultura gastronómica açoriana, é de máxima importância delinear estratégias que garantam a sua conservação e melhoria (Dapkevicius, 2007).

Neste trabalho pretendeu-se (1) estudar características das BAL do queijo do Pico com importância em termos bioactivos e tecnológicos, nomeadamente curvas de crescimento microbiano, acidificação, proteólise, lipólise, actividades enzimáticas, produção de diacetilo a partir de citrato, produção de exopolissacáridos, actividade antimicrobiana, teste de coexistência e resistência à bÍlis; (2) estudar critérios de segurança nas BAL do queijo do Pico, respectivamente hemólise, DNase, gelatinase, produção de histamina e resistência a antibióticos; 3) contribuir para a preservação e melhoria da qualidade do Queijo do Pico; 4) preservar a biodiversidade microbiana



(BAL) deste queijo tradicional açoriano, contemplando a sua utilização como cultura(s) de arranque.

A estrutura global da tese divide-se em: Revisão Bibliográfica, na qual se faz uma discussão actual da temática escolhida; Materiais e Métodos, em que se apresentam as metodologias aplicadas no trabalho experimental, com o intuito de obter informações que permitam caracterizar os isolados em estudo e atingir os objectivos propostos; apresentação dos Resultados obtidos na aplicação das metodologias com a sua Discussão e Conclusões face a outros estudos publicados nesta área.



2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Caracterização geral das bactérias do ácido lático (BAL)

O termo "bactérias do ácido lático" descreve um grupo bastante diverso de microrganismos cuja principal característica é a produção de ácido lático (Axelsson, 2004).

As BAL são bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, catalase e oxidase negativas, desprovidas de citocromos, fastidiosas, anaeróbias tolerantes e tolerantes aos ácidos, que se apresentam sob a forma de cocos ou bacilos. Através da fermentação de hidratos de carbono, produzem ácido lático como produto principal ou único do seu metabolismo e, como carecem de sistemas de transporte de electrões funcionais ligados aos citocromos, obtêm a sua energia através da fermentação, mais precisamente por fosforilação ao nível do substrato (Axelsson, 2004; Mayo *et al.*, 2010). São também caracterizadas por ausência de mobilidade, excepto no caso do *Lactobacillus agilis* e mais recentemente no caso das espécies *Lactobacillus ghanensis* (Nielsen *et al.*, 2007) e *Lactobacillus capillatus* (Chao *et al.*, 2008).

Segundo Axelsson (2004) a característica chave deste grupo é a incapacidade de sintetizar grupos porfirínicos (*e.g.* heme). A catalase é uma enzima que degrada o peróxido de hidrogénio (H₂O₂). Para realizar esta função necessita de um grupo porfirínico, o qual as BAL são incapazes de sintetizar pelo que são catalase negativas. Contudo, Holzapfel *et al.* (2001) admitem haver excepções, nomeadamente em meios de cultura contendo hematina ou compostos relacionados, em que algumas BAL são capazes de produzir uma enzima denominada pseudocatalase ou até mesmo citocromos e, nalguns casos, constituir uma cadeia funcional de transporte de electrões (Engesser & Hammes, 1994).

As BAL empregam duas vias fermentativas: (1) Via homofermentativa ou via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) em que o ácido lático é o produto primário; (2) Via heterofermentativa ou via hexose-monofosfato ou via 6P-gluconato/fosfocetolase em que são produzidos ácido lático, CO₂, ácido acético e etanol (Kleerebezem & Hugenholtz, 2003).

Devido às suas capacidades biossintéticas limitadas (Klaenhammer *et al.*, 2005) e às suas elevadas exigências em termos de fontes de carbono e nitrogénio (Axelsson, 2004), as BAL encontram-se associadas a *habitats* ricos em nutrientes, como produtos alimentares, incluindo leite e produtos lácteos, vegetais, carne e seus derivados, os quais contribuem, muitas vezes, para o aroma, textura, valor nutritivo e para a vida de prateleira mais prolongada que os produtos fermentados apresentam em relação às suas matérias-primas (Leroy & De Vuyst, 2004). Dada a sua vasta utilização em produtos fermentados tradicionais, as BAL possuem o estatuto GRAS, ou seja,



Generally Regarded As Safe concedido pela *American Food and Drug Agency* (FDA) (Ammor *et al.*, 2007). Na Comunidade Europeia o estatuto QPS, *Qualified Presumption of Safety* concedido pela *European Food Safety Authority* (EFSA).

Ao longo da sua evolução, os seres humanos desenvolveram uma relação particularmente íntima com as bactérias do ácido láctico (Schroeter & Klaenhammer, 2009). Tendo em conta a diversidade de meios em que se podem desenvolver, algumas fazem parte integrante da microflora residente dos tractos respiratório, intestinal e genital do Homem e de outros animais (Eckburg *et al.*, 2005). Nestes ambientes as BAL são consideradas componentes essenciais na promoção de saúde, nomeadamente através de imunomodulação, integridade intestinal e resistência a patógenos (Vaughan *et al.*, 2005).

Orla-Jensen em 1919 elaborou a primeira classificação das BAL, agrupando-as nos géneros *Betabacterium*, *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, *Streptococcus*, *Betacoccus*, *Tetracoccus* e *Microbacterium*. Entretanto, com as sucessivas reestruturações na taxonomia das BAL ao longo do tempo, desta classificação, apenas persiste actualmente, o género *Streptococcus* (Axelsson, 2004). De acordo com a taxonomia actual as BAL pertencem ao Filo *Firmicutes*, à Classe *Bacillus*, à Ordem *Lactobacilae* e às Famílias *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* e *Streptococcaceae* (Wright & Axelsson, 2012).

Do ponto de vista da tecnologia alimentar os principais géneros são: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Axelsson, 2004; Holzapfel *et al.*, 2001; Wright & Axelsson, 2012). O género *Bifidobacterium*, embora muitas vezes inserido neste contexto, não se encontra filogeneticamente relacionado e possui um modo de fermentação único (Axelsson, 2004).

Os critérios utilizados na primeira classificação taxonómica das BAL foram essencialmente de origem fenotípica, nomeadamente: (i) morfológicos, das células (forma, endósporos, flagelos, reacção de Gram) e das colónias (cor, dimensões, forma); (ii) bioquímicos (modo de fermentação da glucose, configuração do ácido láctico produzido) e (iii) fisiológicos (crescimento a diferentes temperaturas, capacidade de crescer em elevadas concentrações de sal, e tolerância a pH ácido e alcalino) (Axelsson, 2004). Embora estes critérios ainda sejam utilizados actualmente, surgiram novas metodologias na classificação das BAL, tais como: análise de perfis metabólicos e enzimáticos, tipagem fágica e bacteriocínica, serotipagem, análise de perfis de ácidos gordos ou de perfis de proteínas celulares totais e análise de constituintes da parede celular (Axelsson, 2004).



A taxonomia actual das BAL tem por base extensos trabalhos de determinação de sequências de RNA e DNA ribossómico, particularmente do rRNA 16S (Holzapfel *et al.*, 2001; Makarova & Koonin, 2007; Pfeiler & Klaenhammer, 2007; Schroeter & Klaenhammer, 2009). As BAL típicas como *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* apresentam um teor molar de G + C no DNA inferior a 50 % e como tal, pertencem ao ramo *Clostridium*, enquanto que o ramo *Actinomycetes*, cujo teor molar de G + C é superior a 50 % inclui espécies do género *Bifidobacterium* e outros géneros também importantes na indústria alimentar, como por exemplo *Propionibacterium* (Schleifer & Ludwig, 1995).

2.2. Potencial bioactivo e tecnológico das BAL

A busca por alimentos com propriedades bioactivas valiosas tem incentivado numerosos estudos com BAL. Alimentos funcionais que oferecem benefícios de saúde e sensoriais, além da sua composição nutricional, são cada vez mais importantes para a indústria alimentar (De Vuyst, 2000). Assim sendo, tem ocorrido um grande avanço no desenvolvimento dos chamados produtos probióticos, prebióticos e simbióticos.

Os probióticos são definidos como organismos não patogénicos que, quando ingeridos em determinadas concentrações, exercem uma influência positiva na fisiologia e saúde do hospedeiro (Ouwehand *et al.*, 2002).

A maioria dos probióticos insere-se no grupo das BAL e são normalmente consumidos na forma de iogurtes, leites fermentados ou outros alimentos fermentados. Alguns dos efeitos benéficos do seu consumo são: (1) melhoria da saúde intestinal; (2) melhoria do sistema imunitário; (3) redução dos sintomas de intolerância à lactose, diminuindo a prevalência da alergia em indivíduos susceptíveis, e (4) redução do risco de determinados cancros (Parvez *et al.*, 2006). De acordo com Parvez *et al.* (2006) os mecanismos pelos quais os probióticos exercem os seus efeitos são largamente desconhecidos, mas podem envolver a modificação do pH do intestino e a produção de compostos antimicrobianos.

A utilização das BAL como probióticos obedece a critérios, nomeadamente: (1) exercerem um efeito benéfico sobre o hospedeiro; (2) permanecerem viáveis durante a vida de prateleira do produto; (3) suportarem o trânsito gastrointestinal; (4) aderirem à mucosa intestinal e colonizarem o lúmen do tracto; (5) produzirem substâncias antimicrobianas e (6) estabilizarem a microflora intestinal e estarem associadas a benefícios para a saúde (Parvez *et al.*, 2006). Dentro das BAL, os géneros mais estudados e utilizados como probióticos são *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Saxelin *et al.* 2005).



Segundo Erkkilä & Petäjä (2000) as BAL para actuarem como probióticos têm de ser capazes de sobreviver nas condições ácidas do estômago e resistir aos ácidos biliares no início do intestino delgado. Os sais biliares são sintetizados no fígado a partir do colesterol, armazenados na vesícula biliar e libertados no intestino delgado. A síntese destes compostos é crítica para os microrganismos, uma vez que a sua membrana celular é composta por lípidos e ácidos gordos, e os sais biliares têm um efeito detergente sobre os mesmos. Contudo, alguns microrganismos são capazes de hidrolisar sais biliares através da enzima hidrolase de sais biliares diminuindo a sua solubilidade e como tal, diminuindo o seu efeito de detergente (Erkkilä & Petäjä, 2000). De acordo com Mourad & Nour- Eddine (2006) a resistência aos sais biliares pode variar entre as espécies de BAL e entre as estirpes da mesma espécie.

O leite e os produtos lácteos têm um profundo impacto na saúde humana porque não só conferem benefícios fisiológicos (fornecimento de vitaminas, minerais e macronutrientes essenciais) como também contribuem com péptidos biactivos (Hebert *et al.*, 2010). Estes compostos encontram-se nas sequências primárias das caseínas, num estado latente, necessitando de proteólise enzimática para a sua libertação (Hebert *et al.*, 2010; Silva & Malcata, 2005). O sistema proteolítico das BAL usadas como culturas de arranque no fabrico de iogurtes, leites fermentados e queijos contribui para a libertação dos péptidos bioactivos ou seus precursores (Herreros *et al.*, 2003). Os péptidos bioactivos podem ser libertados durante o processamento alimentar ou durante a digestão gastrointestinal (Hayes *et al.*, 2007; Korhonen & Pihlanto, 2006; Silva & Malcata, 2005). Desempenham ainda importantes funções fisiológicas no sistema cardiovascular (função antitrombótica e antihipertensiva), no sistema nervoso (função agonista e antagonista), no sistema imunitário (função imunomodulatória e antimicrobiana) e no sistema digestivo (melhoramento da absorção dos minerais) (Hayes *et al.*, 2007; Korhonen & Pihlanto, 2006; Silva & Malcata, 2005).

No fabrico do queijo as BAL desempenham diferentes papéis (Settani & Moschetti, 2010). Algumas espécies, designadas por culturas de arranque, participam no processo fermentativo com a degradação da glucose e conseqüente produção de ácidos orgânicos, maioritariamente ácido láctico, enquanto outras, designadas por culturas adjuntas, são responsáveis pelo processo de maturação (Beresford *et al.*, 2001; Settani & Moschetti, 2010).

As culturas de arranque utilizadas nos produtos lácteos podem ser divididas em mesofílicas e termofílicas consoante a temperatura óptima de crescimento. As culturas mesofílicas crescem a temperaturas entre 10 °C – 40 °C, com um óptimo por volta dos 30 °C e são usadas na produção de muitas variedades de queijos, leites fermentados e manteigas. As culturas termofílicas com um óptimo de crescimento entre 40 °C – 50 °C são utilizadas em iogurtes e em variedades de queijos



produzidos a altas temperaturas (e.g. Emmental e Gruyère) (Mäyra-Mäkinen & Bigret, 2004). Estas são normalmente constituídas por diferentes espécies, por uma ou várias estirpes da mesma espécie, ou ainda por uma mistura indefinida de estirpes que no fabrico do queijo são adicionadas inicialmente ou então fazem parte da microflora natural do leite, como é o caso de muitos queijos artesanais produzidos com leite cru (Beresford *et al.*, 2001; Mäyra-Mäkinen & Bigret, 2004). Os géneros mais aplicados em culturas de arranque são *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (Beresford *et al.*, 2001; De Vuyst, 2000).

A maioria das culturas de arranque mesofílicas inclui espécies como *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, sendo estas primariamente usadas como produtoras de ácido (Beresford *et al.*, 2001). As termofílicas incluem espécies dos géneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*. As espécies *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum*, com uma temperatura óptima de crescimento baixa, são consideradas contaminantes naturais do queijo com importância na maturação. A espécie *Lactobacillus casei* é considerada produtora de diacetilo a partir do citrato, pelo que poderá ter impacto sobre o aroma dos produtos lácteos (Mäyra-Mäkinen & Bigret, 2004).

As culturas adjuntas, usualmente designadas por flora secundária, são compostas por uma mistura de bactérias, bolores e leveduras. São adicionadas na forma de culturas definidas, mas em muitas situações são compostas por microrganismos dos ingredientes ou do ambiente de fabrico do queijo (Beresford *et al.*, 2001). Os géneros mais comuns são *Lactobacillus* e *Pediococcus* (Beresford *et al.*, 2001; Settani & Moschetti, 2010). No género *Lactobacillus* as espécies mais comuns em queijo são *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* e *Lb. curvatus*. Por seu turno, do género *Pediococcus* são as espécies *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* (Beresford *et al.*, 2001).

De acordo com Mäyra-Mäkinen & Bigret (2004) as culturas de arranque têm determinadas funções que são de vital importância no fabrico e maturação do queijo, influenciando de forma determinante as qualidades organolépticas do produto final: (1) fermentação dos açúcares, que origina um decréscimo do pH, importante quer no processo de cura, quer na redução ou prevenção do crescimento de microflora contaminante; (2) hidrólise das proteínas, responsável pela textura e, em parte, pelo sabor do queijo; (3) síntese de compostos aromáticos; (4) síntese de agentes texturantes, que podem influenciar a consistência do produto e (5) produção de compostos inibidores.

O processo de fabrico do queijo desempenha um papel importante na definição das condições ambientais finais do produto. O ambiente é altamente selectivo e tem grande impacto no crescimento e sobrevivência dos microrganismos durante o processo de maturação. Os factores que



controlam o crescimento dos microrganismos são: a água, o sal, o pH, a presença de ácidos orgânicos e nitratos, o potencial redox e a temperatura (Beresford *et al.*, 2001; Mäyra-Mäkinen & Bigret, 2004).

A produção de ácido durante a fermentação do leite no fabrico de queijo a uma taxa de acidificação correcta é crucial para produção de queijo de qualidade. A taxa de acidificação depende essencialmente da quantidade de cultura de arranque e da temperatura. Uma rápida acidificação não só previne o crescimento de microrganismos indesejáveis, como é essencial para o aroma, textura e sabor do produto final (De Vuyst, 2000). O crescimento de microrganismos indesejáveis pode levar à produção de gás e *off-flavours* (Fox & McSweeney, 2004). Para Beresford *et al.* (2001) as culturas de arranque devem ser capazes de produzir ácido suficiente para reduzir o pH do leite para 5.3 em 6 h a 30 °C – 37 °C. De acordo com estes investigadores, normalmente o pH da coalhada de queijos de pasta dura varia entre 5.0 - 5.3 e em queijos de pasta mole é de cerca de 4.6.

Segundo Fox & McSweeney (2004) diversos aspectos relacionados com a produção de ácido afectam a produção de queijo, nomeadamente: a força do coalho, a desnaturação e retenção do coalho na coalhada, a sinérese do gel e o crescimento de microrganismos patogénicos.

McSweeney & Sousa (2000) consideram que a proteólise é o evento mais complexo e mais importante em grande parte das variedades de queijo, em particular nos de pasta dura e semi-dura (Smit *et al.*, 2005). Na proteólise, a degradação das caseínas em pequenos péptidos e aminoácidos livres dá-se pela acção das proteases e das peptidases, com posterior formação de aromas específicos pela conversão dos aminoácidos livres em álcoois, aldeídos, ácidos, ésteres e compostos sulfurosos (Smit *et al.*, 2005). As enzimas proteolíticas envolvidas neste processo têm diferentes origens, nomeadamente: enzimas naturalmente presentes no leite como a plasmina e a catepsina D, enzimas dos coagulantes do leite, enzimas de bactérias ácido lácticas e enzimas do tracto digestivo (Mayo *et al.*, 2010).

Em geral, as BAL contribuem pouco para a lipólise. No entanto, deste evento formam-se ácidos gordos livres, os quais podem ser precursores de compostos aromáticos como as cetonas, os álcoois, os ésteres e as lactonas, particularmente importantes em queijos de pasta mole como Camembert e Roquefort (Smit *et al.*, 2005). Segundo McSweeney & Sousa (2000) a especificidade da enzima envolvida na lipólise e o pH do queijo influenciam determinantemente o seu aroma.

Algumas BAL possuem proteases associadas à parede celular que preferencialmente hidrolisam a caseína. Os péptidos da caseína são hidrolisados em pequenos péptidos e aminoácidos livres por peptidases do interior das células (Herrerros *et al.*, 2003).



No grupo das fosfatases, a fosfatase ácida é uma enzima essencial na hidrólise de fosfopéptidos (Fox & McSweeny, 2004).

Nas oxidases a β -galactosidase é a principal enzima na transformação da lactose em ácido láctico por lactobacilos homofermentativos e a α -galactosidase hidrolisa os polissacáridos que contêm galactose, deste modo Herreros *et al.* (2003) sugerem que as BAL que a possuam sejam usadas como probióticos.

As lipases e as esterases influenciam o desenvolvimento do *flavour* do queijo (Fox & McSweeny, 2004). As esterases actuam preferencialmente sobre os ácidos gordos C4 e C6, mas também possuem alguma actividade sobre os C12. A actividade de ambas é dependente da espécie e da estirpe. Como tal, é necessário escolher com precaução as culturas de arranque produtoras de enzimas que aceleram o processo de maturação do queijo (Herreros *et al.*, 2003).

Para Smit *et al.* (2005) o catabolismo dos aminoácidos das BAL é considerado como uma das principais vias para a produção de compostos aromáticos nos produtos lácteos. Algumas BAL têm a capacidade de metabolizar o citrato, convertendo-o em oxaloacetato e em seguida em piruvato e CO₂. A fermentação do citrato pelas BAL leva à produção de compostos como diacetilo, acetato, acetoina e 2,3-butanodiol, os quais possuem propriedades aromáticas, e como tal, são responsáveis pelo aroma típico de muitos produtos lácteos (Mayo *et al.*, 2010; McSweeny & Sousa, 2000).

Um determinado grupo de BAL produzem polissacáridos extracelulares ou exopolissacáridos. Estes podem ser de dois tipos: homopolissacáridos, compostos apenas de frutose ou glicose, ou heteropolissacáridos, constituídos por unidades repetidas de diferentes açúcares, nomeadamente glicose, galactose, frutose e ramnose (De Vuyst *et al.*, 2001).

As propriedades sensoriais dos exopolissacáridos estão bem estabelecidas e existem evidências dos seus benefícios para a saúde (Welman & Maddox, 2003). De acordo com Jolly *et al.* (2002) estão envolvidos numa grande variedade de funções biológicas, incluindo a prevenção da dessecação, a protecção contra stresses ambientais, a aderência a diferentes superfícies, etc. Isolados produtores de exopolissacáridos foram testados com sucesso em queijo Mozzarella magro com o objectivo de haver um aumento da humidade e melhoria no rendimento (Perry *et al.*, 1997). No entanto, os exopolissacáridos são utilizados essencialmente na melhoria da reologia, da textura e do sabor de produtos lácteos fermentados, como os iogurtes (Welman & Maddox, 2003).

A procura de produtos com baixos teores de matéria gorda e açúcares e baixos níveis de aditivos faz com que a produção de exopolissacáridos ao nível industrial seja uma alternativa viável (Jolly *et al.*, 2002).



A flora microbiana do queijo, particularmente a proveniente de leite cru, é bastante complexa e é inevitável a ocorrência de interacções entre os microrganismos que a compõem (Beresford *et al.*, 2001). As BAL podem inibir outras bactérias quer através da competição por nutrientes quer através da produção de diversos tipos de substâncias antimicrobianas (Ouwehand & Vesterlund, 2004).

Há registo de isolados do género *Enterococcus* inibidos devido à acção de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarum* como resultado de competição por nutrientes (Jimeno *et al.*, 1995).

A protecção dos alimentos por parte das BAL de bolores e microrganismos patogénicos está associada à produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogénio (H_2O_2), dióxido de carbono (CO_2), diacetilo, substâncias antimicrobianas com baixo peso molecular e bacteriocinas (Ouwehand & Vesterlund, 2004).

A fermentação das BAL é caracterizada pela acumulação de ácidos orgânicos (principalmente ácido láctico, ácido acético e ácido propiónico) e pela redução do pH. Os níveis e tipos de ácidos orgânicos produzidos durante este processo dependem da espécie, da composição da cultura e das condições de crescimento (Lindgren & Dobrogosz, 1990). Os ácidos orgânicos têm um efeito antimicrobiano através da redução do pH intracelular. Esta alteração tem um efeito directo na permeabilidade da membrana celular bloqueando o sistema de transporte de electrões. Os ácidos láctico, acético e propiónico são capazes de passar através da membrana celular de microrganismos no seu estado não dissociado e dissociam-se no interior da célula, produzindo iões H^+ que diminuem o seu pH. Por seu turno, as células reagem eliminando os protões tentando manter o pH constante. Este mecanismo reduz o crescimento celular microbiano porque exige um maior gasto energético (Kashket, 1987).

O efeito antimicrobiano do ácido láctico e acético sobre o *Staphylococcus aureus* foi estudado inicialmente por Kao & Frasier em 1966. Por seu turno, Adams & Hall em 1988 estudaram esse mesmo efeito mas para o caso da *Escherichia coli* e da *Salmonella*. Para De Vuyst & Leroy (2007) a produção destes ácidos pelas BAL é considerado o aspecto mais importante em termos de actividade antimicrobiana.

O peróxido de hidrogénio é produzido pelas BAL na presença de oxigénio. De acordo com Kong & Davison (1980) o seu efeito antimicrobiano resulta quer da oxidação de grupos sulfidrílo causando a desnaturação de diversas enzimas, quer da peroxidação de lípidos da membrana, aumentando assim a sua permeabilidade. Segundo Byczkowski & Gessner (1988) pode também ser um precursor para a produção de radicais livres capazes de danificar o DNA.



No caso particular do leite cru, o peróxido de hidrogénio activa o sistema da lactoperoxidase produzindo compostos inibidores de um vasto leque de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Kussendrager & Van Hooijdonk, 2000).

O dióxido de carbono é produzido maioritariamente por BAL heterofermentativas, quer a partir do malato e do citrato, quer através da descarboxilação de aminoácidos. Embora o seu mecanismo antimicrobiano seja pouco conhecido, sabe-se que é responsável por criar um ambiente anaeróbico que inibe descarboxilações enzimáticas e por causar disfunções na permeabilidade da membrana (Eklund, 1984). Devido à sua acção antimicrobiana, o CO₂ é muito usado como componente principal de embalagens com atmosfera modificada. Há registos que demonstram que as bactérias Gram-negativas são mais sensíveis ao CO₂ do que as Gram-positivas em atmosfera modificada (Singh *et al.*, 2011).

O diacetilo é produzido pelas BAL através da fermentação do citrato. Este composto tem um efeito inibidor no crescimento de bactérias Gram-negativas, por reagir com a proteína de ligação da arginina, afectando a sua utilização. Jay (1982) demonstrou que o diacetilo é mais eficaz contra bactérias Gram-negativas, bolores e leveduras do que contra bactérias Gram-positivas.

Algumas substâncias com baixo peso molecular como a reuterina, a reuterociclina e o ácido piroglutâmico demonstraram possuir actividade antimicrobiana contra um vasto leque de bactérias (Ouwehand & Vesterlund, 2004). A reuterina é um composto neutro e solúvel em água, produzido pelo *Lactobacillus reuteri*, que é capaz de inibir o crescimento de bactérias dos géneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Clostridium* e *Staphylococcus* (Axelsson *et al.*, 1989; Talarico & Dobrogosz, 1989). A reuterociclina é um composto com carga negativa e altamente hidrofóbico, igualmente produzido pelo *Lactobacillus reuteri*, cujo espectro de inibição inclui bactérias Gram-positivas (Talarico & Dobrogosz, 1989). As bactérias Gram-negativas e as leveduras não são sensíveis a este composto (Gänzle *et al.*, 2000). O ácido piroglutâmico produzido por *Lactobacillus casei* ssp. *casei*, *Lactobacillus casei* ssp. *pseudoplantarum* e *Streptococcus bovis* inibe as espécies *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida* e *Pseudomonas fluorescens* (Ouwehand & Vesterlund, 2004).

As bacteriocinas são compostos proteicos ou peptídicos sintetizados por ribossomas bacterianos. Podem ter um efeito bacteriostático, quando inibem o crescimento de outra bactéria ou um efeito bactericida, quando causam a morte de outra bactéria (Ouwehand & Vesterlund, 2004).

As BAL produzem 3 grandes classes de bacteriocinas: Classe I – lantibióticos (*e.g.* nisina), Classe II - pequenos péptidos termoestáveis (*e.g.* enterocina P) e Classe III – grandes proteínas termolábeis (*e.g.* helveticina J). Existe uma 4^a classe correspondente às bacteriocinas com uma



estrutura complexa, no entanto esta não é aceite por todos os autores (Ouwehand & Vesterlund, 2004). As classes I e II são consideradas as principais por Ouwehand & Vesterlund (2004) devido à sua abundância e aplicabilidade em termos comerciais.

Segundo De Vuyst & Leroy (2007) as bacteriocinas produzidas pelas BAL podem ser utilizadas como aditivos alimentares. A sua adição aos alimentos pode ser de forma directa ou então haver produção *in situ* pela cultura de arranque ou pela co-cultura (Leroy & De Vuyst, 2004).

O espectro de actividade antimicrobiana das bacteriocinas produzidas pelas BAL inclui essencialmente bactérias Gram-positivas como a *Listeria monocytogenes* e o *Staphylococcus aureus*. No entanto também já foi demonstrado a sua acção contra bactérias Gram-negativas como a *Escherichia coli* e a *Salmonella* spp. (De Vuyst & Leroy, 2007).

2.3. Critérios de segurança das BAL

A segurança é um aspecto importante a ter em conta na escolha de culturas de arranque. A *European Food Safety Authority* (EFSA) propôs uma lista de avaliação de microrganismos utilizados na cadeia alimentar, semelhante à já proposta pela *American Food and Drug Agency* (FDA), com a atribuição do estatuto *Qualified Presumption of Safety* (QPS). O estabelecimento do estatuto QPS assenta em 4 pilares (EFSA, 2005): 1) taxonomia – nível taxonómico do grupo onde se inserem os microrganismos em avaliação para a obtenção do estatuto QPS; 2) familiaridade – se sabe-se o suficiente acerca do grupo de microrganismos em causa para justificar uma decisão sobre a sua segurança; 3) patogenicidade – se o grupo de microrganismos possui patógenos. Caso existam, o que se sabe acerca dos seus factores de virulência ou potencial tóxico para que sejam excluídas as estirpes patogénicas e 4) finalidade – se os microrganismos entram na cadeia alimentar ou se são usados na produção de outros produtos. De acordo com estes critérios (EFSA, 2011) os géneros *Lactobacillus* e *Lactococcus* têm estatuto QPS, ao contrário do género *Enterococcus* devido ao conhecimento científico actual sobre a existência de estirpes virulentas deste género. Para os *Enterococcus*, a decisão sobre a sua segurança é feita caso a caso, com base na pesquisa de factores de virulência para cada estirpe.

