

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TECNOLÓGICO E PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS
ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJOS TRADICIONAIS PORTUGUESES

ERICA ALEXANDRA DE ALMEIDA CARLOS

ORIENTADORA:
Doutora Teresa Maria Leitão Semedo
Lemsaddek

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE
DE LISBOA



AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TECNOLÓGICO E PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS
ÁCIDO LÁCTICAS ISOLADAS DE QUEIJOS TRADICIONAIS PORTUGUESES

ERICA ALEXANDRA DE ALMEIDA CARLOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

JÚRI:
PRESIDENTE:
Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

ORIENTADORA:
Doutora Teresa Maria Leitão Semedo
Lemsaddek

VOGAIS:
Doutora Eva Sofia Gonçalves da Cunha
Doutora Teresa Maria Leitão Semedo
Lemsaddek

2022

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Erica Alexandra de Almeida Carlos

Título da Tese ou
Dissertação: Avaliação do potencial tecnológico e probiótico de bactérias ácido
láticas isoladas de queijos tradicionais portugueses

Ano de conclusão: 2022

Designação do curso
de Mestrado ou de
Doutoramento: Segurança Alimentar

Área científica em que melhor se enquadra:

- ☐ Clínica ☒ Produção Animal e Segurança Alimentar
☐ Morfologia e Função ☐ Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- ☐ Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- ☒ Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de ☐ 6 meses, ☒ 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Finalização dos ensaios para publicação em revista internacional.

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações:

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 15 de Fevereiro de 2022

Assinatura: _____

Erica Carlos

Teresa Semedo Lemsaddek



Este trabalho foi financiado por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito do projeto PTDC / OCE-ETA / 1785 / 2020.



Este trabalho foi financiado por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito do projeto UIDB / 00276 / 2020, através do apoio do CIISA - Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa.

Agradecimentos

A realização desta dissertação de mestrado é fruto não apenas de dedicação e empenho pessoal, mas também do apoio de diversas pessoas que, direta ou indiretamente, me incentivaram nesta caminhada. Por esse motivo gostaria de agradecer:

À minha orientadora, Professora Doutora Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek, por me ter aceite para o desenvolvimento deste projeto, pela paciência em esclarecer todas as dúvidas, pelos conhecimentos transmitidos e ajudas ao longo do trabalho.

Às várias pessoas com quem laborei na FMV: Francisca Eusébio, Mariana Pinto, Margarida Gomes, Catarina Araújo, Professora Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza, Maria Helena Fernandes, Engenheira Maria José Fernandes, Anabela Ramos. Aos meus colegas de turma, em especial à Isa que sempre me transmitiu energias positivas: “Tudo vai dar certo!”.

Aos meus familiares: Avós, tios (as) e primos (as). Obrigada pelo vosso apoio e por todo o suporte na minha vida.

Aos meus amigos de sempre e para sempre. Sobretudo para a Mafalda e Sara, obrigada não é suficiente pelo apoio incondicional que me dão ao longo de todos estes anos. Por todos os desabafos, partilhas, lágrimas, sorrisos, vivências, doidices... Vocês são incríveis!

Ao meu porto seguro, Sam. Por todo o amor, amizade, dedicação, companheirismo, memórias, felicidade, destes oito anos juntos. Obrigada pela paciência deste último ano e por me receberes sempre de braços abertos.

Por último, mas não menos importante, ao meu Pai, Mãe e Mana. Esta dissertação é dedicada a vocês. Ensinaram-me o que é o amor incondicional, respeito, entrega, partilha e humildade. O meu coração transborda orgulho pelas pessoas que são. Obrigada por tudo. Amo-vos, muito!

Avaliação do potencial tecnológico e probiótico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos tradicionais portugueses

Resumo

Em Portugal a produção de queijos tradicionais é parte importante do património cultural. A riqueza e peculiaridade destes produtos advém da microbiota autóctone presente, maioritariamente bactérias ácido lácticas -BAL, assim como das práticas de manufatura artesanais. Neste contexto, o principal objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial tecnológico e probiótico de BAL isoladas de queijos tradicionais portugueses com Denominação de Origem Protegida -DOP.

Amostras de queijos DOP, recolhidas em Azeitão e Nisa, foram submetidas a isolamento microbiano, seguido da seleção de bactérias genomicamente distintas. Posteriormente, 203 isolados foram testados quanto à sua atividade antimicrobiana sobre *Listeria monocytogenes*. Aqueles que apresentaram halos inibitórios de maiores dimensões foram submetidos a uma exaustiva série de testes, para avaliar o seu potencial tecnológico e/ou probiótico: avaliação da produção de lipase e protease, capacidade de acidificação do leite, resistência à bÍlis, avaliação da multiplicação a diferentes temperaturas e concentrações salinas. Os isolados mais promissores foram ainda avaliados em relação ao seu potencial de patogenicidade, ou seja, atividade hemolítica e resistência a antibióticos. Dos isolados em estudo, oito revelaram possuir características relevantes, incluindo potencial antimicrobiano, capacidade de multiplicação nas diversas condições testadas, produção de várias enzimas e ausência de características de virulência. Por fim, esses oito isolados foram testados quanto à tolerância a ambientes gastrointestinais (simulação *in vitro* de estômago e intestino), bem como à avaliação da sua capacidade de auto e co-agregação.

Globalmente, os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram a riqueza microbiana dos queijos artesanais portugueses. Evidenciando o potencial tecnológico e probiótico das bactérias ácido lácticas neles presentes. Oito dos isolados em estudo demonstraram ser os mais promissores, embora seja necessário complementar os ensaios realizados.

Palavras-chave: queijo tradicional, denominação de origem protegida, bactérias ácido lácticas, potencial tecnológico, potencial probiótico.

Evaluation of the technological and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional Portuguese cheeses

Abstract

In Portugal, the production of traditional cheeses is an important part of the cultural heritage. The richness and peculiarity of these products comes from the native microbiota present, mostly lactic acid bacteria -LAB-, as well as from artisanal manufacturing practices. In this context, the main objective of the present work was to evaluate the technological and probiotic potential of traditional Portuguese LAB cheeses with Protected Designation of Origin - PDO.

Samples of PDO cheeses, collected from Azeitão and Nisa, were submitted to microbial isolation, followed by the selection of genomically distinct bacteria. Subsequently, the 203 isolates were tested for antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes*. Those presenting larger inhibitory halos were subjected to an exhaustive array of tests to assess their technological and/or probiotic potential: assessment of lipase and protease production, milk acidification capacity, resistance to bile, evaluation of growth at different temperatures and saline concentrations. The most promising isolates were also evaluated in relation to their pathogenicity potential, ie, hemolytic activity and antibiotic resistance. Of the isolates under study, eight revealed to have relevant characteristics, including antimicrobial potential, ability to multiply under the different conditions tested, production of several enzymes and absence of virulence traits. Finally, these eight isolates were tested for tolerance to gastrointestinal environments (*in vitro* simulation of stomach and intestine), as well as the evaluation of their capacity for auto and co-aggregation.

Overall, the results gathered in this study showed the microbial richness of Portuguese artisanal cheeses. Evidencing the technological and probiotic potential of lactic acid bacteria present in them. Eight of the isolates under study proved to be the most promising, although it is necessary to complement the tests performed.

Keywords: traditional cheese, protected designation of origin, lactic acid bacteria, technological potential, probiotic potential.

Índice Geral

Agradecimentos.....	v
Resumo	vi
Abstract	vii
Índice Geral	viii
Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xi
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica	2
2.1. O queijo.....	2
2.1.1. Perspetiva histórica.....	2
2.1.2. Queijos tradicionais portugueses	4
2.1.2.1. Queijo de Azeitão DOP	8
2.1.2.2. Queijo de Nisa DOP	9
2.2. Microbiota do queijo	11
2.2.1. Bactérias ácido lácticas	13
2.2.2. Potencial tecnológico e probiótico da microbiota do queijo	16
2.2.3. Potencial patogénico da microbiota do queijo	19
2.2.3.1. Fatores de virulência	20
2.2.3.2. Resistência a antibióticos	22
3. Objetivos do estudo	25
4. Materiais e métodos.....	25
4.1. Isolamento de bactérias ácido lácticas	25
4.2. Avaliação do potencial antimicrobiano.....	27
4.3. Avaliação do potencial tecnológico.....	28
4.3.1. Multiplicação em diferentes condições.....	28
4.3.2. Capacidade de acidificação do leite	29
4.3.3. Produção de lipase e protease.....	29
4.4. Avaliação do potencial patogénico	30
4.4.1. Atividade hemolítica e gelatinolítica	30
4.4.2. Resistência a antibióticos.....	30
4.5. Avaliação do potencial probiótico	31
4.5.1. Multiplicação a diferentes valores de pH.....	31
4.5.2. Atividade enzimática	32
4.6. Métodos moleculares	32
4.6.1. Identificação ao nível de género e espécie	32
4.6.2. Fatores de virulência.....	34
4.6.3. Pesquisa de genes codificadores de bacteriocinas	34

4.7. Tolerância a condições gastrointestinais e capacidade de auto-agregação e co-agregação	36
5. Resultados e Discussão.....	37
5.1. Avaliação do potencial antimicrobiano.....	37
5.2. Avaliação do potencial tecnológico.....	39
5.2.1. Multiplicação em diferentes condições.....	39
5.2.2. Capacidade de acidificação do leite	41
5.2.3. Produção de lipase e protease.....	42
5.3. Avaliação do potencial patogénico	43
5.3.1. Atividade hemolítica e gelatinolítica	44
5.3.2. Resistência a antibióticos.....	45
5.4. Avaliação do potencial probiótico	49
5.4.1. Multiplicação a diferentes valores de pH.....	49
5.4.2. Atividade antimicrobiana	51
5.5. Atividade enzimática.....	54
5.6. Métodos moleculares	57
5.6.1. Identificação ao nível de género e espécie	57
5.6.2. Fatores de virulência.....	57
5.6.3. Pesquisa de genes codificadores de bacteriocinas	58
5.7. Tolerância a condições gastrointestinais e capacidade de auto-agregação e co-agregação	59
6. Conclusão.....	64
7. Referências bibliográficas	65
ANEXOS.....	76

Índice de Figuras

Figura 1 – Distribuição geográfica dos queijos tradicionais portugueses com selo DOP..	7
Figura 2 – Queijo de Azeitão.....	8
Figura 3 – Queijo de Nisa.....	10
Figura 4 – Número de isolados que mantiveram ou alteraram o pH do leite de ovelha às 2 h, 6 h e 24 h.....	41
Figura 5 – Multiplicação das BAL a diferentes valores de pH (2; 7; 8,5) durante 24 e 48 h.....	49
Figura 6 – Multiplicação dos <i>Enterococcus</i> spp. a diferentes valores de pH (2; 7; 8,5) durante 24 e 48 h.....	50
Figura 7 – Multiplicação dos <i>Lactococcus</i> spp. a diferentes valores de pH (2; 7; 8,5) durante 24 e 48 h.....	51
Figura 8 – Perfil enzimático dos isolados selecionados.....	55
Figura 9 – Perfil dos isolados quanto à capacidade de sobrevivência em condições intestinais.....	59
Figura 10 – Perfil da capacidade de auto-agregação dos isolados em estudo.....	61
Figura 11 – Perfil da capacidade de co-agregação dos isolados em estudo.....	62
Figura 12 – Exemplo de halos de inibição obtidos pelo método <i>spot on lawn</i> por picada (A), riscado (B) e gota (C).....	82

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Meios de cultura e detalhes de incubação para cada microrganismo.....	26
Tabela 2 - Coleção de microrganismos isolados de queijos DOP de Azeitão e Nisa...	27
Tabela 3 - Concentração (µg), classe e alvo dos antibióticos utilizados no ensaio de difusão em disco.....	31
Tabela 4 - Detalhes acerca dos <i>primers</i> utilizados para a identificação ao nível de género e espécie para <i>Enterococcus</i> e identificação ao nível de género para <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> e <i>Leuconostoc</i>	33
Tabela 5 - Detalhes acerca dos <i>primers</i> utilizados para a pesquisa de genes de virulência.....	34
Tabela 6 - Detalhes acerca dos <i>primers</i> utilizados para pesquisa dos genes estruturais que codificam para diferentes bacteriocinas.....	35
Tabela 7 – Diâmetro dos halos de inibição (mm) sobre <i>Listeria monocytogenes</i> , pelo método <i>spot on lawn</i>	38
Tabela 8 – Isolados que não se multiplicaram a pelo menos uma das temperaturas testadas.....	40
Tabela 9 – Fenótipo de resistência observado nos isolados em estudo.....	46
Tabela 10 - Diâmetro dos halos de inibição (mm) de BAL, <i>Enterococcus</i> spp. e <i>Lactococcus</i> spp. sobre as bactérias indicadoras.....	52
Tabela 11 - Diâmetro dos halos de inibição (mm) dos 203 isolados em estudo sobre <i>Listeria monocytogenes</i> pelo método <i>spot on lawn</i>	76
Tabela 12 – Perfil de resistência a antibióticos de 43 isolados de BAL, <i>Enterococcus</i> spp. e <i>Lactococcus</i> spp.....	78
Tabela 13 – Compilação dos vários estudos realizados para os 43 isolados.....	79

1. Introdução

O queijo produzido de forma artesanal é conhecido em quase todos os povos, fazendo parte da sua herança cultural. Em Portugal a produção de queijos tradicionais está distribuída por todo o seu território. A singularidade destes produtos, deve-se maioritariamente à microbiota autóctone presente na sua matriz, sendo que alguns são merecedores de Denominação Origem Protegida (DOP). Apesar da importância que lhes é associada, estes queijos ainda são pouco conhecidos e estudados (Baptista 2018).

Por este motivo foi iniciado, em 2016, um projeto de investigação direcionado para a análise de queijos DOP de Azeitão e Nisa, produzidos em diferentes queijarias. Nesse mesmo ano, iniciou-se a caracterização físico-química e microbiológica desses queijos tradicionais Portugueses (Batista 2017). O estudo prosseguiu em 2017, com a caracterização detalhada da microbiota autóctone presente nesses produtos ao longo do tempo (Baptista 2018). Em 2018, o estudo continuou com a avaliação do potencial de patogenicidade dos isolados, nomeadamente a avaliação da resistência a antibióticos e produção de fatores de virulência (Rocha 2019). Em 2019, o estudo focou-se num género de bactérias ácido lácticas em particular, *Enterococcus* spp. (Eusébio 2020). Desta forma, o tema da presente dissertação é fruto da continuação dos estudos anteriormente referidos. Sendo que o principal objetivo foi o de avaliar o potencial tecnológico e probiótico de bactérias ácido lácticas, isoladas de queijos de Azeitão e Nisa DOP.

O presente trabalho estrutura-se em: revisão bibliográfica, na qual o tema em estudo é contextualizado, nomeadamente o queijo e a microbiota do queijo; objetivos do estudo; materiais e métodos, onde são apresentadas as metodologias aplicadas durante o trabalho experimental de modo a atingir os objetivos propostos; resultados e discussão, que consistem na apresentação dos resultados obtidos após aplicação das metodologias descritas e discussão, face a outros estudos similares.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. O queijo

O queijo é produzido desde as primeiras civilizações, tendo sido introduzido na alimentação humana há muito tempo (Fox et al. 2016). A permanência deste alimento, até aos dias de hoje, deve-se ao facto de poder ser consumido em qualquer hora e lugar, sendo um bom complemento alimentar. Por estes motivos, os próximos capítulos debruçar-se-ão sobre a perspetiva histórica do queijo, os queijos tradicionais portugueses e a importância da microbiota neles presente.

2.1.1. Perspetiva histórica

A utilização do leite por povos primitivos foi demonstrada através da descoberta de resíduos orgânicos de leite, em vasos de cerâmica referentes ao sétimo milénio A.C, no noroeste da Anatólia. Esta descoberta evidenciou que a introdução do leite, foi rapidamente adotada como componente principal das dietas dos agricultores pré-históricos (Evershed et al. 2008). Além disso, foram descobertos fragmentos de cerâmica relativos ao sexto milénio A.C. e foram ainda encontrados pequenos buracos nesses fragmentos, interpretados como “coadores de queijo”; servindo de indicação de que no período neolítico a produção de queijo já existia (Salque et al. 2013). Assim, as informações retiradas das peças de cerâmica, indiciam que naquela época as peneiras eram usadas para o fabrico de queijo, sendo que algumas teriam envolvido cera de abelha para ajudar a retirar o queijo do molde. Em conjunto com a peneira, os vasos de cerâmica seriam ainda utilizados para conservar o soro do leite filtrado (Salque et al. 2013). O processamento do leite, com especial ênfase para a produção de queijo, desempenhou um papel importante na dieta desses povos: uma vez que permitia a preservação do produto lácteo de uma forma não perecível, facilitando o transporte e permitindo que as propriedades nutricionais do leite estivessem disponíveis durante todo o ano (Salque et al. 2013).

Pensa-se que a evolução do queijo se deu no Crescente Fértil, região do Médio Oriente que compreende países como o Egipto, Israel, Jordânia, Líbano, Chipre, Síria, Turquia, Iraque e Kuwait. Foi nessa região, durante a Revolução Agrícola, que alguns animais começaram a ser domesticados, nomeadamente cabras e ovelhas devido ao seu porte pequeno e facilidade de pastoreio. Estes animais eram utilizados essencialmente para fornecer carne, leite, peles e lã, porém o valor nutritivo do leite e seus derivados foi rapidamente reconhecido, passando a constituir um componente da dieta humana (Fox et al. 2016).

Desta forma, a manufatura do queijo acompanhou a evolução da civilização pelo Oriente Médio, Grécia e Roma, ficando bem estabelecida na Roma Antiga. Os soldados romanos, durante as movimentações do exército, contribuíram para a difusão do queijo

pelo mundo, uma vez que fazia parte da sua alimentação. Após a queda do Império Romano, começaram as migrações dos povos pela Europa e, do mesmo modo, a expansão do fabrico de queijo. Durante a Idade Média, os mosteiros e propriedades feudais, foram os principais contribuintes para o avanço da agricultura na Europa e melhoria do vinho, cerveja e queijo. A deslocação dos monges, entre os diversos mosteiros, contribuiu para a evolução e desenvolvimento de novas variedades de queijos. Nas propriedades feudais, durante o verão, eram produzidos alimentos em excesso, para atender às necessidades da comunidade ao longo do ano, sendo que, alimentos como o queijo, eram preservados através da fermentação e salga (Fox et al. 2016). Certamente que a maioria das variedades dos queijos evoluiu de forma accidental, por exemplo, variação da espécie do animal, do local de pastoreio, ou alguma alteração durante o fabrico e armazenamento do queijo, como o crescimento de bolores (Fox et al. 2016). Assim, a produção de queijo espalhou-se pela Europa e Médio Oriente, seguindo para a América do Norte e Sul e chegando à Oceânia. Até meados do século XIX, o modo de produção era maioritariamente artesanal. No entanto, nos dias de hoje, os principais tipos de queijo são produzidos em unidades fabris altamente mecanizadas (Fox et al. 2016).

A Europa, comparativamente às restantes regiões do globo, é a maior produtora de queijo. Na União Europeia, aproximadamente, 37,7% do leite produzido tem como destino final a produção de queijo, sendo que 90% deste é de origem bovina e 2% de origem ovina ou caprina (Eurostat, 2021). Segundo Statista (2021), plataforma *online* de dados estatísticos, em 2020 foram produzidas na União Europeia, 10,44 milhões de toneladas de queijo e a previsão para este ano, 2021, é de 10,34 milhões de toneladas. Nesta plataforma *online* foi ilustrada uma previsão da produção de queijo até 2030, em que os dados indicam que aumentará gradualmente, até atingir 11,54 milhões de toneladas. A maioria da produção de queijo na União Europeia, pertence ao queijo fresco (3,5 milhões de toneladas), seguida pelos queijos de pasta semi-dura (2,7 milhões de toneladas) e pasta dura (1,9 milhões de toneladas) (Eurostat, 2021). Existem três países líderes na produção de queijo: em primeiro lugar a Alemanha (~2,35 milhões de toneladas), em segundo a França (~1,9 milhões de toneladas) e em terceiro a Itália (~1,3 milhões de toneladas). Portugal encontra-se na vigésima primeira posição, neste *ranking* de 37 países (Eurostat, 2021).

Relativamente a Portugal, segundo o INE (Instituto Nacional de Estatística), em 2020 foram produzidas 84 816 toneladas de queijo. Tendo vindo a verificar-se um aumento na produção desde 2016 (80 299 toneladas) até 2019 (87 366 toneladas), porém ocorreu uma diminuição de 2,9% (2550 toneladas) entre 2019-2020, causada pela pandemia COVID-19. Por outro lado, entre 2016-2020, os queijos de vaca foram os mais produzidos,

seguidos pelos queijos de ovelha e os de mistura, os queijos de cabra foram os menos produzidos no nosso país (INE, 2021).

Ao longo dos anos o consumo de queijo tem vindo a aumentar na maioria dos países, tornando-se um dos principais produtos do sector dos laticínios. Este aumento gradual da procura pode ser explicado pela grande diversidade de *flavours* e texturas, por ser aconselhado por nutricionistas e por ser um alimento de conveniência, isto é, pode ser componente principal de uma refeição, uma sobremesa, ser servido como componente de outros alimentos e ser consumido com ou sem preparação (Fox et al. 2016).

A Europa é a região do globo em que o consumo de queijo *per capita* é o mais elevado (Statista, 2021). Entre 2014-2020 esse consumo aumentou de forma constante, sendo o consumo em 2014 de aproximadamente 17,5 kg e em 2020 de aproximadamente 18,44 kg de queijo (Statista, 2021). Segundo o INE, entre 2017 e 2019, o consumo de queijo aumentou em Portugal, sendo que em 2017 foram consumidas 132 000 toneladas de queijo e em 2019 esse valor subiu para 144 000 toneladas. Porém, em 2020 o consumo de queijo teve um decréscimo de 3,6% (5000 toneladas), devido à pandemia COVID-19, que trouxe problemas na sua comercialização, uma vez que restauração, eventos, feiras e mercados locais ficaram condicionados pela crise pandémica.

2.1.2. Queijos tradicionais portugueses

Atualmente é designado por queijo, o produto fresco ou maturado que apresente pasta mole, semi-mole, semidura, dura ou extra-dura, podendo ser revestido e, no qual, a relação proteína/caseína do soro não excede a do leite (Codex Standard 283, 1978). A obtenção deste produto acontece, através da coagulação, parcial ou total, da proteína do leite (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de nata, soros lácteos, leiteiro ou de qualquer combinação destes, coagulados pela ação de coalho ou outros agentes coagulantes (Codex Standard 283, 1978).

No mundo são produzidas centenas de queijos tradicionais, sendo que este tipo de produto tem forte ligação ao território de origem, por isso é símbolo de história, cultura, estilo de vida das comunidades produtoras e de conhecimentos transmitidos entre gerações. Deste modo, o sistema de produção tradicional envolve processos biológicos e naturais que vão influenciar a qualidade do produto final. Em países como França, Itália, Espanha e Portugal a produção de queijos tradicionais ocorre, maioritariamente, em áreas desfavorecidas (Papademas and Bintsis 2017).

Os queijos tradicionais portugueses são queijos curados e a sua manufatura segue protocolos artesanais. A maioria destes queijos utilizam leite cru de cabra ou ovelha (ou uma mistura de ambos) para o seu fabrico, sendo que alguns são produzidos a partir de leite de vaca cru. Estes produtos são conhecidos pela sua singularidade organolética,

sendo a utilização de leite cru responsável por essas características (Freitas et al 2000). São considerados alimentos seguros, pois são consumidos após determinado período de cura (variável de acordo com o tipo de queijo), ao qual a maioria dos microrganismos patogénicos não sobrevive, devido ao baixo valor de pH da matriz deste alimento (Pereira et al. 2009).

Tal como referido acima, a produção da maioria dos queijos tradicionais portugueses é oriunda das regiões mais pobres, tendo-se tornado uma atividade económica muito importante nesses locais (Almeida et al. 2007), pois permite a manutenção do emprego local e é fonte de rendimento de famílias que exploram a produção de queijo, em regiões periféricas ou desérticas (Freitas and Malcata 2000). Porém, a saída de agricultores para áreas urbanas e a exploração de atividades agrícolas diferentes, desencadeou uma redução drástica no número de indivíduos associados à produção de queijos artesanais (Freitas and Malcata 2000). A título de exemplo, na ilha do Pico, nos Açores, o número de produtores diminuiu de 12 para apenas três, devido ao quadro socioeconómico desfavorável (Câmara et al. 2019). Entre diferentes produtores, pode-se esperar algumas dissemelhanças nos queijos, devido a ligeiras diferenças na tecnologia de fabrico e variações na composição química e microbiana do leite (Santos et al. 2017). A maioria dos queijos artesanais, obtidos a partir do leite de ovelha e cabra são sazonais, sendo o pico de produção na primavera (Freitas and Malcata 2000).