A incidência de factores de virulência entre isolados de enterococos com origem alimentar tem sido motivo de estudo por diversos autores, tendo os mesmos confirmado que essa incidência é dependente da estirpe (Franz *et al.*, 2001; Gupta & Malik, 2007; Semedo *et al.*, 2003). No entanto, de salientar que o conhecimento é limitado no que diz respeito às combinações dos factores de virulência que são decisivos para o potencial patogénico das mesmas (Franz *et al.*, 2003).



Um dos factores de virulência bastante estudado em BAL é a produção de β -hemolisina ou citolisina, uma toxina celular responsável pela destruição de eritrócitos através de lise celular, codificada pelo gene *Cyl* (Franz *et al.*, 2003). A produção de citolisina pode ser considerada uma estratégia bacteriana de invasão do sistema imunitário do hospedeiro pela destruição das células do mesmo.

Giraffa (2003) considera que a ausência de actividade hemolítica deve ser um critério de selecção para culturas de arranque em produtos lácteos. Contudo, para Franz *et al.* (2001) a ausência de actividade hemolítica em enterococos isolados de produtos alimentares não significa que estes não sejam virulentos.

Outro factor de virulência é a produção da enzima DNase. Esta enzima extracelular tem a capacidade de digerir DNA. O seu papel nas infecções por enterococos ainda não está bem definido (Elsner *et al.*, 2000). No entanto, um estudo desenvolvido por Semedo *et al.* (2003) sobre factores de virulência neste género detectou a presença desta enzima em isolados de origem alimentar. Estes autores consideraram que pelo facto de ter sido detectada apenas em isolados de origem alimentar e não em isolados de origem clínica, que não constituía um factor de virulência tão grave quanto outros avaliados no mesmo estudo.

A gelatinase, codificada pelo gene *gelE*, é uma endopeptidase extracelular de zinco com capacidade de hidrolisar várias substâncias, como a gelatina, o colagénio e a caseína (Jett *et al.*, 1994). Singh *et al.* (1998) demonstraram que a produção de gelatinase aumenta a patogenicidade em modelos animais. Esta enzima danifica os tecidos do hospedeiro e assim permite a migração e proliferação bacteriana. Por este motivo, tem sido pesquisada em isolados destinados a culturas de arranque.

As aminas, incluindo as aminas biogénicas, são produzidas no queijo por descarboxilação enzimática de aminoácidos livres. Na maioria dos queijos as principais aminas são a tiramina e a histamina produzidas pela descarboxilação da tirosina e da histidina respectivamente. A concentração de aminas no queijo depende do tipo de queijo e da sua microflora (McSweeney & Sousa, 2000). Os queijos produzidos com leite cru contêm maior concentração de aminas biogénicas comparativamente com os queijos produzidos com leite pasteurizado (Beuvier & Buchin, 2004). O aceleramento do tempo de cura é também um factor a ter em conta, uma vez que, sendo este um processo que é acompanhado de uma intensificação da proteólise, torna o queijo mais suscetível à formação de aminas (Joosten & Northolt, 1989). São poucos os casos de intoxicação por histamina em queijos que estão registados na literatura. No entanto, o consumo de alimentos



com elevadas concentrações de histamina pode causar sintomas tais como: irritação cutânea, dor de cabeça, náuseas, hipo ou hipertensão e palitação cardíaca (O'Brien *et al.*, 2004).

Ao longo dos anos tem-se verificado um uso indevido e generalizado dos antibióticos contra as mais diversas infecções bacterianas. Esta prática tem possibilitado às bactérias adaptarem-se e desenvolverem resistências a muitos deles (Mathur & Singh, 2005). As BAL são um exemplo disso, não só adquiriram resistência a determinados antibióticos como transmitiram essa resistência através de genes a bactérias patogénicas (Ammor *et al.*, 2007; Mathur & Singh, 2005; Teuber *et al.*, 1999).

A resistência aos antibióticos pode ser de dois tipos: intrínseca ou inata e extrínseca. Na resistência intrínseca ou inata os microrganismos são resistentes a alguns agentes antimicrobianos, sem terem sido previamente expostos a estes agentes nem possuíam susceptibilidade prévia conhecida. Os genes responsáveis por esta capacidade encontram-se localizados em elementos genéticos de baixa mobilidade. Pelo contrário, no que diz respeito à resistência extrínseca, esta foi adquirida através de mutações ou da aquisição de elementos genéticos móveis extracromossomais (plasmídeos) (Doyle, 2006).

Estudos de Ammor *et al.* (2007), Mathur & Singh (2005) e Teuber *et al.* (1999) demonstraram que os géneros *Lactobacillus* e *Lactococcus* possuem uma resistência inata à vancomicina. Nieto-Arribas *et al.* (2011) provaram que os *Enterococcus* são sensíveis a este antibiótico.

2.4. Biodiversidade de BAL em produtos lácteos tradicionais

Os queijos artesanais são produzidos com determinadas características, obedecendo a um padrão rigoroso de qualidade, aos quais foi atribuída uma Denominação de Origem Protegida (DOP), certificada por um selo de garantia da genuinidade do produto.

Em Portugal existem actualmente os seguintes queijos com Denominação de Origem Protegida (DOP): Queijo de Azeitão, Queijo de Cabra Transmontano, Queijo de Évora, Queijo de Nisa, Queijo do Pico, Queijo Rabaçal, Queijo São Jorge, Queijo Serpa, Queijo Serra da Estrela, Queijo Terrincho, Queijos da Beira Baixa e Requeijão Serra da Estrela (Calado & Soeiro, 2012). Destes, apenas os dois queijos açorianos (do Pico e São Jorge) são produzidos exclusivamente com leite de vaca.

De acordo com Dolci *et al.* (2008a) a microflora autóctone dos queijos artesanais desempenha um papel crítico e crucial no desenvolvimento das características únicas de cada variedade. A dinâmica e comportamento destas culturas ao longo de todo o processo de fabrico do queijo contribuem para um sabor e aroma típicos. Para além das referenciadas ao longo do texto, podemos



mencionar a resistência a ataque de fagos, capacidade de produzir compostos semelhantes a bacteriocinas e diversidade microbiana que também têm uma influência nas características do produto final (Fortina *et al.*, 2003).

Segundo Fortina *et al.* (2003) o estudo desta microflora é importante porque permite evitar a perda da biodiversidade microbiana e, conseqüentemente, a perda de uma vasta gama de queijos produzidos por métodos diferentes, cujas características típicas dependem de tradições locais e regionais. Por outro lado, também permite a selecção de novas estirpes que possam ser utilizadas como culturas de arranque na produção de queijos tradicionais em grande escala mantendo as características originais do produto. Nos últimos anos, vários estudos têm sido realizados para isolar e identificar BAL autóctones tanto de leite cru como de queijos artesanais produzidos sem adição de quaisquer culturas de arranque (Fortina *et al.*, 2003; Franciosi *et al.*, 2009; Randazzo *et al.*, 2009).

Garabal *et al.* (2008) ao caracterizarem queijos de leite cru produzidos na Galiza confirmaram a presença maioritária de espécies do género *Lactococcus* (98 isolados), seguindo-se os géneros *Leuconostoc* (56 isolados), *Lactobacillus* (54 isolados), *Pediococcus* (8 isolados) e *Enterococcus* (2 isolados).

Nos queijos italianos *Raschera* (DOP) e *Castelmagno* (DOP) a espécie *Lc. lactis* ssp. *lactis* foi a espécie isolada com maior frequência em todas as fases de produção destes queijos, enquanto que nos queijos curados as espécies dominantes foram *Lb. paracasei* e *Lb. plantarum* (Dolci *et al.*, 2008a, 2008b). No queijo *Castelmagno* (DOP) foi ainda detectada a presença das espécies *E. faecalis* e *E. faecium* ao longo de todo o processo de fabrico, tanto no leite como no queijo curado. Embora a sua ocorrência no ambiente de fabrico esteja associada a fracas condições de higiene quer na ordenha, quer no acondicionamento do leite, a sua ocorrência no queijo curado pode estar relacionada com uma intensa actividade lipolítica (Dolci *et al.*, 2008a).

Tal como referenciado para os queijos anteriores, em Portugal também já foram realizados inúmeros estudos sobre os queijos DOP. Para além da caracterização das espécies dominantes (Dapkevicius, 2007; Kongo *et al.*, 2007, 2009) existem estudos sobre a qualidade microbiológica e perfis bioquímicos (Dapkevicius, 2007, 2009; Pintado *et al.*, 2008), perfil enzimático (Tavaria & Malcata, 2003), produção de amins biogénicas (Pintado *et al.*, 2008) e dinâmica bacteriana (Pereira *et al.*, 2010).

No caso dos Açores destacamos os trabalhos de Kongo *et al.* (2007, 2009) sobre o queijo de S. Jorge (DOP) e de Dapkevicius (2007, 2009) sobre o queijo do Pico (DOP).

Devido ao crescimento contínuo do mercado dos lacticínios e à importância económica que este sector representa para determinadas regiões geográficas, têm sido criteriosamente



seleccionadas culturas comerciais tendo em vista satisfazer as preferências dos consumidores (qualidade do produto final) e os requisitos técnicos dos produtores (maior rendimento e tempos de produção mais curtos) (Garabal, 2007).

Segundo Dolci *et al.* (2008b) nos últimos anos, queijarias industriais têm produzido o Queijo *Raschera* (DOP) usando culturas de arranque comerciais. Uma vez que queijo feito de leite cru com a adição de culturas de arranque resulta num produto mais uniforme e padronizado, com melhor qualidade sanitária. Contudo, o se verifica é que as características organolépticas deste queijo pouco têm a ver com as do queijo original. Wouters *et al.* (2002) consideram que a adição destas culturas de arranque comerciais provocam uma queda na quantidade de microflora autóctone responsável pelo desenvolvimento dos *flavours* típicos.

Garabal (2007) chama atenção para o facto de, em muitos países europeus na indústria de queijo tradicional ainda se usar leite cru, mas que é sujeito a um tratamento térmico. O mesmo autor refere que este processo é efectuado para garantir a segurança do consumo humano. No entanto, tem uma influência directa na microflora original, inativa as enzimas do leite e provoca a desnaturação parcial das proteínas do soro, perturbando deste modo o equilíbrio natural necessário para a produção deste tipo de queijo. Nestas condições, há um risco crescente de perda de diversidade na microflora do leite cru e a qualidade destes produtos está seriamente ameaçada.

Para além dos factores mencionados que comprometem as características únicas dum produto DOP Peres *et al.* (2005) referem o facto de uma maior procura no mercado por estes produtos originar o aparecimento de queijos de origem duvidosa. Estes autores consideram de máxima importância a autenticidade dos queijos tradicionais. O aumento da sua competitividade passa pela satisfação das exigências cada vez maiores dos consumidores que adquirem este tipo de produto, atendendo ao seu lado tradicional, ao seu sabor e características únicas.

A pesquisa de culturas de arranque entre as BAL autóctones destes queijos pode contribuir para satisfazer os requisitos dos consumidores em termos de *flavour* e autenticidade e ao mesmo tempo responder às necessidades dos produtores em termos de uniformidade do produto, melhor rendimento e melhor qualidade microbiológica.

2.5. O queijo do Pico artesanal

2.5.1. Origem

Não se conhece a data exacta do início do fabrico do queijo do Pico. No entanto, Madruga (1957 *in* Cardoso, 1997) refere que poderá ter sido após as erupções vulcânicas de 1718 e 1720, durante a reconstrução das habitações, o desbravamento dos terrenos e consequentemente com



aparecimento das primeiras pastagens. Segundo o mesmo autor, a indústria do queijo teve a sua origem na freguesia de São João, mas em finais do século XVIII também já se fabricava nas freguesias de S. Roque, Piedade, Lajes e Ribeiras (Coelho, 1961 *in* Cardoso, 1997).

O queijo do Pico, fabricado com leite de excelente qualidade, desde logo se tornou o principal meio de sobrevivência de muitas famílias picoenses, que com os seus hábitos e costumes de fabrico transmitidos pelos primeiros povoadores, originaram um produto impar. Madruga (1957 *in* Cardoso, 1997) refere-se ao queijo do pico do seguinte modo: “ *Mercê do seu sabor inconfundível e da sua apresentação cuidada, o queijo de São João (ou do Pico como também é conhecido) conseguiu merecida fama por quase todas as ilhas dos Açores e até no Continente.* ”

Actualmente apenas cinco queijarias estão activas na ilha do Pico: duas na freguesia da Criação Velha, uma na freguesia de S. João, uma na freguesia das Lajes e uma na freguesia da Candelária e as perspectivas futuras com as novas exigências do mercado não são as mais animadoras para este ramo de actividade.

2.5.2. Tecnologia de fabrico

A técnica de fabrico do queijo do Pico é artesanal. São as mãos das queijeiras que procedem ao corte da coalhada, ao enchimento dos moldes, à prensagem, ao alisamento e à distribuição do sal. O processo de fabrico tem início com a filtração do leite para a tina de fabrico, terminando na cura, como se pode ver em pormenor no esquema da Figura 1.

Coagulação

Nesta fase procede-se à adição de coalho animal (previamente dissolvido em água e misturado com uma colher de sopa de sal grosso) a uma temperatura de 26 °C – 27 °C (embora hoje em dia as temperaturas usadas sejam mais altas – aproximadamente 30 °C), temperatura ideal para o início da coagulação. Esta fase conclui-se ao fim de 45 min - 60 min, com a formação duma coalhada firme. Para determinar quando terminou a coagulação, a queijeira coloca a mão sobre a coalhada, tentando desprendê-la da parede da cuba. Se conseguir, dá a coagulação por terminada. Caso contrário, o tempo de coagulação é prolongado.

Corte

A coalhada é cortada com uma espátula ou com uma lira de malha quadriculada, de forma a formarem-se pedaços que permitem a saída do soro. A coalhada é deixada a dessorar por cerca de 5 min, passando-se então à fase de moldagem. De salientar que algumas queijarias optam por



realizar mais do que um corte alternado por repouso e retirada de soro antes de passar a esta fase (Cardoso, 1997).

Moldagem e Prensagem

A coalhada é colocada sobre um pano fino (que retém a coalhada e deixa sair o soro) em cima de uma francela, onde as queijeiras enchem os cinchos manualmente. A coalhada é colocada dentro dos cinchos, pressionada e espremida de ambos os lados para que haja uma boa ligação da massa e consequentemente as faces dos queijos tenham um aspecto liso.

Salga

A salga é feita a seco, por adição de cerca de 21 g de sal a cada face do queijo (Associação de Produtores de Queijo do Pico, 1996). Após 4 h a 4 h 30 min os queijos são virados e salgados na outra face. Na manhã do dia seguinte, os queijos são retirados dos cinchos e colocados na câmara de cura (Cardoso, 1997).

Cura

Na fase da cura os queijos são colocados em câmaras de frio reguladas para uma temperatura de 10 °C – 14 °C e humidade relativa de 80 % - 85 %, onde permanecem 20 dias, sendo voltados diariamente 2 vezes ao dia. No 3º ou 4º dia são feitas as beiras ao queijo, que consiste no alisamento destas com uma faca (Associação de Produtores de Queijo do Pico, 1996; Cardoso, 1997).

O tempo mínimo de cura são 20 dias (Associação de Produtores de Queijo do Pico, 1996). No entanto este período de tempo pode variar entre 8 - 30 dias, tendo em conta a época do ano, a procura e gosto dos consumidores (Cardoso, 1997).

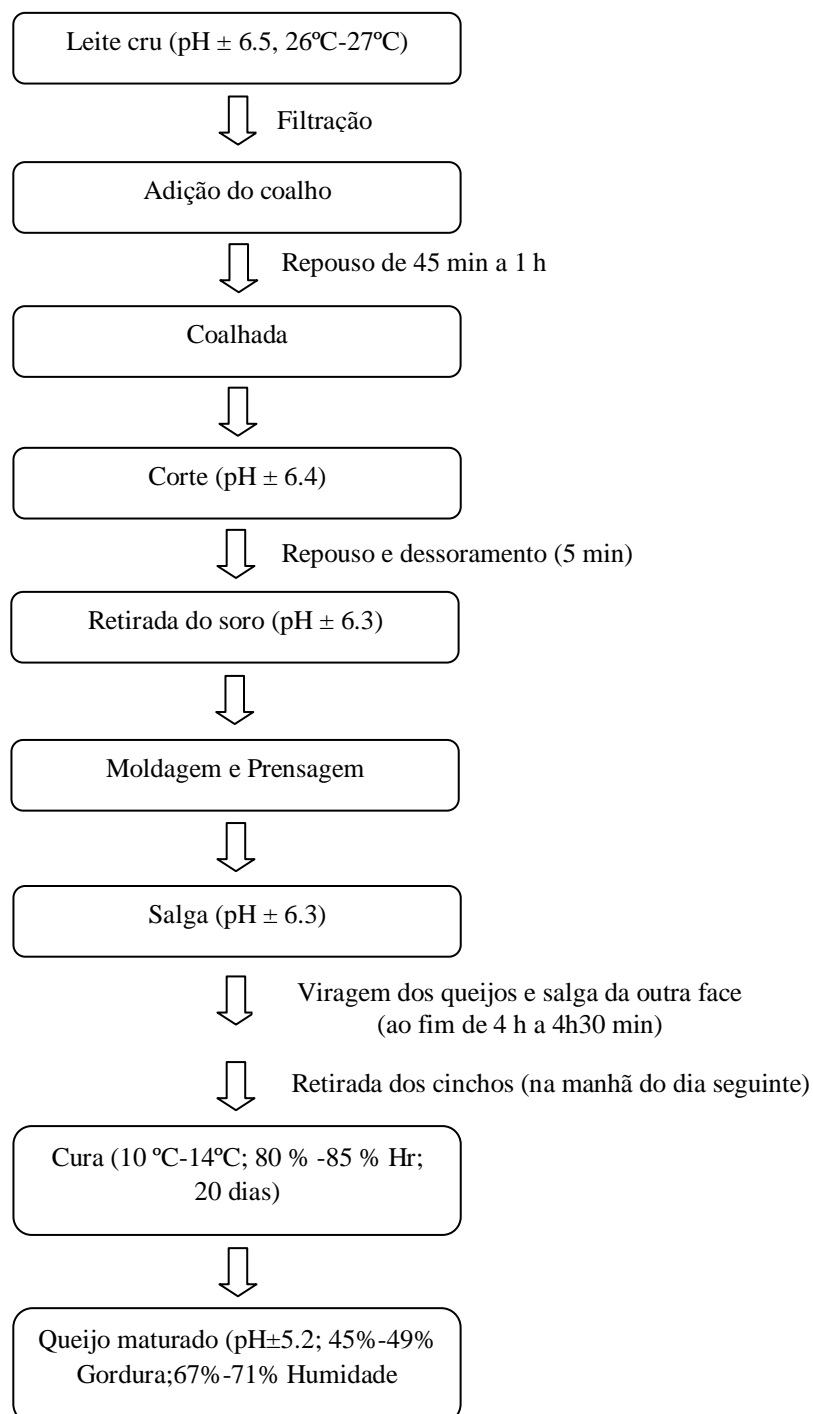


Figura 1. Esquema representativo das etapas de fabrico do queijo do Pico artesanal (Baseado na Associação de Produtores de Queijo do Pico, 1996 e em Cardoso, 1997).



2.5.3. Características gerais

O queijo do Pico artesanal é um queijo curado, resultante do escoamento lento da coalhada após coagulação do leite de vaca cru, com coalho de origem animal. Os seus ingredientes são: leite de vaca cru, coalho animal e sal (Associação de Produtores de Queijo do Pico, 1996).

No Quadro 1 encontram-se as características gerais deste tipo de queijo, relativamente ao aspecto exterior, à pasta e à maturação, descritas no seu caderno de especificações (Associação de Produtores de Queijo do Pico, 1996).

Quadro 1. Características gerais do queijo do Pico artesanal (Retirado de Associação de Produtores de Queijo do Pico, 1996).

Categories	Sub-categorias	Características
Aspecto exterior	Formato	cilíndrico baixo (prato), boleado, regular com abaulamento lateral nas faces
	Diâmetro	16-17 cm
	Altura	2-3 cm
	Peso	650-800 g
	Crosta	Amarela
Pasta	Textura	irregular, com olhos, pouco compacta e muito untosa
	Consistência	mole, pastosa
	Cor	branca amarelada
	Aroma	característico, intenso e agradável
	Sabor	activo e salgado
	Gordura	45 % - 49 % (queijo gordo)
	Humidade	67 % - 71 % (pasta mole)
	Teor médio de acidez	0.92 %
	pH	5.2
	Maturação (1)	Temperatura
Humidade relativa		80 % - 85 %
Tempo mín. de cura		20 dias

(1) Em locais de cura natural ou em instalações de ambiente controlado.



2.5.4. Denominação de origem protegida

De acordo com o REGULAMENTO (CE) N° 510/2006 de 20 de Março a Denominação de Origem Protegida representa o nome de uma região, de um local determinado ou, em casos excepcionais, de um país, que serve para designar um produto agrícola ou um género alimentício: (1) originário dessa região, desse local determinado ou desse país; (2) cuja qualidade ou características se devem essencial ou exclusivamente a um meio geográfico específico, incluindo os factores naturais e humanos e (3) cuja produção, transformação e elaboração ocorrem na área geográfica delimitada.

O queijo do Pico constitui uma Denominação de Origem Protegida de acordo com as normas da União Europeia desde Outubro de 1996. Em Agosto de 1996 a Associação de Produtores de Queijo do Pico havia feito um pedido de registo de denominação de origem para o queijo do Pico através do IAMA (Instituto de Alimentação e Mercados Agrícolas). Entretanto, em Outubro do mesmo ano, foi determinado pelo Secretário Regional da Agricultura e Pescas o reconhecimento do queijo do Pico como Denominação de Origem Protegida (Jornal Oficial nº44 de 29 de Outubro de 1996, II Série).

Existem diversas vantagens na certificação de um produto como DOP, nomeadamente: (1) o incentivo à produção agrícola diversificada; (2) a protecção dos nomes dos produtos contra imitações e utilizações indevidas; (3) a promoção dos produtos característicos de determinados locais; (4) o melhoramento do rendimento dos agricultores; (5) a fixação da população rural e (6) o fornecimento de informação aos consumidores acerca das características específicas dos produtos (European Commission, 2008).

A certificação do queijo do Pico como DOP permite por um lado a diferenciação deste produto, dando-lhe valor e credibilidade no mercado e por outro assegura a individualidade da região que representa.



2.5.5. Principais BAL presentes no queijo do Pico – sua descrição

Os escassos estudos, de natureza ainda preliminar, realizados acerca do queijo do Pico (Cardoso, 1997; Dapkevicius, 2007, 2009; Meneses, 2010; Paulos, 2005; Rego, 2011; Ventura, 1995) demonstraram que este é um produto de extrema importância nutricional, econômica e cultural, que deve ser preservado. Para tal, são necessários mais estudos aprofundados, quer no seu processo de fabrico, quer como produto acabado.

As BAL mais frequentemente isoladas em queijos do Pico foram preliminarmente identificadas como pertencendo aos géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Lactococcus* (Dapkevicius, 2007; Dapkevicius *et al.*, 2009). O isolado encontrado com mais frequência foi o *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, seguindo-se o *E. faecalis*, o *E. faecium*, o *Lb. plantarum*, o *Lb. paracasei* ssp. *rhamnosus* e o *Lc. lactis* ssp. *lactis* (Dapkevicius, 2007; Dapkevicius *et al.*, 2009).

2.5.5.1. Género *Lactobacillus*

No género *Lactobacillus* incluem-se as BAL em forma de bacilos ou cocobacilos, com um teor molar G + C no ADN inferior a 50 %, estritamente fermentativas, aero-tolerantes ou anaeróbias, acidúricas ou acidófilas e fastidiosas (Hammes & Vogel, 1995).

Do ponto de vista metabólico, as espécies do género *Lactobacillus* podem ser divididas em (1) homofermentativas obrigatórias; (2) heterofermentativas facultativas e (3) heterofermentativas obrigatórias. No primeiro grupo incluem-se por exemplo as espécies *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus* e *Lb. salivarius*. No segundo as espécies *Lb. casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, *Lb. paracasei* e *Lb. rhamnosus* e por último como heterofermentativas obrigatórias as espécies *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum* e *Lb. reuteri* (Hammes & Vogel, 1995).

Os lactobacilos estão amplamente distribuídos na natureza, podendo ser isolados das mais diversas fontes. Para além de serem isolados de plantas, fazem parte da microflora indígena das cavidades oral, gastrointestinal e vaginal do Homem e de outros animais (Barbés, 2008). Estudos recentes sobre lactobacilos associados ao aparelho gastrointestinal demonstraram que estes são benéficos para a saúde e como tal, são frequentemente utilizados como probióticos (Walter, 2008). Grande parte das espécies de lactobacilos encontra-se associada ao fabrico de produtos fermentados, tais como produtos lácteos, carnes curadas, vinhos e silagens devido às suas capacidades acidificantes, de melhoria do sabor e textura e por garantirem a qualidade nutritiva dos mesmos (Barbés, 2008). De acordo com Claesson *et al.* (2007) a pesquisa em torno das estirpes de *Lactobacillus* apresenta um grande potencial em termos da indústria alimentar e da saúde.



De todos os géneros que constituem as BAL o género *Lactobacillus* é o maior. É um género com elevado nível de diversidade e com uma filogenia complexa (Claesson *et al.*, 2007). Dentro deste género, dois dos isolados mais frequentes no queijo do Pico foram *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* e *Lb. plantarum* (Dapkevicius, 2007; Dapkevicius *et al.*, 2009).

Os isolados de *Lb. paracasei* apresentam-se sob a forma de bacilos isolados ou em cadeia. Crescem tanto a 10 °C e a 40 °C. Algumas estirpes crescem a 5 °C e a 45 °C. São heterofermentativos facultativos. Efeitos promotores de saúde têm sido amplamente estudados em bactérias do grupo. Vlieger *et al.* (2009) comprovaram que leite para bebés suplementado com *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* e *Bifidobacterium* tem um efeito probiótico. Buriti *et al.* (2007) verificaram que *Lb. paracasei* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* contribuem para a bioconservação de queijos frescos probióticos, ao inibirem o crescimento de contaminantes como coliformes totais e *Staphylococcus* spp.

Os isolados de *Lb. plantarum* apresentam-se sob a forma de bacilos isolados, aos pares ou em cadeia. Crescem predominantemente a 15 °C e são heterofermentativos facultativos. Algumas estirpes exibem pseudocatalase, principalmente quando o crescimento é limitado em glucose, ou verdadeira catalase quando estão na presença de grupos heme (Whitman, 2009).

O *Lb. plantarum* é muito usado em produtos fermentados e como tal, é adequado ao desenvolvimento de probióticos. Nissen *et al.* (2009) demonstraram *in vitro* que o *Lb. plantarum* consegue melhorar a integridade intestinal e a actividade metabólica das células intestinais e estimular respostas imunes. Lönnemark *et al.* (2010) verificaram que esta BAL reduz determinados sintomas gastrointestinais durante tratamentos com antibióticos.

2.5.5.2. Género *Lactococcus*

As estirpes do género *Lactococcus* são homofermentativas, com produção exclusiva de ácido láctico L (+) a partir de glucose. Em termos morfológicos apresentam-se na forma de células ovóides individuais, aos pares ou em cadeia, não esporuladas e não móveis (Teuber, 1995).

São 5 as espécies que compõem este género: *Lc. lactis*, *Lc. garvieae*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffinolactis* e *Lc. piscium*. Todas são aplicadas na indústria dos lacticínios como culturas de arranque (Teuber & Geis, 2006). Segundo Wouters *et al.* (2002) as culturas de arranque industriais da maioria dos queijos são baseadas numa única espécie *Lc. lactis*.

No queijo do Pico destacou-se a presença de *Lc. lactis* ssp. *lactis* (Dapkevicius, 2007; Dapkevicius *et al.*, 2009).



Os isolados de *Lc. lactis* ssp. *lactis* apresentam células ovóides alongadas, aos pares ou em cadeia. Não são hemolíticos, embora algumas estirpes possam produzir hemólise α fraca. Crescem a 10 °C mas não a 4 °C em 4 % de NaCl (Whitman, 2009). A estirpe *Lc. lactis* pode ser encontrada na natureza em plantas e no tracto digestivo de animais (Bolotin *et al.*, 2001; Teuber & Geis, 2006). Têm uma vasta aplicação industrial em produtos lácteos, nomeadamente numa grande variedade de queijos, manteigas e leites fermentados (Wouters *et al.*, 2002), sendo também usada em vacinas contra infecções respiratórias (Hanniffy *et al.*, 2006). É composta por duas subespécies: *Lc. lactis* ssp. *lactis* e ssp. *cremoris*. A ssp. *lactis* é usada preferencialmente no fabrico de queijos de pasta mole e a ssp. *cremoris* em queijos de pasta dura (Bolotin *et al.*, 2001).

2.5.5.3. Género *Enterococcus*

O género *Enterococcus* é constituído pelas BAL com um teor molar G + C no DNA inferior a 50 %, em forma de cocos individuais, aos pares, ou em cadeias curtas, não esporuladas, catalase negativas, anaeróbias facultativas, com metabolismo homofermentativo, onde o produto principal da fermentação da glucose é o ácido láctico L (+) (Devriese & Pot, 1995). Segundo Fisher & Philips (2009) os enterococos são capazes de sobreviver em ambientes extremos, com temperaturas entre 5 °C – 65 °C, pH entre 4.5 - 10 e com altas concentrações de NaCl.

Dentro do género *Enterococcus* dois dos isolados mais frequentes no queijo do Pico foram *E. faecalis* e *E. faecium* (Dapkevicius, 2007; Dapkevicius *et al.*, 2009).

Os isolados de *E. faecalis* são geralmente não hemolíticos, a pseudocatalase pode ser produzida quando cultivados em agar-sangue. As estirpes sobrevivem a temperaturas de 60 °C durante 30 min (Whitman, 2009). Algumas estirpes de *E. faecium* podem ser α -hemolíticas. Entretanto, todas crescem a pH 9.6. Sobrevivem a temperaturas de 60 °C durante 30 min. São negativas quanto à utilização do citrato, do malato e da serina e na hidrólise da gelatina (Whitman, 2009).

De acordo com Foulquié Moreno *et al.* (2006) *E. faecium* e *E. faecalis* são bastante comuns no tracto gastrointestinal do homem e para além disso são regularmente isoladas de fontes ambientais e animais (*e.g.* queijo, peixe e carne de porco).

Nos últimos anos tem surgido alguma controvérsia em torno do uso de enterococos na tecnologia alimentar, uma vez que surgiram relatos de estirpes de *E. faecalis* e *E. faecium* associadas a infecções humanas (*e.g.* endocardites, infecções do tracto urinário e bactericémias) (Foulquié Moreno *et al.*, 2006; Franz *et al.*, 2003). Por outro lado, estas estirpes estão também associadas a resistência a antibióticos (Franz *et al.*, 2001). Franz *et al.* (2003) consideram que existe



uma grande variabilidade fenotípica dentro do género *Enterococcus* e que a resistência a antibióticos e o potencial patogénico são dependentes da fonte do isolado. Para Gupta & Malik (2007) é importante o estabelecimento de critérios de segurança para o uso comercial de enterococos, uma vez que o sistema QPS da União Europeia é omissivo em relação a este aspecto.



3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolados em estudo

A amostra de estudo consistiu em 37 isolados de BAL do queijo do Pico, previamente identificados num estudo anterior (Dapkevicius, 2007). As amostras foram colhidas em 3 unidades de produção (A, B e C) em dois dias de maturação distintos (1 e 21 ° dia). O Quadro 2 apresenta a identificação fenotípica das estirpes efectuada por API 50CHL (bioMérieux S.A., França), o grau de certeza da sua identificação, em percentagem (% ID) e o Índice T (T).

3.2. Características das BAL do queijo do Pico com importância em termos de bioactividade e tecnologia

3.2.1. Curvas de crescimento microbiano

Para o estudo do crescimento microbiano as BAL foram inoculadas em *MRS Broth* (AES, França) e incubadas em aerobiose a 30 °C durante 24 h. Após este período fez-se o acerto das densidades ópticas iniciais das BAL para 0.1 OD_{600nm} e efectuaram-se medições periódicas de 6 em 6 horas, até às 72 h em triplicado no espectrofotómetro (Genesys 20, Thermo Spectronic, EUA).

3.2.2. Curvas de acidificação

De modo a avaliar a capacidade de acidificação das BAL e tendo em conta a metodologia descrita no ponto anterior, após o acerto das densidades ópticas iniciais das BAL para 0.1 OD_{600nm} foi medido o pH, de 6 em 6 horas, até às 72 h em triplicado no potenciómetro (WTW Inolab pH Level 1, Alemanha).



Quadro 2. Identificação fenotípica por API 50CHL (bioMérieux S.A., França), grau de certeza da identificação (% ID) e o Índice T (T) das estirpes isoladas nas unidades de produção A, B e C do queijo do Pico em dois dias de maturação distintos.

Unidade de Produção	Dia de maturação	Codificação da Amostra	Identificação Fenotípica	% ID	% T
A	1	L1A1E5	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	99.8	0.85
A	1	L1A1E6	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	99.9	0.88
A	1	L1A1E7	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	99.4	0.60
A	1	L1A1E8	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	99.9	0.88
A	1	L1A1M4	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	99.9	0.72
A	1	L1A1M7	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	97.7	0.77
A	1	L1A1R4	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	99.8	0.91
A	1	L1A1R6	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	99.9	0.72
B	1	L1B1E2	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	99.9	0.88
B	1	L1B1E3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	99.9	0.86
B	1	L1B1E4	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	99.9	0.61
B	1	L1B1E7	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	99.9	0.88
B	1	L1B1M2	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	99.9	0.88
B	1	L1B1M3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	99.9	0.88
B	1	L1B1R3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	99.9	0.88
B	21	L1B21E1	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	99.4	0.60
B	21	L1B21K5	<i>Enterococcus faecium</i>	99.8	0.32
C	1	L1C1E2	Não identificado	–	–
C	1	L1C1E4	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	99.9	0.91
C	1	L1C1E6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	95.7	0.60
C	1	L1C1E8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.4	0.42
C	1	L1C1K1	<i>Enterococcus faecalis</i>	99.2	0.99
C	1	L1C1K2	<i>Enterococcus faecium</i>	99.0	0.32
C	1	L1C1K3	<i>Enterococcus faecium</i>	99.0	0.32
C	1	L1C1K5	<i>Enterococcus faecalis</i>	99.7	0.66
C	1	L1C1K6	<i>Enterococcus faecalis</i>	99.7	0.67
C	1	L1C1K7	<i>Enterococcus faecalis</i>	99.7	0.66
C	1	L1C1K8	<i>Enterococcus faecalis</i>	99.2	0.99
C	1	L1C1M3	Não identificado	–	–
C	1	L1C1M4	Não identificado	–	–
C	1	L1C1R5	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	99.8	0.88
C	21	L1C21R1	Não identificado	–	–
C	21	L1C21R6	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	99.5	0.53
C	21	L1C21M1	Não identificado	–	–
C	21	L1C21M3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	97.7	0.77
C	21	L1C21M5	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	97.7	0.77
C	21	L1C21M6	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	99.9	0.95



3.2.3. Actividade proteolítica e actividade lipolítica

Para avaliar a proteólise as BAL foram inoculadas em *Skim Milk Agar* (Oxoid, Inglaterra) a 30 °C durante 72 h (placas em duplicado). A presença de um halo transparente em torno das colónias (Figura 2) foi usada como indicação de actividade proteolítica (Franciosi *et al.*, 2009). Na avaliação da actividade lipolítica as BAL foram inoculadas em *Tributyryn Agar* (Merck, Alemanha) a 30 °C durante 72 h (placas em duplicado). Tal como, no teste anterior a reacção positiva é evidenciada pela presença de colónias rodeadas por um halo transparente (Hantsis-Zacharov & Halpern, 2007).

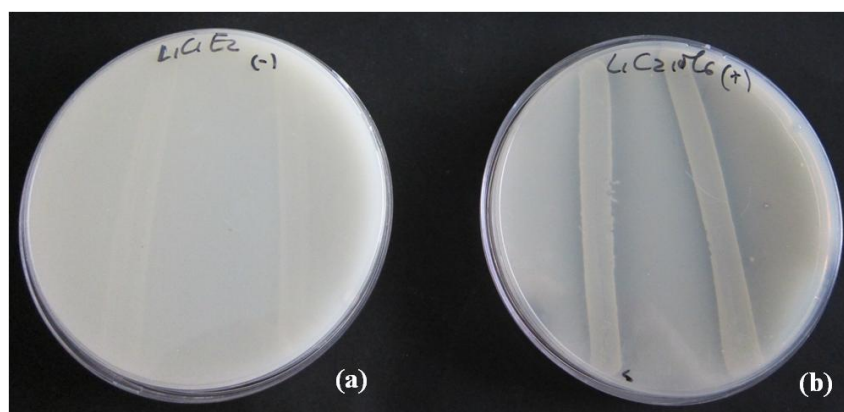


Figura 2. Teste da proteólise. (a) reacção negativa; (b) reacção positiva.

3.2.4. Actividades enzimáticas

Para a determinação das actividades enzimáticas presentes nas BAL em estudo foi utilizado o *kit* APIZYM (Bio-Merieux SA) onde se averiguou a presença de 19 enzimas: fosfatase alcalina, esterase (C4), esterase lipase (C8), lipase (C14), leucina arilamidase, valina arilamidase, cistina arilamidase, tripsina, α -quimotripsina, fosfatase ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, n-acetil- β -glucosaminidase, α -manosidase e α -fucosidase (Hickey *et al.*, 2007). No Quadro 3 encontram-se descritos os substratos destas enzimas.

Cada isolado testado foi previamente inoculado em *MRS Broth* (AES, França) durante 24 h a 30°C. Depois foi feita uma suspensão de cada um dos isolados para uma densidade óptica de 5-6 na escala de *McFarland* em *Api Suspension Medium* (2 ml). Em seguida, preparou-se as galerias e com o auxílio de uma micropipeta adicionou-se 65 μ l de suspensão a cada uma das 20 cúpulas. As galerias foram incubadas durante 4 h 30 a 37 °C. Após a incubação adicionou-se 1 gota de reagente ZYM A e 1 gota de reagente ZYM B a cada uma das cúpulas, aguardou-se 5 min para que houvesse



desenvolvimento das colorações, expôs-se as galerias durante 10 s a uma lâmpada de 1000 W e procedeu-se ao registo dos resultados. Numa escala de 0-5 consoante a intensidade da cor, 0, 1 e 2 para reacção negativa e 3, 4 e 5 para reacção positiva.

Quadro 3. Enzimas utilizadas no *Kit APIZYM* (Bio-Merieux SA) e respectivos substratos.

Enzima	Substrato
Fosfatase alcalina	2-naftil fosfato
Esterase (C4)	2-naftil butirato
Esterase lipase (C8)	2-naftil caprilato
Lipase (C14)	2-naftil miristato
Leucina arilamidase	L-leucil-2-naftilamida
Valina arilamidase	L-valil-2-naftilamida
Cistina arilamidase	L-cistil-2-naftilamida
Tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida
α -quimotripsina	N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida
Fosfatase ácida	2-naftil fosfato
Naftol-AS-BI-fosfohidrolase	Naftol-AS-BI-fosfato
α -galactosidase	6-Br-2-naftil- α D-galactopiranosida
β -galactosidase	2-naftil- β D-galactopiranosida
β -glucuronidase	Naftol-AS-BI- β D-glucuronida
α -glucosidase	2-naftil- α D-glucopiranosida
β -glucosidase	6-Br-2-naftil- β D-glucopiranosida
N-acetil- β -glucosaminidase	1-naftil-N-acetil- β D-glucosaminida
α -manosidase	6-Br-2-naftil- α D-manopiranosida
α -fucosidase	2-naftil- α L-fucopiranosida

3.2.5. Produção de diacetilo a partir de citrato

A produção de diacetilo a partir de citrato foi determinada segundo a metodologia de Franciosi *et al.* (2009). As BAL com crescimento de 24 h a 30 °C em *MRS Broth* (AES, França) foram centrifugadas a 5000 rpm durante 5 min a 4 °C na centrífuga (*Centrifuge 5415 D*, Eppendorf, Alemanha), lavadas com água peptonada (Merck, Alemanha) e inoculadas (1 % v/v) em 10 ml de leite UHT. Após uma incubação de 24 h a 30 °C foi adicionada uma solução de α -naftol (1 % v/v) e KOH (16 % v/v). Em seguida, esta mistura (em duplicado por isolado) foi a incubar a 30 °C durante 10 min. A produção de diacetilo foi observada pela formação de um anel vermelho no topo dos tubos de ensaio (Figura 3).

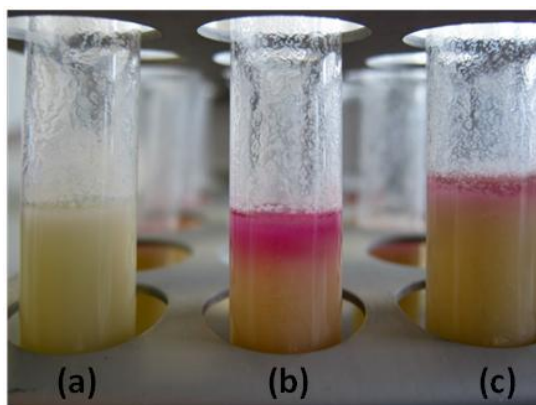


Figura 3. Teste da produção de diacetilo a partir de citrato. (a) negativo; (b) nível alto; (c) nível baixo.

3.2.6. Produção de exopolissacáridos

A determinação da produção de exopolissacáridos foi realizada em duplicado em placas de *MRS Agar* (AES, França) contendo 2 % de cada um dos seguintes açúcares: glucose (Merck, Alemanha), frutose (Merck, Alemanha), sacarose (Fluka, Suíça) e lactose (J. T. Baker, Holanda). As BAL foram inoculadas nas placas com os açúcares e incubadas a 30 °C durante 3 dias, no sentido de se averiguar quais os isolados que ao fim desse tempo produziram colónias viscosas, ou seja, capazes de produzirem exopolissacáridos (Smitinont *et al.*, 2007). Utilizou-se como controlo positivo uma estirpe de *Rhizobium* sp. da colecção de culturas do CITA-A (Centro de Investigação e Tecnologias Agrárias dos Açores).

3.2.7. Determinação da concentração mínima inibidora de bÍlis

A resistência ao ambiente do tracto gastrointestinal foi avaliada através da determinação da concentração mínima inibidora (CMI) de bÍlis de acordo com a metodologia desenvolvida por Hyronimus *et al.* (2000).

Na determinação da CMI, definida como a menor concentração de bÍlis que inibe totalmente o crescimento das BAL, começou-se por preparar *MRS Agar* (AES, França) com diferentes concentrações de bÍlis bovina (Fluka, EUA) respectivamente 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1,0 %. Os meios foram a esterilizar à autoclave durante 15 min a 121 °C. Em seguida foram colocados em placas de Petri (em duplicado). Por último, depositou-se com o auxílio de uma micropipeta 20 µl de BAL com 24 h de crescimento a 30 °C sobre cada um dos meios em placa de Petri. Cada isolado foi testado em duplicado e incluiu-se um branco (meio de cultura não inoculado com BAL) para cada uma das concentrações de bÍlis bovina (Fluka, EUA). As placas de Petri foram colocadas na estufa a 37 °C durante 5 dias e ao fim desse tempo registou-se a CMI.



3.2.8. Actividade antimicrobiana

O estudo da actividade antimicrobiana foi efectuado com recurso a várias bactérias alvo de referência, nomeadamente *Listeria monocytogenes* ATCC 7466, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29523, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Clostridium perfringens* ATCC 8357 segundo o método de difusão em agar: técnica de inoculação cruzada (Guo *et al.*, 2010) e “técnica dos poços” (Tagg & McGiven, 1971).

Na técnica de inoculação cruzada (Figura 4) as BAL foram inoculadas com um riscado central em placas de *MRS Agar* (AES, França). Após 72 h de incubação a 30 °C foi depositada uma segunda camada de *Plate Count Agar* (AES, França) e procedeu-se em seguida à inoculação das bactérias de referência, incubadas em *Nutrient Broth* (AES, França) durante 24 h a 37 °C, através de riscados transversais ao das BAL. Ao fim de 24 h de incubação a 30 °C determinou-se visualmente a existência de inibição do microrganismo alvo pelas BAL ao longo de cada riscado. Cada BAL foi testada em duplicado.



Figura 4. Actividade antimicrobiana pela técnica de inoculação cruzada.

Na “técnica dos poços” (Figura 5) foram utilizadas as culturas inteiras, previamente incubadas por 72 h a 30 °C em *MRS Broth* (AES, França) e respectivos sobrenadantes das BAL centrifugados (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Alemanha) a 4000 rpm, 10 min a 4 °C e filtrados com filtros de 0.22 mm (Sartorius Stedim Biotech, Alemanha).

De forma a excluir o efeito inibitório do ácido láctico e/ou do H₂O₂, o pH dos sobrenadantes foi tratado com NaOH 1N para ajustar o pH para 6.5 e posteriormente adicionou-se catalase de origem bovina (EC 1.11.1.6, 5 mg/mL) deixando actuar 1 h a 37 °C.

As culturas dos microrganismos alvo foram incubadas a 37 °C e diluídas com *Nutrient Broth* (AES, França) até 0.5 na escala de *McFarland* sendo depois incorporadas em 200 ml de *Plate*



Count Agar (AES, França). Após solidificação do agar procedeu-se à realização de poços com 6 mm de diâmetro e ao enchimento dos mesmos com 60 μ l de amostra.

As placas foram mantidas a 4 °C durante 4 h e em seguida incubadas a 37 °C durante 24 h. Ao fim desse tempo mediu-se com o auxílio de uma craveira digital o diâmetro dos halos de inibição. Este teste foi realizado em triplicado.



Figura 5. Actividade antimicrobiana pela técnica dos poços.

3.2.9. Teste de coexistência

A coexistência entre BAL seleccionadas de acordo com o seu potencial bioactivo e tecnológico e critérios de segurança foi analisada segundo a técnica de inoculação cruzada (Guo *et al.*, 2010). As BAL seleccionadas, *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* (L1B1E3), *Lb. plantarum* (L1C1E6) e *Lc. lactis* ssp. *lactis* (L1C1R5), foram inoculadas de forma perpendicular umas às outras placas de *MRS Agar* (AES, França) e incubadas a 30 °C durante 72 h de modo a observar-se o antagonismo entre elas. O teste foi realizado em duplicado.

3.3. Critérios de segurança das BAL do queijo do Pico

3.3.1. Actividade hemolítica

A actividade hemolítica foi determinada em meio de agar-sangue, preparado a partir de *Tryptose Blood Agar Base* (Merk, Alemanha) com adição de sangue de ovelha (70 ml⁻¹), após 48 h de incubação a 37 °C. As placas de agar-sangue (em duplicado) foram analisadas no sentido de se averiguar se apresentavam hemólise β (halo transparente em torno das colónias), hemólise α (halo esverdeado em torno das colónias) ou hemólise γ (ausência de halo em torno das colónias) (Astari *et al.*, 2009).



3.3.2. DNase

A pesquisa da produção da enzima DNase foi feita em meio de *DNase Test Agar* (Sigma-Aldrich, EUA) (em duplicado), o qual foi incubado por 48 h a 37 °C. Considerou-se como reacção positiva o aparecimento dum halo rosado em torno das colónias (Gupta & Malik, 2007). Utilizou-se como controlo positivo a estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 29523.

3.3.3. Gelatinase

A produção da enzima gelatinase foi determinada de acordo com a metodologia de Terzic-Vidojevic *et al.* (2009). Preparou-se um meio de cultura contendo 5 g de peptona (Fluka, EUA), 3 g de extracto de levedura (AES, França), 30 g de gelatina (Biolife, Itália), 17 g de agar (AES, França) e adicionou-se 1000 ml de água destilada. Acertou-se o pH para 7.0 e procedeu-se à sua esterilização em autoclave (121 °C, 15 min). Em seguida, colocou-se o meio em placas de Petri (em duplicado) e procedeu-se à inoculação das BAL, incubando-se depois a 37 °C por 48 h. Ao fim desse tempo, as placas foram inundadas com uma solução saturada de sulfato de amónio (Merck, Alemanha). Neste teste o aparecimento de um halo transparente em torno das colónias é considerado indicador da degradação da gelatina pela gelatinase, ou seja, reacção positiva (Figura 6). Utilizou-se como controlo positivo a estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 29523.

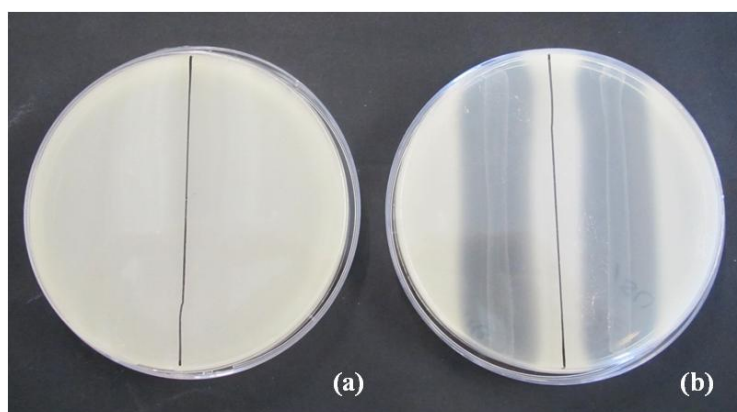


Figura 6. Teste da gelatinase. (a) reacção negativa; (b) reacção positiva.

3.3.4. Produção de histamina

A produção de histamina a partir de histidina foi determinada com recurso ao meio diferencial de Joosten & Northold (1989) com a seguinte composição: 0.5 % de triptona (AES, França), 0.5 % extracto de levedura (AES, França), 0.5 % de NaCl (Merck, Alemanha), 0.1 % de glucose (Merck, Alemanha), 0.05 % de Tween 80 (VWR, EUA), 0.02% de MgSO₄.7H₂O (Merck, Alemanha), 0.01 % de CaCO₃ (Merck, Alemanha), 0.006 % de púrpura de bromocresol (Merck, Alemanha), 0.005



% de $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (Merck, Alemanha), 0.004 % de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck, Alemanha) e 2 % de histidina (Merck, Alemanha). Optou-se por utilizar o meio sem agar. Após acerto do pH para 5.0 ± 0.1 e esterilização a $121^\circ C$ por 10 min procedeu-se à inoculação das BAL com posterior incubação a $30^\circ C$ durante 7 dias, a fim de se verificar ou não mudança na cor do meio, sendo esta mudança indicativa da presença de histamina. O teste foi realizado em duplicado.

3.3.5. Resistência a antibióticos

A resistência aos antibióticos foi determinada segundo o método Kirby-Bauer (método de difusão em agar). Inoculou-se 100 μl de BAL em 5 ml de *MRS Broth* (AES, França) e incubou-se a $30^\circ C$ durante 24 h - 48 h. Ao fim desse tempo, fez-se o acerto da turvação para 5 na escala de *McFarland* e retirou-se 400 μl para novo tubo com 5 ml de *MRS Broth* (AES, França). Em seguida, dividiu-se o conteúdo de cada um dos tubos por 2 placas contendo *Müller-Hinton Agar* (AES, França). Esperou-se cerca de 15 min para que o agar absorvesse algum do líquido. Deitou-se fora o excesso e deixou-se secar bem as placas (1 h). Por último, com o auxílio de uma pinça estéril, aplicou-se sobre o meio os discos com os antibióticos (Oxoid, Inglaterra). Foram testados 22 antibióticos: ácido nalidíxico, ofloxacina, amoxicilina/ácido clavulânico 2:1, carbenicilina, penicilina, piperacilina, canamicina, estreptomicina, gentamicina, netilmicina, tobramicina, cefalotina, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, rifampicina, sulfametoxazol/trimetoprim, tetraciclina e vancomicina.

Os discos (6 por placa) foram colocados com intervalos suficientes para que não houvesse sobreposição das respectivas zonas de inibição. Deixou-se secar as placas durante mais 30 min. Incubou-se a $30^\circ C$, por 24 h - 48 h. Por fim, mediram-se as zonas de inibição por meio duma craveira digital, arredondando as leituras até ao milímetro, incluindo o diâmetro do disco (Figura 7).



Figura 7. Teste de resistência aos antibióticos pelo método de Kirby-Bauer.



Para a interpretação dos resultados, consultou-se as tabelas presentes em documentos de várias entidades de referência nesta matéria (CLSI, 2010, 2011; CSFM, 2010) e classificou-se as BAL em 3 categorias consoante o diâmetro do halo de inibição: Resistente (R) Sensibilidade Intermédia (I) e Sensível (S) (Quadro 4).

Quadro 4. Lista de Antibióticos utilizados no estudo da resistência aos mesmos por parte das BAL do queijo do Pico e respectivos diâmetros críticos (Adaptado de CLSI, 2010, 2011 e CSFM, 2010).

Código	Nome completo	Família/Grupo	Quantidade por disco	Diâmetros Críticos (mm)		
				R	I	S
NA30	Ácido Nalidíxico	Quinolonas	30 µg	<15	15-19	≥20
OFX5	Ofloxacina	Fluoroquinolonas	5 µg	<22	22-24	≥25
AMC30	Amoxicilina/Ácido Clavulânico 2:1	Penicilinas	20/10 µg	<16	16-22	≥23
CAR100	Carbenicilina	Penicilinas	100 µg	<18	18-21	≥22
P10	Penicilina	Penicilinas	10 UI	≤14	-	≥15
PRL100	Piperacilina	Penicilinas	100 µg	≤14	-	≥15
K30	Canamicina	Aminoglicosídeos	30 µg	<15	15-16	≥17
S10	Estreptomicina	Aminoglicosídeos	10 µg	<13	13-14	≥15
CN10	Gentamicina	Aminoglicosídeos	10 µg	<16	16-17	≥18
NET30	Netilmicina	Aminoglicosídeos	30 µg	<19	19-20	≥21
TOB10	Tobramicina	Aminoglicosídeos	10 µg	<16	16-19	≥18
KF30	Cefalotina	Cefalosporinas	30 µg	<12	12-17	≥18
CTX30	Cefotaxima	Cefalosporinas	30 µg	<23	23-27	≥26
CAZ30	Ceftazidima	Cefalosporinas	30 µg	<19	19-20	≥21
CRO30	Ceftriaxona	Cefalosporinas	30 µg	<23	23-25	≥26
DA2	Clindamicina	Lincosamidas	2 µg	<15	-	≥15
C30	Cloranfenicol	Fenicois	30 µg	≤12	13-17	≥18
E15	Eritromicina	Macrólidos	15 µg	≤13	14-22	≥23
RD5	Rifampicina	Ansamicinas	5 µg	≤16	17-19	≥20
SXT25	Sulfametoxazol/Trimetoprim	Sulfamidas	1.25/23.75 µg	<10	10-17	≥16
TE30	Tetraciclina	Tetraciclinas	30 µg	≤14	15-18	≥19
VA30	Vancomicina	Glicopeptídeos	30 µg	≤14	15-16	≥17

(1) resistente (R); sensibilidade intermédia (I) e sensível (S).

3.4. Análise de dados

Na análise das curvas de crescimento microbiano foram estimados segundo o modelo de Baranyi (Baranyi & Roberts, 1994) com o auxílio do *Software MicroFit Version 1.0*. os seguintes parâmetros: OD₀ (absorvância inicial), OD_{máx} (absorvância máxima), µ_{máx} (taxa específica de crescimento máximo), t-lag (duração da fase de latência) e t-d (tempo de duplicação).



Os resultados obtidos foram posteriormente sujeitos a uma análise de componentes principais (*Community Analysis Package 4 Version 4.0*) de modo a estabelecerem-se grupos de isolados com comportamentos semelhantes.

3.5. Selecção de isolados promissores como potenciais culturas de arranque para queijo

De acordo com os critérios abaixo descritos procedeu-se à selecção de 3 isolados a testar em trabalhos futuros no fabrico de queijos modelo.

Foram utilizados como critérios de segurança a existência de estatuto QPS, a ausência de produção de hemolisina, DNase, gelatinase e histamina, bem como, a sensibilidade a um leque alargado de antibióticos.

Do ponto de vista bioactivo e tecnológico utilizou-se os resultados da análise do crescimento, acidificação, proteólise, actividade enzimática, produção de diacetilo e actividade antimicrobiana.