Alguns destes queijos tradicionais, ganharam importância e relevância regional e nacional, o que levou ao seu reconhecimento pelas certificações da Comissão Europeia (Guiné and Florença 2020). Em 1992, a União Europeia criou três designações para promover e proteger o nome de produtos agrícolas e alimentos de qualidade, sendo uma destas a Denominação de Origem Protegida (DOP). Legalmente define-se DOP como “o nome de uma região que serve para designar um produto agrícola ou um género alimentício que seja daí originário, cuja qualidade ou características se devem essencial ou exclusivamente ao meio geográfico específico, incluindo fatores naturais e humanos, cujas fases de produção têm lugar na área geográfica delimitada” (Regulamento nº 1151, 2012).

Atualmente está em vigor o Regulamento (UE) nº 1151/2012 que proporciona um sistema robusto para promover produtos agrícolas de qualidade. Este dá acesso a informação relacionada com requisitos necessários para atribuição da Denominação de Origem Protegida (Fox et al. 2016). Desta maneira, vários tipos de queijos (curados, frescos ou cremosos) obtiveram certificação DOP, contribuindo para a sustentabilidade económica das populações, para a valorização do queijo (características de elevada especificidade e riqueza) e para a expansão do mesmo no comércio internacional (Guiné and Florença 2020).

Os queijos portugueses com DOP são tradicionalmente fabricados com leite cru, dependendo da sua microbiota nativa para o desenvolvimento das características finais, ou seja, não é permitida a adição de microbiota *starter* ou não *starter* neste tipo de queijos (Freitas and Malcata, 2000). Assim, o que distingue os queijos são as suas características intrínsecas, dependentes de ações físicas, químicas e bioquímicas, que o leite e os seus componentes sofrem através de diversos fatores de transformação. Portanto, a microbiota, juntamente com a composição do leite (dependente do local, dieta, condição fisiológica do animal), são responsáveis pelo *flavour* e textura dos queijos tradicionais (Pereira et al. 2010).

Apesar de os queijos tradicionais serem conhecidos pela sua singularidade, todos partilham alguns aspetos tecnológicos em comum, nomeadamente a coagulação, desidratação, moldagem e salga. Estas etapas de processamento são importantes, mas é durante a cura que as características mais relevantes, de textura e *flavour*, se desenvolvem, originando diferentes tipos de queijo (Reis and Malcata, 2011).

Reis e Malcata (2011) estudaram os 13 queijos tradicionais portugueses com DOP, sendo 11 fabricados com leite de ovelha e/ou cabra. O queijo da Serra da Estrela, Serpa, Azeitão e Castelo Branco são queijos bastante conhecidos em Portugal, provenientes de leite de ovelha cru. Estes utilizam coalho vegetal, tal como o queijo de Évora e Nisa, também obtidos a partir de leite de ovelha cru. O queijo do Terrincho tem em comum com estes, o tipo de leite utilizado para a sua produção, mas, ao contrário dos anteriores, é utilizado no seu fabrico, coalho animal. Por outro lado, o queijo de Cabra Transmontano é obtido com leite de cabra cru e é usado coalho animal no seu processamento. Por fim, existe a fusão de leite de ovelha cru e leite de cabra cru, obtendo-se queijos de mistura, como o Picante da Beira Baixa, Rabaçal e Amarelo da Beira Baixa, sendo que em todos estes é usado o coalho animal (Reis and Malcata, 2011).

Para além dos tipos de leite anteriormente mencionados, também é usado para fabrico de queijos, o leite de vaca cru. Os queijos produzidos a partir deste leite, são fabricados no arquipélago dos Açores e são denominados queijo do Pico e queijo de São Jorge, ambos usam para a coagulação o coalho animal (Kongo et al. 2009; Câmara et al. 2019). Na Figura 1, está representada a distribuição geográfica dos queijos tradicionais portugueses com DOP.



Figura 1 – Distribuição geográfica dos queijos tradicionais portugueses com selo DOP.

A produção de queijo com DOP, registou um aumento de 26,9% no ano 2019 face a 2018. Em 2019 a produção foi de 1914,1 toneladas, sendo que 55% (1051,4 toneladas) desta produção foi referente ao queijo São Jorge. Uma vez que este queijo é manufaturado nos Açores, o queijo de Azeitão foi o responsável pela maior produção (242,1 toneladas) em Portugal continental. O queijo de São Jorge, Azeitão, Serpa (209,78 toneladas) e Serra da Estrela (129,60 toneladas), representaram, aproximadamente, 86% da produção de queijo certificado. Ainda em 2019, cerca de 65% da produção teve como destino o mercado nacional, seguindo-se o mercado local (31%) e o mercado internacional (4%). A comercialização destes queijos foi realizada, maioritariamente, através das grandes superfícies, seguindo-se o comercio tradicional (DGADR, 2021).

Posto isto, dos 13 queijos tradicionais portugueses com DOP referidos anteriormente, são de interesse para este trabalho dois deles, o queijo de Azeitão e o queijo de Nisa. Abaixo estão descritas, detalhadamente, as características de cada um destes queijos.

2.1.2.1. Queijo de Azeitão DOP

O queijo de Azeitão terá sido concebido em 1830, pelo agricultor Gaspar Henriques de Paiva, natural da Beira Baixa. Este iniciou a criação de ovelhas em Azeitão porque queria, para consumo próprio, queijos semelhantes aos da Serra da Estrela. Por esta razão, deslocava-se um queijeiro da sua terra natal, para lhe fabricar os queijos, desta maneira os processos de fabrico foram sendo transmitidos, até dar origem ao conhecido queijo de Azeitão (Produtos tradicionais portugueses, 2021).

O queijo de Azeitão, obtido a partir de leite cru de ovelha, é um queijo curado, de pasta semi-mole e amanteigada, com poucos ou nenhuns olhos, cor branca ou ligeiramente amarelada. É caracterizado pelo sabor picante, acidificado e salgado e as suas características organoléticas, devem-se às condições edafoclimáticas da região e ao facto de ser usado como coagulante a flor de cardo espontânea (*Cynara Cardunculus L.*). No leite de ovelha utilizado para a produção de queijo de Azeitão, a adição ou subtração de qualquer substância é rigorosamente interdita, exceto adição de sal e do preparado de cardo. A área geográfica de produção abrange os concelhos de Sesimbra, Setúbal e Palmela sendo que o leite para a produção do queijo, tem de ser proveniente de espécie ovina da referida área geográfica (Produtos tradicionais portugueses, 2021). Na Figura 2 é possível observar o queijo de Azeitão.



Figura 2 – Queijo de Azeitão.

Está disponível no *site* da Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural (DGADR) o caderno de especificações referente ao queijo de Azeitão DOP, onde consta com detalhe a descrição do produto, a área geográfica de produção e transformação do queijo, método de obtenção, prova de origem, estrutura de controlo e rotulagem específica (DGADR, 2021). Deste modo, ao consultar o caderno de especificações, verifica-se que até à obtenção do produto final, existem várias etapas importantes, como a receção do leite, a filtragem, adição de sal, adição do agente coagulante, coagulação, moldagem, desmoldagem e a cura. Será necessária uma lista de fornecedores de leite, com

declaração de compromisso, e a realização de análises físico-químicas e microbiológicas ao leite cru (DGADR, 2021).

Após análise rigorosa do leite, este será filtrado e mantido a temperatura inferior a 4 °C até ser adicionado sal, numa quantidade máxima de 25 g/L, para que em seguida o leite sofra um aquecimento entre 30-32 °C. O preparado de cardo (*Cynara cardunculus* L.) tem de ser feito com algumas horas de antecedência à sua adição ao leite. Depois da adição do sal e do preparado de cardo ao leite, este vai para as cubas de coagulação a temperaturas entre 30-40 °C durante 45-60 min. Após o corte da coalhada, efetua-se um repouso da massa, para que se dê a separação do soro. Já o dessoramento e enchimento da massa são feitos lentamente, para evitar o arrefecimento e, conseqüentemente, a libertação incorreta do soro. A moldagem acontece quando a massa resultante enche os cinchos, que de seguida são prensados e repousam durante 12-24 h. O período de cura tem a duração mínima de 20 dias. A primeira fase de cura tem a duração de oito a 12 dias entre 8-14 °C e humidade relativa entre 65-99%; enquanto a segunda fase de cura tem a duração de oito a 12 dias entre 10-20 °C e humidade relativa entre 55-88%. Durante todo o período de cura é feita a viragem diária dos queijos, para que se mantenham o mais homogêneos possível e, após cada fase de cura, é necessária uma lavagem aos queijos. Logo que a crosta esteja formada e a massa adquirir uma consistência semi-mole e homogênea, a cura dá-se por terminada (DGADR, 2021).

Adicionalmente, é ainda importante referir que mensalmente se reúne um painel de provadores, que avaliam queijos escolhidos de forma aleatória. Os produtos considerados conformes são embalados e podem prosseguir para expedição. Estes têm como destino maioritário os hipermercados, no entanto alguma produção vai para mercados mais pequenos, restaurantes e, por vezes, diretamente para o consumidor final (DGADR, 2021).

2.1.2.2. Queijo de Nisa DOP

Em 1901 o queijo de Nisa foi mencionado por António Maria Horta Camões, o que mostra ser um produto de referência na região do Alentejo desde há muitos anos (Produtos Tradicionais Portugueses, 2021). É um queijo caracterizado pelo seu sabor ligeiramente ácido e aroma intenso, é curado, de pasta semi-dura, tonalidade branca-amarelada, fechado e com alguns olhos pequenos. Obtido, única e exclusivamente, a partir de leite cru de ovelha da raça Merina Branca. No queijo de Nisa, tal como no queijo de Azeitão, é usado no processo de fabrico o coalho vegetal *Cynara Cardunculus* L.. Por outro lado, a área de produção do queijo abrange diversos concelhos do distrito de Portalegre: Nisa, Alter do Chão, Crato, Castelo de Vide, Monforte, Portalegre, Marvão e Arronches (Produtos tradicionais portugueses, 2021). Na Figura 3 é possível observar o queijo de Nisa.



Figura 3 – Queijo de Nisa.

No caderno de especificações do produto, são expostas as condições a ter em conta na produção do queijo de Nisa DOP, nomeadamente na produção do leite, higiene da ordenha e conservação do leite, fabrico e cura do queijo. É muito importante existir um controlo rigoroso sobre o boletim sanitário das ovelhas produtoras do leite utilizado no queijo de Nisa, assim como o tratamento que o leite recebe até chegar à queijaria de destino. Deste modo, a ordenha do leite deve ser efetuada da forma mais higiénica possível e o leite deve ser armazenado adequadamente, não é aconselhável exceder 12 h até à chegada à queijaria (Produtos tradicionais portugueses, 2021).

Após receção do leite é adicionado o agente coagulante, cardo obtido por infusão, e a mistura colocada a uma temperatura entre 25-28 °C, durante 45 a 60 min. De seguida, ao leite coagulado é feito o primeiro corte da coalhada, para permitir a libertação de parte do soro. Seguidamente a coalhada é vertida para cinchos, procedendo-se à primeira viragem, quando a massa não libertar soro. O cincho é aberto no diâmetro máximo e é feita a divisão da massa energicamente, de modo que o queijo fique bem ligado, em seguida é reapertado o cincho para marcar o diâmetro final. O queijo é dividido, mais uma vez, para que a massa fique apertada até esgotamento da coalhada, seguindo-se a prensagem durante 6-10 min. Neste ponto a massa deve apresentar-se muito homogénea, com as superfícies lisas e sem espaços ocultos no interior. Segue-se a salga do queijo, que é realizada por 12 h. Por fim, o queijo passa por duas fases de cura com duração mínima de 45 dias. A primeira fase de cura tem a duração de 15 a 18 dias com humidade relativa de 80-90% e temperatura de 8-10 °C, de modo a desenvolver a rema. Neste período o queijo deverá ser lavado com soro de leite ou água fria e virado diariamente. Já a segunda fase de cura tem a duração de 30 a 40 dias, com humidade relativa 85-90% e temperatura de 10-14 °C, de modo a promover a secagem da rema que, conseqüentemente, leva a uma modificação no aspeto e cheiro do queijo. Este deverá ser lavado com água tépida, ligeiramente salgada e virado duas a três vezes por semana. À medida que o queijo vai

ficando curado o cincho é retirado e dá-se por terminado o período de cura (Produtos Tradicionais Portugueses, 2021).

2.2. Microbiota do queijo

Uma vez que este tipo de alimento tem elevado valor para o património cultural e gastronómico, torna-se importante explorar a sua suscetibilidade à deterioração, de forma a evitar o desperdício alimentar (Lorenzo et al. 2018). Deste modo, os alimentos podem ser agrupados como perecíveis, no caso de a vida útil do alimento ser reduzida, semi-perecíveis, no caso da vida útil do alimento ser de semanas ou meses, e não perecíveis, no caso da vida útil do alimento ser de muitos meses ou anos (Ray 2001).

Os microrganismos que deterioram alimentos, isto é, que contribuem para a decomposição do alimento sem causar doença ao consumidor, designam-se de deteriorativos (Saraiva and Baptista 2003). Como exemplo, Enterobacteriaceae, bolores e leveduras são microbiota deteriorativa que pode existir nos queijos (Fox et al. 2016). A deterioração dos alimentos envolve mecanismos complexos, existindo alteração dos atributos sensoriais (aspeto, cheiro e textura) que tornam o alimento inaceitável para consumo e, conseqüentemente, a rejeição pelo consumidor (Lorenzo et al. 2018).

Os microrganismos multiplicam-se quando expostos a um ambiente favorável, sendo superiores as necessidades nutricionais das bactérias, comparativamente às das leveduras e bolores (Ray 2001). A capacidade de multiplicação desses microrganismos é determinada pelo ambiente intrínseco e extrínseco dos alimentos (Ray 2001). Os fatores intrínsecos de um alimento incluem os nutrientes, atividade da água (a_w), pH, potencial de oxidação-redução, fatores de crescimento e inibidores (Ray 2001). Já os fatores extrínsecos estão relacionados com as condições ambientais em que o alimento é armazenado, ou seja, temperatura, humidade, pressão e gases protetores (Ray 2001). Diferentes alimentos têm diferente suscetibilidade à deterioração por microrganismos, devido às diferenças dos fatores intrínsecos e extrínsecos a que estão sujeitos. Como por exemplo, um alimento com $a_w \approx 0,9$ ou $\text{pH} \approx 5,3$, será menos suscetível à deterioração do que um alimento com $a_w \approx 0,98$ ou $\text{pH} \approx 6,4$ (Ray 2001).

Intimamente associado à atividade da água está o uso de NaCl. A utilização de sal para prevenir a deterioração de alimentos é uma prática bastante antiga. Quando estes fatores se associam, o principal fator inibitório é a redução do a_w que ocorre quando o sal (ou qualquer soluto) se dissolve em água. Nos queijos, a concentração salina pode variar entre 0,7 e 7% (Fox et al. 2016). Outro fator crucial para controlo da multiplicação bacteriana é o pH. A acidificação, diminuição do pH, afeta a composição final e qualidade do queijo (Freitas and Malcata 2000). Sabe-se que a maioria das bactérias se multiplicam, idealmente, a pH neutro e têm dificuldades em se multiplicar a pH inferior a 5. Um queijo

após acidificação da coalhada, fica normalmente com um valor de pH compreendido entre 4,5 e 5,3, o que significa que a multiplicação de algumas bactérias ficará comprometida. O pH aumentará continuamente nas primeiras semanas de cura, até ficar compreendido entre 5,5 e 7,5 (Fox et al. 2016).

Por outro lado, microrganismos que podem causar doenças no consumidor, quando presentes em alimentos, designam-se de patogénicos (Saraiva and Baptista 2003). Existem relatos que o queijo pode possuir este tipo de microbiota, nomeadamente, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (Fox et al. 2016). Os microrganismos patogénicos podem provocar infeções e intoxicações. No primeiro, após o alimento ser ingerido, os microrganismos presentes no alimento multiplicam-se no organismo do indivíduo, provocando doença. No segundo, os microrganismos presentes no alimento produzem toxinas, e são essas toxinas as responsáveis pela doença (Saraiva and Baptista 2003). Por outro lado, o consumo de alimentos que contenham níveis significativos de amins biogénicas pode causar intoxicação alimentar. No caso do queijo, as mesmas são produzidas por descarboxilação enzimática de aminoácidos livres, sendo que as bactérias ácido lácticas podem ser responsáveis pela sua produção. As principais amins presentes em queijo são a tiramina e histamina, produzidas pela descarboxilação da tirosina e histidina, respetivamente. Ainda, o teor de tiramina geralmente é maior em queijos com longos períodos de cura (Fox et al. 2016).

Uma das preocupações associadas aos queijos de leite cru, como é o caso dos queijos tradicionais portugueses, é a possível presença de microrganismos indesejáveis ao longo do processo de fabrico e cura (Pereira et al. 2010). A utilização de leite cru, aliada a diferentes protocolos de ordenha e variações das condições de higienização do local de produção, conduzem a uma variabilidade extensa e imprevisível da microbiota (Pereira et al. 2010). Por a microbiota indígena ser qualitativa e quantitativamente desconhecida, os queijos fabricados com leite cru podem apresentar riscos para a saúde (Freitas and Malcata 2000). Apesar de não existirem surtos associados ao consumo de queijo com selo DOP produzido em Portugal, caso isso ocorresse, a reputação do produto poderia ser posta em causa, e a sua comercialização seria certamente afetada (Almeida et al. 2007).

Por este motivo, torna-se fundamental compreender a dinâmica de interação da microbiota na matriz do queijo, para que seja possível prevenir a deterioração e a transmissão de microrganismos patogénicos ao consumidor (Pereira et al. 2009). É fundamental a sensibilização para um controlo sanitário dos rebanhos, aliado a práticas de fabrico rigorosas (Freitas and Malcata 2000).

Além dos microrganismos deteriorativos e patogénicos, pode existir nos alimentos microbiota com propriedades benéficas/úteis. Fazem parte deste grupo os que contribuem

para a produção do alimento em si, limitem a deterioração e/ou multiplicação de microrganismos patogênicos ou permitam a manutenção de um trato gastrointestinal saudável dos consumidores, entre outros benefícios (Ray 2001). Estes microrganismos designam-se genericamente de úteis, de interesse tecnológico e/ou probiótico e são essenciais, por exemplo, na fermentação para produção de vinho, iogurte, cerveja e queijo (Saraiva and Baptista 2003).

No queijo esses microrganismos desempenham funções fundamentais para o desenvolvimento das propriedades organoléticas, composição nutricional, prazo de validade e segurança microbiológica do produto final (Yeluri Jonnala et al. 2018). A maioria da microbiota constituinte do leite cru, pertence ao grupo das bactérias ácido lácticas (*Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Enterococcus* spp.) que têm um papel fulcral durante a fermentação e período de cura dos queijos tradicionais (Santos et al. 2017). Cerca de 90% desta microbiota proveniente do leite fica retida na coalhada, enquanto os restantes 10% perdem-se no soro. A microbiota imobilizada na coalhada irá fazer parte da matriz tridimensional do queijo (Fox et al. 2016). Uma vez que as bactérias ácido lácticas estão presentes em maioria nos queijos tradicionais, as características das mesmas irão ser exploradas detalhadamente.

2.2.1. Bactérias ácido lácticas

As bactérias ácido lácticas (BAL) estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser isoladas de vários produtos alimentares de origem animal e vegetal (Margalho et al. 2020). A disseminação deste grupo de bactérias nos alimentos está relacionada com o seu metabolismo fermentativo, que envolve a síntese de ácidos orgânicos (como ácido láctico e acético), redução do pH e produção de compostos antimicrobianos (como bacteriocinas e peróxido de hidrogénio), que inibem a multiplicação de microrganismos indesejáveis nos produtos alimentares (Giraffa 2012; Margalho et al. 2020).

BAL têm a capacidade de fermentar açúcares, como glucose ou lactose, produzindo como principal produto final o ácido láctico. Caracterizam-se por serem Gram-positivas, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas e catalase-negativas. Possuem baixo teor de G+C e podem assumir forma de bastonetes ou cocos (König et al. 2009; Giraffa 2012; Domingos-Lopes et al. 2017;). Os principais géneros de bactérias ácido lácticas incluem: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Weissella* (Fox et al. 2016; Margalho et al. 2020).

No fabrico de queijo as BAL desempenham diferentes funções, podendo participar no processo de fermentação, ou de cura. No primeiro caso são responsáveis por dar início à produção de ácido láctico, designando-se por bactérias ácido lácticas *starter* - BALS (Settanni and Moschetti 2010). BALS presentes no queijo, possuem uma função

acidificante, de modo a prolongar o prazo de vida útil do produto, evitando a multiplicação de microrganismos indesejáveis (König et al. 2009). No segundo caso, as BAL desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do sabor e aroma durante o processo de cura dos queijos, designando-se por bactérias ácido lácticas não *starter* – BALNS. Estas contribuem para o catabolismo de aminoácidos, particularmente aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptofano), aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, isoleucina e valina) e metionina, sendo responsáveis pela textura e *flavour* específicos dos queijos curados (Fox et al. 2016).

De acordo com os produtos finais produzidos a partir da glucose, as BAL subdividem-se em dois grupos: as homofermentativas que produzem ácido láctico como único produto final da fermentação desse monossacárido e as heterofermentativas que produzem ácido láctico, dióxido de carbono e etanol como produtos finais da fermentação da glucose (König et al. 2009).

Dada a vasta utilização de BAL em alimentos fermentados, a maioria destas bactérias possui o estatuto GRAS (*Generally Regarded As Safe*), concedido pela *American Food and Drug Agency* (FDA), que considera géneros de bactérias como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, seguros para consumo (Yadav and Shukla 2017; Cui et al. 2018; Grujović et al. 2019). Na Europa esse conceito é substituído pelo estatuto QPS (*Qualified Presumption of Safety*), concedido pela Autoridade Europeia de Segurança dos Alimentos (EFSA), que considera *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* e várias espécies de *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* como seguras (EFSA 2016).

Durante o fabrico e cura do queijo, existem interações espontâneas, entre a microbiota autóctone e a própria matriz do queijo (Pereira et al. 2011), que são responsáveis pela extensão da proteólise (particularmente a degradação da caseína em péptidos e aminoácidos) e lipólise (Guiné and Florença 2020). Deste modo contribuem para a produção de compostos distintos e, conseqüentemente, características organoléticas e bioquímicas únicas que o consumidor associa aos diferentes produtos tradicionais (Domingos-Lopes et al. 2017).

Entende-se a importância que as BAL têm nos queijos, principalmente nos artesanais, devido às características peculiares que lhes atribuem. Ao longo dos anos foram alvo de estudo diversos queijos artesanais utilizando leite cru de ovelha, sem qualquer adição de culturas *starter*, com intuito de explorar a sua diversidade microbiana. Foram analisados, por exemplo, queijos artesanais de Itália, como o Fiore Sardo (Pisano et al. 2006) e o Pecorino di Tramonti (Mormile et al. 2015), de França, como o Ossau-Iraty (Feutry et al. 2012), e Croácia, como Krčki, Istrian e Paski (Fuka et al. 2013).

Estudos similares, como os realizados por Batista (2017) e Baptista (2018), foram realizados em queijos tradicionais portugueses. O primeiro estudo teve como objetivo a

caracterização da microbiota do queijo de Azeitão DOP e Nisa DOP, através da sequenciação do gene rRNA 16S, tendo-se verificado que as BAL foram o grupo dominante em todas as amostras (85%), sendo os géneros mais representativos *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. As espécies, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactococcus lactis*, foram as predominantes em todas as amostras. Mais especificamente, no queijo de Azeitão, as BAL mostraram mais de 85% de dominância em todas as amostras, sendo *Lactococcus* o género mais abundante, seguido de *Leuconostoc* spp. e *Lactobacillus* spp.. Já no queijo de Nisa, as BAL mostraram mais de 90% de dominância em todas as amostras, sendo *Leuconostoc* o género mais abundante, seguido de *Lactococcus* spp. e *Lactobacillus* spp.