4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Características das BAL do queijo do Pico com importância em termos de bioactividade e tecnologia

4.1.1. Curvas de crescimento microbiano

A análise das curvas de crescimento microbiano dos isolados do género *Lactobacillus* permite-nos aferir que existem dois grupos distintos (Quadro 5 e Figura 8). O primeiro grupo teve um crescimento mais abundante. O seu crescimento inicial foi rápido, onde às 12 h existiu um pico de absorvância de 1.4 (isolado L1C1E8). Entre as 12 h e as 24 h os valores de absorvância mantiveram-se relativamente estáveis, excepto no caso do isolado L1B1E4 que apresentou um crescimento contínuo. Entre as 24 h e as 30 h verificou-se de novo uma fase de crescimento, onde o isolado L1A1E5 atingiu o valor máximo de absorvância de todo o período de tempo analisado (1.63). A partir desta altura registou-se uma estabilização nos valores de absorvância medidos, situando-se entre 1.4 e 1.5. Neste 1º grupo destacam-se os isolados de *Lb. plantarum* (L1C1E6 e L1C1E8) e alguns *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* (L1A1E5, L1B1E3, L1B1E4 e L1C1E4).

O 2º grupo apresentou um crescimento inicial menos acentuado que o 1º durante as primeiras 24 h. A partir desta altura os valores medidos mantiveram-se constantes. O valor máximo de absorvância observado foi 0.74 às 72 h para o isolado *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* (L1C21M3).



Quadro 5. Valores médios de absorvância (OD) em MRS inoculado com 37 isolados de BAL obtidos a partir de queijo do Pico, durante incubação aeróbia a 30 °C.

Código	Identificação	Tempo (h)													
		0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	
LIA1E5	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.06	0.76	1.28	1.35	1.43	1.61	1.63	1.56	1.50	1.51	1.51	1.50	1.50	
LIA1E6	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.10	0.18	0.34	0.46	0.58	0.59	0.60	0.61	0.62	0.61	0.60	0.61	0.62	
LIA1E7	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.08	0.10	0.21	0.34	0.48	0.51	0.51	0.52	0.54	0.53	0.52	0.53	0.53	
LIA1E8	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.10	0.13	0.31	0.49	0.66	0.69	0.69	0.70	0.71	0.71	0.71	0.72	0.73	
LIA1M4	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.12	0.15	0.31	0.47	0.62	0.66	0.68	0.70	0.71	0.70	0.70	0.71	0.72	
LIA1M7	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.11	0.16	0.37	0.51	0.65	0.67	0.67	0.68	0.69	0.69	0.68	0.69	0.69	
LIA1R6	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.12	0.16	0.40	0.51	0.62	0.64	0.64	0.63	0.61	0.61	0.60	0.61	0.61	
LIB1M2	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.11	0.15	0.36	0.48	0.61	0.63	0.63	0.64	0.65	0.64	0.64	0.65	0.65	
LIB1M3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.11	0.17	0.41	0.53	0.65	0.66	0.67	0.68	0.69	0.68	0.68	0.68	0.69	
LIB1E2	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.09	0.13	0.28	0.41	0.55	0.57	0.57	0.58	0.59	0.58	0.57	0.58	0.60	
LIB1E3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.06	0.73	1.32	1.39	1.47	1.62	1.61	1.55	1.49	1.49	1.47	1.48	1.48	
LIB1E4	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.06	0.66	1.07	1.28	1.48	1.53	1.51	1.51	1.52	1.52	1.50	1.50	1.50	
LIB1E7	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.09	0.18	0.34	0.47	0.60	0.61	0.61	0.62	0.63	0.63	0.62	0.63	0.64	
LIB1R3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.11	0.18	0.46	0.58	0.71	0.71	0.71	0.69	0.67	0.68	0.67	0.68	0.68	
LIB2IE1	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.06	0.10	0.23	0.36	0.48	0.50	0.50	0.51	0.52	0.52	0.51	0.52	0.53	
LIC1E4	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.07	0.76	1.30	1.37	1.43	1.57	1.57	1.51	1.45	1.44	1.45	1.45	1.45	
LIC2IM3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.12	0.19	0.44	0.57	0.70	0.72	0.73	0.73	0.74	0.73	0.73	0.73	0.74	
LIC2IM5	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.11	0.15	0.35	0.49	0.63	0.65	0.65	0.66	0.67	0.67	0.66	0.67	0.68	
LIC1E6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.05	0.67	1.26	1.35	1.45	1.60	1.60	1.53	1.46	1.46	1.46	1.46	1.46	
LIC1E8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.04	0.80	1.38	1.42	1.47	1.60	1.59	1.53	1.47	1.48	1.47	1.48	1.49	
LIA1R4	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	0.11	0.15	0.39	0.51	0.62	0.66	0.66	0.63	0.60	0.61	0.59	0.60	0.61	
LIC1R5	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	0.11	0.20	0.52	0.67	0.82	0.84	0.84	0.82	0.80	0.81	0.80	0.81	0.82	
LIC2IM6	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	0.13	0.17	0.34	0.50	0.67	0.70	0.73	0.74	0.76	0.75	0.75	0.75	0.76	
LIC2IR6	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	0.12	0.22	0.47	0.69	0.91	1.10	1.17	1.23	1.29	1.29	1.28	1.28	1.29	
LIB2IK5	<i>Enterococcus faecium</i>	0.10	0.11	0.17	0.25	0.34	0.44	0.45	0.45	0.46	0.46	0.46	0.46	0.45	
LIC1K3	<i>Enterococcus faecium</i>	0.11	0.19	0.42	0.50	0.58	0.60	0.62	0.62	0.63	0.55	0.56	0.57	0.57	
LIC1K2	<i>Enterococcus faecium</i>	0.12	0.18	0.40	0.46	0.53	0.55	0.57	0.57	0.57	0.50	0.50	0.50	0.51	
LIC1K1	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.11	0.21	0.42	0.50	0.57	0.60	0.61	0.61	0.62	0.55	0.55	0.55	0.56	
LIC1K5	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.13	0.18	0.38	0.47	0.55	0.57	0.59	0.60	0.61	0.54	0.54	0.54	0.55	
LIC1K6	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.13	0.18	0.38	0.44	0.50	0.52	0.52	0.53	0.54	0.47	0.47	0.48	0.48	
LIC1K7	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.10	0.16	0.38	0.45	0.53	0.55	0.56	0.56	0.56	0.50	0.51	0.51	0.51	
LIC1K8	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.12	0.19	0.42	0.52	0.62	0.65	0.66	0.66	0.67	0.60	0.61	0.61	0.62	
LIC1E2	Não identificado	0.06	0.52	1.08	1.24	1.40	1.54	1.54	1.48	1.42	1.42	1.42	1.42	1.43	
LIC1M3	Não identificado	0.11	0.15	0.31	0.46	0.61	0.63	0.65	0.65	0.66	0.65	0.65	0.65	0.66	
LIC1M4	Não identificado	0.11	0.19	0.48	0.60	0.72	0.73	0.74	0.75	0.76	0.76	0.76	0.77	0.77	
LIC2IM1	Não identificado	0.12	0.64	0.72	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.76	0.75	0.75	0.76	
LIC2IR1	Não identificado	0.11	0.15	0.39	0.51	0.63	0.65	0.65	0.64	0.63	0.62	0.62	0.62	0.63	

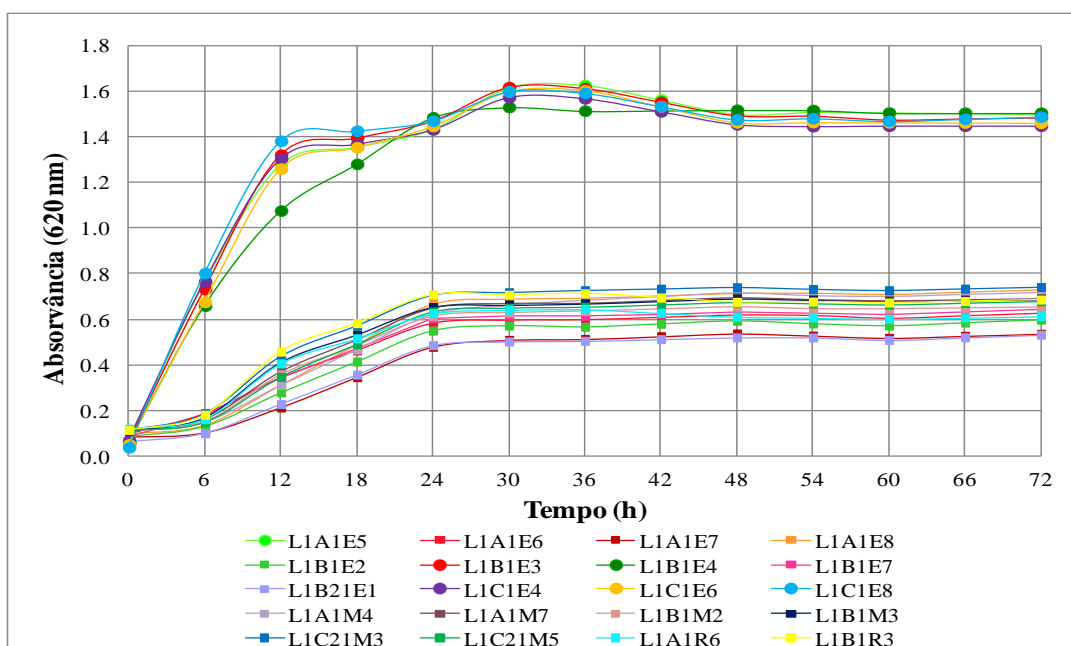


Figura 8. Curvas de crescimento em MRS, a 30 °C, em aerobiose, dos isolados do género *Lactobacillus* obtidos a partir de queijo do Pico.

O estudo do crescimento do género *Lactococcus* (Quadro 5 e Figura 9) demonstra que os isolados de *Lc. lactis* spp. *lactis* L1A1R4, L1C1R5 e L1C21M6 apresentaram um comportamento muito similar, apesar deste último isolado ter exibido crescimento ligeiramente mais lento. O isolado identificado como L1C21R6 destacou-se dos restantes pelo facto de ter crescido de uma forma mais rápida e ter atingido às 48 h o valor máximo de absorbância registado (1.29).

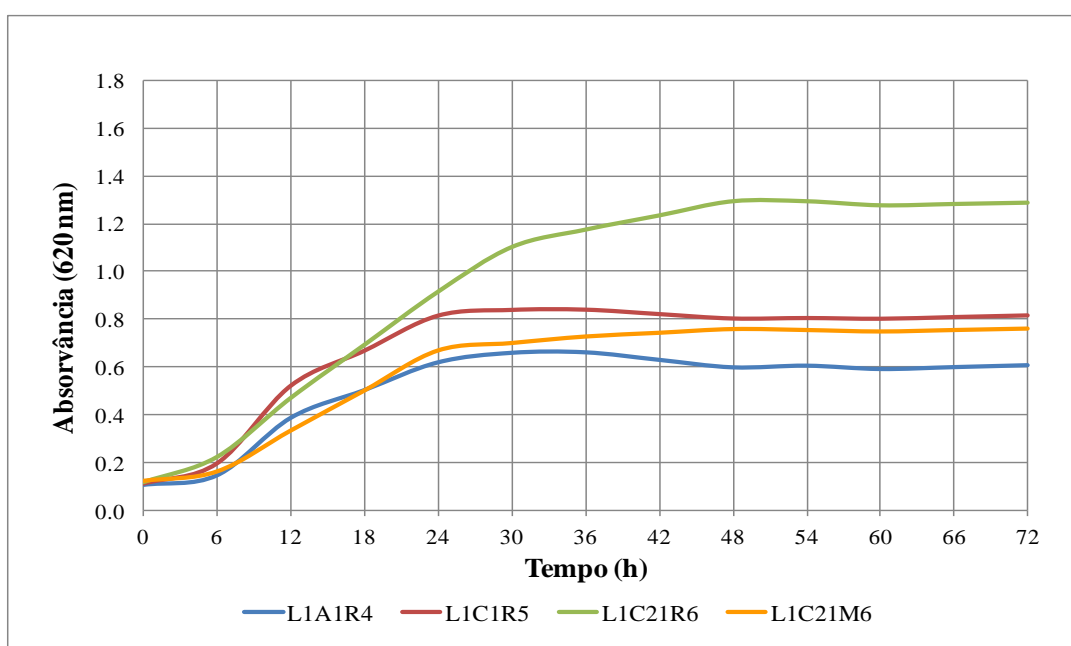


Figura 9. Curvas de crescimento em MRS, a 30 °C, em aerobiose, dos isolados do género *Lactococcus* obtidos a partir de queijo do Pico.



No que se refere às curvas de crescimento do género *Enterococcus* (Quadro 5 e Figura 10), todos os isolados apresentaram comportamentos muito próximos, à excepção do isolado *E. faecium* (L1B21K5). Registe-se o facto de às 48 h todos terem apresentado um ligeiro decréscimo na sua densidade óptica. Dentro do grupo analisado, o isolado *E. faecium* (L1B21K5) revelou um crescimento inicial mais lento e, ao contrário dos restantes, desenvolveu-se de forma gradual. O valor máximo de absorvância atingido foi de 0.67 e foi exibido pelo *E. faecalis* (L1C1K8) às 48 h.

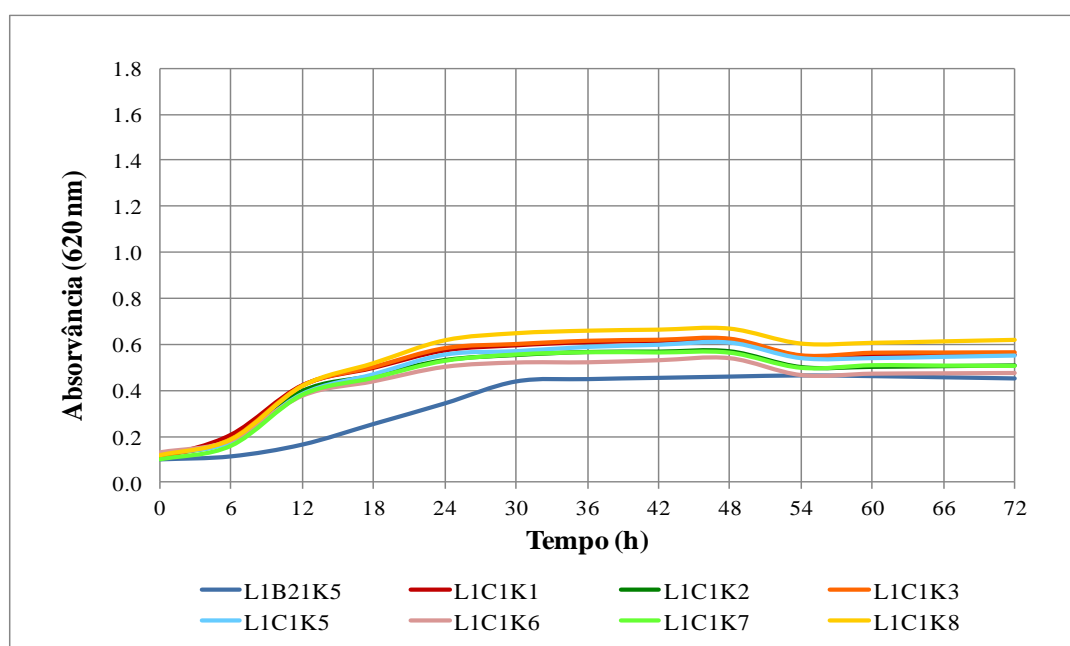


Figura 10. Curvas de crescimento em MRS, a 30 °C, em aerobiose, dos isolados do género *Enterococcus* obtidos a partir de queijo do Pico.

A análise do crescimento dos isolados não identificados das BAL do queijo do Pico (Quadro 5 e Figura 11) revela a existência de um grupo de 3 isolados que apresentaram um desenvolvimento muito homogéneo. O isolado L1C21M1 apresentou um crescimento inicial mais rápido nas primeiras 6 h, tendo registado uma estabilização no seu desenvolvimento a partir desta altura. Uma excepção a esta tendência é a dinâmica apresentada pelo isolado L1C1E2. Este apresentou um crescimento inicial muito mais rápido e abundante. O valor máximo de absorvância medido foi de 1.54 às 30 h.

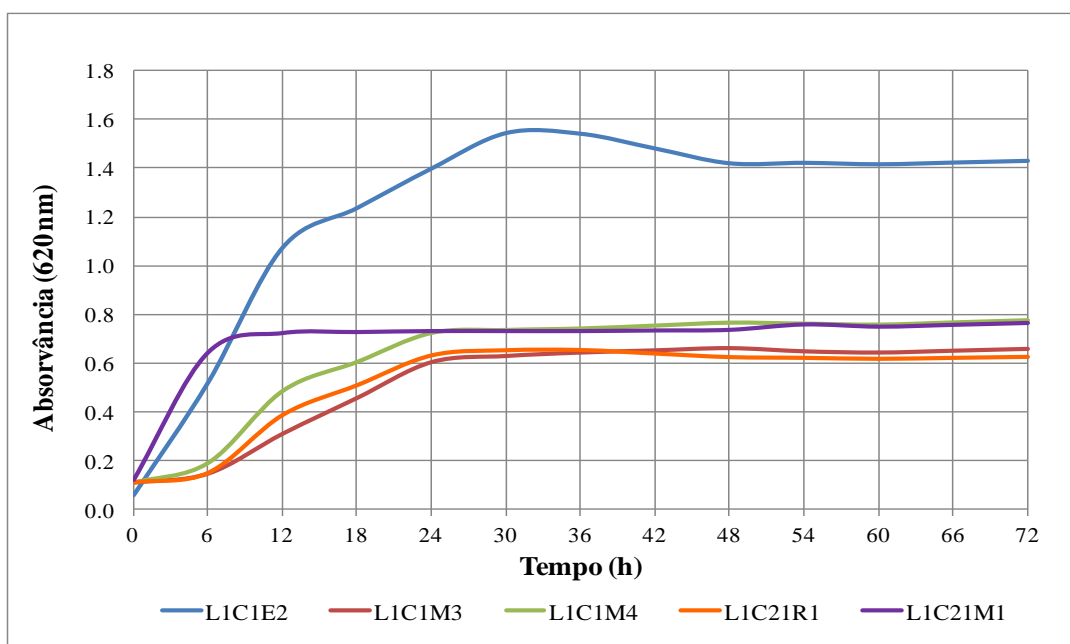


Figura 11. Curvas de crescimento em *MRS*, a 30 °C, em aerobiose, dos isolados não identificados obtidos a partir de queijo do Pico.

O meio *MRS* é considerado um meio selectivo para BAL, que é frequentemente utilizado no isolamento destas bactérias a partir de produtos tradicionais (Muyanja *et al.*, 2003). Diversos autores têm relatado bom crescimento de lactobacilos (Georgieva *et al.* (2009), lactococos (Todorov & Dicks, 2004) e enterococos (Carvalho *et al.*, 2003).

4.1.2. Curvas de acidificação

Ao analisarmos as curvas de acidificação do género *Lactobacillus* (Quadro 6 e Figura 12) é possível distinguir dois grupos: um grupo com menor poder acidificante, que atingiu um valor de pH de 4.5 às 72 h e um que atingiu um valor de pH menor (cerca de 3.8).

Ao longo do tempo existiu um decréscimo do valor de pH, atingindo-se um valor relativamente estável a partir das 60 h. Verificou-se que nas primeiras 24 h esta diminuição foi mais acentuada, período a partir do qual os valores de pH foram baixando mas de uma forma gradual.



Quadro 6. Valores médios de pH em MRS inoculado com 37 isolados de BAL obtidos a partir de queijo do Pico, durante incubação aeróbia a 30 °C.

Código	Identificação	Tempo (h)												
		0	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72
LIA1E5	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	5.54	5.19	4.58	4.29	4.00	3.92	3.82	3.80	3.78	3.74	3.73	3.74	3.75
LIA1E6	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	5.64	5.39	5.22	5.04	4.87	4.84	4.78	4.73	4.67	4.61	4.54	4.57	4.60
LIA1E7	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	5.56	5.40	5.33	5.13	4.93	4.93	4.86	4.78	4.70	4.70	4.63	4.63	4.64
LIA1E8	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	5.56	5.47	5.36	5.12	4.87	4.77	4.77	4.69	4.60	4.59	4.56	4.54	4.52
LIA1M4	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	5.54	5.40	5.28	5.04	4.81	4.74	4.69	4.66	4.63	4.61	4.61	4.56	4.52
LIA1M7	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	5.57	5.36	5.17	4.95	4.73	4.69	4.66	4.62	4.59	4.58	4.56	4.51	4.46
LIA1R6	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	5.49	5.53	5.23	5.08	4.93	4.87	4.74	4.66	4.59	4.56	4.54	4.54	4.54
LIB1M2	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	5.58	5.36	5.16	4.96	4.75	4.70	4.67	4.64	4.62	4.60	4.59	4.56	4.53
LIB1M3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	5.49	5.35	5.16	4.96	4.76	4.67	4.63	4.60	4.56	4.56	4.58	4.53	4.48
LIB1E2	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	5.60	5.44	5.31	5.08	4.86	4.82	4.79	4.70	4.60	4.66	4.58	4.60	4.61
LIB1E3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	5.41	5.11	4.57	4.26	3.96	3.95	3.87	3.82	3.77	3.86	3.79	3.82	3.84
LIB1E4	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	5.53	5.04	4.66	4.33	4.01	3.90	3.92	3.91	3.90	3.94	3.84	3.88	3.91
LIB1E7	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	5.66	5.34	5.27	5.05	4.83	4.70	4.74	4.71	4.68	4.72	4.53	4.54	4.55
LIB1R3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	5.62	5.52	5.27	5.05	4.84	4.79	4.73	4.64	4.56	4.52	4.51	4.50	4.50
LIB21E1	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	5.54	5.44	5.33	5.09	4.85	4.88	4.81	4.75	4.69	4.71	4.63	4.60	4.57
LIC1E4	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	5.52	5.15	4.54	4.25	3.95	3.95	3.96	3.94	3.92	3.80	3.88	3.86	3.85
LIC21M3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	5.54	5.40	5.16	4.93	4.70	4.69	4.63	4.61	4.58	4.55	4.55	4.49	4.43
LIC21M5	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	5.51	5.40	5.18	4.99	4.80	4.69	4.66	4.62	4.58	4.59	4.62	4.55	4.47
LIC1E6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	5.40	5.16	4.58	4.26	3.94	3.89	3.83	3.80	3.78	3.74	3.81	3.78	3.75
LIC1E8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	5.64	5.15	4.50	4.22	3.95	3.96	3.93	3.88	3.84	3.90	3.88	3.90	3.92
LIA1R4	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	5.42	5.41	5.15	4.89	4.63	4.55	4.50	4.44	4.38	4.32	4.30	4.31	4.33
LIC1R5	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	5.68	5.52	5.24	5.03	4.82	4.72	4.66	4.58	4.51	4.45	4.44	4.44	4.44
LIC21M6	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	5.52	5.42	5.24	5.08	4.92	4.80	4.73	4.72	4.72	4.67	4.66	4.62	4.58
LIC21R6	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	5.53	5.56	5.35	5.02	4.68	4.60	4.49	4.35	4.21	4.19	4.18	4.23	4.28
LIB21K5	<i>Enterococcus faecium</i>	5.52	5.43	5.37	5.25	5.14	5.08	5.05	4.96	4.87	4.87	4.83	4.81	4.78
LIC1K3	<i>Enterococcus faecium</i>	5.60	5.34	5.16	5.04	4.93	4.83	4.82	4.77	4.71	4.70	4.68	4.66	4.64
LIC1K2	<i>Enterococcus faecium</i>	5.48	5.40	5.21	5.06	4.91	4.85	4.83	4.82	4.80	4.68	4.67	4.64	4.61
LIC1K1	<i>Enterococcus faecalis</i>	5.61	5.35	5.18	5.02	4.86	4.84	4.82	4.76	4.71	4.67	4.66	4.63	4.59
LIC1K5	<i>Enterococcus faecalis</i>	5.58	5.36	5.16	5.04	4.93	4.86	4.83	4.79	4.75	4.72	4.71	4.68	4.64
LIC1K6	<i>Enterococcus faecalis</i>	5.45	5.39	5.16	5.03	4.90	4.84	4.82	4.79	4.76	4.74	4.70	4.67	4.64
LIC1K7	<i>Enterococcus faecalis</i>	5.42	5.37	5.17	5.03	4.89	4.86	4.84	4.78	4.72	4.69	4.69	4.66	4.62
LIC1K8	<i>Enterococcus faecalis</i>	5.53	5.42	5.23	5.08	4.92	4.87	4.84	4.79	4.73	4.71	4.70	4.65	4.61
LIC1E2	Não identificado	5.66	5.37	4.83	4.46	4.09	4.06	4.02	4.02	4.02	3.95	3.96	3.99	4.02
LIC1M3	Não identificado	5.53	5.39	5.24	5.05	4.86	4.74	4.72	4.69	4.66	4.62	4.62	4.56	4.50
LIC1M4	Não identificado	5.60	5.42	5.16	4.92	4.69	4.65	4.63	4.62	4.60	4.57	4.52	4.49	4.45
LIC21M1	Não identificado	5.49	4.95	4.79	4.66	4.53	4.49	4.41	4.44	4.47	4.40	4.38	4.35	4.31
LIC21R1	Não identificado	5.53	5.49	5.30	5.11	4.92	4.84	4.80	4.69	4.58	4.56	4.53	4.54	4.56

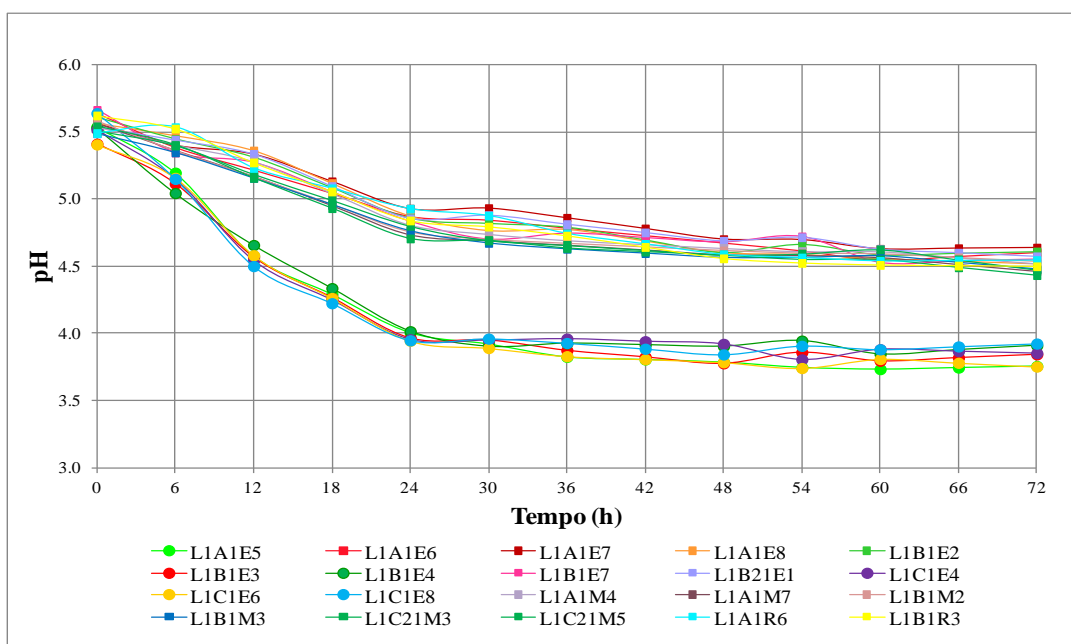


Figura 12. Curvas de acidificação em MRS, a 30 °C, em aerobiose, dos isolados do género *Lactobacillus* obtidos a partir de queijo do Pico.

Em relação aos valores de pH obtidos para os isolados do género *Lactococcus*, estes apresentaram um poder de acidificação muito semelhante (Quadro 6 e Figura 13). Às 72 h, o isolado *Lc. lactis* ssp. *lactis* identificado como L1C21R6 foi o que obteve valores de pH mais baixos (4.28). Por sua vez, o valor de pH medido para o isolado *Lc. lactis* ssp. *lactis* (L1C21M6) foi o mais elevado (4.58).

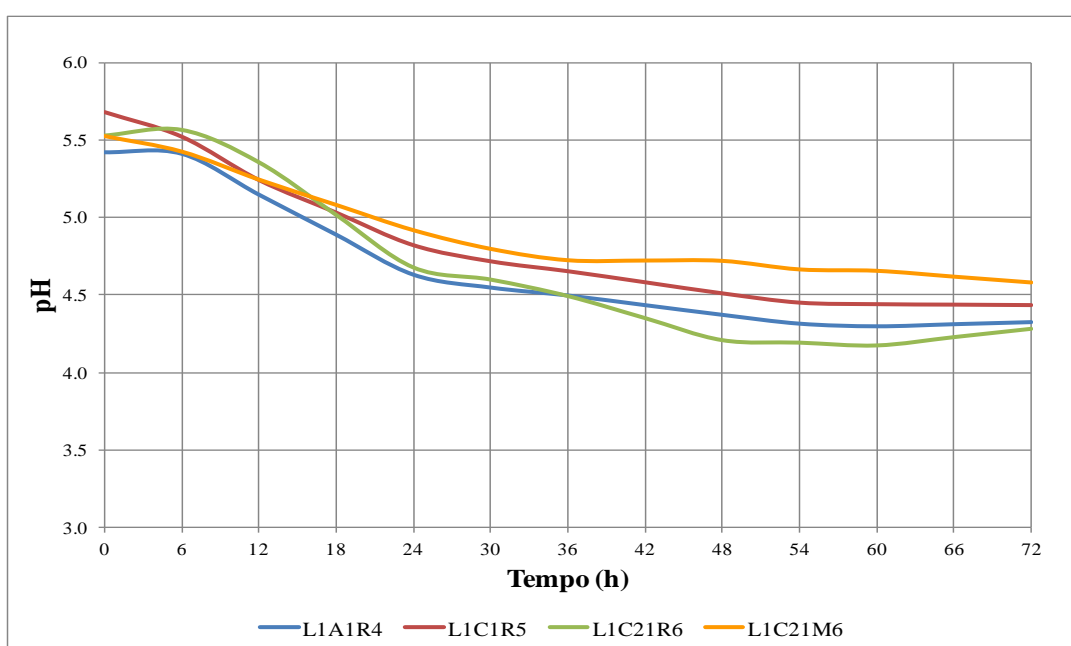


Figura 13. Curvas de acidificação em MRS, a 30 °C, em aerobiose, dos isolados do género *Lactococcus* obtidos a partir de queijo do Pico.



Uma análise ao Quadro 6 e à Figura 14 permite comprovar que a variação de pH que se verificou para os isolados do género *Enterococcus* foi muito semelhante. De salientar que o isolado que menos acidificou o meio foi o *E. faecium* com a referência L1B21K5.

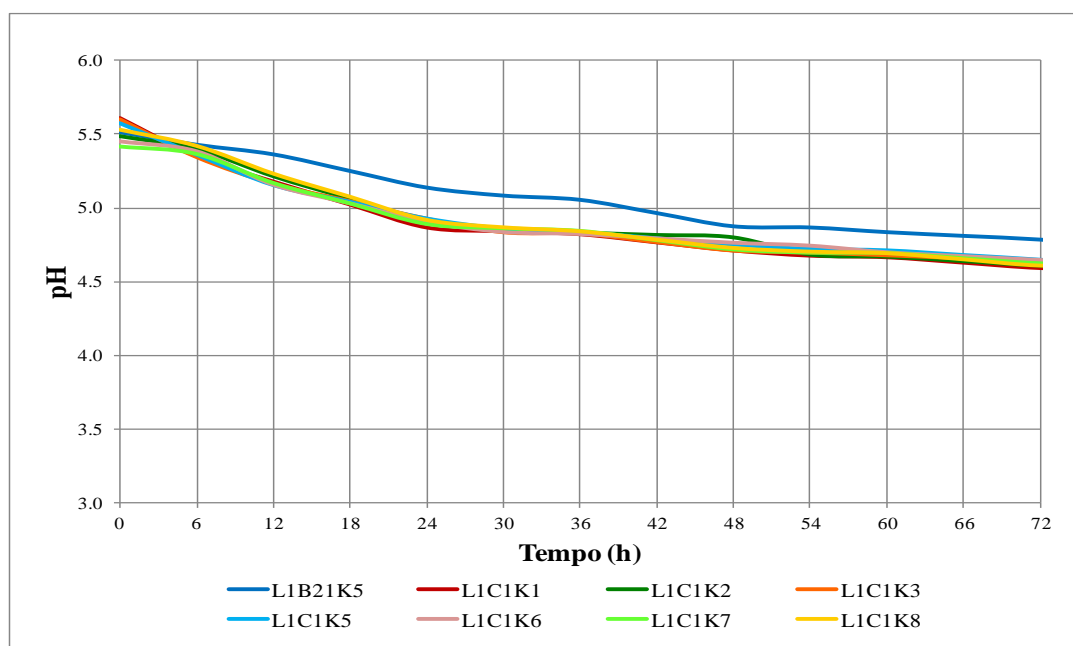


Figura 14. Curvas de acidificação em MRS, a 30 °C, em aerobiose, dos isolados do género *Enterococcus* obtidos a partir de queijo do Pico.

A evolução do valor de pH ao longo do tempo para os isolados não identificados das BAL do queijo do Pico mostrou que todos eles tiveram um comportamento homogéneo. De salientar que o isolado L1C1E1 foi um dos que apresentou um decréscimo mais acentuado de pH, registando-se 3.95 às 54 h (Quadro 6 e Figura 15).

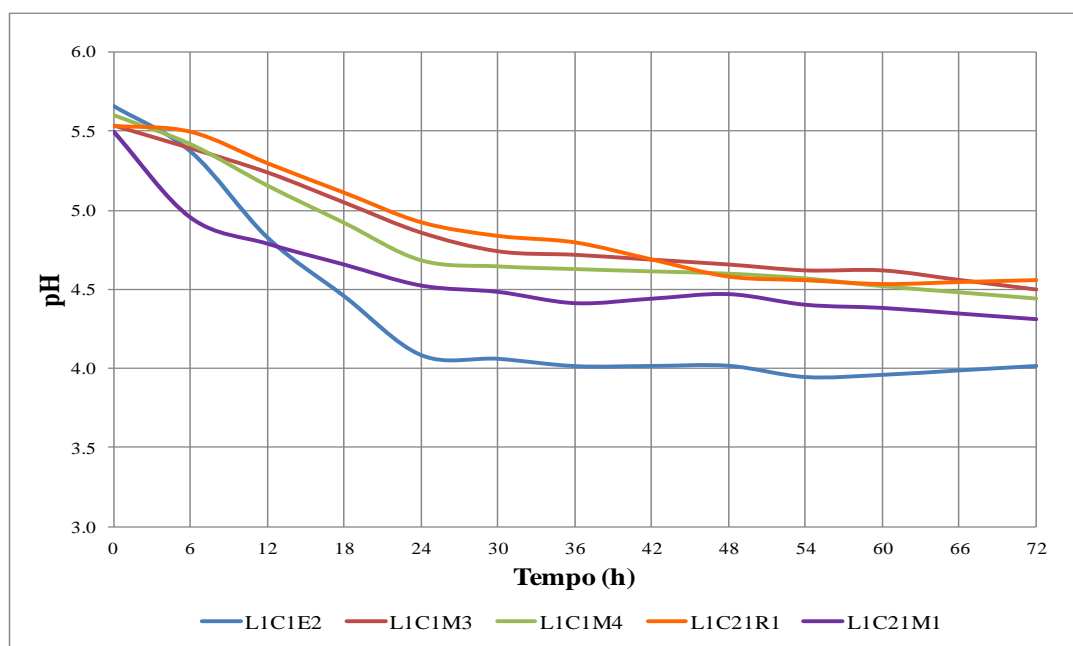


Figura 15. Curvas de acidificação em *MRS*, a 30 °C, em aerobiose, dos isolados não identificados obtidos a partir de queijo do Pico.

Em resumo, os isolados pertencentes ao género *Lactobacillus* produziram, ao fim de 72 h de incubação, nas condições testadas, valores de pH entre os 3.8 e os 4.5, enquanto que os isolados do género *Lactococcus* conduziram a valores de pH entre 4.3 e 4.6, tendo os enterococos atingido valores de pH entre 4.6 e 4.8. Tendo em conta que os lactococos e os enterococos são géneros homofermentativos de BAL, seria de esperar uma maior produção de ácido e, conseqüentemente, valores de pH mais baixos nos isolados pertencentes a estes grupos taxonómicos. Foram, contudo, os lactobacilos, género reconhecido pela sua maior resistência ao ácido (Hutkins, 2006) a atingir valores mais baixos de pH em meio de *MRS*.

Em ensaios destinados a seleccionar isolados de BAL para a fermentação de resíduos de pescado, também Dapkevicius (2002) verificou serem os lactobacilos que conduziram a valores de pH inferiores, quando testados em meio de *MRS*. Em sistemas-modelo com leite, também Villani & Coppola (1994) consideraram os enterococos como produtores de ácido “lentos”, por terem obtido decréscimos de pH de apenas 0.4 a 0.8. Num estudo realizado em leite, Badis *et al.* (2004) verificaram que os isolados com maior poder acidificante eram lactococos (44.3 %) e lactobacilos (36.1 %), resultados semelhantes aos obtidos por Mannu *et al.* (2000). Outros autores, contudo, obtiveram resultados diferentes, que apontavam para melhor acidificação por lactococos (Franciosi *et al.*, 2009; Herreros *et al.*, 2003; Nieto-Arribas *et al.*, 2011; Sarantinopoulos *et al.*, 2001; Suzzi *et al.*, 2000).



4.1.3. Actividade proteolítica e actividade lipolítica

Todos os isolados demonstraram ausência de actividade lipolítica em relação à tributirina. Quanto à actividade proteolítica (Figura 16), em todos os géneros houve isolados com proteólise negativa. Só foi detectada proteólise positiva em isolados dos géneros *Lactobacillus* (L1A1E8, L1A1M7, L1B1E2, L1C1E4, L1C1E6 e L1C1E8) e *Lactococcus* (L1C1R5 e L1C21M6).

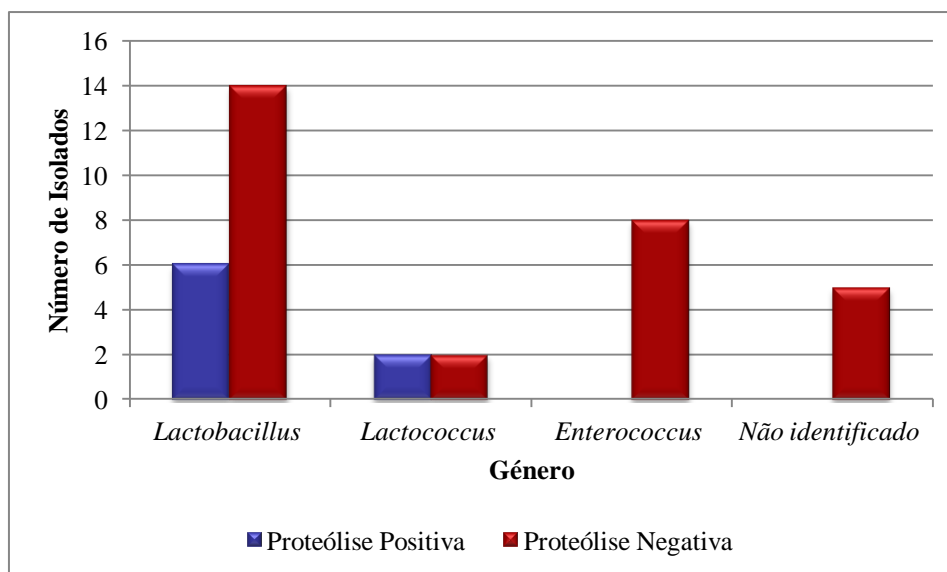


Figura 16. Resultados do teste da proteólise efectuado a 37 BAL do queijo do Pico.

Os isolados apresentaram fraca actividade proteolítica. Este aspecto vai de encontro ao detectado por Terzic-Vidojevic *et al.* (2009) no estudo das BAL do queijo “Zlata”, um queijo igualmente artesanal produzido com leite cru. Quanto à lipólise, os nossos resultados estão de acordo com a fraca capacidade lipolítica das BAL, referida, entre outros autores, por McSweeny & Sousa (2000).

4.1.4. Actividades enzimáticas

A análise dos perfis enzimáticos dos diversos géneros estudados através do *Kit* API Zym patentes nos Quadros 7 - 10 permite-nos tirar as seguintes conclusões acerca da actividade dos diversos grupos de enzimas estudados:

Proteases

Um total de 16 isolados mostraram possuir actividade da α -quimotripsina, enquanto que só 9 demonstraram actividade da tripsina. Os dois isolados com maior actividade (20 nanomoles de substrato hidrolisado) foram um *E. faecalis* e um isolado não identificado. De salientar, que nenhum



dos isolados da espécie *Lc. lactis* ssp. *lactis* demonstrou actividade nestas duas enzimas. Os isolados que apresentaram fraca ou inexistente actividade enzimática das proteases no API Zym foram os que apresentaram proteólise inexistente.

Peptidases

A actividade das peptidases foi frequente nos isolados estudados. Catorze isolados demonstraram a actividade da leucina arilamidase, outros 14 da valina arilamidase e 16 para a cistina arilamidase. De salientar que nenhum dos isolados de *Lc. lactis* ssp. *lactis* demonstrou actividade em relação à cistina arilamidase. Os isolados com maior actividade da enzima leucina arilamidase, com 40 ou mais nanomoles de substrato hidrolisado, foram 1 *E. faecalis*, 3 *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, 1 *Lc. lactis* ssp. *lactis* e 2 isolados não identificados.

No que se refere à enzima valina arilamidase, a actividade máxima desta enzima (com 40 ou mais nanomoles de substrato hidrolisado) foi detectada em 4 *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, pelo que os restantes demonstraram comportamento semelhante à leucina arilamidase.

As actividades acentuadas por parte das enzimas leucina arilamidase e valina arilamidase estão de acordo com o que já foi descrito por Herreros *et al.* (2003) e Papamanoli *et al.* (2003). No entanto, os resultados obtidos em relação à cistina arilamidase não coincidem com os de Papamanoli *et al.* (2003) que mencionam a baixa actividade da cistina arilamidase, enquanto que Herreros *et al.* (2003) descrevem a ausência da mesma por parte de *Lc. lactis* ssp. *lactis*. Para estes últimos autores as peptidases não só desempenham um papel importante na libertação de aminoácidos envolvidos no desenvolvimento de *flavours* no queijo como podem ter um efeito adoçante durante o processo de cura.

Segundo Smit *et al.* (2005) os lactococos utilizados nas fermentações lácteas são conhecidos pela sua capacidade limitada na biossíntese de aminoácidos, o que explica as suas complexas necessidades nutricionais e torna indispensável a existência de um sistema proteolítico, do qual fazem parte peptidases, para permitir a utilização dos aminoácidos presentes na caseína.

Fosfatases

A fosfatase alcalina teve uma actividade praticamente inexistente, tendo sido detectada apenas em dois isolados: um *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* e um isolado não identificado. Pelo contrário, a fosfatase ácida e a naftol-AS-BI-fosfohidrolase tiveram actividades acentuadas. Em relação à fosfatase ácida, os isolados com maior actividade (20 nanomoles de substrato hidrolisado)



pertenceram às espécies *E. faecalis*, *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, *Lc. lactis* ssp. *lactis* e isolados não identificados (onde se observou um caso de 30 nanomoles de substrato hidrolisado).

Os isolados com maior actividade da naftol-AS-BI-fosfohidrolase (com 20 ou mais nanomoles de substrato hidrolisado) foram 3 *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, 1 *Lc. lactis* ssp. *lactis*, 1 *E. faecalis* e 2 isolados não identificados.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores (Herreros *et al.*, 2003; Nieto-Arribas *et al.*, 2011; Serio *et al.*, 2010). Para Fox & McSweeney (2004) a fosfatase ácida é uma enzima essencial na hidrólise de fosfopéptidos, que faz assim parte do complexo sistema proteolítico das BAL.

Esterases/Lipases

A maioria dos isolados hidrolisou o 2-naftil butirato (esterase C4) e o 2-naftil caprilato (esterase lipase C8). Entretanto, só um dos isolados (*Lb. paracasei* ssp. *paracasei*) conseguiu hidrolisar o 2-naftil miristato (lipase C14) e de forma bastante fraca, com apenas 5 nanomoles de substrato hidrolisado. Destas 3 enzimas mencionadas, apenas foi detectada uma actividade muito fraca do 2-naftil butirato (esterase lipase C8) em *Lb. plantarum*. Os isolados com maior actividade apresentaram essencialmente 20 nanomoles de substrato hidrolisado, no entanto houve 3 casos de isolados com 30 nanomoles de substrato hidrolisado, um dos quais da espécie *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* e os outros dois isolados não identificados. A ausência de actividade da lipase (C14) está de acordo com o referido por Durlu-Ozkaya *et al.* (2001). Os nossos dados sobre a actividade da esterase (C4), da esterase lipase (C8) e da lipase (C14) vão de encontro ao que foi observado por Herreros *et al.* (2003). Segundo Herreros *et al.* (2003) certas estirpes de *Lactobacillus* contribuem para a lipólise no queijo quando libertam enzimas lipolíticas intracelulares durante a autólise. Estas enzimas contribuem para um aumento da concentração de ácidos gordos livres no queijo. Baixas concentrações de ácidos gordos livres contribuem para o *flavour* do queijo, em particular quando estão em equilíbrio com os produtos da proteólise ou de outras reacções (McSweeney & Sousa, 2000).

Nos lactococos verificou-se presença de actividade da esterase (C4) e da esterase lipase (C8) e ausência de actividade da lipase (C14) tal como no estudo de Herreros *et al.* (2003), verificando-se a mesma situação para os enterococos (Nieto-Arribas *et al.*, 2011; Serio *et al.*, 2010).



Oxidases

A actividade das oxidases foi muito pouco frequente entre os isolados estudados. Nenhum dos isolados demonstrou actividade tanto da α -manosidase como da α -fucosidase. Apenas um dos isolados *Lc. lactis* ssp. *lactis* demonstrou a actividade da β -glucuronidase com 40 ou mais nanomoles de substrato hidrolisado. Uma baixa actividade (5 - 10 nmol) da n-acetil- β -glucosaminidase foi detectada apenas em isolados de *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* (3), *Lb. plantarum* (2) e *E. faecalis* (2). Em relação à α -glucosidase (20 - 30 nmol), verificou-se a sua presença em 4 isolados de *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* e 1 isolado de *Lc. lactis* ssp. *lactis*.

No que se refere à actividade das enzimas relacionadas com o metabolismo dos glúcidos, podemos concluir que esta foi pouco frequente nos 3 géneros, ao contrário do que já foi referido por outros autores (Herreros *et al.*, 2003; Nieto-Arribas *et al.*, 2011; Serio *et al.*, 2010), principalmente no caso da β -galactosidase. Neste estudo, só foi observada forte actividade desta enzima em dois isolados (um *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* e um *Lc. lactis* ssp. *lactis*). Dois isolados apresentaram actividade muito fraca (um *E. faecalis* e um isolado não identificado), tendo nos restantes isolados estado ausente.



Quadro 7. Quantidade de substrato hidrolisado (nanomoles) através da utilização do *Kit* APIZYM (Bio-Merieux SA) por isolados do género *Lactobacillus* obtidos a partir de queijo do Pico.

Código	Identificação	Enzima (*)																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
LIA1E5	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0	5	20	0	≥40	≥40	5	0	0	0	5	0	≥40	0	20	0	5	0	0
LIA1E6	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0	10	10	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA1E7	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0	10	10	0	5	5	10	5	10	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0
LIA1E8	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0	10	5	0	0	5	5	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA1M4	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0	20	0	0	0	0	0	0	0	10	20	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA1M7	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0	20	10	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIA1R6	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0	20	10	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
LIB1M2	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0	30	20	0	20	0	0	0	0	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
LIB1M3	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0	10	10	0	0	0	0	0	0	5	20	0	0	0	0	0	0	0	0
LIB1E2	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0	10	10	0	0	5	5	5	5	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0
LIB1E3	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0	10	20	0	≥40	≥40	5	0	5	0	0	0	0	0	30	0	10	0	0
LIB1E4	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0	20	10	0	0	0	0	0	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
LIB1E7	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0	10	20	5	30	≥40	5	5	5	5	5	0	0	0	20	5	0	0	0
LIB1R3	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0	10	5	0	0	0	0	0	0	5	10	0	0	0	0	0	0	0	0
LIB2E1	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0	10	10	0	0	10	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0
LIC1E4	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0	5	10	0	≥40	≥40	10	5	5	5	10	0	0	0	20	0	5	0	0
LIC2M3	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0	20	10	0	0	0	0	0	0	10	20	0	0	0	0	0	0	0	0
LIC2M5	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0	20	10	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIC1E6	<i>Lb. plantarum</i>	0	0	0	0	0	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0
LIC1E8	<i>Lb. plantarum</i>	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0

(*) 1-fosfatase alcalina; 2-esterase (C4); 3-esterase lipase (C8); 4-lipase (C14); 5-leucina arilamidase; 6-valina arilamidase; 7-cistina arilamidase; 8-tripsina; 9- α -quimotripsina; 10-fosfatase ácida; 11-naftol-AS-BI-fosfolhidrolase; 12- α -galactosidase; 13- β -galactosidase; 14- β -glucuronidase; 15- α -glucosidase; 16- β -glucosidase; 17-n-acetil- β -glucosaminidase; 18- α -manosidase; 19- α -fucosidase.

Quadro 8. Quantidade de substrato hidrolisado (nanomoles) através da utilização do *Kit* APIZYM (Bio-Merieux SA) dos isolados do género *Lactococcus* obtidos a partir de queijo do Pico.

Código	Identificação	Enzima (*)																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
LIA1R4	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	0	0	10	0	5	0	0	0	0	10	5	0	0	0	0	30	0	0	0
LIC1R5	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	0	20	20	0	0	0	0	0	0	5	10	0	0	0	0	0	0	0	0
LIC2M6	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	0	20	20	0	0	0	0	0	0	5	10	0	0	0	0	0	0	0	0
LIC2R6	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	10	5	20	0	≥40	30	0	0	0	20	20	30	≥40	≥40	20	0	0	0	0

(*) 1-fosfatase alcalina; 2-esterase (C4); 3-esterase lipase (C8); 4-lipase (C14); 5-leucina arilamidase; 6-valina arilamidase; 7-cistina arilamidase; 8-tripsina; 9- α -quimotripsina; 10-fosfatase ácida; 11-naftol-AS-BI-fosfolhidrolase; 12- α -galactosidase; 13- β -galactosidase; 14- β -glucuronidase; 15- α -glucosidase; 16- β -glucosidase; 17-n-acetil- β -glucosaminidase; 18- α -manosidase; 19- α -fucosidase.



Quadro 9. Quantidade de substrato hidrolisado (nanomoles) através da utilização do *Kit* APIZYM (Bio-Merieux SA) dos isolados do género *Enterococcus* obtidos a partir de queijo do Pico.

Código	Identificação	Enzima (*)																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
LIB21K5	<i>Enterococcus faecium</i>	0	10	10	0	0	0	5	0	5	5	10	0	0	0	0	0	0	0	0
LIC1K3	<i>Enterococcus faecium</i>	0	10	10	0	0	0	0	0	0	5	10	0	0	0	0	0	0	0	0
LIC1K2	<i>Enterococcus faecium</i>	0	10	10	0	0	10	10	5	5	10	5	5	5	0	0	0	0	0	0
LIC1K1	<i>Enterococcus faecalis</i>	0	10	5	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
LIC1K5	<i>Enterococcus faecalis</i>	0	10	5	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
LIC1K6	<i>Enterococcus faecalis</i>	0	10	20	0	≥40	5	20	0	20	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0
LIC1K7	<i>Enterococcus faecalis</i>	0	10	5	0	5	10	5	0	10	5	5	0	0	0	0	0	5	0	0
LIC1K8	<i>Enterococcus faecalis</i>	0	5	5	0	0	0	0	5	5	5	0	0	0	0	0	0	10	0	0

(*) 1-fosfatase alcalina; 2-esterase (C4); 3-esterase lipase (C8); 4-lipase (C14); 5-leucina arilamidase; 6-valina arilamidase; 7-cistina arilamidase; 8-tripsina; 9- α -quimotripsina; 10-fosfatase ácida; 11-naftol-AS-BI-fosfohidrolase; 12- α -galactosidase; 13- β -galactosidase; 14- β -glucuronidase; 15- α -glucosidase; 16- β -glucosidase; 17-n-acetil- β -glucosaminidase; 18- α -manosidase; 19- α -fucosidase.

Quadro 10. Quantidade de substrato hidrolisado (nanomoles) através da utilização do *Kit* APIZYM (Bio-Merieux SA) de isolados não identificados obtidos a partir de queijo do Pico.

Código	Identificação	Enzima (*)																		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
LIC1E2	Não identificado	0	30	30	0	≥40	0	10	0	5	20	10	0	0	0	0	0	0	0	0
LIC1M3	Não identificado	0	20	20	0	30	5	10	5	20	10	5	0	0	0	0	0	0	0	0
LIC1M4	Não identificado	0	20	10	0	0	0	0	0	0	5	20	0	0	0	0	0	0	0	0
LIC21M1	Não identificado	5	5	5	0	30	0	5	0	0	30	10	0	5	0	0	5	0	0	0
LIC21R1	Não identificado	0	30	30	0	≥40	0	20	0	5	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0

(*) 1-fosfatase alcalina; 2-esterase (C4); 3-esterase lipase (C8); 4-lipase (C14); 5-leucina arilamidase; 6-valina arilamidase; 7-cistina arilamidase; 8-tripsina; 9- α -quimotripsina; 10-fosfatase ácida; 11-naftol-AS-BI-fosfohidrolase; 12- α -galactosidase; 13- β -galactosidase; 14- β -glucuronidase; 15- α -glucosidase; 16- β -glucosidase; 17-n-acetil- β -glucosaminidase; 18- α -manosidase; 19- α -fucosidase.



4.1.5. Produção de diacetilo a partir de citrato

De acordo com a Figura 17, todos os géneros apresentaram isolados que produziram diacetilo a partir de citrato. Dos vinte isolados do género *Lactobacillus*, 9 apresentaram um nível médio de produção (L1A1E5, L1A1E6, L1A1E7, L1A1R6, L1B1E2, L1B1E7, L1B1M2, L1B1R3 e L1C1E6) e 4 nível alto (L1A1E8, L1A1M7, L1C21M3 e L1C21M5). No género *Lactococcus* houve 2 isolados com nível alto (L1C1R5 e L1C21M6), 1 com nível baixo (L1C21R6) e 1 que não produziu diacetilo (L1A1R4). Em contrapartida, no género *Enterococcus* 7 dos 8 isolados apresentaram nível baixo e 1 não produziu diacetilo (L1B21K5).

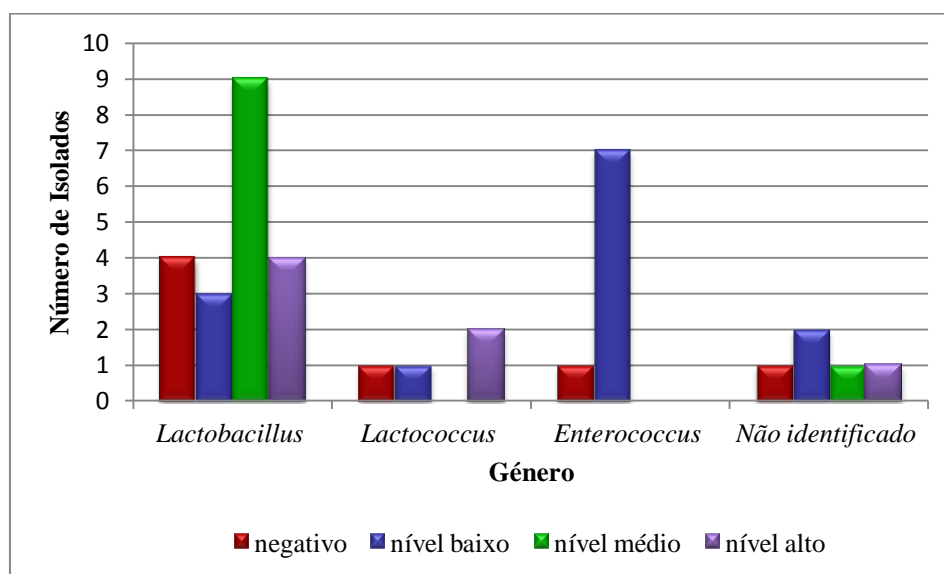


Figura 17. Resultados do teste da produção de diacetilo a partir de citrato efectuado a 37 BAL isoladas a partir de queijo do Pico.

Franciosi *et al.* (2009) verificou que a produção de diacetilo por BAL de leite cru é dependente da estirpe, uma vez que obteve 3 níveis de produção diferentes (alto, médio e baixo) no seu estudo e algumas estirpes não produziram diacetilo, o que está de acordo com resultados obtidos no presente trabalho.