Por outro lado, o estudo de Baptista (2018) com o objetivo de caracterizar a microbiota dos queijos DOP de Azeitão e Nisa, verificou que estes queijos possuem uma microbiota muito específica por serem produzidos artesanalmente e sem adição de culturas *starter*. Através da sequenciação do gene rRNA 16S, verificou-se que as BAL eram o grupo dominante, sendo *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus* os géneros maioritários.

Foram também realizados estudos acerca da microbiota constituinte do queijo Serpa DOP e Serra da Estrela DOP. No estudo de Gonçalves et al. (2018) foi avaliada a microbiota presente no queijo tradicional Serpa DOP, através da sequenciação do gene rRNA 16S e sequenciação de nova geração (NGS-Next Generation Sequencing). Os resultados obtidos mostraram as bactérias ácido lácticas como predominantes, nomeadamente as pertencentes ao género *Lactococcus* (40%-60% da microbiota), seguido de *Lactobacillus* spp. e *Leuconostoc* spp.. Já no estudo de Rocha et al. (2021) o objetivo foi caracterizar a microbiota do queijo tradicional Serra da Estrela DOP. Através de sequenciação de nova geração, concluíram que a microbiota era constituída 50%-90% por BAL, nomeadamente membros dos géneros *Leuconostoc* spp., *Lactococcus* spp. e *Enterococcus* spp.. As principais espécies detetadas foram *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactococcus lactis*.

Por fim, Cardinali et al. (2021) analisou a microbiota do Queijo de Azeitão DOP. Mais uma vez os resultados demonstraram a predominância das BAL, sendo que 37% da microbiota dos produtos em análise era constituída por *Leuconostoc mesenteroides* e 29% correspondente à espécie *Lactococcus lactis*.

Assim, na indústria alimentar as BAL exercem inúmeras funções importantes, pelo seu contributo benéfico nos alimentos, nomeadamente em queijos. De seguida serão descritas em pormenor as características tecnológicas e probióticas atribuídas a este grupo bacteriano.

2.2.2. Potencial tecnológico e probiótico da microbiota do queijo

Tal como foi referido anteriormente, o processo de fabrico do queijo é fundamental para as características finais do produto, sendo que o ambiente tem grande impacto na multiplicação e sobrevivência dos microrganismos presentes durante as várias etapas (Beresford et al. 2001).

No passo inicial do processo de manufatura, a acidificação do leite é uma consequência da produção de ácido láctico, resultado da fermentação realizada pelas bactérias ácido lácticas. A produção de ácido láctico, a partir da lactose, baixa o pH do leite (Fox et al. 2016) e uma rápida acidificação previne a multiplicação microbiana indesejável, mas é essencial para o aroma e textura do produto final (De Vuyst 2000). A extensão da acidificação é variável, uma vez que a microbiota indígena do leite depende de diversos fatores (Fox et al. 2016).

Quanto à coagulação do leite, esta pode ser dividida em duas fases: hidrólise da proteína k-caseína e agregação e gelificação das micelas alteradas pelo coalho (Fox et al. 2016). Na primeira fase, as enzimas do coalho provocam a clivagem da ligação peptídica Met105-Phe106 da k-caseína. Esta é uma proteína estabilizadora, presente na superfície das micelas da caseína do leite, que rodeia a α_s -caseína e β -caseína. O coalho animal possui as enzimas quimosina e pepsina, enquanto o coalho vegetal (*Cynara Cardunculus* L.) possui cardosina A e cardosina B. Apesar de serem enzimas distintas entre um tipo de coalho e outro, a função de cada par de enzimas é similar, embora a cardosina A clive mais ligações peptídicas do que a quimosina, resultando num padrão diferente de proteólise (Pereira et al. 2008). Na segunda fase, quando ~85% do total das k-caseína forem hidrolisadas, a estabilidade das micelas é tão reduzida que quando colidem, ficam agrupadas, transformando-se num gel semi-sólido (coalhada) (Fox et al. 2016).

Os constituintes orgânicos envolvidos nas características primárias da cura do queijo, incluem proteínas e lípidos (Fox et al. 2016). A proteólise e lipólise são os principais processos bioquímicos envolvidos, embora a importância de cada um dependa do tipo de queijo. Estes processos bioquímicos, envolvem a ação de vários microrganismos viáveis e enzimas (Freitas and Malcata 2000). Na cura do queijo é importante a ação de enzimas como proteases, plasmina, lipoproteína lipase, fosfatase ácida e xantina oxidase (Fox et al. 2016).

A proteólise é das reações bioquímicas mais importantes para o desenvolvimento da textura e do *flavour* durante a cura dos queijos (Pereira et al. 2008). Esta reação depende das proteases indígenas do leite (como plasmina e catepsina D), de proteases provenientes do coagulante, proteases e peptidases das bactérias ácido lácticas, do tipo de queijo e das condições de cura (Guerreiro et al. 2013). Cada elemento desempenha uma função específica, mas é o conjunto das interações que resulta no produto final (Pereira et

al. 2008). Assim, a proteólise contribui para a textura do queijo através da hidrólise da caseína, existindo uma diminuição da atividade da água na coalhada (McSweeney 2004). Por outro lado, tem influência direta no *flavour* devido à proteólise de caseínas que origina péptidos de tamanho grande e médio, que serão posteriormente degradados. Através da ação de enzimas exógenas e endógenas ocorre novamente clivagem, libertando-se pequenos péptidos e aminoácidos, que originam diversos compostos aromáticos importantes (Freitas and Malcata 2000).

A lipólise no queijo é catalisada por lipases provenientes da microbiota do leite, coalho e queijo (McSweeney 2004). O leite contém uma lipase indígena muito importante, a lipoproteína lipase, sendo a sua atividade mais significativa nos queijos fabricados a partir de leite cru, uma vez que são inativadas pelas temperaturas de pasteurização (McSweeney 2004). Assim, pela ação de lipases, os triacilgliceróis sofrem hidrólise, originando ácidos gordos livres durante a cura do queijo (McSweeney 2004). A maioria dos ácidos gordos livres gerados são precursores de compostos voláteis, como metil-cetonas, aldeídos e lactonas, que desempenham um papel relevante no *flavour* do queijo (Buffa et al. 2001).

As BAL podem ainda ativar a produção de inibidores contra bactérias patogénicas, como ácidos orgânicos e bacteriocinas. No caso dos ácidos orgânicos estes acidificam o meio, o que significa que afetam a multiplicação de microrganismos desfavoráveis (Yadav and Shukla 2017). Já as bacteriocinas são definidas como pequenos péptidos antimicrobianos, sintetizados ribossomicamente, que atuam principalmente sobre bactérias Gram-positivas. Os mecanismos usados pelas bacteriocinas são diversos e bastante distintos: formação de poros, degradação de DNA celular, rutura por clivagem do rRNA16S ou inibição da síntese do peptidoglicano (Favaro et al. 2014; Ribeiro et al. 2014). Deste modo, são capazes de reduzir ou inibir a multiplicação de agentes patogénicos, nomeadamente espécies pertencentes a géneros como *Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Pseudomonas* e *Streptococcus* (Settanni and Moschetti 2010; Fox et al. 2016; Yadav and Shukla 2017), que são uma grande preocupação para a segurança microbiológica do produto final (Pereira et al. 2010).

Estão descritas inúmeras bacteriocinas produzidas por BAL. A título de exemplo, algumas das produzidas pelo género *Enterococcus* são: enterocina B, enterocinas L50A e L50B, enterocina A e enterocina P (Ahmadova et al. 2013; Margalho et al. 2020). É importante salientar que, a nível mundial, está autorizada a inclusão em alimentos e comercialização da bacteriocina nisina, pura ou semi-purificada (Favaro et al. 2014).

Assim sendo, é benéfico que os queijos possuam na sua constituição microbiota produtora de bacteriocinas, pois estes microrganismos vão contribuir para a segurança e qualidade do alimento, para o controlo da microbiota encarregue da fermentação,

aceleração do processo de cura e extensão da vida útil do alimento (Ahmadova et al. 2013; Ribeiro et al. 2014; Ribeiro et al. 2016).

Os alimentos fermentados são igualmente conhecidos por apresentarem efeitos benéficos para a saúde do consumidor. Os alimentos que influenciam positivamente uma ou mais funções biológicas do corpo humano, melhorando a sua saúde e bem-estar, designam-se de alimentos funcionais (Settanni and Moschetti 2010). Estão abrangidos nos alimentos funcionais, os produtos alimentares que contenham microrganismos probióticos (Settanni and Moschetti 2010). Vários géneros de BAL têm mostrado características probióticas, sendo este um motivo da sua aplicabilidade em alimentos. Por definição, bactérias probióticas são “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO 2002, p.8, tradução livre). Entre as principais BAL encontradas no intestino humano, estão membros dos géneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, frequentemente utilizados nos alimentos como probióticos (Giraffa 2012).

Deste modo, para que um microrganismo possa ser considerado probiótico, deverá sobreviver às condições encontradas no trato gastrointestinal, ou seja, deverá tolerar variação nos valores de pH, resistir a sais biliares, enzimas gástricas e deverá ainda ter a capacidade de aderir à mucosa intestinal, para conseguir colonizar o intestino (Plessas et al. 2012; Cui et al. 2018; Margalho et al. 2020). Para além disso, não pode apresentar fatores de virulência e deve prevenir a multiplicação de microrganismos patogénicos (Margalho et al. 2020). Por estes motivos, a seleção de microrganismos probióticos exige uma rigorosa e criteriosa análise, como se atesta pelo estudo de Ruiz-Moyano et al. (2019). Estes autores avaliaram as propriedades probióticas de BAL, isoladas de queijo Serpa DOP para possível aplicação no processo de fabrico. Dos 116 isolados selecionados, pertencentes aos géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*, três demonstraram ter características promissoras para serem aplicadas no futuro como probióticas, sendo todas do género *Lactobacillus*.

Existe dúvidas quanto ao potencial probiótico do género *Enterococcus*, uma vez que não possui estatuto QPS (Câmara et al. 2020). A utilização de bactérias deste género é um tema controverso, pois são responsáveis pelo desenvolvimento de características sensoriais únicas, equilibram a microbiota intestinal e podem ter efeitos benéficos na saúde (Favaro et al. 2014; Fuka et al. 2017), mas a sua resistência a uma gama ampla de antibióticos e presença de fatores de virulência (Ahmadova et al. 2013) levantam questões acerca da sua segurança em alimentos prontos a consumir, como o queijo (Fuka et al. 2017).

É ainda essencial que, durante o fabrico e armazenamento do alimento, os probióticos mantenham a sua viabilidade (Settanni and Moschetti 2010). Estudos como o

de Cruz et al. (2009), Karimi et al. (2011), Plessas et al. (2012) e Hammam e Ahmed (2019) demonstraram que os queijos são ótimos intermediários de BAL probióticas para o consumidor, devido às características da sua matriz alimentar. Hamman e Ahmed (2019) referem que é através das especificidades físico-químicas do queijo, nomeadamente pH entre 5 e 6, alto teor de gordura, disponibilidade de nutrientes e baixo teor de oxigénio, que é possível a sobrevivência das BAL probióticas até ao trato gastrointestinal. Devido a essas características, os queijos possuem capacidade como portadores de BAL, pois as suas características proporcionam um ambiente estável e favorável, garantindo que os microrganismos probióticos sobrevivam na passagem pelo trato gastrointestinal (Settanni and Moschetti 2010; Plessas et al. 2012).

Apesar das características do queijo serem favoráveis para BAL probióticas, isso não impede que a viabilidade deste tipo de microrganismos seja um desafio. Nos queijos, esta viabilidade tem de permanecer durante o período de cura, e ser garantida a sobrevivência dos microrganismos em número significativo para beneficiar a saúde humana (Cruz et al. 2009; Plessas et al. 2012). A fim de influenciar positivamente a saúde do consumidor, os alimentos portadores de microrganismos probióticos, devem ser ingeridos diariamente numa quantidade aproximada 100 g de produto alimentar, que corresponde sensivelmente a 10^8 - 10^9 células viáveis (Ruiz-Moyano et al. 2019; Margalho et al. 2020). De salientar que os microrganismos probióticos não devem provocar alterações sensoriais, nomeadamente no sabor, aroma e textura do alimento. Também não devem implicar uma perda de qualidade do produto, o nível de proteólise e lipólise deverá manter-se igual, ou ser superior, com a incorporação de bactérias probióticas no alimento (Cruz et al. 2009).

Pelo que foi referido anteriormente, consumos regulares de alimentos ricos em bactérias probióticas fornecem vários benefícios para a saúde, tais como o equilíbrio da microbiota intestinal, melhoria do sistema imunológico, proteção contra a microbiota patogénica gastrointestinal, prevenção de alergias alimentares e proteção contra o cancro do cólon e bexiga (König et al. 2009; Giraffa 2012; Ganesan et al. 2014; Yadav and Shukla 2017). Autores como Hammam e Ahmed (2019) e Homayouni et al. (2020) destacam a importância do queijo como fonte de probióticos para consumo humano e enfatizam os benefícios para a saúde que os probióticos podem conferir.

2.2.3. Potencial patogénico da microbiota do queijo

Como foi referido, as BAL apresentam inúmeras vantagens tecnológicas e probióticas, mas o facto de estarem presentes ao longo da cadeia alimentar e serem membros da microbiota de animais e humanos, significa que podem servir como veículo

de transmissão de genes, tanto de fatores de virulência, como de resistência a antibióticos. Por este motivo, estes dois temas serão abordados de seguida.

2.2.3.1. Fatores de virulência

A descoberta de fatores de virulência, contribuiu para compreender melhor a patogenicidade bacteriana e as interações existentes com o hospedeiro (Wu et al. 2008). Um isolado pode tornar-se patogénico quando combinada a presença de fatores de virulência e/ou genes de resistência (Chajęcka-Wierzchowska et al. 2017). Os fatores de virulência, quando produzidos por microrganismos, conferem-lhes a capacidade de invadir, colonizar, multiplicar e persistir num hospedeiro, podendo causar doença (Cross 2008).

Ao longo dos anos o género *Enterococcus* spp. tem vindo a assumir grande importância nas diversas áreas da microbiologia, uma vez que possui a capacidade de adquirir, acumular e transferir elementos móveis que codificam genes de virulência e/ou resistência (Gaglio et al. 2016). Para além disso, são conhecidos como patogénicos oportunistas e por causarem infeções associadas aos cuidados de saúde, como infeções no trato urinário e endocardites (Serio et al. 2007; Özkan et al. 2021). Estudos comprovam que isolados de *Enterococcus* spp. com fatores de virulência, causam infeções mais graves no hospedeiro, do que os que não possuem esses determinantes genéticos (Chajęcka-Wierzchowska et al. 2017). Segundo Serio et al. (2007), a espécie *E. faecalis* aparenta ter maior ocorrência de determinantes de virulência, em comparação com *E. faecium*.

A capacidade de bactérias patogénicas causarem doença ao hospedeiro é determinada por múltiplos fatores de virulência que agem individualmente, ou em conjunto (Wu et al. 2008). Entre os fatores de virulência que promovem a colonização das células hospedeiras inclui-se a substância de agregação (gene *agg* ou *asa1*), adesina do colagénio (gene *ace*), adesina da parede celular (gene *efaA*) e proteínas de superfície (gene *esp*) (Chajęcka-Wierzchowska et al. 2017; Dapkevicius et al. 2021). *Enterococcus* spp. são capazes de aderir aos tecidos do hospedeiro, através da produção de adesinas que permitem ligar-se a recetores da membrana celular ou proteínas da matriz extracelular, favorecendo a colonização do epitélio (Chajęcka-Wierzchowska et al. 2017). Após o processo de colonização, os isolados secretam substâncias tóxicas, com efeito negativo sobre os tecidos do hospedeiro. Os fatores de virulência secretados por *Enterococcus* spp. incluem a citolisina (gene *cyl*), gelatinase (gene *gelE*) e hialuronidase (gene *hyl*) (Chajęcka-Wierzchowska et al. 2017; Dapkevicius et al. 2021).

Neste grupo bacteriano, a citolisina é um dos fatores de virulência melhor caracterizados. É uma exotoxina com atividade bactericida e hemolítica sobre eritrócitos (β -hemólise), leucócitos e macrófagos (Dapkevicius et al. 2021). A produção da mesma é regulada por um operão composto por oito genes: *cylR1*, *cylR2*, *cylLI*, *cylLs*, *cylIM*, *cylB*, *cylA* e *cylI*. Este operão localiza-se em elementos genéticos móveis, como plasmídeos que

respondem a feromonas, ou ilhas de patogenicidade cromossômicas (Chajęcka-Wierzchowska et al. 2017). Genes codificadores de citolisina já foram encontrados em várias espécies de *Enterococcus*, nomeadamente *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. malodoratus* e *E. raffinosus*, incluindo isolados de animais e produtos alimentares (Dapkevicius et al. 2021). Como por exemplo, num estudo de Semedo et al. (2003), 96 isolados de *Enterococcus* spp. provenientes de queijo e leite de ovelha, revelaram 6% de capacidade hemolítica e a presença de genes *cyl* foi detetada em 70% desses isolados. Ainda, o gene *cylB* foi detetado em *Enterococcus* spp. de um queijo turco e o gene *cylA* foi detetado em *Enterococcus* spp. isolados de um queijo egípcio (Chajęcka-Wierzchowska et al. 2017).

Outro fator de virulência bem caracterizado é a gelatinase. Esta é uma metaloendopeptidase extracelular dependente de zinco, com capacidade de hidrolisar gelatina, elastina, colagénio e hemoglobina, podendo contribuir para a formação de biofilmes (Dapkevicius et al. 2021). A gelatinase é codificada pelo gene *gelE*, responsável pela degradação da caseína e subsequente produção de péptidos bioativos (Özkan et al. 2021). O gene *gelE* é regulado pelo locus *fsr*, constituído por três genes: *fsrA*, *fsrB*, *fsrC* (Chajęcka-Wierzchowska et al. 2017). Genes codificadores de gelatinase já foram encontrados em *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* e *E. durans*, isolados de queijos artesanais produzidos com leite cru (Templer and Baumgartner 2007). O gene *gelE* foi detetado em todos os isolados (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. dispar* e *E. hirae*) de leite de ovelha cru e queijos tradicionais Portugueses (Lopes et al. 2006); detetado em 76% das espécies de *Enterococcus* presentes em queijos de leite cru de vaca (Templer and Baumgartner 2007); e em todos os isolados de *E. faecalis* de queijos de cabra da Andaluzia (Martín-Platero et al. 2009).

A presença de fatores de virulência em isolados de origem alimentar, não implica necessariamente que esses microrganismos causem doença no ser humano. No entanto, *Enterococcus* spp. provenientes de alimentos, com fatores de virulência, podem tornar-se um potencial risco para indivíduos imunocomprometidos quando colonizam o intestino humano (Chajęcka-Wierzchowska et al. 2017). Por este motivo têm sido realizados diversos estudos, com o intuito de explorar a presença de fatores de virulência em *Enterococcus* spp. de origem alimentar.

Neste âmbito, o estudo de Pimentel et al. (2007) teve como intuito avaliar *Enterococcus* spp. provenientes do queijo tradicional Terrincho. Todos os isolados foram negativos para os genes *cylL*, *cylM*, *cylB* e *agg*. Já os isolados da espécie *E. faecalis* continham o gene *esp* e apenas um possuía o gene *cylA*.

Outro estudo, Soares-Santos et al. (2015), consistiu em avaliar isolados provenientes de amostras de alimentos e das superfícies em que os mesmos são

processados. Dos 132 isolados, 52% eram β -hemolíticos, 39% produtores de gelatinase e 45% continham o gene *gelE*. Os genes *agg* e *esp* foram detetados em menos de metade dos isolados (25% e 11% respetivamente). Deste modo, o estudo demonstrou que *Enterococcus* spp. provenientes de alimentos podem conter fatores de virulência. Por este motivo é importante controlar a disseminação de *Enterococcus* spp. com potencial de patogenicidade, para evitar problemas de saúde pública.

Ainda, um estudo (Jahansepa et al. 2019) consistiu na análise de 50 amostras de queijos tradicionais curados do noroeste do Irão, de modo a investigar a incidência de resistência bacteriana e fatores de virulência. De 40 *E. faecalis* e oito *E. faecium*, vários apresentaram genes de virulência entre os quais, *gelE* (89,6%), *ace* (87,5%), *agg* (72,9%), *cylA* (12,5%) *esp* (10,4%) e *hyl* (8,3%). Os autores concluíram que os isolados em estudo possuíam vários genes de virulência.

Por fim, um estudo recente (Câmara et al. 2020) foi realizado com o objetivo de avaliar fatores de virulência, resistência a antibióticos e produção de aminas biogénicas em 28 isolados de queijo tradicional do Pico. Apenas um dos isolados foi identificado como β -hemolítico, porém 54% dos isolados eram produtores de gelatinase. Foram detetados vários genes de virulência entre os quais *efaA* (100%), *gelE* (86%), *ace* (71%), *esp* (46%) e *agg* (43%). Estes resultados mostram, mais uma vez, como *Enterococcus* spp. podem ser um potencial reservatório de genes de virulência com impacto na patogenicidade, sendo importante a monitorização dos mesmos.

2.2.3.2. Resistência a antibióticos

Um dos maiores problemas enfrentados pela saúde pública é o uso indevido ou excessivo de antibióticos, tornando o tratamento de infeções microbianas cada vez mais desafiante (Cui et al. 2018). A resistência bacteriana aos antibióticos pode ser classificada como intrínseca ou adquirida, sendo a primeira aquela que é universalmente encontrada no genoma da espécie, enquanto a segunda pode ocorrer por meio de mutações esporádicas em genes pré-existente ou por aquisição de novo material genético (plasmídeos, transposões, bacteriófagos) (Hollenbeck and Rice 2012). A resistência intrínseca apresenta um menor risco de propagação horizontal, enquanto a resistência adquirida apresenta elevado risco, quando os genes de resistência estão em elementos genéticos móveis (Ruiz-Moyano et al. 2019). A transferência horizontal de genes permite que as bactérias troquem genes de resistência a antibióticos de forma eficiente, promovendo o desenvolvimento de multirresistências na comunidade microbiana (Dapkevicius et al. 2021). Segundo Magiorakos et al. (2012), o conceito de multirresistência a antibióticos corresponde à ocorrência de resistência a pelo menos um antibiótico de três classes distintas, com alvos celulares diferentes.

No desenvolvimento da resistência a antibióticos, tem grande importância e impacto a sua utilização indiscriminada em medicina humana e veterinária, nomeadamente na produção animal (Cui et al. 2018; Chiesa et al. 2020; Margalho et al. 2020). O desenvolvimento e disseminação da resistência, resulta da elevada capacidade de adaptabilidade dos microrganismos, quando se deparam com circunstâncias adversas (Rodríguez-Rojas et al. 2013). Estes possuem (ou desenvolvem) a capacidade de inativar ou excluir os antibióticos, ou mecanismos que bloqueiam os efeitos inibitórios/destruidores dos mesmos (Davison et al. 2000). Deste modo, dada a constante deteção de bactérias resistentes a antibióticos, este assunto tornou-se um importante foco de investigação, uma vez que bactérias resistentes a antibióticos constituem uma ameaça para humanos, animais e meio ambiente (Paula et al. 2018).

Em alguns estudos realizados anteriormente em queijos tradicionais, as bactérias ácido lácticas foram consideradas resistentes a antibióticos como a estreptomicina, vancomicina, gentamicina e ciprofloxacina (Morandi et al. 2015; Cui et al. 2018; Margalho et al. 2020). Isolados do género *Leuconostoc* apresentaram resistências à vancomicina no estudo de Morandi et al. (2015) e a cefalosporinas, aminoglicosídeos e ácido nalidíxico num estudo relativo ao queijo tradicional do Pico de Domingos-Lopes et al. (2017). Já o género *Lactobacillus* é considerado intrinsecamente resistente a aminoglicosídeos (gentamicina, estreptomicina, canamicina), glicopeptidos (vancomicina) e quinolonas (ciprofloxacina) (Ruiz-Moyano et al. 2019; Margalho et al. 2020).

Como foi referido anteriormente, existe uma preocupação crescente relativamente ao género *Enterococcus*, por estes microrganismos estarem amplamente disseminados pelo meio ambiente, dada a sua adaptabilidade e resistência a condições ambientais adversas (Russo et al. 2018). Ao contrário de outras bactérias ácido lácticas, este género pode albergar várias resistências a antibióticos, transmissíveis a microrganismos patogénicos (Favaro et al. 2014).