De acordo com Badis *et al.* (2004) apenas 14.1 % dos isolados de *Lactococcus* e *Lactobacillus* conseguiram produzir elevadas concentrações de diacetilo, enquanto que os restantes isolados conseguiram produzir níveis médios deste composto. No nosso estudo, as proporções de isolados com produção de níveis elevados de diacetilo foram maiores.



A produção de diacetilo é uma característica importante para uma potencial cultura de arranque, uma vez que este composto participa no aroma de muitos produtos lácteos (Mayo *et al.*, 2010).

4.1.6. Produção de exopolissacáridos

Nenhum dos isolados em estudo produziu exopolissacáridos a partir dos açúcares em análise. Embora a produção destes compostos seja considerada uma característica importante na selecção das BAL como culturas de arranque para determinados produtos lácteos (Parente & Cogan, 2004), não é frequente entre isolados provenientes de queijo (Franciosi *et al.*, 2009).

4.1.7. Determinação da concentração mínima inibidora de bñlis

Na determinação da concentração mínima inibidora (CMI) de bñlis 18 isolados obtiveram CMI de 0.1 % e 19 CMI de 0.2 % (Figura 18). Os isolados com CMI de 0.2 % foram 9 do género *Lactobacillus* (L1A1E8, L1B1E2, L1B1E3, L1B1E4, L1B1E7, L1B21E1, L1B1M2, L1C1E4 e L1C1E8), 1 do género *Lactococcus* (L1C21R6), 6 do género *Enterococcus* (L1C1K1, L1C1K2, L1C1K5, L1C1K6, L1C1K7 e L1C1K8) e 3 não identificados (L1C1M3, L1C1M4 e L1C1E2) obtiveram CMI de 0.2 % (Figura 18).

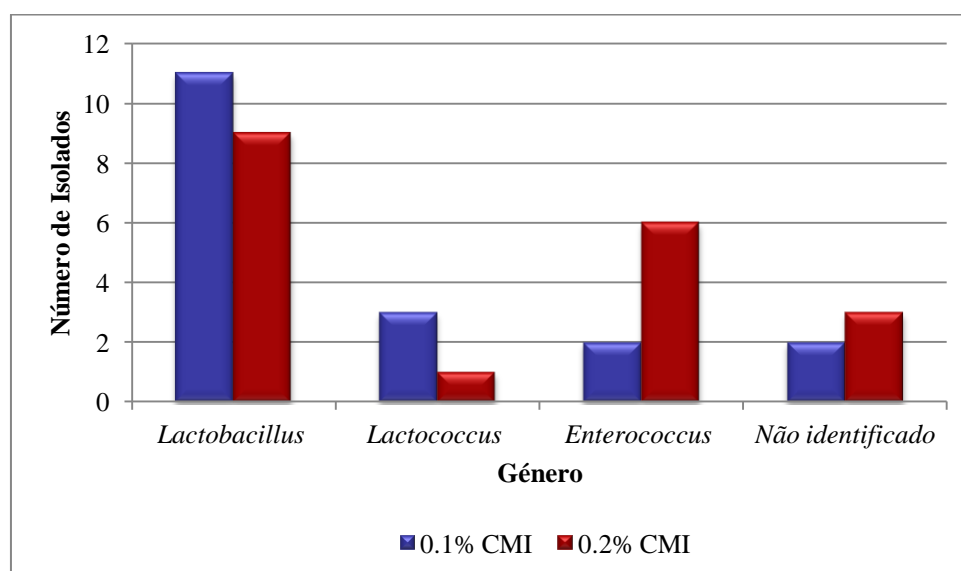


Figura 18. Concentração mínima inibidora (CMI) de bñlis apresentada por 37 BAL obtidas a partir de queijo do Pico.



Com base nestes resultados, e de acordo com Erkkilä & Petäjä, (2000), estes isolados não podem ser considerados como bons candidatos a agentes probióticos, visto não crescerem na presença de sais biliares à concentração crítica de 0.3 %.

4.1.8. Actividade antimicrobiana

Técnica de inoculação cruzada

Na técnica de inoculação cruzada, todos os isolados de BAL do queijo do Pico em estudo inibiram as 5 bactérias alvo de referência, embora o mesmo não tenha ocorrido quando culturas inteiras destas BAL foram avaliadas pela técnica dos poços. O recurso a esta técnica simples foi contemplado para permitir uma triagem rápida dos isolados quanto à sua capacidade antimicrobiana. Embora produza bons resultados em isolados doutras origens, especialmente naqueles em que a actividade antimicrobiana se encontra relacionada com um modo de vida em biofilme (Coelho, 2011), não se revelou adequada como metodologia para a triagem de BAL.

Técnica dos poços

Os resultados da actividade antimicrobiana segundo a técnica dos poços contemplados nas tabelas que se seguem (Quadros 11 - 14) referem-se apenas à inibição das culturas inteiras e dos sobrenadantes, uma vez que os resultados das culturas com catalase adicionada e dos sobrenadantes neutralizados foram todos negativos.

As bactérias alvo de referência com maiores inibições pelas culturas inteiras foram o *C. perfringens* e a *L. monocytogenes* (1.3 cm de diâmetro médio da zona de inibição), seguidos da *E. coli* (1.2 cm) do *S. aureus* (1.1 cm) e da *P. aeruginosa* (0.7 cm). Nos sobrenadantes as maiores inibições foram para a *P. aeruginosa* (0.3 cm), seguida do *C. perfringens* e da *E. coli* (0.2 cm) e por último pela *L. monocytogenes* (0.1 cm). No caso do *S. aureus* não houve inibições por parte dos sobrenadantes.

As bactérias alvo de referência foram consideravelmente mais inibidas pelas culturas inteiras do que pelos sobrenadantes. Nas culturas inteiras os isolados mais inibidores foram L1B1E4, L1A1E5, L1B1E3, L1C1E4 (*Lb. paracasei* ssp. *paracasei*) e L1C1E6 (*Lb. plantarum*) seguindo-se os isolados L1C1E2 (não identificado), L1C1E8 (*Lb. plantarum*), L1B1R3 (*Lb. paracasei* ssp. *paracasei*), L1C1R5 (*Lc. lactis* ssp. *lactis*), L1C1K2 (*E. faecium*) e L1C1K1 e L1C1K8 (*E. faecalis*). Nos sobrenadantes os isolados mais inibidores foram L1B1E4, L1A1E5, L1C1E4 (*Lb. paracasei*



ssp. *paracasei*) e L1C1E6 (*Lb. plantarum*) seguindo-se os isolados L1C1E2 (não identificado), L1C1E8 (*Lb. plantarum*) e L1B1E3 (*Lb. paracasei* ssp. *paracasei*).

A forte inibição de bactérias com significado tecnológico (pseudomonas, implicadas na rancificação de produtos lácteos; enterobactérias, implicadas no flato precoce; e clostrídios, causadores de flato tardio) pela maioria dos isolados em estudo, demonstra o potencial das bactérias autóctones do queijo do Pico para o controlo de problemas que afectam a qualidade organoléptica deste produto.

A perda de actividade antimicrobiana por tratamento dos sobrenadantes de todas as culturas com catalase e por neutralização indica que os mecanismos de inibição presentes são a produção de H_2O_2 e de ácido. Provavelmente, a produção de bacteriocinas não desempenha um papel importante na actividade antimicrobiana destes isolados contra os microrganismos alvo em estudo.



Quadro 11. Médias \pm desvios padrão dos diâmetros dos halos de inibição (cm) obtidos no estudo da actividade antimicrobiana (técnica dos poços) em culturas inteiras e sobrenadantes de isolados do género *Lactobacillus* provenientes de queijo do Pico.

Código	Identificação	<i>Clostridium perfringens</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
		Cultura Inteira	Sobrenadante	Cultura Inteira	Sobrenadante	Cultura Inteira	Sobrenadante	Cultura Inteira	Sobrenadante	Cultura Inteira	Sobrenadante
L1A1E5	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	1.4 \pm 0.2	1.2 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1	1.1 \pm 0.2	1.4 \pm 0.2	1.1 \pm 0.1	1.4 \pm 0.1	1.2 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0
L1A1E6	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	1.3 \pm 0.3	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
L1A1E7	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	1.3 \pm 0.3	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0
L1A1E8	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	1.3 \pm 0.4	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
L1A1M4	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	1.3 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
L1A1M7	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	1.4 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0
L1A1R6	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.6	0.0 \pm 0.0
L1B1M2	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	1.3 \pm 0.3	0.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.3	0.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0
L1B1M3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	1.4 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0
L1B1E2	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	1.3 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.9 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
L1B1E3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	1.5 \pm 0.2	1.1 \pm 0.2	1.5 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2	1.4 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	1.2 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
L1B1E4	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	1.5 \pm 0.3	1.1 \pm 0.1	1.5 \pm 0.2	1.1 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1	1.3 \pm 0.2	1.5 \pm 0.4	1.4 \pm 0.3	1.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0
L1B1E7	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	1.2 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0
L1B1R3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	1.4 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.4 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
L1B2I1	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	1.3 \pm 0.3	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
L1C1E4	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	1.6 \pm 0.4	1.1 \pm 0.2	1.3 \pm 0.1	1.0 \pm 0.2	1.5 \pm 0.2	1.2 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	1.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0
L1C2I3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	1.2 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0
L1C2I5	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	1.3 \pm 0.3	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
L1C1E6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1.4 \pm 0.2	1.1 \pm 0.1	1.5 \pm 0.1	1.2 \pm 0.2	1.5 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1	1.1 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0
L1C1E8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1.4 \pm 0.1	1.1 \pm 0.2	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.4 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	1.2 \pm 0.1	1.4 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0

Quadro 12. Médias \pm desvios padrão dos diâmetros dos halos de inibição (cm) obtidos no estudo da actividade antimicrobiana (técnica dos poços) em culturas inteiras e sobrenadantes de isolados do género *Lactococcus* provenientes de queijo do Pico.

Código	Identificação	<i>Clostridium perfringens</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
		Cultura Inteira	Sobrenadante	Cultura Inteira	Sobrenadante	Cultura Inteira	Sobrenadante	Cultura Inteira	Sobrenadante	Cultura Inteira	Sobrenadante
L1A1R4	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	1.5 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
L1C1R5	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	1.4 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.4 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0
L1C2I6	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	1.2 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0
L1C2I6	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0



Quadro 13. Médias \pm desvios padrão dos diâmetros dos halos de inibição (cm) obtidos no estudo da actividade antimicrobiana (técnica dos poços) em culturas inteiras e sobrenadantes de isolados do género *Enterococcus* provenientes de queijo do Pico.

Código	Identificação	<i>Clostridium perfringens</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
		Cultura Inteira	Sobrenadante	Cultura Inteira	Sobrenadante	Cultura Inteira	Sobrenadante	Cultura Inteira	Sobrenadante	Cultura Inteira	Sobrenadante
L1B2IK5	<i>Enterococcus faecium</i>	1.1 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
L1C1K3	<i>Enterococcus faecium</i>	1.4 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0
L1C1K2	<i>Enterococcus faecium</i>	1.3 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0
L1C1K1	<i>Enterococcus faecalis</i>	1.4 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
L1C1K5	<i>Enterococcus faecalis</i>	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
L1C1K6	<i>Enterococcus faecalis</i>	1.4 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.2	1.2 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0
L1C1K7	<i>Enterococcus faecalis</i>	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0
L1C1K8	<i>Enterococcus faecalis</i>	1.4 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0

Quadro 14. Médias \pm desvios padrão dos diâmetros dos halos de inibição (cm) obtidos no estudo da actividade antimicrobiana (técnica dos poços) em culturas inteiras e sobrenadantes de isolados não identificados provenientes de queijo do Pico.

Código	Identificação	<i>Clostridium perfringens</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
		Cultura Inteira	Sobrenadante	Cultura Inteira	Sobrenadante	Cultura Inteira	Sobrenadante	Cultura Inteira	Sobrenadante	Cultura Inteira	Sobrenadante
L1C1E2	Não identificado	1.5 \pm 0.4	1.2 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	1.3 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
L1C1M3	Não identificado	1.2 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0
L1C1M4	Não identificado	1.3 \pm 0.3	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.2	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0
L1C2IM1	Não identificado	1.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
L1C2IR1	Não identificado	1.4 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.1	0.0 \pm 0.0	1.3 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.2 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0



De acordo com Savadogo *et al.* (2004) as bactérias Gram-positivas patogénicas são mais sensíveis aos compostos antimicrobianos produzidos pelas BAL. A resistência das bactérias Gram-negativas é-lhes conferida pela sua parede celular.

Em diversos estudos efectuados por outros autores, demonstrou-se o potencial antimicrobiano das BAL contra patógenos importantes, transmissíveis pelos lacticínios. Num estudo de Guessas *et al.* (2007), 96 isolados de *Lc. lactis* apresentaram efeito antagonístico contra o *Staphylococcus aureus*. Segundo estes autores este efeito deveu-se ao decréscimo do pH resultante da produção de ácidos orgânicos. Os sobrenadantes de dois isolados desta espécie mostraram igualmente inibição relativamente ao *S. aureus*, o que segundo Guessas *et al.* (2007) tenha sido devido a outras substâncias antibacterianas que não os ácidos orgânicos. Tal como neste estudo, apenas uma pequena fracção dos isolados que inibiam os patógenos quando aplicados sob a forma de cultura inteira continuavam a produzir inibição quando se empregavam os respectivos sobrenadantes.

Num trabalho de Tûma *et al.* (2008), todos os isolados de *Lb. paracasei* inibiram as várias estirpes de *Clostridium* sp. testadas, enquanto que Anas *et al.* (2008) verificaram que todos os isolados de *Lb. plantarum* e *Lb. paracasei ssp. paracasei* estudados apresentavam efeito inibitório para o *S. aureus*, sendo esse efeito mais significativo por parte dos isolados de *Lb. plantarum*. O efeito inibidor deste microrganismo também foi estudado por Ebrahimi *et al.* (2011), que demonstraram que o *Lb. plantarum* para além de inibir *S. aureus* também inibia *E. coli* e *L. monocytogenes*. Os resultados obtidos nesta análise demonstraram que a capacidade antimicrobiana apresentada pelos isolados está directamente relacionada com a produção de ácido láctico.

4.2. Critérios de segurança das BAL do queijo do Pico

4.2.1. Actividade hemolítica

Através da análise do Figura 19 podemos constatar que predominou a presença de hemólise α em todos os géneros. Entretanto, a presença das hemólises γ e β só se verificou no género *Lactobacillus* em 4 isolados de *Lb. paracasei ssp. paracasei* (L1A1E5, L1B1E4, L1B21E1 e L1B1R3) e 1 *Lb. paracasei ssp. paracasei* (L1A1M4) respectivamente. A presença de hemolisinas é considerada uma característica negativa para culturas a aplicar em produtos alimentares. Por este motivo, não deverá ser considerada a utilização do isolado L1A1M4 (*Lb. paracasei ssp. paracasei*) como potencial cultura de arranque/cultura adjunta. Embora não tenha sido ainda descrita actividade β -hemolítica em *Lb. paracasei*, a identificação fornecida pelo sistema API 50CHL não é



definitiva e poderá tratar-se doutra espécie bacteriana. A produção de hemólise β foi referida em isolados de enterococos (Gupta & Malik, 2007) e de *Weisella* (Olano *et al.*, 2001).

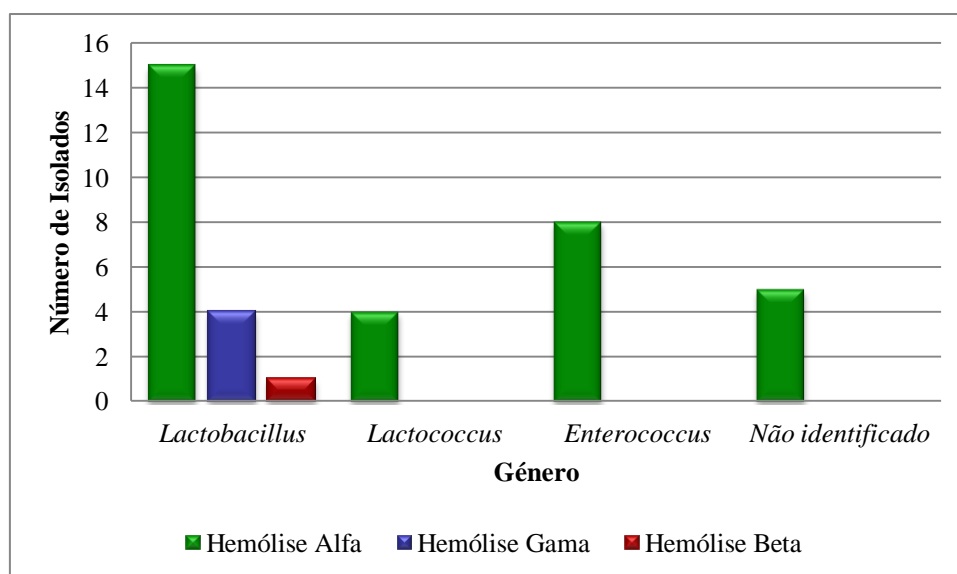


Figura 19. Resultados do teste da hemólise efectuado a 37 BAL isoladas a partir de queijo do Pico.

4.2.2. DNase

Todos os resultados foram negativos para a produção de DNase (dados não apresentados), embora outros autores tenham encontrado isolados de enterococos DNase positivos (Nascimento *et al.*, 2010).

4.2.3. Gelatinase

A análise da Figura 20 permite-nos concluir que todos os géneros apresentaram isolados gelatinase-positivos à excepção dos enterococos que foram todos gelatinase-negativos. Dentro do género *Lactobacillus* os isolados gelatinase-positivos foram L1A1E6, L1A1E7, L1A1E8, L1A1M7, L1A1R6, L1B1E2, L1B1E7, L1B1M2, L1B1R3, L1C21M3 e L1C21M5, no género *Lactococcus* foram L1A1R4, L1C21R6 e L1C21M6 e os isolados não identificados foram L1C1M3 e L1C21R1.

A ausência de gelatinase é especialmente importante nos enterococos destinados à produção de alimentos, em que a segurança tem que ser comprovada caso a caso por não possuírem estatuto QPS. O facto de todos os enterococos em estudo não terem produzido gelatinase constitui um factor positivo, mas que deverá ser confirmado por pesquisa dos genes que codificam este caracter (Lopes *et al.*, 2006).

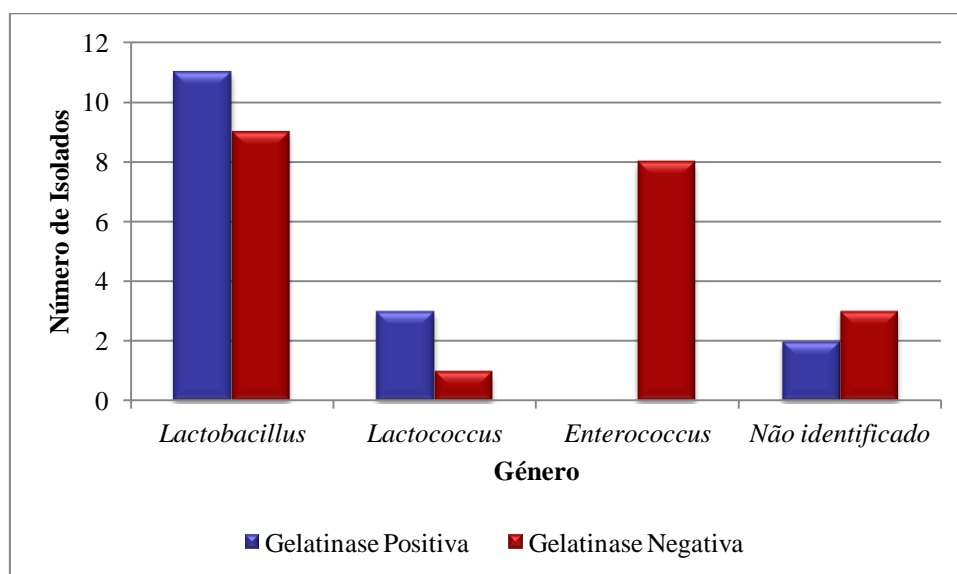


Figura 20. Resultados do teste da gelatinase efectuado a 37 BAL isoladas a partir de queijo do Pico.

4.2.4. Produção de histamina

Não se verificou a produção de histamina em nenhum dos isolados (dados não apresentados), embora outros autores refiram a presença de BAL produtoras de histamina em queijos (Ladero *et al.*, 2008). Os mesmos concluem que os teores mais elevados de histamina e as maiores proporções de BAL produtoras de histamina se encontram em queijos com longos períodos de maturação, o que não é o caso do queijo do Pico.

4.2.5. Resistência a antibióticos

Através da análise do Quadro 15 e da Figura 21 constatamos que quase totalidade dos isolados do género *Lactobacillus* demonstrou sensibilidade relativamente ao grupo das penicilinas (amoxicilina/ácido clavulânico 2:1, a carbenicilina, a penicilina e a piperacilina) com excepção de 1 isolado que demonstrou sensibilidade intermédia à amoxicilina/ácido clavulânico 2:1, assim como no caso do grupo das sulfamidas representado pelo sulfametazol/trimetoprim, dos 20 isolados 19 foram sensíveis, e 1 resistente. Em relação ao cloranfenicol, à vancomicina, à tetraciclina e à rifampicina houve uma maior tendência para apresentarem sensibilidade. No entanto, registaram-se alguns casos de resistência. Para o grupo das cefalosporinas verificou-se resistência em relação à ceftazidima e à ceftriaxona. No caso da cefotaxima praticamente metade dos isolados foram sensíveis e a outra metade resistentes e relativamente à cefalotina a maioria dos isolados mostrou-se sensível.



Quadro 15. Padrões de resistência/sensibilidade a 22 antibióticos de BAL isoladas a partir de queijo do Pico. S – sensível; I – sensibilidade intermédia e R – resistente.

Código	Identificação	Antibiótico (*)																					
		AMC30	C30	CAR100	CAZ30	CN10	CRO30	CTX30	DA2	E15	K30	KF30	NA30	NET30	OFX5	P10	PRL100	RD5	S10	SXT25	TE30	TOB10	VA30
L1A1E5	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	S	S	S	I	R	S	S	R	I	R	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S
L1A1E6	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	S	R	S	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S
L1A1E7	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	S	S	S	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	S	S	I	R	S	S	R	R
L1A1E8	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	S	R	S	R	R	R	I	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S
L1A1M4	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	S	R	S	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	S	S	I	R	S	S	R	I
L1A1M7	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	S	I	S	I	R	R	S	R	I	R	I	R	R	R	S	S	I	R	S	S	R	I
L1A1R6	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	I	R	S	R	R	S
L1B1M2	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	S	S	S	R	R	I	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S
L1B1M3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	S	R	S	I	R	R	S	R	I	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S
L1B1E2	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	S	S	S	R	R	S	R	R	I	R	S	R	R	R	S	S	I	R	S	R	R	S
L1B1E3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	S	S	S	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	I	S	S	S	R	S	S	R	S
L1B1E4	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	S	S	S	R	R	R	S	R	I	R	S	R	R	R	S	S	I	I	S	S	R	I
L1B1E7	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	S	S	S	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	S	S	I	R	S	R	R	S
L1B1R3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	I	R	S	R	R	I
L1B21E1	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	S	S	S	R	R	R	R	R	I	R	I	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S
L1C1E4	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	I	R	S	S	R	I
L1C21M3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	S	S	S	R	R	R	I	R	I	R	S	R	R	R	S	S	I	R	S	S	R	S
L1C21M5	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	S	S	S	R	R	R	S	R	I	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	I
L1C1E6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	I	S	S	R	S	R	S	S	S	I	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R
L1C1E8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	S	S	S	R	R	R	S	R	I	R	S	R	R	I	S	S	S	R	S	S	R	R
L1A1R4	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	S	S	S	S	I	S	S	R	I	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S
L1C1R5	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	S	I	S	R	R	R	R	R	I	R	I	R	R	R	S	S	I	R	S	S	R	S
L1C21M6	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	S	S	I	R	R	R	R	R	I	R	I	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	R
L1C21R6	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S
L1B21K5	<i>Enterococcus faecium</i>	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	R	R	S
L1C1K3	<i>Enterococcus faecium</i>	S	S	S	R	R	R	S	R	I	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S
L1C1K2	<i>Enterococcus faecium</i>	S	I	S	R	R	I	R	R	I	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	I
L1C1K1	<i>Enterococcus faecalis</i>	S	I	S	R	R	S	S	R	I	R	I	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S
L1C1K5	<i>Enterococcus faecalis</i>	S	S	S	R	R	S	S	R	I	R	I	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	S
L1C1K6	<i>Enterococcus faecalis</i>	S	I	S	R	R	I	S	R	I	R	I	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	I
L1C1K7	<i>Enterococcus faecalis</i>	S	S	S	R	R	R	I	R	I	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	I
L1C1K8	<i>Enterococcus faecalis</i>	S	S	S	R	R	I	I	R	I	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	I
L1C1E2	Não identificado	S	S	S	R	R	R	R	R	I	R	S	R	R	R	S	S	S	R	I	S	R	R
L1C1M3	Não identificado	S	S	S	R	R	I	S	R	I	R	S	R	R	R	S	S	I	R	S	S	R	I
L1C1M4	Não identificado	S	S	S	S	R	I	I	R	I	R	S	R	R	R	S	S	I	R	S	S	R	S
L1C21M1	Não identificado	S	S	S	R	R	I	S	R	I	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	R	S
L1C21R1	Não identificado	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	I	R	S	R	R	S

(*) AMC30 - amoxicilina/ácido clavulânico 2:1; C30 – cloranfenicol; CAR100 – carbenicilina; CAZ30 – ceftazidima; CN10 – gentamicina; CRO30 – ceftriaxona; CTX30 – cefotaxima; DA2 – clindamicina; E15 – eritromicina; K30 – canamicina; KF30 – cefalotina; NA30 - ácido nalidíxico; NET30 – netilmicina; OFX5 – ofloxacina; P10 – penicilina; PRL100 – piperacilina; RD5 – rifampicina; S10 – estreptomicina; SXT25 - sulfametoxazol/trimetoprim; TE30 – tetraciclina; TOB10 – tobramicina; VA30 – vancomicina.



Passando para o grupo dos aminoglicosídeos (gentamicina, canamicina, netilmicina, estreptomicina e tobramicina), constatamos que a quase totalidade dos isolados demonstrou resistência a estes antibióticos. No que se refere ao caso da clindamicina, do ácido nalidíxico e da ofloxacina (quinolonas), os isolados foram na sua maioria resistentes. O mesmo não se verificou para a eritromicina, em que obtivemos 2 isolados sensíveis, 11 com sensibilidade intermédia e 7 resistentes (Quadro 15 e Figura 21).

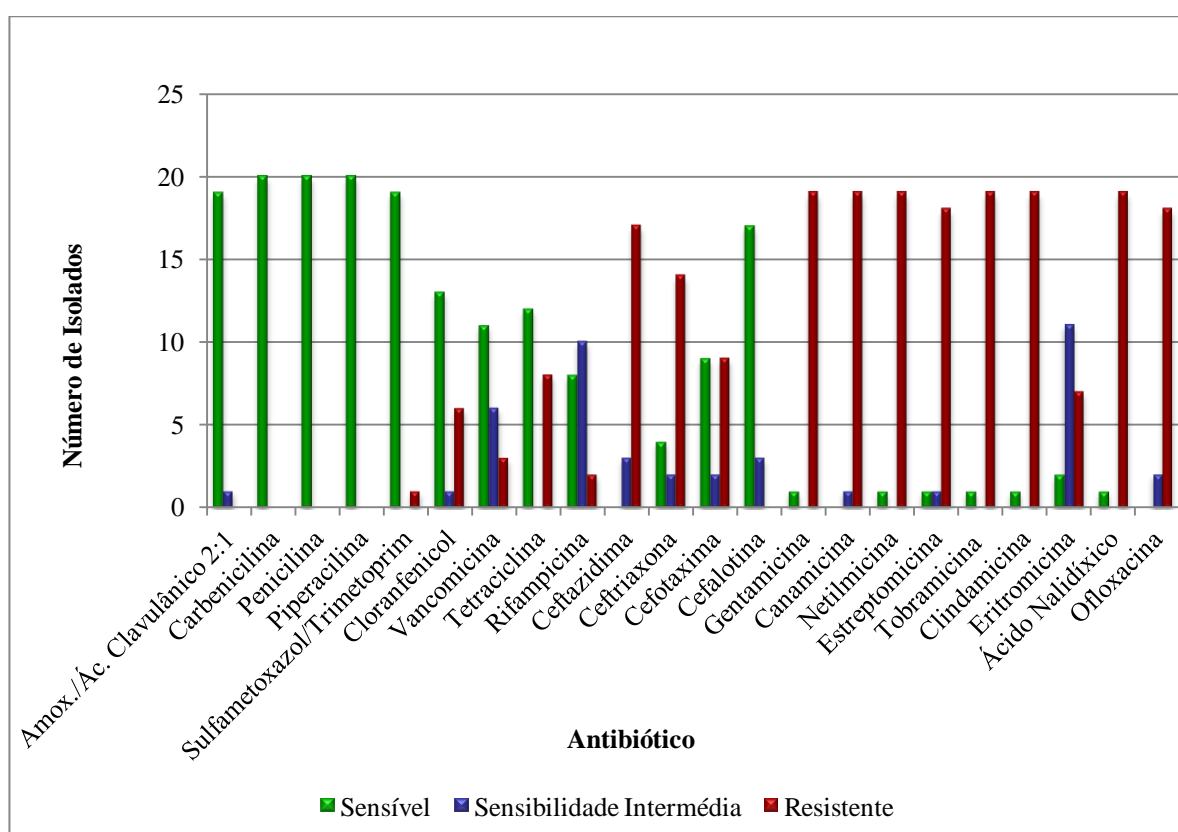


Figura 21. Padrões de sensibilidade/resistência a 22 antibióticos de isolados do género *Lactobacillus* provenientes de queijo do Pico.

No Quadro 15 e Figura 22 podemos observar que os isolados do género *Lactococcus* apresentaram quase na sua totalidade sensibilidade ao grupo das penicilinas, com excepção de 1 isolado que demonstrou sensibilidade intermédia à carbencilina. Em relação ao sulfametoxazol/trimetoprim, ao cloranfenicol, à vancomicina, à tetraciclina e à rifampicina houve uma maior tendência para apresentarem sensibilidade, no entanto, registaram-se alguns casos de resistência. Nos grupos cefalosporinas e aminoglicosídeos verificou-se maioritariamente resistência, assim como, no caso da clindamicina, do ácido nalidíxico e ofloxacina. Relativamente à eritromicina



dos 4 isolados do género 3 apresentaram sensibilidade intermédia e 1 resistência (Quadro 15 e Figura 22).

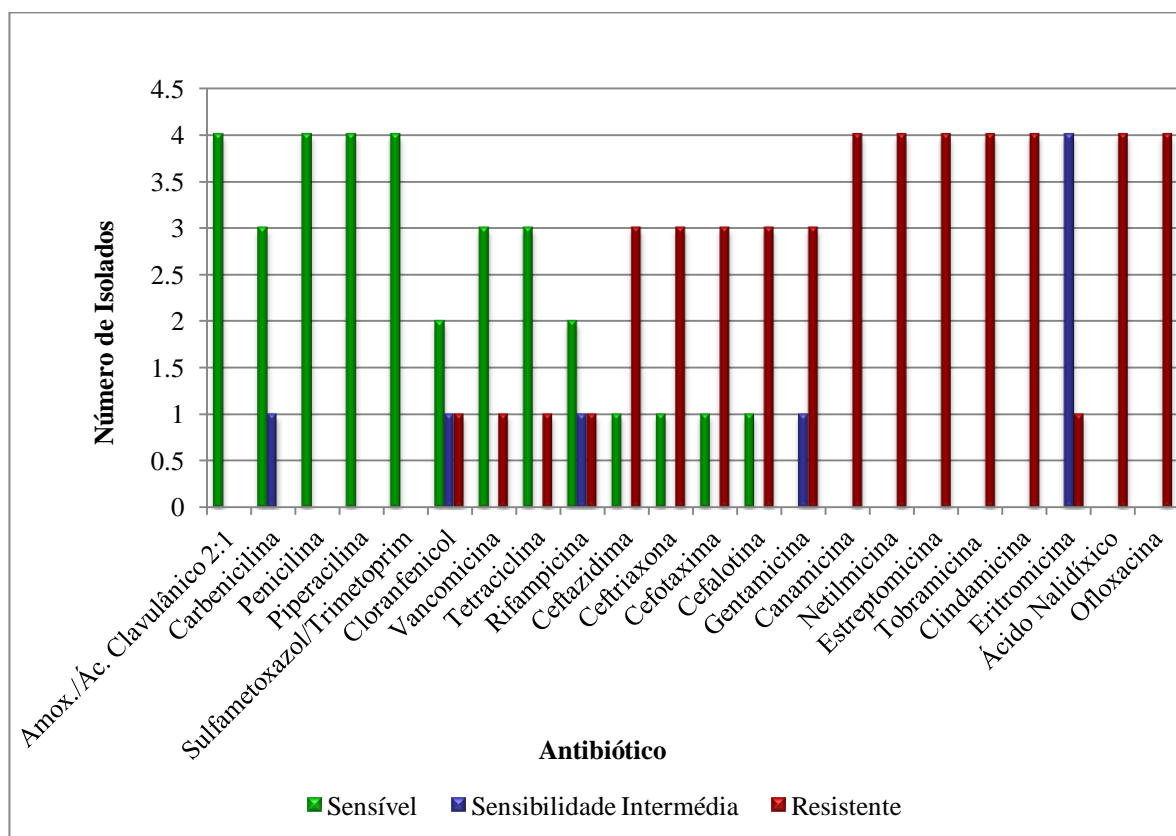


Figura 22. Padrões de sensibilidade/resistência a 22 antibióticos de isolados do género *Lactococcus* provenientes de queijo do Pico.

O Quadro 15 e Figura 23 permite-nos constatar que todos os isolados do género *Enterococcus* apresentaram sensibilidade às penicilinas. No caso do sulfametoxazol/trimetoprim, do cloranfenicol, da vancomicina apresentaram sensibilidade e sensibilidade intermédia, enquanto que mostraram-se resistentes para a tetraciclina e rifampicina. Para o grupo das cefalosporinas, todos os isolados exibiram resistência à ceftazidima. Em relação à ceftriaxona, à cefotaxima e à cefalotina apresentaram mais sensibilidade e sensibilidade intermédia a estes antibióticos, no entanto destacam-se alguns casos de resistência. No grupo dos Aminoglicosídeos os isolados foram maioritariamente resistentes, à excepção de 1 caso de sensibilidade relativamente à estreptomicina. Por último, temos a clindamicina, a ofloxacina e o ácido nalidíxico para os quais apresentaram resistência e para a eritromicina sensibilidade.

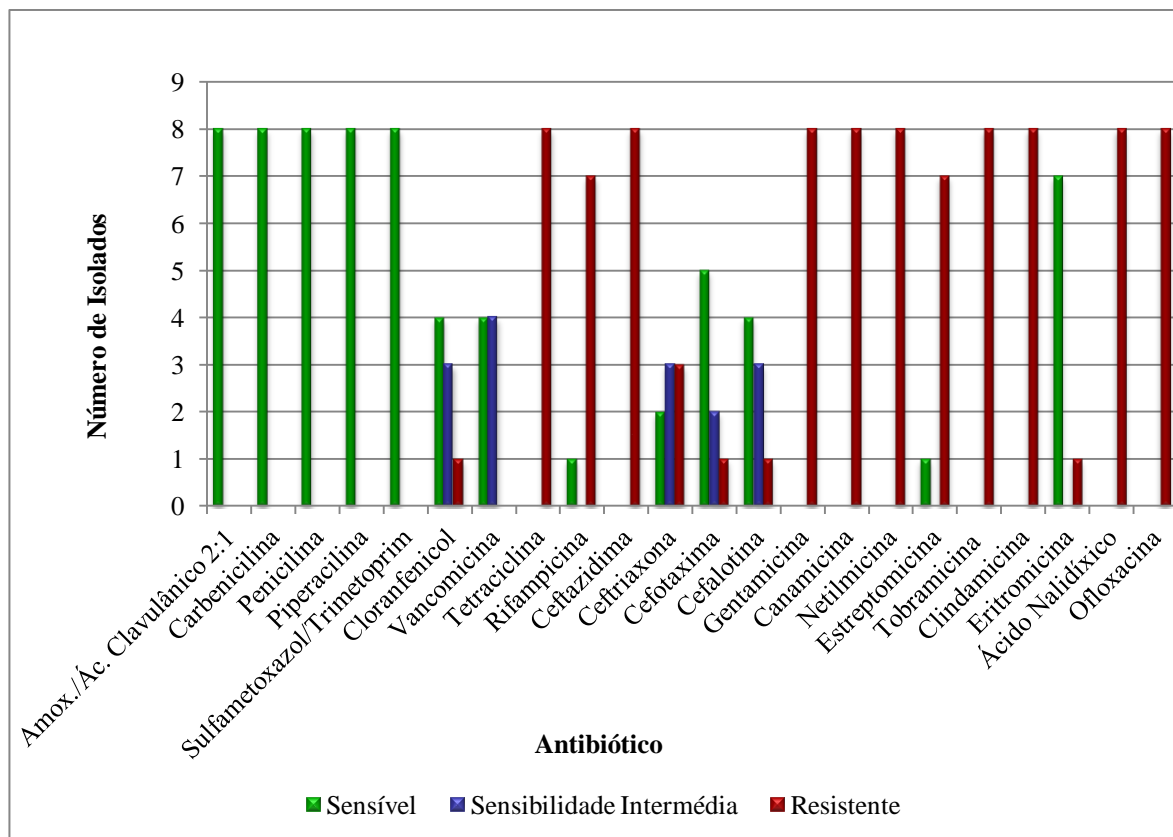


Figura 23. Padrões de sensibilidade/resistência a 22 antibióticos de isolados do género *Enterococcus* provenientes de queijo do Pico.

Pela análise do Quadro 15 e Figura 24 concluiu-se que todos os isolados cujos géneros não foram identificados foram todos sensíveis às penicilinas. No caso do sulfametoxazol/trimetoprim, do cloranfenicol, da vancomicina e da tetraciclina apresentaram sensibilidade e sensibilidade intermédia, enquanto que para a rifampicina mostraram-se resistentes. No grupo das cefalosporinas, apresentaram quase todos resistência à ceftazidima. Quanto à ceftriaxona, à cefotaxima e à cefalotina apresentaram mais sensibilidade e sensibilidade intermédia, no entanto com alguns casos de resistência. No grupo dos aminoglicosídeos os isolados foram todos resistentes. Por último, temos a clindamicina, a ofloxacina e o ácido nalidíxico para os quais todos apresentaram resistência, enquanto que para a eritromicina apenas 1 isolado foi resistente os restantes 4 obtiveram sensibilidade intermédia.

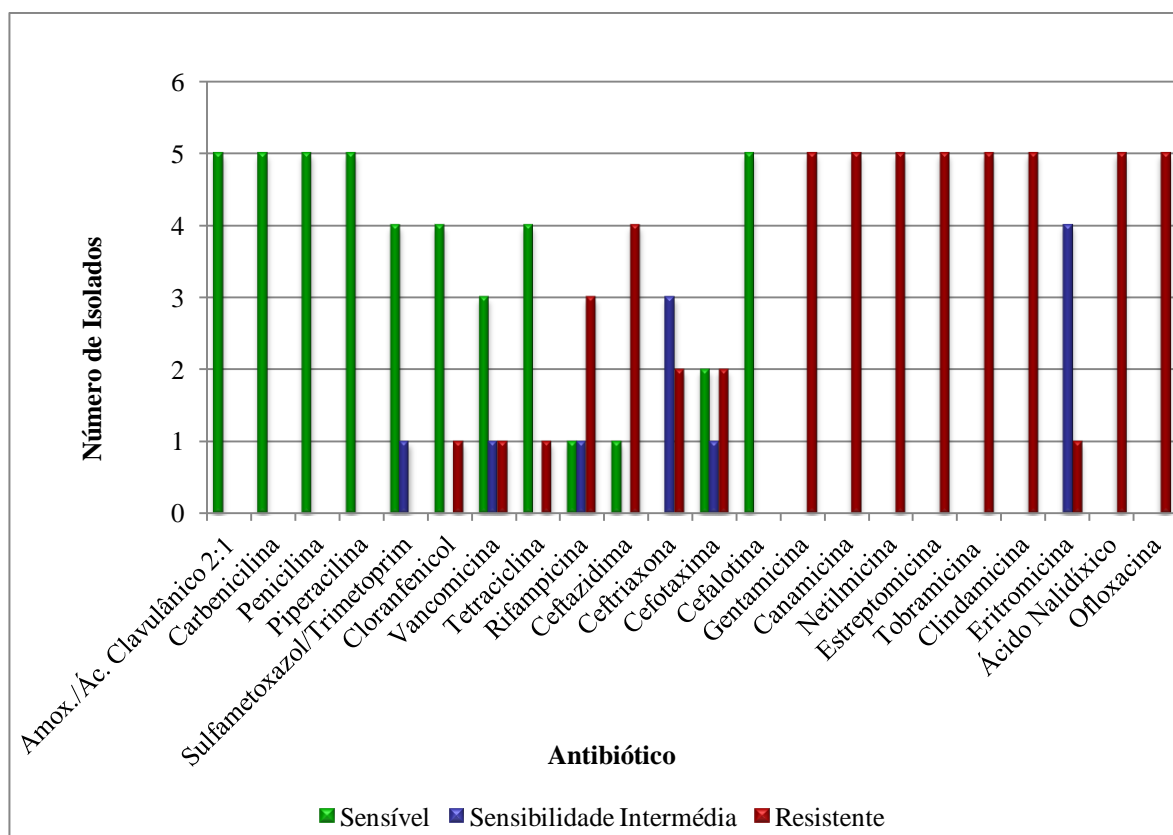


Figura 24. Padrões de sensibilidade/resistência a 22 antibióticos de isolados não identificados provenientes de queijo do Pico.

Ao determinarmos a resistência aos antibióticos pelas BAL do queijo do Pico deparamo-nos com a quase inexistência de documentos com parâmetros de avaliação, situação já referenciada por Mathur & Singh (2005) no seu trabalho. Os estudos existentes dizem respeito maioritariamente ao género *Enterococcus*, nomeadamente para *E. faecalis* e *E. faecium*, por serem as espécies mais estudadas nessa matéria. Como tal, optamos por utilizar esses parâmetros no caso do género *Enterococcus* e para os géneros *Lactobacillus* e *Lactococcus* utilizamos os parâmetros destinados às BAL em geral (CLSI, 2010, 2011 e CSFM, 2010).

A análise do perfil de resistência das BAL em relação aos 22 antibióticos testados revelou que os isolados de todos os géneros, até dos não identificados, apresentaram quase na sua totalidade (salvo duas exceções de sensibilidade intermédia) sensibilidade para como o grupo das penicilinas. Este aspecto está de acordo com o que já foi referido por Ammor *et al.* (2007) sobre o perfil de resistência aos antibióticos para os géneros *Lactobacillus* e *Lactococcus* e por Teuber *et al.* (1999) e Nieto-Arribas *et al.* (2011) para o género *Enterococcus*. Também demonstraram sensibilidade ao cloranfenicol e à tetraciclina observados igualmente neste estudo, embora não totalmente porque no



caso dos isolados do género *Lactobacillus* alguns foram resistentes à tetraciclina e no caso do género *Enterococcus* todos os isolados foram resistentes a este antibiótico. Nieto-Arribas *et al.* (2011) também identificou alguns isolados deste género resistentes à tetraciclina.

A maior parte dos isolados demonstrou ser sensível ao sulfametoxazol/trimetoprim e à vancomicina. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Nieto-Arribas *et al.* (2011) para os *Enterococci*. No entanto, para os *Lactobacillus* e *Lactococcus* vem referido na literatura (Ammor *et al.* 2007; Mathur & Singh, 2005; Teuber *et al.* 1999) que possuem uma resistência natural a estes antibióticos. Observou-se sensibilidade face à rifampicina pelos géneros *Lactobacillus* e *Lactococcus*, embora na literatura venha referido que os *Lactococci* sejam resistentes a este antibiótico (Mathur & Singh, 2005; Teuber *et al.* 1999). Todos os *Enterococci* foram resistentes à Rifampicina. Nieto-Arribas *et al.* (2011) identificou alguns isolados do género *Enterococcus* resistentes à rifampicina. No grupo das cefalosporinas a tendência foi para apresentarem resistência em relação à ceftazidima, à ceftriaxona e à cefotaxima e sensibilidade no caso da cefalotina o que está de acordo com os autores Ammor *et al.* (2007) e Mathur & Singh (2005). Relativamente ao grupo dos aminoglicosídeos (gentamicina, canamicina, netilmicina, estreptomina e tobramicina) os isolados foram maioritariamente resistentes a este grupo. Ammor *et al.* (2007), Mathur & Singh (2005) e Teuber *et al.* (1999) consideram que os géneros estudados são muito resistentes a estes antibióticos e também à clindamicina, à eritromicina, ao ácido nalidíxico e à ofloxacina como se pode comprovar pelos resultados que apresentamos.

Os resultados da avaliação fenotípica da resistência a antibióticos necessitam de ser complementados com a pesquisa dos respectivos genes de resistência. A localização dos genes em elementos genéticos de alta mobilidade, que exclui a sua inclusão em alimentos devido ao risco da transferência da resistência para patógenos, só pode ser determinada deste modo (Ammor *et al.*, 2008).

4.3. Análise de dados

4.3.1. Curvas de crescimento microbiano

Os parâmetros OD_0 (absorvância inicial), $OD_{máx}$ (absorvância máxima), $\mu_{máx}$ (taxa específica de crescimento máximo), t-lag (duração da fase de latência) e t-d (tempo de duplicação) estimados segundo o modelo de Baranyi encontram-se descritos no Quadro 16.



Quadro 16. Parâmetros de OD₀ (absorvância inicial), OD_{máx} (absorvância máxima), $\mu_{máx}$ (taxa específica de crescimento máximo), t-lag (duração da fase de latência) e t-d (tempo de duplicação) estimados segundo o modelo de Baranyi (*Software MicroFit Version 1.0.*) para 37 isolados de BAL provenientes de queijo do Pico.

Código	Identificação	OD ₀	OD _{máx}	$\mu_{máx}$	t-lag	t-d
L1A1E5	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.05	1.53	0.3	0.25	2.27
L1A1E6	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.1	0.61	0.21	9.21	3.28
L1A1E7	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.08	0.52	0.36	13.03	1.95
L1A1E8	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.09	0.71	0.33	11.79	2.07
L1A1M4	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.1	0.7	0.17	11.54	4.15
L1A1M7	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.11	0.67	0.34	10.53	2.02
L1A1R6	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.12	0.62	0.44	10.06	1.57
LIB1M2	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.11	0.64	0.38	10.73	1.84
LIB1M3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.11	0.67	0.37	9.86	1.86
LIB1E2	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.09	0.58	0.29	11.58	2.41
LIB1E3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.06	1.56	0.35	1.44	1.97
LIB1E4	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.21	1.63	0.17	0.97	4.1
LIB1E7	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.09	0.62	0.22	9.26	3.12
LIB1R3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.11	0.7	0.4	9.35	1.74
LIB21E1	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.03	0.51	0.29	12.02	2.41
LIC1E4	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.07	1.52	0.33	0.87	2.07
LIC21M3	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.11	0.72	0.35	9.64	1.98
LIC21M5	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	0.11	0.66	0.39	11.14	1.78
LIC1E6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.05	1.51	0.35	1.84	1.98
LIC1E8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.04	1.53	0.41	1.39	1.71
L1A1R4	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	0.11	0.62	0.44	10.21	1.57
LIC1R5	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	0.11	0.83	0.38	9.02	1.8
LIC21M6	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	0.11	0.75	0.18	11.32	3.95
LIC21R6	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	0.16	1.29	0.16	10.91	4.44
LIB21K5	<i>Enterococcus faecium</i>	0.1	0.45	0.19	17.35	3.7
LIC1K3	<i>Enterococcus faecium</i>	0.11	0.58	0.37	8.71	1.87
LIC1K2	<i>Enterococcus faecium</i>	0.11	0.57	0.32	7.92	2.16
LIC1K1	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.11	0.57	0.32	7.92	2.16
LIC1K5	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.13	0.56	0.39	9.7	1.77
LIC1K6	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.13	0.49	0.42	9.06	1.66
LIC1K7	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.1	0.53	0.41	9.13	1.71
LIC1K8	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.12	0.63	0.36	9.3	1.92
LIC1E2	Não identificado	0.14	1.51	0.22	2.75	3.16
LIC1M3	Não identificado	0.11	0.64	0.33	11.63	2.07
LIC1M4	Não identificado	0.11	0.75	0.38	9.06	1.84
LIC21M1	Não identificado	0.13	0.74	0.51	1.79	1.37
LIC21R1	Não identificado	0.11	0.63	0.44	10.33	1.59



A análise dos parâmetros descritos na Quadro 16 pelo programa estatístico *Community Analysis Package 4 Version 4.0* permitiu a elaboração do seguinte dendograma (Figura 25).

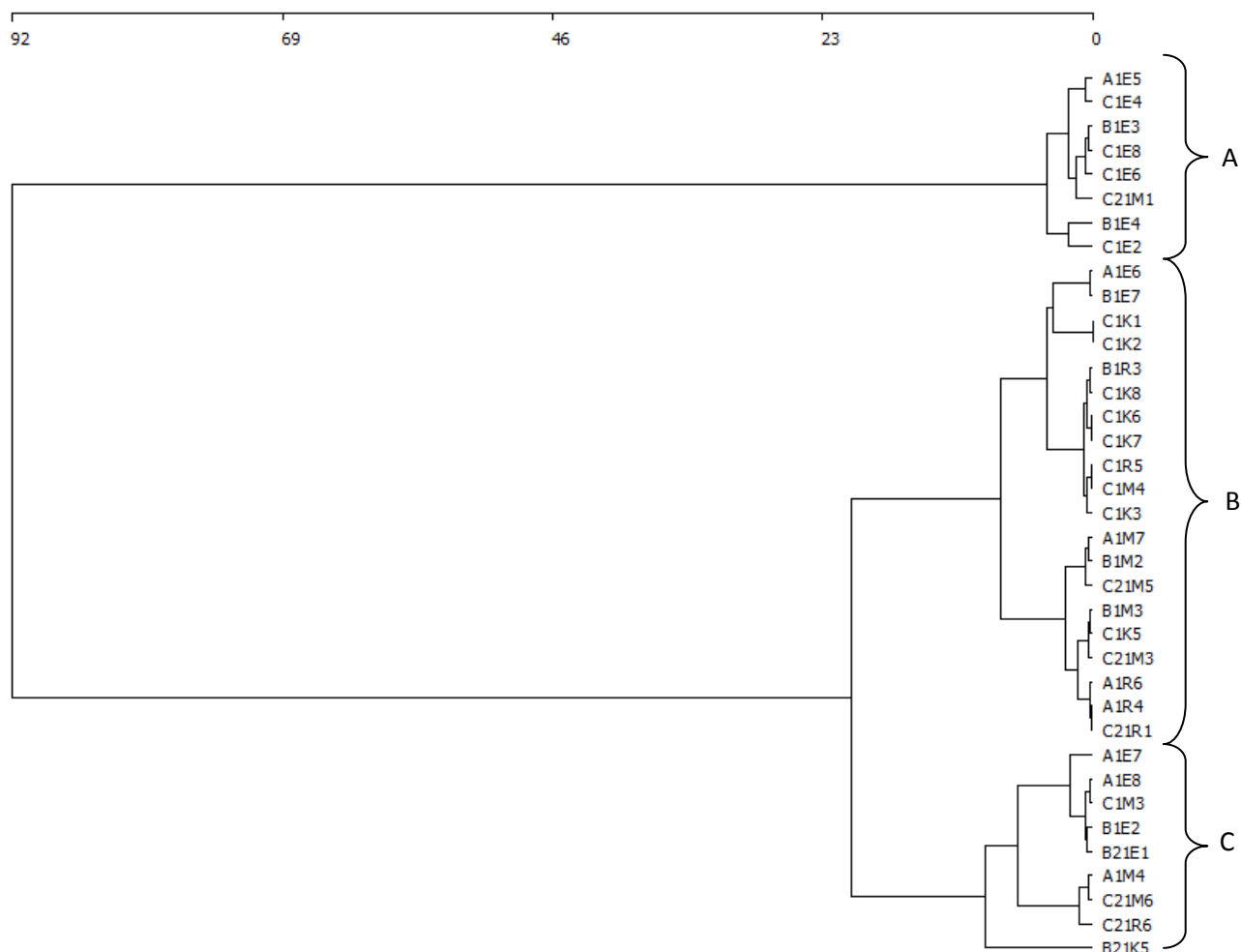


Figura 25. Dendrograma da análise dos parâmetros das curvas de crescimento (OD_0 , $OD_{máx}$, $\mu_{máx}$, t-lag e t-d) de 37 isolados de BAL provenientes de queijo do Pico obtido através do programa *Community Analysis Package 4 Version 4.0*. A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança dado pela análise de *clusters*. Neste programa, quanto mais próximo de 0, maior o grau de similaridade entre os isolados.

A análise do dendrograma (Figura 25) permite identificar 3 grupos de isolados (A, B e C). O grupo A é diferente dos grupos B e C em cerca de 92 %. Por sua vez os grupos B e C diferem entre si apenas 20, 21 %. O grupo A engloba 4 isolados de *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, os 2 isolados de *Lb. plantarum* e 2 isolados não identificados.

O grupo B é o maior e mais diversificado. Para além de *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, *Lc. lactis* ssp. *lactis*, inclui quase todos os enterococos, excepto um que faz parte do grupo C juntamente com *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, *Lc. lactis* ssp. *lactis* e um isolado não identificado.



O grupo A é representativo dos isolados que apresentaram fases de latência (t-lag) mais curtas e maiores absorvâncias máximas ($OD_{máx}$), ou seja, um crescimento mais rápido e abundante. O grupo B é caracterizado pelos isolados com as fases de latência mais prolongadas e com absorvâncias máximas menores, ou seja, um crescimento mais lento e não tão acentuado como no caso do grupo A. No grupo C os isolados apresentaram as fases de latência mais prolongadas e absorvâncias máximas menores, tal como no grupo B, mas ao contrário deste, maiores tempos de duplicação (t-d), apresentando assim um crescimento ainda mais lento do que neste grupo.

4.3. Selecção de isolados promissores como potenciais culturas de arranque para queijo

A Figura 26 mostra os isolados seleccionados para futuros ensaios em queijos modelo e os motivos que levaram à sua selecção. Foram seleccionados apenas 3 isolados por questões logísticas. Embora os enterococos constituam uma proporção importante dos isolados obtidos a partir do queijo do Pico (Dapkevicius et al., 2009) nenhum foi seleccionado devido a preocupações com o estatuto QPS deste género. Isolados de *Lc. lactis* (Pereira et al., 2008), *Lb. plantarum* (Pereira et al., 2010) e *Lb. paracasei* (Kongo et al., 2007) foram considerados candidatos promissores a culturas de arranque para o fabrico de queijos modelo semelhantes a produtos tradicionais portugueses.

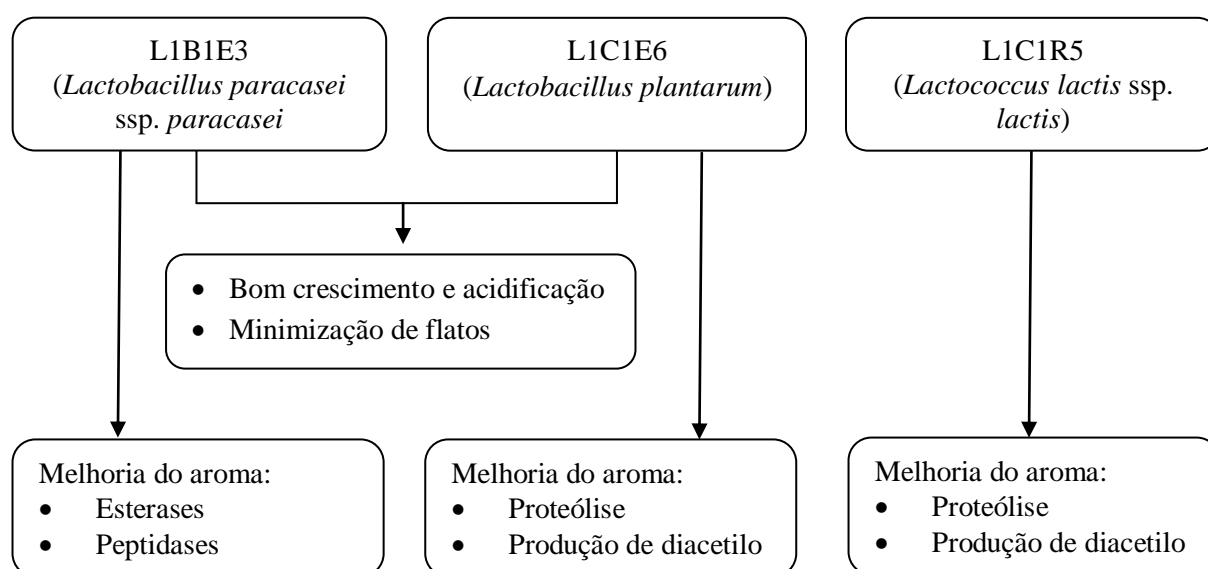


Figura 26. Culturas lácticas seleccionadas para futuros testes de fabrico de queijos modelo, obtidas a partir de 37 isolados de BAL do queijo do Pico e justificação da sua escolha.