As espécies de *Enterococcus* são intrinsecamente resistentes a penicilinas semissintéticas (concentrações reduzidas) (Torres et al. 2018; Dapkevicius et al. 2021), aminoglicosídeos (concentrações reduzidas), cefalosporinas, quinupristina e dalfopristina (Fuka et al. 2017; Dapkevicius et al. 2021), lincomicina (Fuka et al. 2017; Ruiz-Moyano et al. 2019), polimixinas (Torres et al. 2018; Ruiz-Moyano et al. 2019), clindamicina (Ruiz-Moyano et al. 2019; Dapkevicius et al. 2021) e vancomicina (*E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. flavescens*) (Torres et al. 2018). O facto de serem intrinsecamente resistente a vários antibióticos, resulta numa maior facilidade de se acumularem mutações e genes exógenos, o que lhes confere resistências adicionais (Russo et al. 2018). Segundo Domingos-Lopes et al. (2017) é de elevada preocupação a resistência de *Enterococcus* spp. à vancomicina uma vez que este antibiótico é utilizado para tratar infeções graves, em que o paciente

esteja em risco de vida. É também de salientar que as resistências adquiridas à eritromicina e tetraciclina já foram descritas no género *Enterococcus*, informação preocupante uma vez que estes antibióticos são utilizados para o tratamento de infeções agudas e crónicas (Morandi et al. 2015; Dapkevicius et al. 2021).

As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são consideradas a terceira e quarta espécie patogénica causadora de infeções associadas aos cuidados de saúde mais prevalentes em todo o mundo, sendo também as espécies mais frequentemente detetadas no intestino humano (Torres et al. 2018). Têm a capacidade de transferir genes de resistência a antibióticos para *Staphylococcus aureus* e *Listeria* spp. no trato intestinal humano ou animal, ambiente e nos alimentos (Russo et al. 2018).

Num estudo realizado por Valenzuela et al. (2009) a alimentos artesanais de origem animal, os resultados revelaram isolados resistentes à rifampicina, ciprofloxacina e levofloxacina, para estas duas espécies. Observaram ainda resistência à tetraciclina e eritromicina, para *E. faecalis*.

Noutro estudo, realizado por Soares-Santos et al. (2015), foram recolhidas 89 amostras de alimentos e superfícies de processamento de alimentos de uma fábrica de queijos, matadouro de suínos e de um hipermercado. Destas amostras foram isolados 132 *Enterococcus*, todos foram considerados resistentes à sulfametoxazol-trimetoprima, 58% resistentes à quinupristina-dalfopristina, 55% à tetraciclina, 38% à rifampicina, 31% à eritromicina, 7% à estreptomicina, 6% à penicilina, 4% ao cloranfenicol e 4% à vancomicina. Estes resultados destacam a importância da necessidade de redes de vigilância eficazes, para evitar a disseminação de microrganismos potencialmente patogénicos ao longo da cadeia alimentar.

Pelo que foi dito anteriormente, o aumento do número de bactérias multirresistentes é um problema da atualidade, constituindo uma questão de saúde pública (Van Duin and Paterson 2016). Sem a existência de novos procedimentos contra bactérias multirresistentes, várias áreas da medicina ficam comprometidas, como o tratamento do cancro, transplantes e outros procedimentos cirúrgicos (Worthington and Melander 2013; Van Duin and Paterson 2016). Segundo Van Duin and Paterson (2016) para diminuir a resistência bacteriana aos antibióticos, seria ideal a remoção dos antibióticos da cadeia alimentar, o tratamento eficaz de águas residuais contaminadas (como as geradas por fábricas farmacêuticas e instalações médicas) e a limitação do uso empírico, frequentemente desnecessário, de antibióticos.

3. Objetivos do estudo

Os queijos tradicionais portugueses são parte importante do património cultural nacional, vários dos quais reconhecidos com a certificação de Denominação de Origem Protegida (DOP). Apesar da microbiota autóctone destes produtos ser responsável pelas suas características organoléticas, existem poucos estudos que analisem em detalhe estes microrganismos. Deste modo, o presente estudo incidiu sobre os microrganismos presentes em dois queijos tradicionais DOP – Azeitão e Nisa.

Entre os anos de 2016 e 2019 foram recolhidas amostras de cinco queijarias de Azeitão e duas Nisa, incluindo todos os produtores certificados das regiões em estudo. Esses produtos foram anteriormente analisados quanto à composição e diversidade microbiana por várias alunas de mestrado (Batista 2017; Baptista 2018; Rocha 2019; Eusébio 2020).

No seguimento dos estudos anteriores, o principal objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial tecnológico e probiótico de bactérias ácido lácticas –BAL– isoladas de queijos de Azeitão e Nisa (microrganismos criteriosamente selecionados, com base nos resultados prévios). Com o intuito de verificar o potencial tecnológico das BAL, foram cumpridas uma série de etapas, que permitiram reduzir o número de isolados em estudo, com o objetivo de selecionar apenas os mais promissores. Assim, começou por se avaliar o potencial antimicrobiano, seguido pela verificação da produção de protease e lipase, análise da capacidade de acidificação do leite, multiplicação a diferentes temperaturas, valores de pH e concentrações de NaCl. Para os isolados mais promissores foi avaliado o potencial de patogenicidade, nomeadamente avaliação das atividades hemolítica e gelatinolítica e resistência a antibióticos. Ainda foi realizada caracterização do perfil enzimático e avaliação do potencial probiótico.

4. Materiais e métodos

4.1. Isolamento de bactérias ácido lácticas

Entre os anos de 2016 e 2019 foram recolhidas amostras de queijos DOP portugueses, produzidos em cinco queijarias de Azeitão e duas de Nisa.

O isolamento de bactérias ácido lácticas decorreu de acordo com o procedimento a seguir descrito: adicionaram-se 25 g de queijo a 225 ml de solução de Ringer (Oxoid, Reino Unido) num saco de *stomacher*, sendo a mistura homogeneizada por 90 s (ISO 6887-5, 2020) num Stomacher Lab Blender 400. Foi necessário que a recolha de 25 g de queijo incluísse casca e interior, de modo que a amostra fosse representativa do produto em estudo. O preparado obtido após homogeneização corresponde à suspensão 10^{-1} , tendo servido de base para a preparação de diluições decimais seriadas, realizadas de acordo com a ISO 6887-5, 2020.

As diluições foram inoculadas em três meios de cultura diferentes: Slanetz Bartley agar - SBA (Scharlau, Espanha), Man Rogosa and Sharpe- MRS (Pronadisa, Espanha) e M17 (Oxoid, Reino Unido), utilizando o método de espalhamento à superfície. A ficha técnica para o meio SBA foi acedida em Scharlab (2021), a ficha técnica do meio MRS acedida em Condalab (2021) e a ficha técnica do M17 acedida em Oxoid (2021). Na Tabela 1 estão expressas as condições necessárias para multiplicação dos microrganismos em estudo.

Nota: Apesar de *Enterococcus* spp. e *Lactococcus* spp. serem géneros pertencentes às bactérias ácido lácticas, será feita uma distinção ao longo dos materiais e métodos e resultados, relacionada com os meios de cultura utilizados no isolamento bacteriano a partir das amostras de queijo. Portanto, para as bactérias isoladas de meio MRS, vai ser utilizada a designação de “bactérias ácido lácticas”, enquanto os microrganismos provenientes de SBA serão nomeados *Enterococcus* spp. e os recolhidos de meio M17, *Lactococcus* spp..

Tabela 1 - Meios de cultura e detalhes de incubação para cada microrganismo.

Microrganismos	Meios de cultura	Temperatura e período de incubação	Características das colónias	Atmosfera
Bactérias ácido lácticas	Man Rogosa and Sharpe (MRS)	30 °C / 72 h	0,5-2 mm; cor bege claro	Anaerobiose (Genbox anaer, BioMérieux, França)
<i>Enterococcus</i> spp.	Slanetz Bartley agar (SBA)	37 °C / 48 h	Aproximadamente 1 mm; cor vermelho escuro	Aerobiose
<i>Lactococcus</i> spp.	M17	30 °C / 72 h	1-2 mm; cor branca;	Microaerofilia (Genbox anaer, BioMérieux, França)

Após incubação e multiplicação microbiana, procedeu-se à contagem de unidades formadoras de colónias (UFC) por grama de queijo, contabilizando para cada um dos meios de cultura apenas as placas de Petri que continham entre 15 e 150 colónias (Roberts and Greenwood, 2003). Logo que reunidos os dados necessários foi aplicada a fórmula que se segue: $UFC / g = \text{número de colónias} \times \frac{1}{\text{diluição}} \times \frac{1}{\text{volume do inóculo}}$ (Nota: a fórmula deve ser aplicada a duas diluições sucessivas contáveis e, após os valores obtidos, ser realizada a média.)

De seguida, selecionou-se para cada um dos meios de cultura, a placa de Petri com o maior número contável de colónias e ~20% dessas (selecionadas aleatoriamente) foram repicadas para placas quadradas (120x120mm) contendo o mesmo meio, exceto para *Enterococcus* spp. em que o meio utilizado foi Brain Heart Infusion (BHI) agar (Sharlau, Espanha). As temperaturas e períodos de incubação continuaram a ser os acima mencionados.

Adicionalmente, de modo a garantir a conservação dos isolados de interesse por períodos de tempo mais longos, procedeu-se à inoculação de cada microrganismo num *eppendorf* contendo o respetivo meio agarizado (conservação a 4 °C). Também, num criotubo, ressuspendeu-se cada cultura microbiana em 750 µl de APT (Scharlau, Espanha), seguindo-se da adição de 750 µl de glicerol (Scharlau, Espanha) a 40% (conservação a -80 °C). De seguida, à placa de Petri utilizada para seleção e repicagem das colónias, adicionaram-se 500 µl de solução de Ringer (Oxoid, Reino Unido), de modo a suspender todas as células bacterianas existentes. Por fim, retiraram-se 500 µl dessa suspensão bacteriana e adicionaram-se a um criotubo com 500 µl de glicerol a 40%, com o intuito de conservar as suspensões bacterianas a -80 °C.

4.2. Avaliação do potencial antimicrobiano

Os isolados selecionados com base em estudos anteriores (ver Tabela 2) foram testados quanto à sua atividade antimicrobiana sobre as bactérias indicadoras: *Listeria monocytogenes* CECT 935 (CECT-Colección Española de Cultivos Tipo), *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Bacillus cereus* ATCC25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442 e *Escherichia coli* ATCC25922 (ATCC-American Type Culture Collection).

Tabela 2 - Coleção de microrganismos isolados de queijos DOP de Azeitão e Nisa.

Microrganismos	Ano	Queijo de Azeitão					Queijo de Nisa		Total isolados
		A1	A2	A3	A4	A5	N9	N10	
Bactérias ácido lácticas	2016	5	4	5	5	6	5	5	35
	2017	3	-	2	-	5	2	3	15
<i>Enterococcus</i> spp.	2016	7	2	5	4	4	4	6	32
	2017	7	3	5	4	3	4	5	31
	2019	9	5	6	9	-	2	3	34
<i>Lactococcus</i> spp.	2016	4	3	5	2	4	4	3	25
	2017	6	6	2	3	4	3	3	27
	2018	2	-	-	2	-	-	-	4
									203

Coleção de microrganismos isolados em 2016 por Batista (2017), em 2017 por Baptista (2018), em 2018 por Rocha (2019) e em 2019 por Eusébio (2020).

A avaliação do potencial antimicrobiano decorreu tendo por base os estudos de Çadirci e Çitak (2005), Rao e Rao (2016) e Touret et al. (2018). Procedeu-se à inoculação por picada (Ensaio 1) e riscado de 1,5 cm (Ensaio 2) dos microrganismos de interesse em meio sólido (MRS, BHI ou M17; dependendo do isolado) e incubação nas condições anteriormente descritas. Adicionalmente, os isolados em estudo foram inoculados em meio líquido (MRS, BHI ou M17) e incubados durante a noite. Após esse período, gotas de 20 µl de cada cultura (Ensaio 3) foram inoculadas em meio sólido (MRS, BHI ou M17), seguida de incubação nas condições anteriormente descritas.

Em paralelo, foram preparadas suspensões bacterianas das estirpes indicadoras, de acordo com o procedimento a seguir descrito: começou por se inocular o microrganismo em 5 ml de BHI líquido, seguindo-se incubação a 37 °C durante a noite. Após esse período, realizou-se uma diluição 1:10 da cultura e foi efetuada leitura da densidade ótica a 600 nm (Ultrospec 2000 Pharmacia Biotech, Suécia), de modo a ajustá-las ao padrão 0,5 McFarland, aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml (Dalynn Biologicals, 2021). Através da leitura de densidade ótica foi calculada a quantidade de UFC/ ml da cultura, sabendo que o valor 1 de densidade ótica corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Após obtenção do valor de UFC por ml, realizou-se o cálculo para saber quantos ml devem ser retirados da cultura original, sabendo que a concentração final pretendida é de 5×10^9 UFC. Assim, a quantidade necessária de suspensão bacteriana foi recolhida para um microtubo e centrifugada durante 15 min, a 14.000 rpm (Hermle Z233 M-2, Alemanha). O sobrenadante foi deprezado e o pellet ressuspendido em 100 µl de solução de Ringer (Oxoid, Reino Unido) com o auxílio de vortex (Labnet VX-200, Estados Unidos), para garantir a homogeneização total.

Nota: Todas as suspensões bacterianas preparadas ao longo do trabalho (independentemente de corresponderem a isolados ou estirpes indicadoras), foram realizadas como acima descrito, variando apenas o meio de cultura e condições de incubação.

De seguida, a suspensão bacteriana foi adicionada a um tubo de ensaio contendo 15 ml de BHI com 0,7% agar (Sharlau, Espanha) que esteve previamente reservado num banho (Mettler W350, Alemanha) a 50 °C. Após agitação ligeira no vortex, o meio de cultura com a bactéria indicadora foi vertido sobre as placas de Petri em que inocularam os isolados de interesse (potenciais produtores) em picada (ensaio 1), em riscado (ensaio 2) e em gota (ensaio 3). Assim que a sobrecamada solidificou, a placa foi colocada a incubar a 37 °C durante a noite. Considerou-se que o isolado possuía potencial antimicrobiano, sempre que se observaram halos de inibição, impedindo a multiplicação da bactéria indicadora em redor do microrganismo em estudo. O diâmetro dos halos foi registado (em mm), para posterior comparação.

4.3. Avaliação do potencial tecnológico

4.3.1. Multiplicação em diferentes condições

A capacidade de multiplicação a diferentes temperaturas, 4, 10, 20, e 37 °C, foi avaliada tendo por base a metodologia descrita de Leroi et al. (2012). As BAL foram inoculadas em MRS agar, *Lactococcus* spp. em M17 agar e *Enterococcus* spp. em BHI agar. Durante os sete dias de incubação as placas foram observadas diariamente, tendo

sido registados como positivos os isolados que apresentaram multiplicação visível a determinada temperatura, e negativos sempre que não se observou multiplicação.

Para avaliar a multiplicação a diferentes concentrações salinas, 1, 2,5 e 5% (p/v) NaCl (Merck, Alemanha), recorreu-se ao método descrito por Meng et al. (2018). Cada meio de cultura, BHI agar, M17 agar ou MRS agar, foi suplementado com as concentrações salinas anteriormente referidas. Após inoculação por riscado e incubação durante 48 h, a 30 °C para as BAL e *Lactococcus* spp. e 37 °C para *Enterococcus* spp., foram registados como positivos os isolados que apresentaram multiplicação visível a determinada concentração salina, e negativos os isolados em que não se observou multiplicação.

A capacidade de multiplicação em meios suplementados com 0,5% de bÍlis foi avaliada tendo por base a metodologia descrita por Argyri et al. (2013). Cada meio de cultura, BHI agar, M17 agar ou MRS agar, foi suplementado com 0,5% (p/v) bÍlis (Biokar Diagnostics, França). Após inoculação por riscado e incubação durante 48 h, a 30 °C para as BAL e *Lactococcus* spp. e 37 °C para os *Enterococcus* spp., foram registados como positivos para resistência à bÍlis os isolados com multiplicação visível, e negativos os isolados em que não se observou multiplicação.

A reprodutibilidade dos ensaios em placa foi avaliada pela realização de 10% de réplicas biológicas.

4.3.2. Capacidade de acidificação do leite

A capacidade de acidificação do leite foi determinada por inoculação dos isolados de interesse em 1 ml de leite de ovelha (fornecido pelas queijarias), metodologia adaptada de Fuka et al. (2017). Posteriormente, procedeu-se à incubação durante 24 h a 30 °C para as BAL e *Lactococcus* spp. e a 37 °C para *Enterococcus* spp.. Após 2, 6 e 24 h de incubação foi registado o valor de pH utilizando tiras indicadoras. A reprodutibilidade dos ensaios foi avaliada pela realização de 10% de réplicas biológicas.

4.3.3. Produção de lipase e protease

A produção de lipase foi avaliada utilizando o meio de cultura *Spirit Blue Agar* (Difco, Estados Unidos) suplementado com substrato de lipase (Difco, Estados Unidos), metodologia adaptada de Câmara et al. (2019). O meio, inoculado por picada, foi incubado durante 48 h a 30 °C para as BAL e *Lactococcus* spp. e a 37 °C para *Enterococcus* spp.. O teste foi considerado positivo sempre que se observaram halos transparentes à volta das colónias, correspondentes à degradação dos lípidos presentes no meio de cultura.

A produção de protease foi avaliada após inoculação em meio de cultura preparado com 20 g de *skim milk* (PanReac AppliChem, Alemanha), 4 g de agar (Scharlau, Espanha) e 200 ml de água destilada, metodologia adaptada de Carlos et al. (2009) e Dias et al.

(2019). O meio, inoculado por picada, foi incubado durante 48 h a 30 °C para as BAL e *Lactococcus* spp. e a 37 °C para *Enterococcus* spp.. O teste foi considerado positivo sempre que se detetaram halos transparentes à volta das colónias.

A reprodutibilidade dos ensaios foi avaliada pela realização de 10% de réplicas biológicas.

4.4. Avaliação do potencial patogénico

4.4.1. Atividade hemolítica e gelatinolítica

A atividade hemolítica foi avaliada através da inoculação dos isolados de interesse em placas de Columbia agar suplementado com 5% de sangue de cavalo (Frilabo, Portugal), metodologia adaptada de Touret et al. (2018). As placas inoculadas por riscado foram incubadas durante 72 h a 30 °C para as BAL e *Lactococcus* spp. e a 37 °C para *Enterococcus* spp.. Os isolados rodeados por um halo transparente foram classificados como β -hemolíticos (lise total dos eritrócitos), os rodeados por um halo verde classificados como α -hemolíticos (lise parcial dos eritrócitos) e os isolados sem halo foram classificados como γ -hemolítico (não ocorre lise).

A atividade gelatinolítica foi avaliada através da inoculação dos isolados de interesse em meio de cultura preparado com 2,5 g de peptona (Difco, Estados Unidos), 1,5 g de extrato de levedura (Scharlau, Espanha), 15 g de gelatina (Oxoid, Reino Unido), 10 g de agar (Scharlau, Espanha) e 500 ml de água destilada, metodologia adaptada de Domingos-Lopes et al. (2017). Os isolados foram incubados durante 48 h a 30 °C para as BAL e *Lactococcus* spp. e a 37 °C para os *Enterococcus* spp.. Após o período de incubação foi adicionada uma solução saturada de sulfato de amónio, de forma a cobrir a superfície do meio, por 1 h à temperatura ambiente e 15 minutos a temperatura de refrigeração. Os isolados rodeados de um halo transparente foram considerados gelatinolíticos.

A reprodutibilidade dos ensaios em placa foi avaliada por realização de 10% de réplicas biológicas.

4.4.2. Resistência a antibióticos

A técnica da difusão em disco foi utilizada para avaliar a resistência aos antibióticos (CLSI, 2016). As BAL foram incubadas em meio MRS agar, *Lactococcus* spp. em meio M17 agar e *Enterococcus* spp. em BHI agar. Cada cultura bacteriana, proveniente de placas incubadas durante a noite, foi adicionada a 500 μ l de Ringer (Oxoid, Reino Unido) e ajustada ao padrão 0,5 McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml). De seguida a suspensão bacteriana foi inoculada numa placa de Petri quadrada (meio de cultura adequado para cada tipo de microrganismo) com o auxílio de um espalhador. Posteriormente foram distribuídos os discos de antibióticos, (Liofilchem, Itália) devidamente

separados para facilitar a visualização e medição dos halos. As placas foram incubadas a 37 °C para *Enterococcus* spp. e a 30 °C para BAL e *Lactococcus* spp. durante 24 h. Após incubação, foram medidos os diâmetros dos halos (mm) e interpretados de acordo com os critérios definidos por *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2021) para *Enterococcus* spp. e interpretados de acordo com Charteris et al. (1998) e Touret et al. (2018) para *Lactococcus* spp. e BAL. Todos os antibióticos utilizados, a concentração correspondente, a classe e alvo são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentração (µg), classe e alvo dos antibióticos utilizados no ensaio de difusão em disco.

Antibiótico	BAL	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	Classe	Alvo
Teicoplanina	-	30	-	Glicopéptidos	Síntese da Parede Celular
Vancomicina	30	30	30		
Amoxicilina / Ácido clavulânico	-	30	-	Penicilinas	
Ampicilina	10	10	10	Tetraciclinas	
Tetraciclina	30	30	30		
Ciprofloxacina	-	5	-	Quinolonas	Síntese de DNA
Levofloxacina	-	5	-		
Canamicina	30	-	30	Aminoglicosídeos	Síntese Proteica
Estreptomina	10	300	10		
Gentamicina	10	120	10		
Cloranfenicol	30	30	30	Cloranfenicol	
Quinupristina/ Dalfoprostina	-	15	-	Estreptograminas	
Clindamicina	2	-	2	Lincosamides	
Eritromicina	15	15	15	Macrólidos	
Linezolide	-	30	-	Oxazolidinonas	

4.5. Avaliação do potencial probiótico

4.5.1. Multiplicação a diferentes valores de pH

A capacidade de multiplicação a pH 2, 7 e 8,5 foi avaliada em ensaios, utilizando microplacas de 96 poços (VWR, Estados Unidos), metodologia adaptada de Touret et al. (2018). Utilizaram-se os meios líquidos MRS, BHI e M17 ajustados aos diferentes valores de pH. Para esse ajuste utilizou-se NaOH ou HCl até obtenção dos valores pretendidos. Para inoculação das microplacas utilizaram-se 2 µl de suspensão bacteriana, preparada como previamente descrito (ver 4.2.), que foi adicionada a 198 µl de meio de cultura (MRS, BHI ou M17; ajustados a pH 2, 7 ou 8,5). Estes ensaios ocorreram em triplicado e as microplacas foram incubadas durante 48 h a 37 °C. Após 24 e 48 h de incubação foi registrada leitura de densidade óptica a 620 nm, utilizando um leitor de microplacas (Tecan Sunrise, Suíça) e o *software* XFLUOR4.

4.5.2. Atividade enzimática

A capacidade de produzir diferentes enzimas, foi avaliada utilizando galerias API ZYM (BioMérieux, França), de acordo com as instruções do fabricante. Com este método é possível estudar rápida e simultaneamente a produção 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. O registo dos resultados foi realizado seguindo as indicações do fabricante.

4.6. Métodos moleculares

4.6.1. Identificação ao nível de género e espécie

O DNA de cada isolado foi extraído tendo por base o método da fervura (Millar et al. 2000). Deste modo, com auxílio de um palito estéril, foi retirada parte da colónia de interesse para um *ependorf* contendo 50 μ l de tampão Tris-EDTA com Tris-HCl 10mM e EDTA 1mM (Sigma-Aldrich, Reino Unido) e *Tween* 20 a 0,1% (v/v). De seguida, a amostra foi submetida à temperatura de 100 °C durante 10 min, seguida de choque térmico por colocação em gelo. Por fim, procedeu-se a centrifugação a 14000 rpm durante 5 min, numa centrífuga Hermle Z233 M-2 (Hermle, Alemanha) e o sobrenadante foi utilizado nas reações de PCR subsequentes.

A identificação ao nível de género e espécie foi avaliada por *PCR-multiplex* (ver Tabela 4). As estirpes de referência utilizadas como controlo foram *Enterococcus durans* QN10 (Coleção de *Enterococcus* spp., Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa), *Enterococcus faecalis* MMH594 (gentilmente cedida por Pascale Serror, Unitè des Bactéries Lactiques et Pathogènes Opportunistes, INRA, Jouy-en-Josas, França), *Enterococcus faecium* DSMZ 20477 (obtida de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemanha), *Lactococcus lactis* ATCC19435 (gentilmente cedida por Dragica Damjanovic, School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, Faculty of Science, UNSW Sydney, Kensington, Australia), *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* (gentilmente cedida por Dragica Damjanovic, School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, Faculty of Science, UNSW Sydney, Kensington, Australia), *Lactobacillus plantarum* CECT 220 (Colección Española de Cultivos Tipo), *Lactobacillus paracasei* Lb446R (gentilmente cedida por Luísa Brito, Coleção do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa), *Leuconostoc mesenteroides* CECT 219 (Colección Española de Cultivos Tipo) e *Leuconostoc citreum* CECT 4025 (Colección Española de Cultivos Tipo).

A mistura da reação para um volume total de 20 µl foi: 10 µl taq Master Mix 2X (taq DNA Polymerase, tampão com 5,5 mM MgCl₂ e dNTPs 400 µM de cada) (Bioron, Germany), 0,25 µl de cada *primer* (12,5 pmol) e 1 µl de DNA. Para amplificação foi utilizado um termociclador Doppio (VWR, Estados Unidos) e as condições de amplificação estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Detalhes acerca dos *primers* utilizados para a identificação ao nível de género e espécie para *Enterococcus* e identificação ao nível de género para *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*.

Alvo	Primers	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Tamanho do produto (pb)	Programa de PCR	Referência
<i>Enterococcus</i> spp.	Ent1	TACTGACAAACCATTCATGATG	112	DI: 95 °C 5min 35 ciclos 95 °C 1min A: 55 °C 1min E: 72 °C 1min EI: 72 °C 5min	Ke et al. (1999)
	Ent2	AACTTCGTCACCAACGCGAAC			
<i>E. durans</i>	DU1	GCAAGGCTTCTTAGAGA	295	DI: 95 °C 5min 35 ciclos 95 °C 1min	Jackson et al. (2004)
	DU2	CATCGTGTAAGCTAACTTC			
<i>E. faecalis</i>	FL1	ACTTATGTGACTAACTTAACC	360	A: 60 °C 1min E: 72 °C 1min	
	FL2	TAATGGTGAATCTTGGTTTGG			
<i>E. faecium</i>	FM1	GAAAAACAATAGAAGAATTAT	215	EI: 72 °C 10min	Corroler et al. (1999)
	FM2	TGCTTTTTTGAATTCTTCTTA			
<i>Lactococcus</i> spp.	His1	CTTCGTTATGATTTTACA	933	DI: 95 °C 5min 35 ciclos 95 °C 1min A: 45 °C 1min E: 72 °C 1min EI: 72 °C 5min	
	His2	CAATATCAACAATTCCAT			
<i>Lactobacillus</i> spp.	LbLMA1 -rev	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC	250	DI: 95 °C 5min 35 ciclos 95 °C 30s A: 55 °C 30s	Dubernet et al. (2002)
	R16-1	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA			
<i>Leuconostoc</i> spp.	LeucA	CAC TTT GTC TCC GAA GAG	613	E: 72 °C 1min EI: 72 °C 10min	Macián et al. (2004)
	LeucS	AAG CAC TGT TGT ATG GGA			

Legenda: DI – Desnaturação Inicial; A – *Anneling*; E - Extensão; EI – Elongamento.

Por fim, foi preparado o gel de agarose a 1% com tampão TBE 0,5X (40 mM de Tris-Cl, 45 mM de ácido bórico e 1 mM de EDTA). Na eletroforese foi utilizada uma mistura de 8 µl de produto de *PCR* com 1 µl de fluorocromo Gelstar10X (Lonza, Estados Unidos) e 1 µl de azul de bromofenol, realizando-se a separação dos amplicões a 90 V durante 50 min. O marcador utilizado foi NZYDNA Ladder VI (NZYTech, Portugal) e a visualização do gel foi feita com o ChemiDoc XRS+ e o *software* ImageLab (BIO-RAS, Estados Unidos).

4.6.2. Fatores de virulência

Após a extração de DNA (Millar et al. 2000), a presença de genes de virulência foi avaliada por *PCR-multiplex* (ver Tabela 5). A mistura da reação para um volume total de 20 µl foi: 10 µl taq Master Mix 2X (taq DNA Polymerase, tampão com 5,5 mM MgCl₂ e dNTPs 400 µM de cada) (Bioron, Germany), 0,25 µl de cada *primer* (12,5 pmol) e 1 µl de DNA.

Para amplificação foi utilizado um termociclador Doppio (VWE, Estados Unidos), em que foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min; seguindo-se de 35 ciclos a 95 °C durante 30 s; *annealing* a 55 °C durante 30 s; extensão a 72 °C durante 1 min e alongamento final a 72 °C durante 10 min.

Por fim, foi preparado o gel de agarose a 1% com tampão TBE 0,5X (40 mM de Tris-Cl, 45 mM de ácido bórico e 1 mM de EDTA). Na eletroforese foi utilizada uma mistura de 8 µl de produto de *PCR* com 1 µl de fluorocromo Gelstar10X (Lonza, Estados Unidos) e 1 µl de azul de bromofenol, realizando-se em tampão TBE 0,5X a 90 V durante 50 min. O marcador utilizado foi NZYDNA Ladder VI (NZYTech, Portugal) e a visualização do gel foi feita através do ChemiDoc XRS+ com o *software* ImageLab (BIO-RAS, Estados Unidos).

Tabela 5 - Detalhes acerca dos *primers* utilizados para a pesquisa de genes de virulência.

Fatores de Virulência	gene	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
Citolisina	<i>cylA</i>	TAGCGAGTTATATCGTTCACTGTA CTCACCTCTTTGTATTAAAGCATG	1282	Semedo et al. (2003)
Gelatinase	<i>gelE</i>	ACCCCGTATCATTGGTTT ACGCATTGCTTTTCCATC	419	Eaton e Gasson (2001)
Proteína de superfície de <i>Enterococcus</i>	<i>esp</i>	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	933	Eaton e Gasson (2001)
Substância de agregação	<i>agg</i>	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC AAACGGCAAGACAAGTAAATA	1553	Eaton e Gasson (2001)

Foi utilizada a estirpe QSE123 (Coleção de *Enterococcus* spp., Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa) como controlo positivo para os genes *agg*, *cylA*, *esp* e *gelE*.

4.6.3. Pesquisa de genes codificadores de bacteriocinas

Após extração de DNA (Millar et al. 2000), a presença de genes codificadores para diferentes bacteriocinas foi avaliada através de *PCR-multiplex* (ver Tabela 6). A mistura da reação para um volume total de 20 µl foi: 10 µl taq Master Mix 2X (taq DNA Polymerase, tampão com 5,5 mM MgCl₂ e dNTPs 400 µM de cada) (Bioron, Germany), 0,25 µl de cada *primer* (12,5 pmol) e 1 µl de DNA.

Para amplificação foi utilizado um termociclador Doppio (VWR, Estados Unidos), nas condições seguintes: desnaturação inicial a 95 °C durante 5 min; seguindo-se de 35 ciclos a 95 °C durante 1 min; *annealing* dependente do *primer* utilizado (consultar Tabela 6); extensão a 72 °C durante 1 min e alongamento final a 72 °C durante 5 min.

Tabela 6 - Detalhes acerca dos *primers* utilizados para pesquisa dos genes estruturais que codificam para diferentes bacteriocinas.

Enterocina Alvo	Primers	Sequência dos primers (5'-3')	Tamanho do produto (pb)	Anneling (°C)	Referência
A	EntA-F	TTAGGTGGAGCAATTCCAGG	294	55 °C 1 min	Pangallo et al. (2004)
	EntA-R	CCAGCAGTTCTTCCAATTTCA			
AS-48	AS48 -1	AATAAACTACATGGGT	377	48 °C 1 min	Martínez-Bueno et al. (1998)
	AS48-5	CCAAGCAATAACTGCTCTTT			
B	EntB-F	CGAAAGAGATGAAACAAATTATCG	151	60 °C 1 min	Pangallo et al. (2004)
	EntB-R	CATGCTAGTGGTCTTTTGGG			
EJ97	E21-4	GCAGCTAAGCTAACGACT	279	48 °C 1min	Sánchez-Hidalgo et al. (2003)
	E21-9	AGGGGAAGGGGAACAGA			
Enterolysin A	RH114	GGACTAGTGATCTTAATTAGGAGG GG	1086	60 °C 1 min	Hickey et al. (2004)
	RH115	CCCAAGCTTTGCATAATCCTACTGT C			
L50AB	Ent50A B-F	GGAGCAATCGCAAATTAGTAG	237	55 °C 1 min	Pangallo et al. (2004)
	Ent50A B-R	TGTCCAATAAATTGCATGATTTG			
P	EntP-F	GATGCAGCTACGCGTTCATA	206	55 °C 1 min	Pangallo et al. (2004)
	EntP-R	GGGTGGCTAATGCTGTTTCA			
Q	EntQ-F	GGAATAAGAGTAGTAGTGAATACT GATATGAGAC	653	60 °C 1 min	Cintas et al. (2000)
	EntQ-R	AAAGACTGCTCTTCCGAGCAGCC			
31	Ent31-F	TGTGGCATTATTGGGATTGG	448	55 °C 1 min	Pangallo et al. (2004)
	Ent31-R	TTTTTGGCCCTCTTTAGTCACA			
1071	1071-F	ATGAAGCAATATAAAGTATTGAATG	785	55 °C 1 min	Maldonado-Barragán et al. (2009)
	1071-R	TACTTAATTAAATAGTTCAGTACA			

Foram utilizadas as estirpes de referência L50 como controlo para Ent31, Ent50AB, EntB, EntQ e RH114 e RH115, 2771 controlo para 1071, EntA, EntP, EntB, EntQ e RH114 e RH115 e 2772 controlo para 1071, EntA e EntP. As estirpes de referência (L50, 2771 e 2772) foram gentilmente cedidas por Giorgio Giraffa, Agriculture Research Council, Research Centre for Fodder Crop and Dairy Productions (CRA-FLC), Lodi, Itália.

Por fim, foi preparado o gel de agarose a 1% com tampão TBE 0,5X (40 mM de Tris-Cl, 45 mM de ácido bórico e 1 mM de EDTA). Na eletroforese foi utilizada uma mistura de 8 µl de produto de PCR com 1 µl de fluorocromo Gelstar10X (Lonza, Estados Unidos) e 1 µl de azul de bromofenol, realizando-se em tampão TBE 0,5X a 90 V durante 50 min. O marcador utilizado foi NZYDNA Ladder VI (NZYTech, Portugal) e a visualização do gel foi feita com ChemiDoc XRS+ e o *software* ImageLab (BIO-RAS, Estados Unidos).

4.7. Tolerância a condições gastrointestinais e capacidade de auto-agregação e co-agregação

Para simular condições presentes no estômago e intestino, e avaliar a capacidade de auto-agregação e co-agregação, teve-se por base o estudo de Grujović et al. (2019). Durante 48 h BAL foram inoculadas em MRS líquido, *Lactococcus* spp. em M17 líquido e *Enterococcus* spp. em BHI líquido durante 24 h. Após o período de incubação, suspensões bacterianas foram ajustadas ao padrão 0,5 McFarland, como anteriormente descrito (4.2.).

De modo a simular as condições encontradas no estômago, foi preparada uma mistura com 0,5% NaCl (Merck, Alemanha) e 0,22% pepsina (Merck, Alemanha) em água destilada. O pH da solução foi ajustado a 2 com adição de HCl, que foi seguidamente esterilizada utilizando filtro para seringa com poro da membrana 0,2 µm (Membrane Solutions, Estados Unidos). Deste preparado, foram distribuídos por poços de microplacas 198 µl e adicionados 2 µl de suspensão bacteriana em cada poço. As microplacas foram incubadas durante 3 h a 37 °C, para simular o período de tempo que os alimentos permanecem em contacto com o suco gástrico no estômago. Por outro lado, para simular as condições do intestino delgado, foi preparada uma mistura com 0,5% NaCl (Merck, Alemanha), 0,2% pancreatina (U.S.P, The Wilson laboratories) e 0,4% bÍlis (Biokar Diagnostics, França) em água destilada. O pH foi ajustado a 8 com adição de NaOH e a esterilização realizada com filtro para seringa de poro 0,2 µm (Membrane Solutions, Estados Unidos). Deste preparado 198 µl foram distribuídos por poços de microplacas e adicionados 2 µl de suspensão bacteriana. As microplacas foram incubadas durante 4 h a 37 °C, para simular o período de tempo que os alimentos permanecem no intestino. Para ambos os ensaios acima descritos, a determinação do número de microrganismos viáveis, foi realizada retirando uma gota de 20 µl de cada poço, seguida de inoculação em meio de cultura sólido e incubação durante a noite. A percentagem de sobrevivência dos isolados nas condições simuladoras de estômago e intestino (TGI-trato gastrointestinal), foi calculada através da fórmula abaixo apresentada, em que UFC corresponde à contagem das unidades formadoras de colónias:

$$\% \text{ Sobrevivência} = \frac{\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} \text{ do isolado testado nas diferentes condições TGI}}{\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} \text{ do isolado testado em meio sem enzimas a } 37^{\circ}\text{C}}$$

Adicionalmente, para avaliar o potencial de colonização do trato gastrointestinal, analisou-se a capacidade de auto-agregação dos isolados. Aos poços que, previamente, continham 198 µl de tampão fosfato 0,1 M, adicionaram-se 2 µl de suspensão bacteriana. Seguiu-se incubação durante 24 h a 37 °C, sendo que foi registada leitura da densidade óptica a 620 nm utilizando um leitor de microplacas (Tecan Sunrise, Suíça) e *software* XFLUOR4 às 1, 2, 3, 4, 5 e 24 h de incubação. A percentagem de auto-agregação foi calculada através da fórmula apresentada abaixo, em que A_t corresponde à absorvância a

620 nm do inóculo depois da incubação e A_0 corresponde à absorvância do inóculo antes da incubação.

$$\% \text{ Agregação} = \frac{(A_0 - A_t)}{(A_0)} * 100 \text{ (Grujović et al. 2019)}$$

Para estimar o potencial de co-agregação dos isolados em estudo com *Escherichia coli* ATCC25922, aos poços que continham 196 µl de tampão fosfato 0,1 M e 2 µl de *Escherichia coli* (preparada como descrito em 4.2.), adicionaram-se 2 µl de suspensão bacteriana dos microrganismos em avaliação. Seguiu-se incubação durante 2 h a 37 °C, sendo que após este período de tempo foi registada leitura da densidade óptica a 620 nm em leitor de microplacas e *software* XFLUOR4. A percentagem de co-agregação foi calculada com a fórmula acima apresentada, em que A_t corresponde à absorvância a 620 nm do inóculo depois de incubação a 2 h e A_0 corresponde à absorvância do inóculo antes de incubação. Todos os ensaios foram realizados em triplicado.

5. Resultados e Discussão

O presente estudo, insere-se num projeto que se iniciou em 2016. Desde esse ano têm vindo a ser estudados queijos de Azeitão e Nisa com DOP, provenientes de diferentes queijarias: as amostras de queijo de Azeitão pertencem a cinco queijarias (A1-A5) e as amostras de queijo de Nisa a duas (N9 e N10). O estudo iniciou-se pela caracterização físico-química e microbiológica das amostras recolhidas em 2016 (Batista 2017), seguindo-se o estudo e comparação da diversidade microbiana dos queijos de 2016 e 2017 (Baptista 2018). Posteriormente, foi feita a comparação da diversidade microbiológica ao longo do tempo (queijos de 2016, 2017 e 2018) e, também, a avaliação do potencial patogénico desses isolados (Rocha 2019). No estudo seguinte, foi feita a comparação dos isolados anteriores com microrganismos recolhidos em 2019, tendo sido aprofundada a análise do potencial de patogenicidade de *Enterococcus* spp. (Eusébio 2020).

Assim sendo, desde 2016 foram isolados um total de 203 microrganismos (para detalhes consultar a Tabela 2 do ponto 4.2.): 50 bactérias ácido lácticas, 97 *Enterococcus* spp. e 56 *Lactococcus* spp. A partir desta coleção de microrganismos, o presente estudo teve como intuito avaliar o potencial tecnológico e probiótico de bactérias ácido lácticas, isoladas de queijos de Azeitão e Nisa DOP.

5.1. Avaliação do potencial antimicrobiano

O método *spot on lawn* (por picada, identificado no “Material e Métodos” como ensaio 4.2.) foi realizado aos 203 isolados em estudo, utilizando como indicadora *Listeria monocytogenes*. Segundo Çadirci e Çitak (2005), esta metodologia é simples e adequada para pesquisa de atividade antimicrobiana, uma vez que a formação de halo significa que

o isolado inibe a multiplicação da bactéria indicadora. *Listeria monocytogenes* foi a indicadora escolhida, por ser uma bactéria patogénica Gram-positiva de origem alimentar, capaz de multiplicar entre 1 – 45 °C, tolera altos níveis de concentração salina e baixos valores de pH (Ribeiro et al. 2014). Sendo responsável por causar infeções, surtos de origem alimentar e, por vezes, a morte. Os grupos de risco (grávidas, recém-nascidos, indivíduos imunodeprimidos e idosos) são os mais afetados (Margarho et al. 2020).

Dos 203 isolados submetidos a esta metodologia, 50 BAL (100%), 74 *Enterococcus* spp. (76%) e 30 *Lactococcus* spp. (54%), ou seja, 76% dos isolados, apresentaram atividade antimicrobiana sobre *L. monocytogenes* (consultar Tabela 11 do Anexo 1). Estes resultados vão de encontro ao estudo realizado por Ahmadova et al. (2013), onde foi demonstrada forte atividade inibitória de *Enterococcus faecium* sobre *L. monocytogenes*, sendo a maioria das estirpes testadas inibida. Por outro lado, o estudo de Sant'Anna et al. (2017) e Margarho et al. (2020) em queijos artesanais do Brasil, mostrou que vários isolados pertencentes às BAL apresentaram elevado potencial antimicrobiano sobre *L. monocytogenes*. Ainda, um estudo (Dias et al. 2019) debruçado, sobre *Lactococcus lactis* e *Enterococcus faecalis*, provenientes de leite de ovelha, mostraram inibição sobre *L. monocytogenes*.

Com base nos resultados de inibição, procedeu-se à seleção dos isolados a utilizar nos estudos subsequentes. Como critério de seleção, teve-se em consideração os isolados que apresentaram maior halo de inibição sobre a bactéria indicadora. Para além disso, procurámos manter a diversidade da amostra, ou seja, foram escolhidos isolados de diferentes anos e origens (regiões e queijarias). Portanto, foram eliminados 160 isolados: as BAL foram reduzidas de 50 para 12, enterococos de 97 para 20 e lactococos de 56 para 11. Na Tabela 7 estão representados os diâmetros dos halos de inibição obtidos para os isolados selecionados para os estudos seguintes.

Tabela 7 – Diâmetro dos halos de inibição (mm) sobre *Listeria monocytogenes*, pelo método spot on lawn.

BAL				<i>Enterococcus</i> spp.						<i>Lactococcus</i> spp.			
2016	H	2017	H	2016	H	2017	H	2019	H	2016	H	2017	H
A1.3	7	A1.7	13	A1.40	4,5	A1.6	4,5	A1.9	10	A1.47	11	N9.14	5
A2.7	6	A3.8	15	A2.48	4	A2.17	4,5	A2.20	12	A2.60	6,5	N10.29	4
A3.14	5	A5.23	13	A3.34	4,5	A3.9	7	A3.2	8	A3.6	6,5		
A4.44	6	N9.4	15	A4.19	5	A4.6	6	A4.16	5	A4.60	5	2018	H
A5.19	8	N10.11	20	A5.17	4	A5.18	6	N9.1	3	A5.31	8	A1.11	4
N9.16	9			N9.25	5	N9.10	8	N10.14	4	N9.48	7,5	A4.10	5
N10.15	17			N10.46	6	N10.27	7			N10.56	6,5		

Legenda: H – Halo em milímetros.

Os resultados mostram que BAL apresentaram maiores halos de inibição (5 – 20 mm) sobre *L. monocytogenes*, comparativamente aos halos produzidos por *Enterococcus* spp. (3 – 12 mm) e *Lactococcus* spp. (4 – 11 mm). Nas BAL os isolados de 2017 exibiram halos maiores, comparativamente aos de 2016, sendo N10.11.2017 o isolado que produziu maior halo, dos 43 em estudo. Já nos enterococos, os isolados de 2017 e 2019 exibiram halos de dimensão superior, comparativamente aos de 2016, sendo N9.1.2019 o isolado que produziu menor halo. Os lactococos de 2016 foram os que exibiram halos de maior dimensão.

Face aos resultados obtidos, os isolados referidos revelaram possuir atividade antimicrobiana sobre *L. monocytogenes*, um indício importante, uma vez que poderão contribuir para excluir ou inibir competitivamente esta bactéria patogénica de origem alimentar. No entanto, a natureza desse efeito não ficou completamente esclarecida. Está descrito que as BAL podem produzir diferentes compostos antimicrobianos nomeadamente, ácidos orgânicos (lático, acético, fórmico), peróxido de hidrogénio, diacetil e bacteriocinas (Ahmadova et al. 2013). Deste modo, teriam de ser realizados mais estudos para aferir qual a natureza do composto responsável pelo efeito observado. De qualquer forma, o facto de os isolados possuírem capacidade de inibir uma bactéria patogénica é um resultado relevante, uma vez que microrganismos com esta característica, quando presentes nos alimentos que consumimos, contribuem para a segurança dos mesmos.

5.2. Avaliação do potencial tecnológico

Os 43 isolados mais promissores (Tabela 7), foram seguidamente avaliados quanto à capacidade de multiplicação em diferentes condições, acidificação do leite e verificação da produção de lipase e protease. Estes ensaios foram realizados em paralelo e visaram a caracterização do potencial tecnológico dos isolados.

5.2.1. Multiplicação em diferentes condições

Os isolados foram submetidos, durante sete dias, às seguintes temperaturas: 4 °C para representar a temperatura de refrigeração; 10 °C representando uma das temperaturas utilizadas na indústria alimentar; 20 °C como temperatura ambiente e 37 °C a temperatura corporal humana. A maioria dos isolados conseguiram multiplicar-se às diferentes temperaturas testadas. No entanto, os isolados presentes na Tabela 8, não conseguiram multiplicar-se em pelo menos uma das condições avaliadas.

Tabela 8 – Isolados que não se multiplicaram a pelo menos uma das temperaturas testadas.

	Isolado	Temperatura a que não multiplicou
BAL	A1.3.2016	4 °C
	A2.7.2016	4 °C
	A5.23.2017	4 °C
	N10.11.2017	4 °C
<i>Lactococcus</i> spp.	A2.60.2016	4 °C, 10 °C, 20 °C e 37 °C
	A4.60.2016	4 °C, 10 °C, 20 °C e 37 °C
	N10.56.2016	4 °C, 10 °C, 20 °C e 37 °C

Analisando os resultados obtidos: as BAL que não se multiplicaram a 4 °C não serão, provavelmente, viáveis quando o produto alimentar for colocado em refrigeração. Situação distinta do que ocorreu com lactococos, que não se multiplicaram a nenhuma das temperaturas. Este resultado ambíguo estará provavelmente relacionado com problemas associados às culturas utilizadas, por exemplo perda de viabilidade ao longo do tempo, uma vez que era expectável observar multiplicação a 20 e 37 °C (temperaturas próximas das suas condições ótimas de multiplicação (Ray 2001)).

Quanto à avaliação da capacidade de multiplicação em diferentes condições salinas, um dos motivos da utilização de cloreto de sódio na indústria alimentar, deriva da capacidade de este melhorar as características sensoriais dos produtos alimentares. Para além disso, é amplamente utilizado como conservante nos queijos e é importante durante o período de cura. Assim, é fundamental que as BAL sejam tolerantes às concentrações salinas exigidas durante o fabrico do queijo, nomeadamente durante o período de cura (Meng et al. 2018). Posto isto, para avaliar a viabilidade dos isolados quando submetidos a condições salinas similares às dos queijos, foram observados os rótulos dos queijos DOP de Azeitão e Nisa, e os isolados foram submetidos a concentrações de NaCl equivalentes: 1% e 2,5%, tendo sido definido o valor de 5% NaCl como extremo. À semelhança dos resultados anteriores, os mesmos lactococos também não se multiplicaram a nenhuma das diferentes concentrações salinas, reforçando a ideia de que, provavelmente, a ausência de multiplicação está relacionada com o processo de repicagem/manutenção, e não com as condições a que foram submetidos. Para além destes isolados, N10.11.2017 (BAL) não se multiplicou à concentração de 5%. Os 39 isolados restantes, multiplicaram-se em todas as concentrações de NaCl testadas. Num estudo (Ribeiro et al. 2014), BAL foram consideradas resistentes a diferentes concentrações salinas (2, 6 e 8%). Noutro estudo, de Meng et al. (2018), dirigido a queijos artesanais de cabra, todas as BAL revelaram capacidade de multiplicação a 2% NaCl e 80% dos isolados revelaram capacidade de se multiplicar a 6% NaCl.

Relativamente à multiplicação na presença de bÍlis, este composto desempenha um papel fundamental no mecanismo de defesa do intestino, sendo que a magnitude dessa defesa depende da concentração de sais biliare (Argyri et al. 2013). Assim, a capacidade

de resistência à bÍlis é uma característica importante dos microrganismos, pois permite-lhes sobreviver e exercer a sua ação no trato gastrointestinal. Por este motivo, os isolados foram submetidos a um meio com 0,5% bÍlis, sendo os resultados similares aos anteriores. Os lactococos anteriormente referidos também não se multiplicaram na presença de bÍlis, bem como A5.19.2016 (BAL). Os restantes 39 isolados multiplicaram-se nas condições testadas.

5.2.2. Capacidade de acidificação do leite

No processo de fabrico do queijo é essencial uma rápida diminuição do pH do leite, uma vez que é essencial para a coagulação e para o controlo de microrganismos indesejáveis (Ribeiro et al. 2014; Dias et al. 2019). Segundo Beresford et al. (2001), as bactérias *starter* podem ser definidas como microrganismos que devem ser capazes de reduzir o pH do leite para valores abaixo de 5,3 em 6 h a 30-37 °C. No presente estudo o pH do leite de ovelha foi verificado antes da inoculação (pH=7) e como se constata pela Figura 4, todos os isolados conseguiram acidificar o leite. Pelo gráfico entende-se que às 2 h, 12 BAL e 11 lactococos não acidificaram o leite e 20 enterococos acidificaram o leite para pH 6. Às 6 h, quatro BAL não acidificaram o leite e oito BAL, 20 enterococos e 11 lactococos, acidificaram o leite para pH 6. Às 24 h, três enterococos e cinco lactococos, acidificaram o leite para pH 6 e 12 BAL, 17 enterococos e seis lactococos, acidificaram o leite para pH 5.

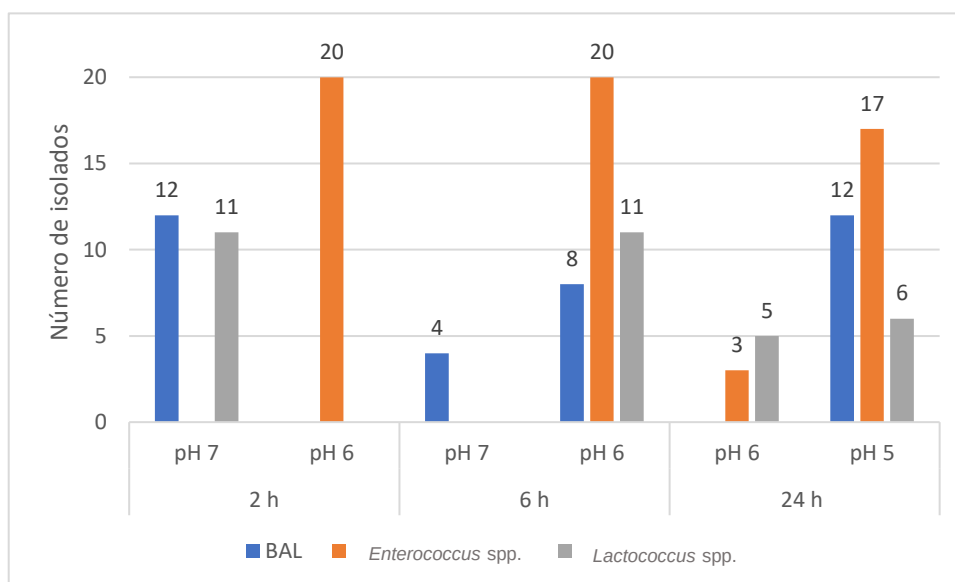


Figura 4 – Número de isolados que mantiveram ou alteraram o pH do leite de ovelha às 2 h, 6 h e 24 h.

BAL e lactococos, foram os únicos que ao fim de 2 h de incubação não acidificaram o leite. No entanto, após 6 h de incubação, a maioria das BAL acidificaram o leite e nas 24 h de incubação, esta acidificação fez o pH do leite baixar para 5. Relativamente aos

lactococos após 6 h de incubação, todos acidificaram o leite e depois de 24 h de incubação a maioria dos isolados, reduziram o pH do leite para 5. Por oposição, enterococos acidificaram o leite ao fim de 2 h de incubação, sendo que nos períodos de incubação seguintes o pH foi sempre diminuindo (exceto para 3 isolados que após 24 h mantiveram pH=6). Assim, verificámos que enterococos acidificaram mais rapidamente o leite comparativamente a BAL e lactococos, resultados distintos dos relatados em alguns estudos anteriores. Fuka et al. (2017), verificou que enterococos possuem baixa capacidade de produção de ácido, sendo que a maioria só consegue reduzir o pH do leite em apenas 0,4-0,8 unidades. Ainda Perin et al. (2017), a partir de isolados de leite cru de cabra, indica uma maior redução do pH em lactococos, comparativamente a enterococos, apresentando elevados perfis de acidificação, entre 4,90 e 5,73, após 6 h. Nenhum dos isolados do presente estudo foi capaz de reduzir o pH do leite para valores abaixo de 5,3 em 6 h, resultados distintos dos relatados por Ribeiro et al. (2014) e Dias et al. (2019). Assim, segundo o conceito de Beresford et al. (2001) (bactérias *starter* devem ser capazes de reduzir o pH do leite para <5,3 em 6 h a 30–37 °C), os isolados deste estudo não podem ser considerados bons *starter*. No entanto, poderão ser promissores como bactérias não *starter*, ou seja, contribuir para o desenvolvimento do sabor e aroma do queijo, durante o processo de cura.

5.2.3. Produção de lipase e protease

A capacidade lipolítica e proteolítica, propriedades tecnológicas relevantes para o desenvolvimento do queijo, desempenham um importante papel na cura, no desenvolvimento da textura e *flavour* (Domingos-Lopes et al. 2017; Fuka et al. 2017). Para avaliação da capacidade lipolítica dos microrganismos em estudo foi utilizado o meio de cultura *Spirit Blue Agar* suplementado com substrato de lipase e na avaliação da capacidade proteolítica foi utilizado um meio de cultura preparado com *skim milk*. Os resultados foram considerados positivos quando detetados halos transparentes à volta das colónias. No teste da lipólise os halos correspondem à degradação dos lípidos presentes no meio de cultura, enquanto na proteólise os halos derivam da capacidade de degradar a caseína, proteína maioritária do leite. Deste modo, 6% (14/43) dos isolados exibiram capacidade lipolítica: quatro BAL (N9.16.2016; N10.15.2016; A1.7.2017; N9.4.2017), sete enterococos (A1.6.2017; A2.17.2017; A3.9.2017; A5.18.2017; A1.9.2019; A2.20.2019; A3.2.2019) e três lactococos (A2.60.2016; A1.11.2018, A4.10.2018). Os isolados apresentaram fraca capacidade lipolítica o que, de certo modo, pode ser vantajoso durante o fabrico de queijo. Durante um longo período de cura, a produção de ácidos gordos livres (precursores de compostos aromáticos voláteis), pode levar a uma lipólise excessiva, criando um sabor amargo e rançoso no queijo (Meng et al. 2018). McSweeney and Sousa (2000) também referem a baixa capacidade lipolítica das BAL analisadas. Ainda no estudo

de Ozturkoglu-Budak et al. (2016), *Lactobacillus* spp., *Enterococcus faecium* e *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, provenientes de um queijo artesanal de leite de ovelha cru, apresentaram baixa atividade lipolítica. Entre os principais géneros de BAL, o género *Enterococcus* é o que mais contribui para a lipólise do queijo (Domingos-Lopes et al. 2017), sendo que os presentes resultados sugerem isso mesmo.

Relativamente à actividade proteolítica, 65% (28/43) dos isolados exibiram essa capacidade. Cinco BAL mostraram atividade proteolítica (N9.16.2016; N10.15.2016; A1.7.2017; N9.4.2017; N10.11.2017) e todos os enterococos foram positivos para este teste, destacando-se A3.2.2019 com halo de 14 mm e A4.16.2019 com halo de 13 mm. Nos lactococos apenas três (A1.47.2016; N9.14.2017; A4.10.2018) exibiram atividade proteolítica. A degradação da caseína, para além de contribuir para o *flavour* e textura do queijo, pode levar à acumulação de péptidos bioativos com potenciais benefícios para a saúde (Dapkevicius et al. 2021). A capacidade proteolítica observada no presente estudo está de acordo com relatos anteriores: Meng et al. (2018), em que 60% das estirpes (*Lactobacillus* spp.) isoladas de queijo de cabra artesanal, apresentaram capacidade proteolítica e Dias et al. (2019), em que todas as estirpes (*Lactococcus lactis* e *Enterococcus faecalis*) isoladas de leite de ovelha apresentaram capacidade proteolítica.

Tendo em conta os resultados discutidos no ponto 5.2., estes indicam que a maioria dos isolados poderão ter potencial tecnológico. De 43 isolados, 36 multiplicaram-se nas várias temperaturas testadas e 39 nas diferentes concentrações salinas, todos foram capazes de acidificar o leite de ovelha, a maioria revelou capacidade proteolítica e, alguns, lipolítica. Estas características são relevantes, nomeadamente se forem utilizados como culturas não *starter* para a produção de queijo. Apesar de ser completamente interdita a adição de culturas em queijos tradicionais com certificado DOP, o mesmo não acontece para queijos sem esse selo. Assim, poderia ser bastante vantajosa a aplicação deste tipo de cultura numa queijaria que produza queijos sem certificação, pois poderá contribuir para a uniformização das características do queijo em termos organoléticos, tanto ao longo do ano, como de ano para ano, ou seja, evitando as variações sazonais.

Para os testes subsequentes foram mantidos os 43 isolados anteriormente selecionados, visto não terem sido reunidas informações suficientes para poder excluir alguns. Por este motivo, avançou-se para a avaliação do potencial patogénico.

5.3. Avaliação do potencial patogénico

Com o objetivo de avaliar o potencial de patogenicidade dos isolados em estudo, foram avaliadas a capacidade hemolítica e gelatinolítica, assim como a sua resistência aos antibióticos. Todos estes ensaios foram realizados em paralelo.

5.3.1. Atividade hemolítica e gelatinolítica

Os microrganismos foram testados quanto à sua atividade hemolítica, utilizando placas de Columbia agar suplementado com 5% de sangue de cavalo. Os isolados rodeados por um halo transparente foram classificados como β -hemolíticos (lise total dos eritrócitos), os rodeados por um halo verde classificados como α -hemolíticos (lise parcial dos eritrócitos) e os que não apresentaram halo foram classificados como γ -hemolítico (não ocorre lise). Mais uma vez, os lactococos referidos na Tabela 8, não mostraram qualquer multiplicação, por isso optámos por excluí-los dos ensaios. Dos restantes isolados, 7% (3/43) mostraram atividade β -hemolítica, 79% (34/43) α -hemolítica e 7% (3/43) λ -hemolítica. Os β -hemolíticos pertencem aos géneros *Enterococcus* (A4.16.2019 e N9.1.2019) e *Lactococcus* (N9.48.2016). Deste modo, os microrganismos em estudo, revelaram baixa atividade β -hemolítica, tal como no estudo de Suzzi et al. (2000) e Semedo et al. (2003). É importante frisar que, uma vez que as hemolisinas provocam a lise dos eritrócitos, podendo aumentar a severidade de infeção (Dapkevicius et al. 2021) os isolados β -hemolíticos não são considerados seguros na indústria alimentar.

A avaliação da atividade gelatinolítica foi realizada com recurso a um meio de cultura preparado com peptona, extrato de levedura e gelatina. Os isolados rodeados de um halo transparente foram considerados gelatinolíticos. Apenas 7% (3/43) dos microrganismos em estudo apresentaram esta actividade, sendo todos do género *Enterococcus*: A1.9.2019 (halo de 10 mm); A3.2.2019 (halo de 10 mm); A4.16.2019 (halo de 20 mm). A baixa atividade gelatinolítica está de acordo com os estudos de Semedo et al. (2013) e Ribeiro et al. (2014). O primeiro foi realizado com isolados de leite e queijo de ovelha, 19% dos quais (todos enterococos) produziram gelatinase. O segundo foi realizado com microrganismos recolhidos de queijo do Pico, um *Lactococcus lactis* e três *Enterococcus faecalis* apresentaram resultados positivos para a produção de gelatinase. Uma vez que os isolados com capacidade gelatinolítica observados no presente estudo, pertencem ao género *Enterococcus*, os resultados devem ser abordados em dois sentidos. Primeiramente, se os isolados conseguem utilizar a gelatina presente no meio, isso significa que estarão mais capacitados para utilizar a proteína presente no leite (matéria-prima do queijo), sendo este facto visto como uma importante característica tecnológica. Porém, a gelatinase desempenha um papel importante no processo infeccioso, uma vez que está envolvida na hidrólise de várias moléculas-alvo, incluindo gelatina, colagénio, caseína, insulina, elastina e hemoglobina, substratos presentes nos tecidos humanos e animais (Soares-Santos et al. 2015). Em resumo, para melhor aferirmos a patogenicidade dos microrganismos em estudo, a análise dos membros do género *Enterococcus* deverá incluir a pesquisa de outros fatores de virulência e a avaliação da resistência a antibióticos.

5.3.2. Resistência a antibióticos

Nos dias de hoje, a resistência aos antibióticos é uma grande preocupação na medicina, sendo a cadeia alimentar uma das principais vias de disseminação (Morandi et al. 2015). No presente estudo foi necessário começar por decidir quais os *breakpoints* a utilizar para classificação dos isolados em estudo como resistentes, ou suscetíveis, a um determinado antibiótico. Ao pesquisar acerca de resistência das BAL a antibióticos, deparámo-nos com a quase inexistência de *breakpoints* estabelecidos na literatura. Uma vez que não há consenso quanto aos *breakpoints* a serem aplicados para os géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus*, foram utilizados como base os critérios estabelecidos por Charteris et al. (1998) e Touret et al. (2018). O mesmo não acontece para o género *Enterococcus*, cujos *breakpoints* estão claramente definidos em diferentes organizações, nomeadamente *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2016) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2021). Todavia, existem algumas discrepâncias entre os critérios definidos por estas duas entidades. A título de exemplo: segundo EUCAST um enterococos é considerado resistente à teicoplanina quando o halo de inibição é inferior a 16 mm, enquanto para CLSI, o halo de inibição a considerar deve ser igual ou inferior a 10 mm, valores estes que são consideravelmente diferentes. Uma vez que Portugal está inserido na Comunidade Europeia, os critérios EUCAST serão os mais apropriados para interpretação de isolados recolhidos de alimentos produzidos em Portugal, no entanto, esta organização não possui *breakpoints* para todos os antibióticos usados no estudo (ex: cloranfenicol, eritromicina, linezolid e tetraciclina). Por este motivo, durante o presente estudo ambas as organizações foram utilizadas para análise de dados.

Os resultados da resistência a antibióticos estão apresentados na Tabela 9, e no Anexo 2 está disponibilizada a Tabela 12 com informação complementar. De imediato, verifica-se que os isolados demonstraram resistência a pelo menos um dos antibióticos em estudo, à exceção dos enterococos A4.6.2017 e N10.27.2017, que não apresentaram fenótipo de resistência. Por outro lado, de todos os isolados em análise, dois enterococos (A5.17.2016 e A1.9.2019) foram considerados multirresistentes; resistência a pelo menos um antibiótico de três classes distintas, com alvos celulares diferentes (Magiorakos et al. 2012). Este tipo de resistência em microrganismos alimentares pode ser preocupante para os consumidores, especialmente para aqueles com sistema imunológico debilitado. Em seguida serão analisadas as resistências mais frequentemente observadas.

Tabela 9 – Fenótipo de resistência observado nos isolados em estudo.

Fenótipo de resistência		
BAL	2016	A1.3 C - CN - K - S - TE
		A2.7 DA - S - TE
		A3.14 CN - S - TE
		A4.44 CN - DA - S - TE
		A5.19 CN - DA - S - TE
		N9.16 C - K - S - VA
		N10.15 C - CN - K - S - VA
	2017	A1.7 AMP - C - K - VA
		A3.8 K - VA
		A5.23 AMP - CN - K - S - VA
		N9.4 K - S - VA
Enterococcus spp.	2016	A1.40 QD - TE
		A2.48 QD - S - TE
		A3.34 QD - S - TE
		A4.19 CIP - QD - TE
		A5.17 C - LEV - QD - TE
		N9.25 C - CN - LZD - QD - S - TE - TEC - VA
		N10.46 QD - TE
	2017	A1.6 QD
		A2.17 QD - S - TE
		A3.9 QD - S - TEC - VA
		A4.6 -
		A5.18 C - E - QD - S - TE - TEC - VA
		N9.10 TE
		N10.27 -
	2019	A1.9 AUG - C - CIP - E - QD - S - TE - TEC - VA
		A2.20 QD - S - TE - TEC - VA
		A3.2 QD - S - TE - TEC - VA
		A4.16 QD - S - TEC
		N9.1 C - E - QD - S - TE - TEC
		N10.14 AMP - LZD - QD
Lactococcus spp.	2016	A1.47 AMP - C - CN - DA - E - K - S
		A3.6 DA - E - K - S
		A5.31 AMP - C - CN - DA - E - K - S - TE - VA
		N9.48 C - DA - E - K - S
	2017	N9.14 CN - DA - E - K - S
		N10.29 C - E - S
	2018	A1.11 DA - VA
		A4.10 K - VA

Legenda: AMP – ampicilina; AUG - amoxicilina/ácido clavulânico; C – cloranfenicol; CIP – ciprofloxacina; CN – Gentamicina; DA – clindamicina; E – eritromicina; K – canamicina; LEV – Levofloxacina; LZD – Linezolid; QD - Quinupristina/ Dalfoprostina; S – estreptomicina; TE – Tetraciclina; TEC – teicoplanina; VA – vancomicina; VERDE – isolados considerados resistentes segundo Charteris et al. (1998); VERMELHO - isolados considerados resistentes segundo CLSI (2016); AZUL - isolados considerados resistentes segundo EUCAST

(2021); LARANJA – isolados considerados resistentes segundo Touret et al. (2018); PRETO - isolados considerados resistentes segundo EUCAST (2021) e CLSI (2016) para enterococos e segundo Charteris et al. (1998) e Touret et al. (2018) para BAL e lactococos.

A análise do perfil de resistência das BAL demonstrou que 81% dos isolados são resistentes à estreptomicina, 63% resistentes à canamicina, 54% resistentes à gentamicina e vancomicina e 45% resistentes à tetraciclina. Em alguns estudos realizados com microrganismos recolhidos de queijos tradicionais (Morandi et al. 2015; Cui et al. 2018; Margalho et al. 2020), BAL foram consideradas resistentes a estreptomicina, gentamicina e vancomicina, sendo os presentes resultados concordantes com esses relatos. Segundo Ruiz-Moyano et al. (2019), o género *Lactobacillus* é intrinsecamente resistente aos aminoglicosídeos (gentamicina, estreptomicina, canamicina), podendo esta ser uma explicação para as percentagens de resistência observadas no presente estudo. A resistência à tetraciclina é mais preocupante, uma vez que os genes de resistência estão localizados em elementos genéticos móveis, aumentando o potencial de transferência horizontal (Comunian et al. 2010). Este tipo de transferência permite que as bactérias troquem genes de resistência a antibióticos de forma eficiente, podendo constituir uma ameaça à saúde pública (Dapkevicius et al. 2021).

Relativamente a enterococos, 85% dos isolados são resistentes à quinupristina-dalfopristina, 70% à tetraciclina, 55% à estreptomicina, 40% à teicoplanina e 30% à vancomicina. Relatos prévios indicam que as espécies de *Enterococcus* são intrinsecamente resistentes à quinupristina-dalfopristina (Fuka et al. 2017; Dapkevicius et al. 2021), no entanto os resultados obtidos não estão de acordo com essa generalização, assim como os estudos de Soares-Santos et al. (2015) e Rocha et al. (2021). Apesar da elevada percentagem de resistência observada, 15% dos isolados revelaram suscetibilidade a esse antibiótico, provavelmente devido a uma mutação no gene *lsa*, uma vez que uma mutação nesse gene culmina num fenótipo suscetível (Soares-Santos et al. 2015). Mais de metade dos isolados foram considerados resistentes à tetraciclina, resistência considerada adquirida neste género de bactérias, tal como nos estudos de Pimentel et al. (2007), Soares-Santos et al. (2015), Câmara et al. (2020) e Rocha et al. (2021). A resistência fenotípica à estreptomicina, também foi detetada noutros estudos (Morandi et al. 2015; Soares-Santos et al. 2015). A resistência à classe dos glicopéptidos (teicoplanina e vancomicina) é preocupante, uma vez que antibióticos desta classe são utilizados em medicina para tratamento de infeções graves (Domingos-Lopes et al. 2017). Sendo, porém, de salientar que os isolados foram considerados resistentes à teicoplanina pelos *breakpoints* estabelecidos pelo EUCAST e não pelo CLSI. Isto reforça a problemática de existirem diferentes organizações para interpretação de resultados, pois enquanto para o EUCAST alguns dos isolados são resistentes, de acordo com o CLSI não são. Por este

motivo, é de extrema importância que sejam estabelecidos critérios de forma mais harmoniosa.

A resistência adquirida à vancomicina é de grande preocupação, uma vez que faz parte da lista de medicamentos essenciais, publicada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo de extrema importância a prevenção da disseminação deste tipo de resistências (Dapkevicius et al. 2021). No entanto, para além de no presente estudo terem sido detetados enterococos resistentes à vancomicina, outros estudos (Pimentel et al. 2007; Soares-Santos et al. 2015; Câmara et al. 2020) também detetaram alguns isolados com esta característica.

Por fim, lactococos revelaram 75% de resistência à clindamicina, eritromicina, canamicina e estreptomicina e 50% de resistência ao cloranfenicol. Como mencionado anteriormente, as bactérias ácido lácticas são consideradas resistentes à estreptomicina (Morandi et al. 2015; Cui et al. 2018), logo não é surpreendente a elevada percentagem de isolados resistentes a este antibiótico. Já para os antibióticos clindamicina e eritromicina, as percentagens de resistência foram elevadas, ao contrário do estudo de Sant'Anna et al. (2017) em que todos os isolados foram considerados sensíveis a estes antibióticos. A resistência à eritromicina é preocupante porque, tal como a tetraciclina, os genes de resistência estão localizados em elementos genéticos móveis, aumentando o potencial de transferência horizontal (Comunian et al. 2010).

Após os ensaios realizados com enfoque no potencial patogénico, foram analisados os resultados dos diversos ensaios, de modo a selecionar os isolados a utilizar nos testes subsequentes. Para além da análise criteriosa dos resultados obtidos (consultar Tabela 13 do Anexo 3), teve-se sempre em consideração a manutenção da diversidade da amostra, ou seja, perante os resultados, tentou-se prosseguir com isolados provenientes de diferentes anos e origens. A título de exemplo, no caso das BAL do ano 2016, foram excluídos cinco isolados com resistência à tetraciclina, pois é uma resistência preocupante neste grupo de bactérias, restando apenas dois isolados. Entre os dois restantes, foi selecionado o que produziu maior halo de inibição na avaliação do potencial antimicrobiano. Relativamente ao ano de 2017, começou-se por excluir o N10.11.2017 que apresentou problemas de multiplicação, sendo o A5.23.2017 excluído por não apresentar capacidade lipolítica nem proteolítica. O mesmo tipo de raciocínio foi seguido para enterococos e lactococos, mas o número de isolados selecionados para o género *Enterococcus* foi maior, pois o número inicial de isolados também era superior.

Posto isto, dos 43 isolados submetidos aos vários ensaios acima descritos, foram eliminados 28, ou seja, os ensaios subsequentes foram aplicados a 15 isolados: quatro BAL (N10.15.2016; A1.7.2017; A3.8.2017; N9.4.2017), oito enterococos (A1.40.2016;

A2.48.2016; A3.34.2016; A2.17.2017; N9.10.2017; N10.27.2017; A2.20.2019; A3.2.2019) e três lactococos (A1.47.2016; N9.14.2017; A4.10.2018).

5.4. Avaliação do potencial probiótico

Com o objetivo de avaliar o potencial probiótico dos isolados, foi realizado um ensaio para avaliar a capacidade de multiplicação dos microrganismos a diferentes valores de pH e o potencial antimicrobiano sobre diversos microrganismos patogênicos.

5.4.1. Multiplicação a diferentes valores de pH

Um dos desafios que os probióticos enfrentam, é a sua capacidade de resistir a diferentes valores de pH. Durante a passagem pelo trato gastrointestinal do hospedeiro, um probiótico terá de ser capaz de resistir ao pH da cavidade oral ($\text{pH} \approx 7$), do estômago ($\text{pH} \approx 2$) e do intestino ($\text{pH} \approx 8,5$), para que os seus benefícios ocorram no hospedeiro (Cruz et al. 2009). Por esse motivo, foi testada a capacidade de multiplicação dos isolados a diferentes valores de pH, recorrendo a ensaios em microplacas de 96 poços e leitura da densidade ótica a 620 nm. Existe uma proporcionalidade entre o valor da densidade ótica e a multiplicação microbiana, isto é, quanto mais elevado o valor de densidade ótica, maior a multiplicação microbiana (Fox et al. 2016). Na Figura 5, está representada para cada BAL, a multiplicação observada nas diferentes condições a 24 e 48 h. Verificámos que em todos os isolados, a multiplicação a pH 2 foi mais baixa do que a pH 8,5. A pH 7 a multiplicação de N10.15.2016 e A1.7.2017 foi evidente, quando comparada com pH 2. Por oposição, em A3.8.2017 e N9.4.2017, a multiplicação a pH 2 e 7 foi similar. Observámos ainda, que a maioria dos isolados teve maior multiplicação a pH 8,5 às 48 h.

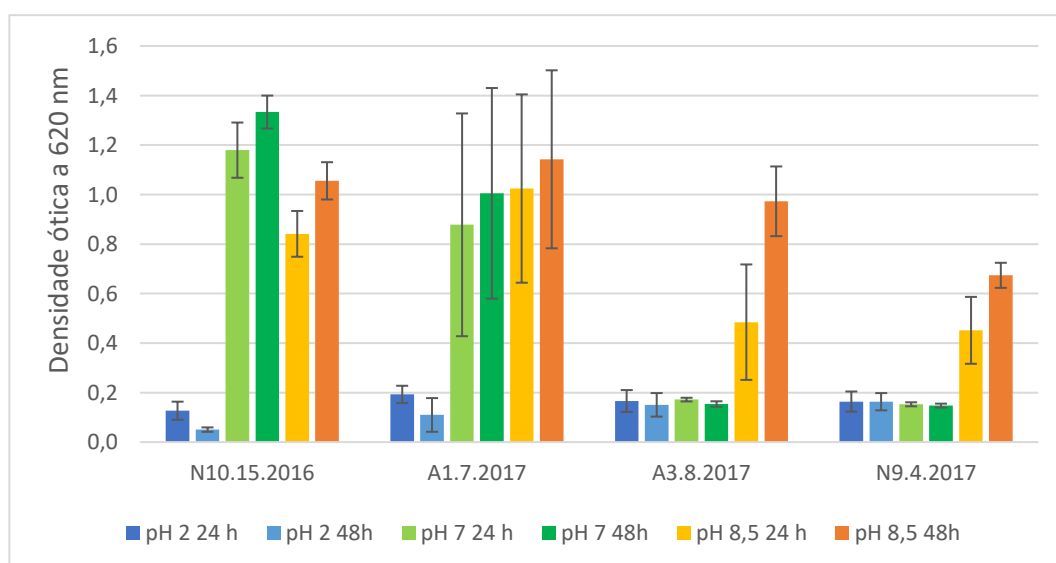


Figura 5 – Multiplicação das BAL a diferentes valores de pH (2; 7; 8,5) durante 24 e 48 h.

Na Figura 6, está representada para cada enterococos, a multiplicação nos diferentes valores de pH a cada 24 e 48 h. Verificámos que todos os isolados tiveram comportamento similar. Em todos, a multiplicação a pH 2 foi mais baixa do que a pH 8,5, tal como nas BAL. A pH 7 a maioria dos isolados teve uma maior multiplicação nas 24 h do que nas 48 h. Em todos os isolados, exceto A3.2.2019, verificou-se que a pH 8,5 às 24 h, ocorreu a multiplicação mais elevada.

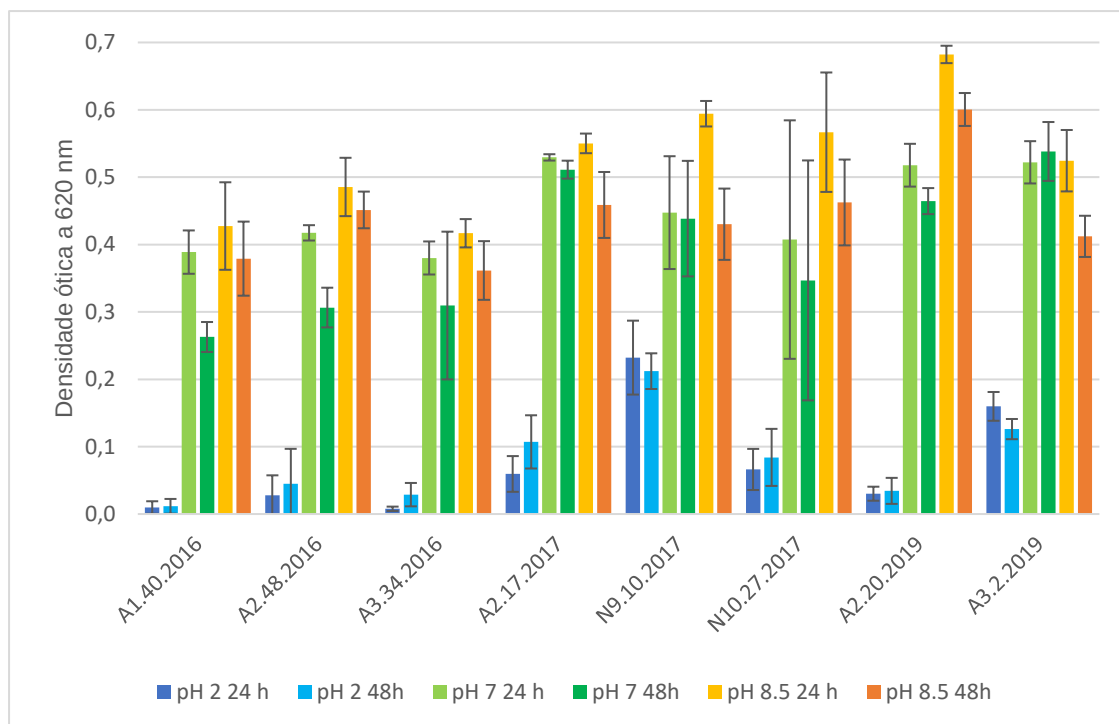


Figura 6 – Multiplicação dos *Enterococcus* spp. a diferentes valores de pH (2; 7; 8,5) durante 24 e 48 h.

Na Figura 7, está representada a multiplicação dos lactococos nos diferentes valores de pH, a cada 24 e 48 h. Os isolados A1.47.2016 e N9.14.2017, tiveram um comportamento bastante similar. A pH 2, os isolados tiveram mais dificuldades de multiplicação e a pH 7 e 8,5 observou-se maior multiplicação, sendo os valores de densidade ótica muito equivalentes. Comparativamente aos anteriores, A4.10.2018 revelou menor capacidade de multiplicação a todos os valores de pH.

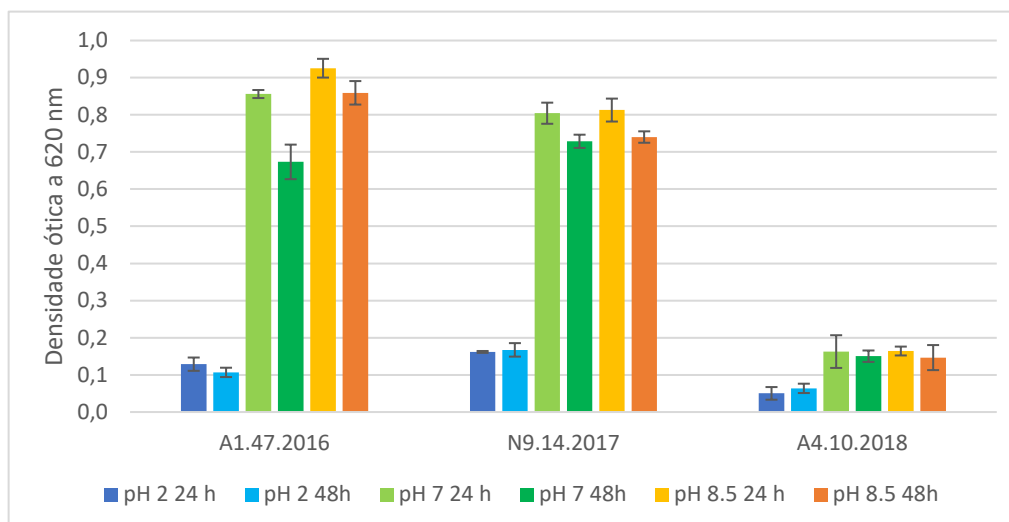


Figura 7 – Multiplicação dos *Lactococcus* spp. a diferentes valores de pH (2; 7; 8,5) durante 24 e 48 h.

O estudo de Favaro et al. (2014) está de acordo com os resultados obtidos. Nesse estudo, os isolados mostraram menor multiplicação a pH ácido, comparativamente a pH 7, 8 e 9, onde a multiplicação foi maior. Por outro lado, todos os isolados do presente estudo, conseguiram multiplicar-se a pH 2, ao contrário do estudo de Margalho et al. (2021), que observou que apenas 41,8% das BAL eram resistentes a baixos valores de pH.

Posto isto, os isolados que avançaram para os estudos seguintes, foram os que mostraram uma maior capacidade de multiplicação em todas as condições testadas, pois na seleção de probióticos é importante que os isolados tolerem as diferentes condições (ácidas, neutras e básicas) durante o percurso pelo trato-gastrointestinal. Assim sendo, dos 15 isolados, foram eliminados sete, tendo sido selecionados oito para os ensaios seguintes: três BAL (N10.15.2016; A1.7.2017; A3.8.2017), três enterococos (A2.17.2017; N9.10.2017; A3.2.2019) e dois lactococos (A1.47.2016; N9.14.2017).

5.4.2. Atividade antimicrobiana

Após uma redução significativa dos isolados em estudo, com base nos resultados anteriormente descritos, optou-se por repetir o método *spot on lawn*, alargando o lote de indicadoras. No entanto, para além do ensaio realizado com picada (ensaio 1), foram realizados, em paralelo, ensaios com riscado de 1,5 cm (ensaio 2) e com gota de 20 µl (ensaio 3), tal como descrito no ponto 4.2.

Foram utilizadas como indicadoras, duas bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis*) e duas bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*). *Bacillus cereus* é capaz de se multiplicar em vários alimentos (arroz, vegetais, produtos láteos, carne), tolerando temperaturas entre 4–50 °C, pH entre 4,5-9,3 e concentração salina abaixo de 10%, tendo capacidade para formar esporos

termorresistentes. *Enterococcus faecalis* é encontrada no trato gastrointestinal de humanos e outros animais, solo, alimentos fermentados, sendo capaz de multiplicar entre 10–45 °C, vasta gama de valores de pH e elevadas concentrações salinas. *Escherichia coli* é encontrada em vários alimentos (carne, peixe, produtos láteos, vegetais, água), possuindo capacidade de multiplicação entre 10–50 °C, pH ótimo entre 6-7 e concentração salina entre 6.5-8,5% (Ray 2001). Por fim, *Pseudomonas aeruginosa* é amplamente encontrada no meio ambiente, água, leite e produtos láteos, temperatura ótima de multiplicação 37 °C, pH mínimo para multiplicação de ~5,6 e é responsável por diversas doenças e manifestações clínicas (Ray 2001; Raposo et al. 2017).

Na Tabela 10 estão apresentados os diâmetros dos halos de inibição obtidos e na Figura 12 do Anexo 4 está exibido um exemplo de halos de inibição obtidos por picada, riscado e gota. Verifica-se que as BAL, inibiram todas as bactérias indicadoras. O mesmo não aconteceu para enterococos e lactococos. Dois enterococos, A2.17.2017 e A3.2.2019, não mostraram qualquer atividade inibitória sobre *B. cereus*, e nenhum enterococos, inibiu *E. coli*. O gênero *Lactococcus* foi o grupo com menor capacidade de inibição das bactérias patogênicas analisadas, nomeadamente *E. faecalis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Tabela 10 - Diâmetro dos halos de inibição (mm) de BAL, *Enterococcus* spp. e *Lactococcus* spp. sobre as bactérias indicadoras.

		BAL			<i>Enterococcus</i> spp.			<i>Lactococcus</i> spp.	
		2016		2017	2017		2019	2016	2017
		N10.15	A1.7	A3.8	A2.17	N9.10	A3.2	A1.47	N9.14
<i>B. cereus</i>	P	8	23	26	0	10	0	5	7
	R	16	29	37	0	11	0	9	11
	G	24	35	57	0	13	0	10	11
<i>E. faecalis</i>	P	10	18	20	4	5	9	0	0
	R	12	15	32	5	8	13	0	0
	G	12	21	23	7	11	16	0	0
<i>E. coli</i>	P	4	10	18	0	0	0	0	0
	R	8	19	20	0	0	0	0	0
	G	17	30	25	0	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	P	8	21	30	4	8	9	0	0
	R	8	11	30	15	10	7	0	0
	G	10	13	27	11	9	14	0	0

Legenda: Halos em milímetros. *B.cereus* – *Bacillus cereus*; *E.faecalis* – *Enterococcus faecalis* ; *E.coli* – *Escherichia coli*; *P.aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*. P – Picada; R – Riscado; G- Gota. A sombreado estão os isolados que não foram capazes de inibir o microrganismo patogênico.

O estudo de Sant'Anna et al. (2017) está de acordo com os resultados obtidos para as BAL. Vários isolados deste grupo, provenientes de um queijo do Brasil, foram submetidos a diferentes indicadores patogénicos, entre os quais, *E. coli* e *E. faecalis*, exibindo halos de inibição. Noutro estudo (Dias et al. 2019), foram avaliados *E. faecalis* e *Lactococcus lactis*, proveniente de leite de ovelha, com as indicadoras *E. coli* e *P. aeruginosa*. Todos os isolados foram capazes de inibir *E. coli*, porém o mesmo não aconteceu com *P. aeruginosa*. Comparando com os resultados obtidos no presente estudo, enterococos e lactococos não inibiram *E. coli* e *P. aeruginosa* não foi inibida por lactococos. Por fim, num estudo realizado por Favaro et al. (2014) foi avaliada a capacidade de enterococos inibirem, entre outras bactérias patogénicas, *E. faecalis* e *E. coli*. Os resultados foram similares aos obtidos no presente estudo: *E. faecalis* foi inibido por enterococos, que não foram capazes de inibir *E. coli*.

A análise da Tabela 10 permitiu ainda verificar que, na maioria dos isolados, o diâmetro do halo de inibição foi maior quando o ensaio foi realizado com gota, seguindo-se o ensaio realizado em riscado e, por fim, com picada. A título de exemplo, N10.15.2016 (BAL), perante *Bacillus cereus*, apresentou um halo de inibição de 8 mm no ensaio com picada, 16 mm no ensaio com riscado e 24 mm no ensaio com gota. Uma possível explicação para este acontecimento, está relacionada com a quantidade de células que constituem o inóculo. Por outras palavras, no ensaio com picada, a quantidade de células corresponde à “ponta do palito”, já no riscado a quantidade de células foi espalhada ao longo de 1,5 cm e no ensaio com gota, o inóculo foi colocado a multiplicar *overnight*, fazendo com que o número inicial de microrganismos tenha aumentado substancialmente.

Face os presentes resultados, BAL, enterococos e lactococos, mostraram comportamento distinto quando expostos a diferentes microrganismos patogénicos. Os isolados mais promissores foram as BAL, pois exibiram um largo espetro de inibição sobre bactérias patogénicas Gram-positivas e Gram-negativas. O facto de um isolado revelar características inibitórias perante uma estirpe patogénica, indica que poderá ter capacidade de controlar a proliferação de microrganismos indesejáveis no alimento (Ribeiro et al. 2016). Pela mesma lógica os lactococos foram os menos promissores, uma vez que só inibiram *B. cereus*. Na perspetiva da indústria alimentar, o facto de isolados possuírem a capacidade de inibir diferentes microrganismos patogénicos é bastante relevante, pois significa que podem contribuir para a segurança microbiológica do produto final (Dias et al. 2019).

5.5. Atividade enzimática

A atividade enzimática deve ser abordada em dois sentidos. Primeiramente, as enzimas pepsina, pancreatina e hidrolase de sais biliares são fundamentais durante o processo digestivo (Derrien and Van Hylckama Vlieg 2015). A pepsina, comparativamente à pancreatina e hidrolase de sais biliares, atua em primeiro lugar sobre os alimentos (Derrien and Van Hylckama Vlieg 2015). Caso estes carreguem estirpes probióticas, as mesmas terão de ser capazes de sobreviver à pepsina para serem conduzidas até ao intestino. Nesse órgão, a pancreatina e a hidrolase de sais biliares atuam, sendo que estirpes probióticas devem resistir-lhes, de modo a conseguirem colonizar o intestino do hospedeiro e permitir que os efeitos benéficos ocorram (Derrien and Van Hylckama Vlieg 2015). Assim, a capacidade enzimática está relacionada com o potencial probiótico. Por outro lado, é interessante explorar o perfil enzimático de isolados alimentares, uma vez que as atividades enzimáticas são fundamentais durante diversas fases de produção dos queijos, nomeadamente, a coagulação e cura. Sendo de extrema relevância durante os processos bioquímicos da proteólise e lipólise (Freitas and Malcata 2000). Deste modo, o perfil enzimático está também relacionado com o potencial tecnológico dos microrganismos.

Portanto, através da utilização de galerias API ZYM, verificou-se que os oito isolados em análise, possuem um amplo espectro de atividades enzimáticas. O fundo das galerias é constituído por um suporte que contém substrato, de modo a favorecer o contacto entre a enzima produzida pelo microrganismo em estudo e o substrato. Após inoculação, caso o isolado produza a enzima, ocorrerá uma reação durante o período de incubação, traduzida por viragem de cor. Pelo contrário, se o microrganismo não produzir a enzima, não haverá alteração de cor (Biomérieux 2021). Na Figura 8, está representado o perfil enzimático obtido para cada um dos isolados analisados.

		α -fucosidase	α -galactosidase	α -glucosidase	α -manosidase	α -quimotripsina	β -galactosidase	β -glucosidase	β -glucuronidase	Cistina arilamidase	Esterase (C4)	Esterase lipase (C8)	Fosfatase ácida	Fosfatase alcalina	Leucina arilamidase	Lipase (C14)	N-acetil- β -glucosaminidase	Naftol-AS-BI-fosfolidrolase	Tripsina	Valina arilamidase
BAL	N10.15.2016																			
	A1.7.2017																			
	A3.8.2017																			
<i>Enterococcus</i> spp.	A2.17.2017																			
	N9.10.2017																			
	A3.2.2019																			
<i>Lactococcus</i> spp.	A1.47.2016																			
	N9.14.2017																			

Figura 8 – Perfil enzimático dos isolados selecionados.

Legenda: Verde – reação enzimática forte; amarelo – reação enzimática fraca; vermelho – reação enzimática negativa.

Por análise da Figura 8, verificou-se que todos os isolados apresentaram forte produção de leucina arilamidase, como reportado no estudo de Herreros et al. (2003). A atividade da cistina arilamidase e valina arilamidase, foi bastante similar. Uma BAL (A1.7.2017), dois enterococos (A2.17.2017; A3.2.2019) e um lactococos (N9.14.2017) revelaram forte produção da cistina arilamidase e duas BAL (A1.7.2017; A3.8.2017), dois enterococos (A2.17.2017; A3.2.2019) e um lactococos (N9.14.2017) revelaram forte produção da valina arilamidase. As três peptidases (leucina arilamidase, cistina arilamidase e valina arilamidase) desempenham funções importantes na libertação de aminoácidos aromáticos, envolvidos no desenvolvimento de *flavours* desejáveis nos queijos (Herreros et al. 2003).

Observou-se em duas BAL (A1.7.2017; A3.8.2017) e nos enterococos, fraca produção de fosfatase alcalina, sendo a produção inexistente nos restantes isolados. Estes resultados estão de acordo com Herreros et al. (2003) e Serio et al. (2010), que confirmam a fraca ou inexistente atividade desta enzima, em enterococos e lactococos. Pelo contrário, a fosfatase ácida, essencial para a hidrólise de fosfopéptidos na cura do queijo (Serio et al. 2010; Ahmadvova et al. 2013), apresentou forte atividade nas BAL, dois enterococos (A2.17.2017; A3.2.2019) e um lactococos (N9.14.2017). Numa BAL (A1.7.2017) e dois

enterococos (A2.17.2017; A3.2.2019) evidenciou-se forte produção de naftol-AS-BI-fosfohidrolase e, nos restantes, fraca produção.

Foi observada em duas BAL (N10.15.2016; A3.8.2017) e um enterococos (A3.2.2019) fraca produção de esterase (C4) e esterase lipase (C8), enquanto os restantes isolados apresentaram produção forte para as mesmas enzimas. A atividade da esterase (C4) e esterase lipase (C8), aumenta a concentração de ácidos gordos de cadeia curta, contribuindo para sabores picantes, especialmente em queijos obtidos de leite de ovelha e cabra (Serio et al. 2010). Por oposição, a produção de lipase C14 foi inexistente numa BAL (N10.15.2016), num enterococos (N9.10.2017) e lactococos e, nos restantes a produção foi fraca. Estes resultados estão de acordo com Herreros et al. (2003), Serio et al. (2010) e Ahmadova et al. (2013) e não são surpreendentes, uma vez que as BAL apresentam, por norma, uma fraca capacidade lipolítica.

Nenhum isolado produziu tripsina, à exceção de A1.7.2017 (BAL) que apresentou fraca produção. Metade dos isolados apresentaram forte produção de α -quimotripsina e fraca ou inexistente nos restantes.

Nenhum isolado produziu as enzimas α -fucosidase, α -manosidase e β -glucuronidase. Em seis isolados a produção de N-acetil- β -glucosaminidase foi baixa ou inexistente. Nenhum isolado produziu α -galactosidase, à exceção de A3.8.2017 (BAL) que apresentou produção fraca e em N9.14.2017 (lactococos) que apresentou forte produção. Ainda, uma BAL (N10.15.2016), um enterococos (N9.10.2017) e os lactococos não produziram α -glucosidase. Uma BAL (A3.8.2017), um enterococos (N9.10.2017) e um lactococos (N9.14.2017) mostraram forte produção da enzima β -galactosidase, sendo esta responsável pela hidrólise da lactose que leva à libertação de açúcares, servindo de fonte de energia para os microrganismos durante o período de cura (Nieto-Arribas et al. 2011). Por fim, uma BAL (N10.15.2016) não produziu β -glucosidase e uma BAL (A1.7.2017), um enterococos (A3.2.2019) e um lactococos (A1.47.2016) apresentaram fraca produção.

Posto isto, A1.7.2017 foi o isolado das BAL com maior produção enzimática (9/19), nos enterococos A2.17.2017 (9/19) e nos lactococos N9.14.2017 (10/19). Estes isolados têm em comum forte produção de cistina arilamidase, esterase (C4), esterase lipase (C8), fosfatase ácida, leucina arilamidase e valina arilamidase. Estas enzimas são fundamentais para o desenvolvimento de *flavours* desejáveis nos queijos, contribuindo, também, para a sua textura (Herreros et al. 2003; Serio et al. 2010). Assim, as várias atividades enzimáticas influenciam as características organoléticas do produto final.

5.6. Métodos moleculares

Recorreu-se a métodos moleculares para identificação ao nível de género e espécie dos oito isolados mais promissores. No entanto, a pesquisa de genes de virulência e de genes codificadores para bacteriocinas foi realizada apenas para *Enterococcus* spp., uma vez que estes protocolos já estavam otimizados no laboratório.

5.6.1. Identificação ao nível de género e espécie

Através da realização de *PCR-multiplex*, usando *primers* específicos (Tabela 4, ponto 4.6.1.), foi identificada a espécie dos *Enterococcus* spp. e o género de duas BAL. Os resultados mostraram que A2.17.2017 pertence à espécie *E. durans*, N9.10.2017 e A3.2.2019 foram identificados como *E. faecium*. As BAL foram identificados ao nível de género: A1.7.2017 e A3.8.2017 foram identificados como *Lactobacillus* spp.. Para N10.15.2016 (BAL), não foi possível comprovar o seu género e para os *Lactococcus* spp. (A1.47.2016, N9.14.2017), não foi possível identificar a espécie. Considerando que não foi possível identificar estes quatro isolados de forma conclusiva pela metodologia adotada, o ideal seria, no futuro, recorrer à sequenciação do rRNA 16S, utilizando *primers* universais.

5.6.2. Fatores de virulência

A avaliação da patogenicidade de *Enterococcus* spp. (A2.17.2017; N9.10.2017; A3.2.2019) foi complementada por pesquisa de genes de virulência, através da realização de *PCR-multiplex*, usando *primers* específicos (Tabela 5, ponto 4.6.2.). Os resultados mostraram que nenhum dos isolados continha genes de virulência (*cylA*, *gelE*, *esp*, *agg*). O mesmo aconteceu no estudo de Pimentel et al. (2007) e Ahmadova et al. (2013). No primeiro estudo o isolado *E. durans*, proveniente do queijo tradicional do Terrincho, não exibiu genes de virulência, assim como no segundo estudo, o isolado de *E. faecium*, proveniente de um queijo tradicional, também não exibiu genes de virulência. Tal como referido em 2.2.3.1., a presença de citolisina, gelatinase, proteína de superfície de *Enterococcus* e substância de agregação, em enterococos provenientes de alimentos, pode tornar-se um potencial risco para indivíduos imunocomprometidos quando colonizam o intestino humano (Chajęcka-Wierzchowska et al. 2017). Os enterococos são frequentemente associados a infeções, sendo que a presença de fatores de virulência agrava a severidade das mesmas. Isto acontece porque os fatores de virulência estão associados, entre outros, à colonização e invasão de tecidos do hospedeiro (Dapkevicius et al. 2021). Portanto, a ausência de genes de virulência nos isolados em estudo é um resultado bastante relevante, pois a presença dos mesmos poderia permitir que as bactérias atuassem como patogénicos oportunistas.

5.6.3. Pesquisa de genes codificadores de bacteriocinas

Inúmeros enterococos provenientes de queijos, produzem uma grande diversidade de bacteriocinas com atividade sobre bactérias patogênicas de origem alimentar, como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, entre outros (Dapkevicius et al. 2021). Por isso, os enterococos em estudo (A2.17.2017; N9.10.2017; A3.2.2019), foram submetidos a *PCR-multiplex*, usando *primers* específicos (Tabela 6, ponto 4.6.3.), para avaliar a presença de genes codificadores para diferentes bacteriocinas. Os resultados indicaram que A2.17.2017 contém o gene que codifica para a enterocina P, N9.10.2017 contém o gene que codifica para a enterocina A e B e em A3.2.2019 não se detetou a presença dos genes codificadores de bacteriocinas em análise. Deste modo, em nenhum dos isolados, foram detetadas as enterocinas alvo AS-48, EJ97, Enterolysin A, L50AB, Q, 31,1071. Nos estudos de Moraes et al. (2012), Favaro et al. (2014), Morandi et al. (2015) e Gaglio et al. (2016), diferentes enterococos, isolados de queijos, foram identificados como possuindo genes codificadores das enterocinas A, B e/ ou P. Nos mesmos estudos, apesar de outros genes codificadores de enterocinas terem sido detetados, as enterocinas A, B e P foram mais frequentes. Para N9.10.2017, o facto de ter a presença de mais do que um gene codificador de bacteriocina, não significa que esses genes sejam expressos simultaneamente, ou seja, que esse isolado seja capaz de produzir múltiplas bacteriocinas ao mesmo tempo (Moraes et al. 2012). Assim sendo, é bastante positiva a presença de genes codificadores de bacteriocinas nos enterococos, uma vez que os produtores de bacteriocina podem contribuir para modular a microbiota durante a cura, promover a autólise das *starter* e não *starter* e inibir microrganismos patogênicos e deteriorativos (Dapkevicius et al. 2021). Na indústria alimentar, o uso de microrganismos produtores de enterocinas, tem recebido atenção como método de preservação para controlar bactérias patogênicas (Valenzuela et al. 2009).

Após realização das análises anteriormente descritas (direcionadas para o potencial tecnológico e patogénico), os ensaios subsequentes foram determinantes para verificar o poder probiótico dos isolados em estudo. Assim, os microrganismos considerados mais promissores, foram testados quanto à tolerância a ambientes gastrointestinais (simulação *in vitro* de estômago e intestino), capacidade de auto e co-agregação.

5.7. Tolerância a condições gastrointestinais e capacidade de auto-agregação e co-agregação

Tal como mencionado no ponto 2.2.2., para que um microrganismo possa ser considerado probiótico, deverá sobreviver às condições encontradas no trato gastrointestinal, ou seja, deverá tolerar variação nos valores de pH, resistir a sais biliares, enzimas gástricas e deverá ainda ter capacidade para aderir à mucosa intestinal, de modo a conseguir colonizar o intestino (Plessas et al. 2012; Cui et al. 2018; Margalho et al. 2020). Por estes motivos, foram realizados ensaios em microplacas de 96 poços, com o intuito de verificar o potencial probiótico dos oito isolados em estudo: N10.15.2016, A1.7.2017, A3.8.2017 (BAL); A2.17.2017, N9.10.2017, A3.2.2019 (*Enterococcus* spp.); A1.47.2016, N9.14.2017 (*Lactococcus* spp.). Todos os ensaios foram realizados em paralelo.

De modo a simular as condições do estômago, foi preparada uma mistura com 0,5% NaCl e 0,22% pepsina, ajustada a pH 2 e para simular as condições do intestino delgado, foi preparada uma mistura com 0,5% NaCl, 0,2% pancreatina e 0,4% bílis, ajustada a pH 8 (Grujović et al. 2019). A capacidade de auto-agregação e a capacidade de co-agregação com *Escherichia coli* também foi avaliada, sendo a primeira avaliada durante um período de 24 h e a segunda durante um período de 2 h.

No ensaio em que os isolados foram submetidos a condições similares às do estômago, nenhum mostrou capacidade de sobrevivência às condições testadas. O mesmo não aconteceu quando foram submetidos a condições similares às do intestino delgado. Verifica-se pela Figura 9 que, à exceção de N10.15.2016 (BAL), todos os isolados sobreviveram às condições testadas. Os dois lactococos e A3.8.2017 (BAL), foram os que apresentaram maior percentagem de sobrevivência, 100% e 90,8%, respetivamente.

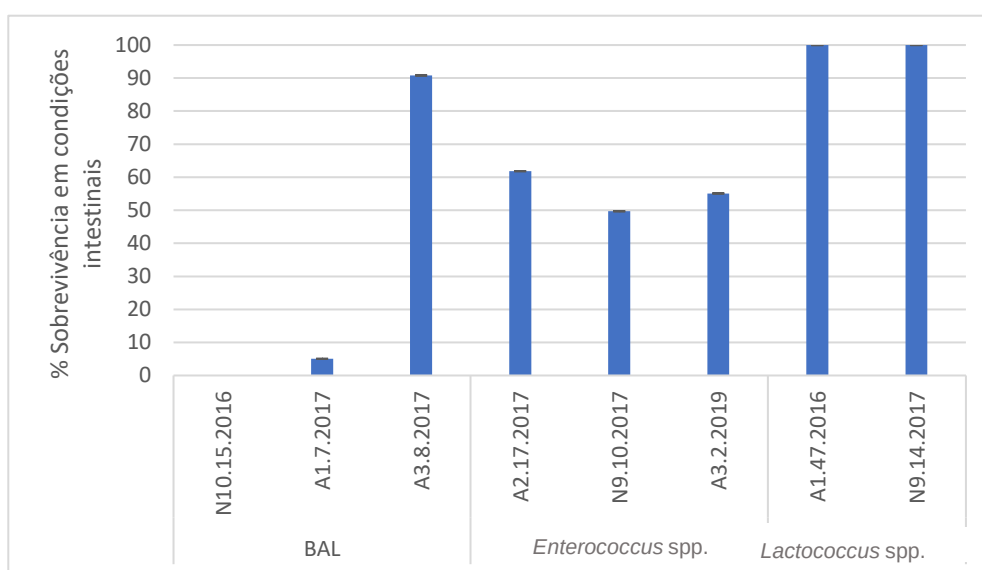


Figura 9 – Perfil dos isolados quanto à capacidade de sobrevivência em condições intestinais.

No estudo de Fuka et al. (2017), debruçado sobre um queijo artesanal de leite cru, observou-se uma sobrevivência média de 75,45% dos *Enterococcus* spp. quando simulado o ambiente do estômago e uma sobrevivência média de 55,58% quando simulado o ambiente intestinal. Ainda, no estudo de Grujović et al. (2019), dirigido a um queijo tradicional proveniente da Sérvia, verificou-se que *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp. tiveram, tal como no estudo anterior, uma percentagem de sobrevivência maior no ambiente estômago, ao invés do ambiente intestino. Perante os resultados deste estudo, verifica-se que no ensaio com condições similares à do estômago, os isolados não cumprem um critério primário para serem aplicados como probióticos, ou seja, a sobrevivência às condições do trato-gastrointestinal (Ruiz-Moyano et al. 2019). Nenhum isolado sobreviveu quando expostos ao ambiente estômago, sugerindo que não são benéficos para aplicação como probióticos. Por oposição, constata-se que quando simuladas as condições intestino, o comportamento dos isolados foi diferente. Neste caso, cinco, revelaram percentagem de sobrevivência superior a 50%. Resumidamente, N10.15.2016 (BAL) e A1.7.2017 (BAL) destacam-se negativamente pela inexistência ou fraca sobrevivência em ambas as condições.

A capacidade de auto-agregação é importante para analisar a habilidade de aderência dos microrganismos às células epiteliais ou superfícies mucosas, sendo que maiores percentagens de auto-agregação significam maior potencial de adesão ao epitélio intestinal (Özkan et al. 2021). Através da Figura 10, verifica-se que N10.15.2016 e A1.7.2017 são os únicos que não revelaram possuir capacidade de auto-agregação durante o período de 24 h. Comparando BAL com enterococos e lactococos, a capacidade de auto-agregação de enterococos foi ligeiramente superior à dos restantes isolados. A3.8.2017 apresentou média de 19% de auto-agregação, enterococos capacidade média de auto-agregação entre 32-39% e lactococos entre 22-24%.

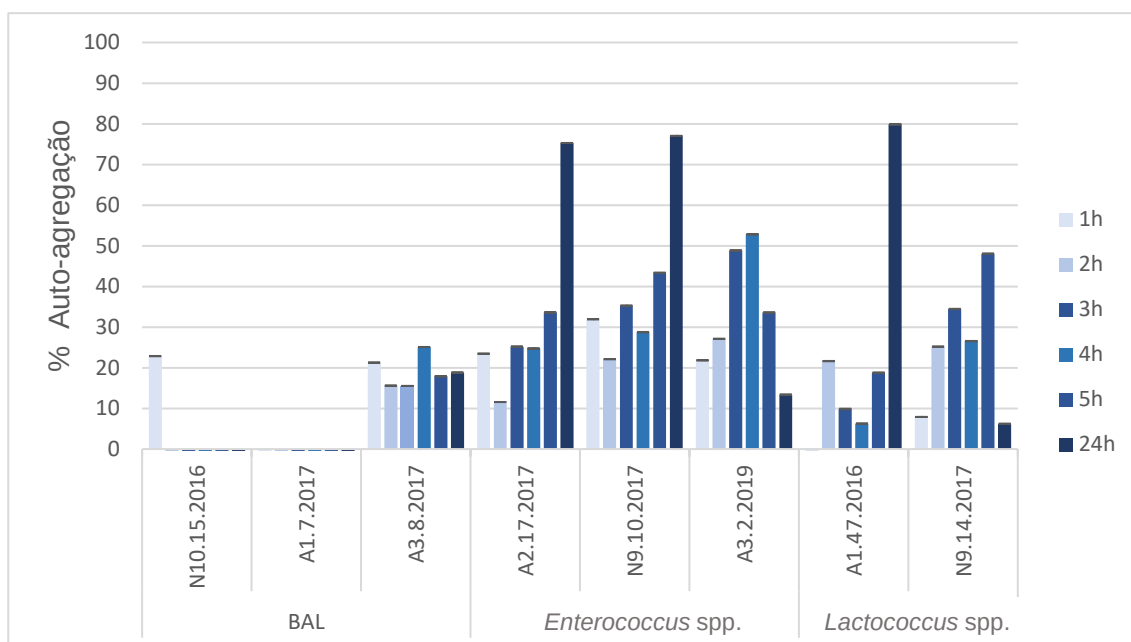


Figura 10 – Perfil da capacidade de auto-agregação dos isolados em estudo.

Os resultados para enterococos foram distintos dos relatados por Fuka et al. (2017), pois nesse estudo exibiram baixa capacidade de auto-agregação (média 13,22%). Situação semelhante verificou-se para BAL e lactococos, pois os resultados foram diferentes dos observados por Grujović et al. (2019), uma vez que nesse estudo as capacidades de auto-agregação foram mais elevadas. Os resultados de A3.8.2017 (BAL), os enterococos e lactococos, sugerem que esses microrganismos possuem capacidade de adesão às células epiteliais intestinais/mucosa intestinal. Este acontecimento é um fator positivo e importante, pois é um dos critérios para uma estirpe ser considerada probiótica (Ruiz-Moyano et al. 2019). Comparando os resultados dos dois isolados BAL (N10.15.2016 e A1.7.2017) com os resultados anteriores (simulação das condições estômago e intestino), estes reforçam a ideia de que não cumprem os devidos critérios para poderem ser consideradas potenciais probióticos.

A capacidade de co-agregação dos isolados foi avaliada utilizando a bactéria *Escherichia coli*, visto que é a espécie mais abundante no intestino delgado humano (Ray 2001). Desta maneira, se os isolados conseguirem agregar-se a esta bactéria, podem formar uma barreira que poderá contribuir para impedir/minimizar a colonização por microrganismos patogênicos (Grujović et al. 2019). Pela Figura 11, constata-se que todos os isolados apresentaram capacidade de co-agregação, tendo os enterococos apresentado as percentagens mais elevadas, seguidos de lactococos e, por fim, as BAL.

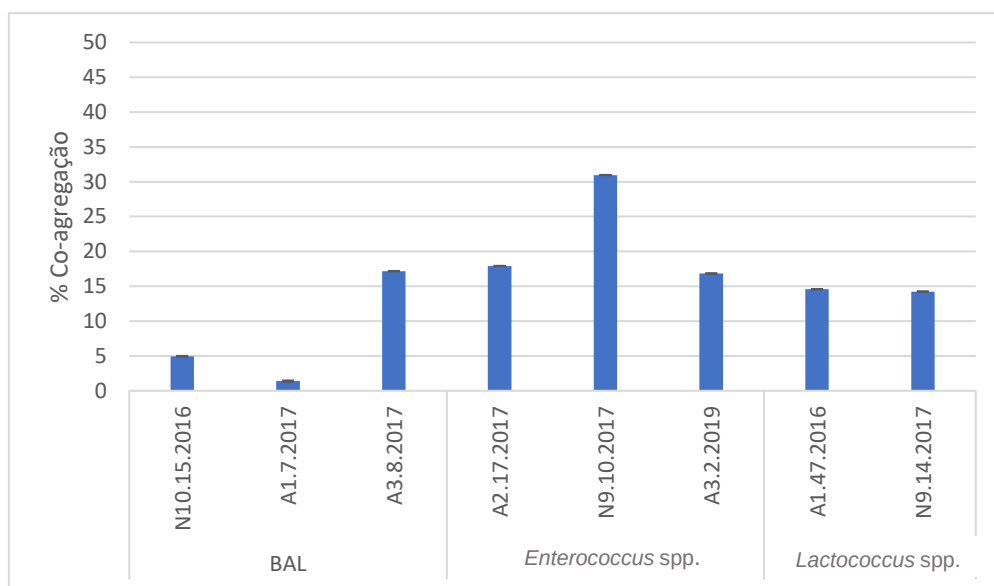


Figura 11 – Perfil da capacidade de co-agregação dos isolados em estudo.

No estudo de Grujović et al. (2019), acerca de um queijo artesanal, todos os isolados do género *Lactobacillus* revelaram capacidade de co-agregação em *E.coli*, sendo os valores entre 13,92–41,45%. Também foi verificada capacidade de co-agregação em lactococcus, porém valores muito baixos (~3%). No presente estudo, destaca-se N9.10.2017 com maior capacidade de co-agregação (31%) e dois isolados BAL (N10.15.2016 e A1.7.2017) com menor capacidade de co-agregação (inferior a 5%).

Analisando globalmente os ensaios, os isolados em estudo não podem ser considerados potenciais probióticos, visto que não mostraram capacidade de sobrevivência quando simulada a condição estômago. Porém, este ensaio foi repetido com uma estirpe probiótica (*Lactobacillus rhamnosus* GG) e o problema manteve-se, ou seja, era expectável que esta estirpe sobrevivesse nas condições simuladoras de estômago e isso não aconteceu. Assim, este acontecimento sugere que os resultados obtidos para o referido ensaio, poderão advir do procedimento (por exemplo, *stock* de enzimas utilizadas) e não propriamente da não aptência probiótica dos isolados em análise. Posto isto, o ideal será repetir estes ensaios com um *cocktail* enzimático novo.

Fazendo uma análise profunda aos oito isolados, verificamos que, de modo geral, todos têm um bom potencial tecnológico, mas não apresentam promissor potencial probiótico (a confirmar após repetição do ensaio acima referido). Isto significa que os oito apresentaram capacidade de acidificação do leite de ovelha, a maioria revelou capacidade proteolítica e metade capacidade lipolítica, todos se multiplicaram às diferentes condições a que foram submetidos e nenhum sobreviveu quando simulada a condição estômago. No entanto, entre estes isolados, destacam-se as BAL que, comparativamente aos restantes, produziram halos de inibição sobre *L. monocytogenes* de maiores dimensões (13-17 mm),

e foram as únicas com capacidade de inibir as restantes indicadoras. Ainda, nenhum dos três isolados apresentaram características gelatinolíticas ou β -hemolíticas, sendo que as resistências a antibióticos que evidenciaram não são alarmantes. Por oposição, destacam-se os lactococos que apresentaram várias resistências a antibióticos, informação preocupante, uma vez que evidencia um maior potencial patogénico (Morandi et al. 2015). Em acréscimo, uma das resistências é relativa à eritromicina, que como foi anteriormente referido, é uma resistência muito preocupante (Comunian et al. 2010). Além disso, estes dois isolados foram os que apresentaram menor capacidade de inibição, inibindo apenas *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*, ambas Gram-positivas. Relativamente aos enterococos, destaca-se A3.2.2019, por apresentar maior número de resistências, comparativamente aos outros dois isolados, sendo que duas são muito preocupantes neste género - teicoplanina e vancomicina (Domingos-Lopes et al. 2017). Adicionalmente, este foi o único enterococos que não apresentou genes codificadores de bacteriocinas. Note-se que a presença de enterococos como microbiota autóctone de alguns alimentos, assim como a sua aplicação como culturas *starter*, tem originado debate, sendo questionada a sua segurança, uma vez que estão frequentemente associados a infeções (Dapkevicius et al. 2021). Por este motivo, apesar de os enterococos A2.17.2017 e N9.10.2017, terem revelado várias características pertinentes, como capacidade proteolítica e lipolítica, poucas resistências e não preocupantes, inibição de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, ausência de fatores de virulência e, ainda, presença de genes que codificam para a enterocina P em A2.17.2017 e para a enterocina A e B em N9.10.2017; seriam necessários mais estudos, como pesquisa de genes de resistência, para completar o seu perfil de patogenicidade e, só depois, equacionar a sua potencial aplicação em alimentos. Por tudo o que foi dito, os isolados de BAL mostraram ser os mais promissores quanto ao seu potencial tecnológico, não esquecendo que os resultados apontaram para um reduzido potencial patogénico e um amplo espetro enzimático.

6. Conclusão

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar o potencial tecnológico e probiótico de bactérias ácido lácticas, isoladas de queijos de Azeitão e Nisa DOP. Secundariamente, foi avaliado o potencial patogénico dos isolados, nomeadamente a capacidade hemolítica e gelatinolítica, e resistência a antibióticos.

A análise global de todos os parâmetros estudados permite concluir que, dos 203 isolados em estudo, oito revelaram possuir potencial tecnológico. Nomeadamente, capacidade de acidificação do leite de ovelha, a maioria apresentou capacidade proteolítica, capacidade de multiplicação a diferentes temperaturas e concentrações salinas. Por outro lado, revelaram capacidade de multiplicação na presença de bílis, multiplicação em diferentes valores de pH (2; 7; 8,5) e capacidade de inibição de diferentes microrganismos patogénicos, indiciando potencial probiótico. Porém, quando testados quanto à tolerância a ambientes gastrointestinais (simulação *in vitro* de estômago e intestino), nenhum dos isolados mostrou capacidade de sobrevivência na condição estômago (resultado a confirmar por repetição do ensaio). Dos oito isolados, nenhum revelou ser β -hemolítico e apenas um enterococos é gelatinolítico. Nenhum enterococos possui os fatores de virulência pesquisados e dois isolados, A2.17.2017 e N9.10.2017, revelaram a presença de genes codificadores para as enterocinas P, A e B, respetivamente. Revelaram possuir resistências a alguns antibióticos, mas nenhum foi considerado multirresistente. No entanto, por apresentarem algumas resistências preocupantes, os lactococos (A1.47.2016; N9.14.2017) e A3.2.2019 (enterococos) foram descartados de possível aplicação na indústria alimentar. Para os restantes enterococos são necessários mais estudos acerca da sua patogenicidade e quanto à segurança da sua aplicabilidade em alimentos, devido ao seu historial como patogénicos oportunistas. Posto isto, este trabalho permitiu selecionar três isolados (BAL) com potencial utilização no fabrico de queijos tradicionais, podendo ser útil em queijarias que produzam queijos de ovelha sem certificação DOP. A adição destas culturas como bactérias *starter*, ou não *starter* poderá contribuir para a uniformização das características do queijo em termos organoléuticos ao longo do ano e de ano para ano, evitando variações sazonais.

Como perspetivas futuras, seria aliciante explorar a natureza da atividade antimicrobiana, ou seja, realizar ensaios para verificar se os isolados são efetivamente produtores de bacteriocinas. Para além da pesquisa de genes de virulência e pesquisa de genes de bacteriocinas nos enterococos (realizado), alargar o estudo a BAL e lactococos. Seria ainda interessante pesquisar genes de resistência a antibióticos. Por fim, para completar a análise do potencial patogénico, seria útil realizar ensaios de adesão e formação de biofilme, dada a preocupação que geram na indústria alimentar.

7. Referências bibliográficas

- Ahmadova A, Todorov SD, Choiset Y, Rabesona H, Zadi TM, Kuliyeu A, Franco BDGM, Chobert JM, Haertlé T. 2013. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. Food Control. 30(2): 631-641.
- Almeida G, Figueiredo A, Rôla M, Barros RM, Gibbs P, Hogg T, Teixeira P. 2007. Microbiological characterization of randomly selected Portuguese raw milk cheeses with reference to food safety. Journal of Food Protection. 70(7