4.4. Teste de coexistência

O *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* (L1B1E3) inibiu o *Lb. plantarum* (L1C1E6) e o *Lc. lactis* ssp. *lactis* (L1C1R5). Por seu turno, o *Lb. plantarum* (L1C1E6) demonstrou capacidade inibitória sobre o *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* (L1B1E3) e o *Lc. lactis* ssp. *lactis* (L1C1R5). No entanto, o isolado *Lc. lactis* ssp. *lactis* (L1C1R5) não provocou inibição nos outros dois isolados: *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* (L1B1E3) e *Lb. plantarum* (L1C1E6).

O efeito inibitório dos isolados *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* (L1B1E3) e *Lb. plantarum* (L1C1E6) pode estar relacionado com a competição por nutrientes ou com a produção de compostos inibitórios.

Este teste permitiu-nos saber que isolados irão predominar em produtos que eventualmente utilizem estas BAL como culturas de arranque/adjuntas.



5. CONCLUSÕES

A análise global de todos os parâmetros estudados permite-nos concluir que, dentro deste grupo de 37 BAL, existem efectivamente algumas com potencial bioactivo e tecnológico para possíveis aplicações industriais. Constituiu-se uma colecção de BAL provenientes do queijo do Pico e procedeu-se à sua caracterização do ponto de vista das propriedades tecnológicas, aspectos de segurança e bioactividade.

Os isolados em estudo não revelaram ser promissores como probióticos devido à sua baixa resistência à bÍlis e por não apresentarem indÍcios da produção de bacteriocinas.

Este trabalho permitiu seleccionar 3 isolados com caracterÍsticas adequadas ao fabrico de queijos que poderão constituir um produto com alto grau de inovação e contribuir para a sustentabilidade econmica do sector dos lacticÍnios na Região. É ainda possÍvel contemplar a utilização das culturas seleccionadas para ajudar a resolver problemas relevantes da produção de queijo do Pico artesanal, como a uniformização das caracterÍsticas de cada queijaria, a melhoria do *flavour* e o controlo de flatos precoces e tardios.

Sugere-se a realização de mais estudos que permitam aprofundar os assuntos tratados e desvendar efectivas aplicações práticas destes isolados, nomeadamente:

- (1) Caracterização genotÍpica das BAL;
- (2) Estudo das cinéticas de crescimento e de acidificação em sistemas modelo;
- (3) Detecção e quantificação de compostos aromáticos por tÉcnicas de cromatografia e espectrofotometria;
- (4) Selecção e estudo do efeito da associação entre *Lb. paracasei* spp. *paracasei* com *Streptococcus* autóctones no controlo de coliformes totais e de *Staphylococcus* ssp. no queijo do Pico;
- (5) Detecção de marcadores de virulência através de métodos bioquímicos e moleculares;
- (6) Optimização da colecção de BAL com base no seu potencial tecnológico e na sua utilização como culturas de arranque (individualmente ou em grupo) na produção de queijo.



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M.R., Hall, C.J., 1988. Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *International Journal of Food Science & Technology* 23, 287–292.
- Ammor, M.S., Flórez, A.B., van Hoek, A.H.A.M., de los Reyes-Gavilán, C.G., Aarts, H.J.M., Margolles, A., Mayo, B., 2008. Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 14, 6–15.
- Ammor, M.S., Flórez, A.B., Mayo, B., 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology* 24, 559–570.
- Anas, M., Eddine, H. J., Mebrouk, K., 2008. Antimicrobial activity of species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 3, 39-49.
- Associação de Produtores de Queijo do Pico, 1996. Caderno de Especificações do Queijo do Pico DOP.
- Asteri, I.-A., Robertson, N., Kagkli, D.-M., Andrewes, P., Nychas, G., Coolbear, T., Holland, R., Crow, V., Tsakalidou, E., 2009. Technological and flavour potential of cultures isolated from traditional Greek cheeses – A pool of novel species and starters. *International Dairy Journal* 19, 595–604.
- Axelsson, L.T., 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Third Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker, New York, pp. 1-72.
- Axelsson, L.T., Chung, T.C., Dobrogosz, W.J., Lindgren, S.E., 1989. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease* 2, 131–136.
- Badis, A., Guetarni, D., Moussa Boudjema, B., Henni, D.E., Kihal, M., 2004. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology* 21, 579–588.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology* 23, 277-94.
- Barbés, C. 2008. *Lactobacilli*. In: Versalovic, J., Wilson, M. (Eds.), *Therapeutic Microbiology. Probiotics and Related Strategies*, First Edition. ASM Press, Washington, pp. 19-33.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L. Cogan, T.M., 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11, 259–274.
- Beuiver, E, Buchin, S., 2004. Raw milk cheese. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Third Edition. Elsevier, London, pp. 310-345.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Sorokin, A., 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research* 11, 731–753.



- Buriti, F.C.A., Cardarelli, H.R., Saad, S.M.I., 2007. Biopreservation by *Lactobacillus paracasei* in coculture with *Streptococcus thermophilus* in potentially probiotic and synbiotic fresh cream cheeses. *Journal of Food Protection* 70, 228-235.
- Byczkowski, J., Gessner, T., 1988. Biological role of superoxide ion-radical. *International Journal of Biochemistry* 20, 569-580.
- Calado, A., Soeiro, A., 2012. Lista de produtos tradicionais portugueses. Associação Nacional de Municípios e de Produtores para a Valorização e Qualificação dos Produtos Tradicionais Portugueses.
Acedido a 17 de Abril de 2012. Disponível em www.acpp.pt/extra/dlFileInDB.php?f=3301.
- Cardoso, S., 1997. Queijo do Pico: Contributo para o estudo da sua flora láctica e melhoria da sua qualidade. Relatório de Estágio do Curso de Engenharia Zootécnica. Universidade dos Açores, Departamento de Ciências Agrárias, Angra do Heroísmo.
- Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., Gibbs, P., 2003. Effect of various growth media upon survival during stage of freeze-dried *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans*. *Journal of Applied Microbiology* 94, 947-952.
- Chao, S.-H., Tomii, Y., Sasamoto, M., Fujimoto, J., Tsai, Y.-C., Watanabe, K., 2008. *Lactobacillus capillatus* sp. nov., a motile *Lactobacillus* species isolated from stinky tofu brine. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 2555-2559.
- Claesson, M.J., van Sinderen, D., O'Toole, P.W., 2007. The genus *Lactobacillus* - a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiology Letters* 269, 22-28.
- CLSI, 2010. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing: Twentieth Informational Supplement. M100-S20. Vol. 30 No 1.
- CLSI, 2011. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-First Informational Supplement. M100-S21. Vol. 31 No 1.
- Coelho, M.A., 1961. A Freguesia de Nossa Senhora da Piedade na Ilha do Pico. *Separata do Boletim do N. C. da Horta*. Horta.
- Coelho, M.C.M., 2011. Estudo da actividade antimicrobiana de isolados provenientes de ambientes vulcânicos da Ilha Terceira - Açores – contra microrganismos indicadores relacionados com ambientes alimentares. Tese de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar. Universidade dos Açores, Departamento de Ciências Agrárias, Angra do Heroísmo.
- Cogan, T.M., Beresford, T.P., Steele, J., Broadbent, J., Shah, N.P., Ustunol, Z., 2007. Invited review: advances in starter cultures and cultured foods. *Journal of Dairy Science* 90, 4005-4021.
- CSFM, 2010. Communiqué du comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie. Recommandations 2010.
- Dapkevicius, A., 2007. 1.º Relatório Técnico - Científico. Projecto M1.1.2/I/005A/2005.
- Dapkevicius, A., 2009. 3.º Relatório Técnico - Científico. Projecto M1.1.2/I/005A/2005.
- Dapkevicius, M.L.N.E., 2002. Biological ensilage of fish. Optimization of stability, safety and functionality. PhD Thesis. Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.



- Dapkevicius, M.L.N.E., Dapkevicius, A., Silva, C.C.G., Rego, O.A., 2009. Biodiversidade do Queijo do Pico. Bactérias Láticas. Actas do 9º Encontro de Química dos Alimentos. Qualidade e Sustentabilidade: Uma Abordagem Integrada. 29 de Abril a 2 de Maio. Angra do Heroísmo.
- Devriese, L.A., Pot, B., 1995. The genus *Enterococcus*. In: Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H. (Eds.), The Genera of Lactic Acid Bacteria, Vol. 2. Blackie Academic & Professional, UK, pp. 327-367.
- De Vuyst, L., 2000. Technology aspects related to the application of functional cultures. *Food Technology and Biotechnology* 38, 105–112.
- De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F., Degeest, B., 2001. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 11, 687–707.
- De Vuyst, L., Leroy, F., 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 13, 194–199.
- Dolci, P., Alessandria, V., Rantsiou, K., Rolle, L., Zeppa, G., Cocolin, L., 2008a. Microbial dynamics of Castelmagno PDO, a traditional Italian cheese, with a focus on lactic acid bacteria ecology. *International Journal of Food Microbiology* 122, 302–311.
- Dolci, P., Alessandria, V., Zeppa, G., Rantsiou, K., Cocolin, L., 2008b. Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 25, 392–399.
- Doyle, M.P., 2006. Antimicrobial resistance: implications for the food system. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5, 71–137.
- Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunail, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., 2001. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *Journal of Applied Microbiology* 91, 861-870.
- Ebrahimi, M.T., Ouwehand, A.C., Hejazi, M.A., Jafari, P., 2011. Traditional Iranian dairy products: A source of potential probiotic *lactobacilli*. *African Journal of Microbiology Research* 5, 20-27.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E., Relman, D.A., 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 308, 1635–1638.
- EFSA, 2005. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA related to A generic approach to the safety assessment by EFSA of microorganisms used in food/feed and the production of food/feed additives. *EFSA Journal* 226, 1-12.
- EFSA, 2011. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2011 update). *EFSA Journal* 9, 2497 [82 pp.].
- Engesser, D.M., Hammes, W.P., 1994. Non-heme catalase activity of lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 17, 11-19.
- Eklund, T., 1984. The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. *International Journal of Food Microbiology* 1, 179-185.



- Elsner, H.A., Sobotka, I., Mack, D., Claussen, M., Laufs, R., Wirth, R., 2000. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 19, 39–42.
- Erkkilä, S., Petäjä, E., 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science* 55, 297-300.
- European Commission, 2008. Evaluation of the CAP policy on protected designations of origin (PDO) and protected geographical indications (PGI). Short Summary. London Economics. pp. 1-10.
- Fisher, K., Philips, C., 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155, 1749-1757.
- Fortina, M.G., Ricci, G., Acquati, A., Zeppa, G., Gandini, A., Manachini, P.L., 2003. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. *Food Microbiology* 20, 397-404.
- Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L., 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* 106, 1-24.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., 2004. Cheese: An Overview. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Third Edition. Elsevier, London, pp. 1-18.
- Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A., Poznanski, E., 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International Dairy Journal* 19, 3–11.
- Franz, C.M.A.P., Muscholl-Silberhorn, A.-B., Yousif, N.-M.K., Vancanneyt, M., Swings, J., Holzappel, W.H., 2001. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4385–4389.
- Franz, C.M., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzappel, W.H., 2003. Enterococci in foods - a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology* 88, 105-22.
- Gänzle, M.G., Hölzel, A., Walter, J., Jung, G., Hammes, W.P., 2000. Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4325-4333.
- Garabal, J.I., 2007. Biodiversity and the survival of autochthonous fermented products. *International Microbiology* 10, 1-3.
- Garabal, J.I., Rodríguez-Alonso, P., Centeno, J.A., 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from raw cows' milk cheeses currently produced in Galicia (NW Spain). *LWT - Food Science and Technology* 41, 1452–1458.
- Georgieva, R., Koleva, P., Nikolova, D., Yankov, D., Danova, S., 2009. Growth parameters of probiotic strain *Lactobacillus plantarum*, isolated from traditional white cheese. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 23, 861-865.
- Giraffa, G., 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 88, 215-222.



- Guessas, B., Hadadji, M., Saidi, N., Kihal, M., 2007. Inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by lactic acid bacteria in milk. *African Crop Science Conference Proceedings* 8, 1159-1163.
- Guo, X.-H., Kim, J.-M., Nam, H.-M., Park, S.-Y., Kim, J.-M., 2010. Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe* 16, 321-326.
- Gupta, H., Malik, R.K., 2007. Incidence of virulence in bacteriocin-producing enterococcal isolates. *Lait* 87, 587-601.
- Hammes, W.P., Vogel, R.F., 1995. The genus *Lactobacillus*. In: Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H, (Eds.), *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Vol. 2. Blackie Academic & Professional, UK, pp. 19-54.
- Hanniffy, S.B., Carter, A.T., Hitchin, E., Wells, J.M., 2006. Mucosal delivery of a pneumococcal vaccine using *Lactococcus lactis* affords protection against respiratory infection. *The Journal of Infectious Diseases* 195, 185-193.
- Hantsis-Zacharov, E., Halpern, M., 2007. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 7162-7168.
- Hayes, M., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., Ross, R.P., 2007. Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: bioactive peptide functions. *Journal of Biotechnology* 2, 435-449.
- Hebert, E.M., Saavedra, L., Ferranti, P., 2010. Bioactive peptides derived from casein and whey proteins. In: Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M. (Eds.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Blackwell Publishing, USA, pp. 233-249.
- Herreros, M.A., Fresno, J.M., González Prieto, M.J., Tornadijo, M.E., 2003. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *International Dairy Journal* 13, 469-479.
- Hickey, D.K., Kilcawley, K.N., Beresford, T.P., Wilkinson, M.G., 2007. Lipolysis in Cheddar Cheese made from raw, thermized, and pasteurized milks. *Journal of Dairy Science* 90, 47-56.
- Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U., 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 365-373.
- Hutkins, R.W., 2006. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Blackwell, USA.
- Hyronimus, B., Le Marrec, C., Hadj Sassi, A., Deschamps, A., 2000. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 61, 193-197.
- Jay, J.M., 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology* 44, 525-532.
- Jett, B.D., Huycke, M.M., Gilmore, M.S., 1994. Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews* 7, 462-478.
- Jimeno, J., Lazaro, M.J., Sollberger, H., 1995. Antagonistic interactions between propionic acid bacteria and non-starter lactic acid bacteria. *Lait* 75, 401-413.
- Jolly, L., Vincent, S.J.F., Duboc, P., Neeser, J.-R., 2002. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 367-374.



- Joosten, H.M.L.J., Northold, M.D., 1989. Detection, growth, and amine-producing capacity of *Lactobacilli* in Cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 55, 2356-2359.
- Jornal Oficial nº44 de 29 de Outubro de 1996, II Série.
- Kao, C.T., Frazier, W.C., 1966. Effect of lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus*, *Applied Microbiology* 14, 251–255.
- Kashket, E.R., 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: Cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Reviews* 46, 233–244.
- Klaenhammer, T.R., Barrangou, R., Buck, B.L., Azcarate-Peril, M.A., Altermann, E., 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 393–409.
- Kleerebezem, M., Hugenholtz, J., 2003. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 232–237.
- Kong, S., Davison, A.J., 1980. The role of interactions between O_2 , H_2O_2 , $-OH$, e^- and O_2^- in free radical damage to biological systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 204, 18-29.
- Kongo, J.M., Gomes, A.M., Malcata, F.X., McSweeney, P.L.H., 2009. Microbiological, biochemical and compositional changes during ripening of São Jorge – a raw milk cheese from the Azores (Portugal). *Food Chemistry* 112, 131–138.
- Kongo, J.M., Ho, A.J., Malcata, F.X., Wiedmann, M., 2007. Characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from São Jorge cheese, using biochemical and ribotyping methods. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1838–1844.
- Konings, W.N., Kok, J., Kuipers, O.P., Poolman, B., 2000. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Current Opinion in Microbiology* 3, 276-282.
- Korhonen, H., Pihlanto, A., 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal* 16, 945–960.
- Kussendrager, K.D., van Hooijdonk, A.C., 2000. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *British Journal of Nutrition* 84, 19-25.
- Ladero, V., Linares, D.M., Fernández, M., Alvarez, M.A., 2008. Real time quantitative PCR detection of histamine-producing lactic acid bacteria in cheese: Relation with histamine content. *Food Research International* 41, 1015–1019.
- Leroy, F., De Vuyst, L., 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* 15, 67–78.
- Licitra, G., 2010. World wide traditional cheeses: Banned for business. *Dairy Science & Technology* 90, 357-374.
- Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.J., 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews* 87, 149–164.
- Lönnermark, E., Friman, V., Lappas, G., Sandberg, T., Berggren, A., Adlerberth, I., 2010. Intake of *Lactobacillus plantarum* reduces certain gastrointestinal symptoms during treatment with antibiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology* 44, 106-12.



- Lopes, M.F.S., Simões, A.P., Tenreiro, R., Marques, J.J.F., Crespo, M.T.B., 2006. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *International Journal of Food Microbiology* 112, 208–214.
- Madruga, M., 1957. A Freguesia de São João Batista da Ilha do Pico na Tradição Oral dos seus Habitantes. Separata do Boletim do N. C. da Horta. Horta.
- Makarova, K.S., Koonin, E.V., 2007. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology* 189, 1199–1208.
- Mannu, L., Paba, A., Pes, M., Scintu, M.F., 2000. Genotypic and phenotypic heterogeneity among lactococci isolated from traditional Pecorino Sardo cheese. *Journal of Applied Microbiology* 89, 191–197.
- Mathur, S., Singh, R., 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology* 105, 281–295.
- Mayo, B., Aleksandrak – Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez - Martín, P., Bardowski, J., 2010. Updates in the Metabolism of Lactic Acid Bacteria. In: Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M. (Eds.), *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Blackwell Publishing, USA, pp. 3-33.
- Mäyra-Mäkinen, A., Bigret, M., 2004. Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria. In: Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Third Edition, Revised and Expanded*. Marcel Dekker, New York, pp. 175-198.
- McSweeney, P.L.H., Sousa, M.J., 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait* 80, 293–324.
- Meneses, C., 2010. Potencial da microflora autóctone para a garantia da qualidade e segurança do Queijo do Pico D.O.P.. Projecto Final do Curso de Ciências Agrárias. Universidade dos Açores, Departamento de Ciências Agrárias, Angra do Heroísmo.
- Mourad, K., Nour-Eddine, K., 2006. In vitro preselection criteria for probiotic *Lactobacillus plantarum* strains of fermented olives origin. *International Journal of Probiotics and Prebiotics* 1, 27-32.
- Muyanja, C.M.B.K., Narvhus, J.A., Treimo, J., Langsrud, T., 2003. Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. *International Journal of Food Microbiology* 80, 201-210.
- Nascimento, M.S., Moreno, I., Kuaye, A.Y., 2010. Antimicrobial activity of *Enterococcus faecium* Fair-E 198 against Gram-positive pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 74-81.
- Nielsen, D.S., Schillinger, U., Franz, C.M.A.P., Bresciani, J., Amoa-Awua, W., Holzappel, W.H., Jakobsen, M., 2007. *Lactobacillus ghanensis* sp. nov., a motile lactic acid bacterium isolated from Ghanaian cocoa fermentations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1468-1472.
- Nieto-Arribas, P., Seseña, S., Poveda, J.M., Chicón, R., Cabezas, L., Palop, L., 2011. *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects. *Food Microbiology* 28, 891-899.



- Nissen, L., Chingwaru, W., Sgorbati, B., Biavati, B., Cencic, A., 2009. Gut health promoting activity of new putative probiotic/protective *Lactobacillus* spp. strains: a functional study in the small intestinal cell model. *International Journal of Food Microbiology* 135, 288-94.
- O'Brien, N.M., O'Connor, T.P., O'Callaghan, J., Dobson, A.D.W., 2004. Toxins in Cheese. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Third Edition. Elsevier, London, pp. 560-571.
- Olano, A., Chua, J., Schroeder, S., Minari, A., La Salvia, M., Hall, G., 2001. *Weissella confusa* (Basonym: *Lactobacillus confusus*) Bacteremia: a Case Report. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 1604–1607.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E., 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 279–289.
- Ouwehand, A.C., Vesterlund, S., 2004. Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. In: Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Third Edition, Revised and Expanded. Marcel Dekker, New York, pp. 375-396.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Kotzekidou, P., 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science* 65, 859–867.
- Parente, E., Cogan, T.M., 2004. Starter Cultures: General Aspects. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Third Edition. Elsevier, London, pp. 123-147.
- Parvez, S., Malik, K.A., Kang, S.A., Kim, H.-Y., 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology* 100, 1171–1185.
- Paulos, W., 2005. Contributo para a caracterização do Queijo do Pico. Relatório de Estágio do Curso de Engenharia Zootécnica. Universidade dos Açores, Departamento de Ciências Agrárias, Angra do Heroísmo.
- Pereira, C.I., Graça, J.A., Ogando, N.S., Gomes, A.M., Malcata, F.X., 2010. Influence of bacterial dynamics upon the final characteristics of model Portuguese traditional cheeses. *Food Microbiology* 27, 339-46.
- Pereira, C.I., Neto, D.M., Capucho, J.C., Gião, M.S., Gomes, A.M.P., Malcata, F.X., 2010. How three adventitious lactic acid bacteria affect proteolysis and organic acid production in model portuguese cheeses manufactured from several milk sources and two alternative coagulants. *Journal of Dairy Science* 93, 1335–1344.
- Peres, A.M., Ramalhosa, E., Veloso, A.C.A., 2005. Autenticidade de queijos tradicionais: um factor de qualidade. In: *Jornadas de Controlo de Qualidade de Produtos Regionais*, 30 e 31 de Maio de 2005. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança.
- Perry, D.B., McMahan, D.J., Oberg, C.J., 1997. Effect of exopolysaccharide-producing cultures on moisture retention in low-fat Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science* 80, 799-805.
- Pfeiler, E.A., Klaenhammer, T.R., 2007. The genomics of lactic acid bacteria. *Trends in Microbiology* 15, 546-553.



- Pintado, A.I.E., Pinho, O., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Pintado, M.M.E., Gomes, A.M.P., Malcata, F.X., 2008. Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. *International Dairy Journal* 18, 631–640.
- Randazzo, C.L., Caggia, C., Neviani, E., 2009. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods* 78, 1–9.
- Rego, I., 2011. Marcadores de patogenicidade em bactérias do ácido lático, provenientes do Queijo do Pico. Projecto Final do Curso de Ciências Agrárias. Universidade dos Açores, Departamento de Ciências Agrárias, Angra do Heroísmo.
- REGULAMENTO (CE) Nº 510/2006, do Conselho de 20 de Março de 2006, relativo à protecção das indicações geográficas e denominações de origem dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M.D., Rea, M.C., Lombardi, A., Cogan, T.M., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E., 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *International Dairy Journal* 11, 621–647.
- Savado, A., Ouattara, C.A.T., Bassole, I.H.N., Traore, S.A., 2004. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. *Pakistan Journal of Nutrition* 3, 174-179.
- Saxelin, M., Tynkkynen, S., Mattila-Sandholm, T., de Vos, W.M., 2005. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Current Opinion in Biotechnology* 16, 204–211.
- Schleifer, K.H., Ludwig, V., 1995. Phylogenetics relationships of lactic acid bacteria. In: Wood, B.J.B., Holzappel, W.H. (Eds.), *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Vol. 2. Chapman & Hall, UK, pp. 7-17.
- Schroeter, J., Klaenhammer, T., 2009. Genomics of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 292, 1–6.
- Semedo, T., Santos, M.A., Lopes, M.F.S., Marques, J.J.F., Crespo, M.T.B., Tenreiro, R., 2003. Virulence factors in food, clinical and reference *Enterococci*: a common trait in the genus? *Systematic and Applied Microbiology* 26, 13–22.
- Serio, A., Chaves-López, C., Paparella, A., Suzzi, G., 2010. Evaluation of metabolic activities of enterococci isolated from Pecorino Abruzzese cheese. *International Dairy Journal* 20, 459-464.
- Settanni, L., Moschetti, G., 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology* 27, 691-697.
- Silva, S.V., Malcata, F.X., 2005. Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal* 15, 1–15.
- Singh, P., Wani, A.A., Karim, A.A., Langowski, H.C., 2011. The use of carbon dioxide in the processing and packaging of milk and dairy products: a review. *International Journal of Dairy Technology* 65, 161-177.
- Singh, K.V., Qin, X., Weinstock, G.M., Murray, B.E., 1998. Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *Journal of Infectious Diseases* 178, 1416–1420.



- Smit, G., Smit, B.A., Engels, W.J.M., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 591–610.
- Smitinont, T., Tansakul, C., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Navarini, L., Bosco, M., Cescutti, P., 2007. Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional thai fermented foods: isolation, identification and exopolysaccharide characterization. *International Journal of Food Microbiology* 51, 105-111.
- Suzzi, G., Caruso, M., Gardini, F., Lombardi, A., Vannini, L., Guerzoni, M.E., Andrighetto, C., Lanorte, M.T., 2000. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *Journal of Applied Microbiology* 89, 267–274.
- Tagg, J.R., McGiven, A.R., 1971. Assay system for bacteriocins. *Applied Microbiology* 21, 943.
- Talarico, T.L., Dobrogosz, W.L., 1989. Chemical characterization of an antimicrobial substance produced by *Lacobacillus reuterii*. *Antimicrob Agents Chemother* 33, 674–679.
- Tavaria, F.K., Malcata, F. X., 2003. Enzymatic activities of non-starter lactic acid bacteria isolated from a traditional Portuguese cheese. *Enzyme and Microbial Technology* 33, 236–243.
- Terzic-Vidojevic, A., Veljovic, K., Tolinacki, M., Nikolic, M., Ostojic, M., Topisirovic, L., 2009. Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Zlatar cheese produced at two different geographical location. *Genetika* 41, 117-136.
- Teuber, M., 1995. The genus *Lactococcus*. In: Wood, B.J.B., Holzapfel, W.H. (Eds.), *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Vol. 2. Blackie Academic & Professional, UK, pp.173-232.
- Teuber, M., Geis, A., 2006. The genus *Lactococcus*. *Prokaryotes* 4, 205–228.
- Teuber, M., Meile, L., Schwarz, F., 1999. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek* 76, 115–137.
- Todorov, S.D., Dicks, L.M., 2004. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. *Journal of Basic Microbiology* 44, 305-316.
- Tůma, Š., Kučerová, K., Plocková, M., 2008. Isolation of anticlostridially active lactobacilli from semi-hard cheese. *Czech Journal of Food Sciences* 26, 324-332.
- Vaughan, E.E., Heilig, H.G., Ben-Amor, K., de Vos, W.M., 2005. Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 477–490.
- Ventura, A. 1995. Caracterização do fabrico e estudo da flora microbológica do queijo São João do Pico. Relatório de Estágio do Curso de Engenharia Zootécnica dos Açores. Universidade dos Açores, Departamento de Ciências Agrárias, Angra do Heroísmo.
- Villani, F., Coppola, S., 1994. Selection of enterococcal strains for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. *Annales Microbiologia Enzimologia* 44, 97–105.
- Vlieger, A.M., Robroch, A., van Buuren, S., Kiers, J., Rijkers, G., Benninga, M.A., te Biesebeke, R., 2009. Tolerance and safety of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* in combination with *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in a prebiotic-containing infant formula: a randomised controlled trial. *British Journal of Nutrition* 102, 1-7.



- Walter, J., 2008. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Applied and Environmental microbiology* 74, 4985–4996.
- Welman, A. D., Maddox, I.S., 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology* 21, 269–274.
- Whitman, W.B., 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 3, The Firmicutes, Second Edition. Springer, USA.
- Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J. Smit, G., 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal* 12, 91–109.
- Wright, L., Axelsson, L., 2012. Lactic Acid Bacteria: An Introduction. *In*: Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S. von Wright, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Fourth Edition, Revised and Expanded. CRC Press, USA, pp. 1-16.



Esta tese foi elaborada no âmbito do Projecto BIOLACTAZORES “Valorização dos produtos lácteos dos Açores – bioactividade” com o apoio das seguintes entidades:

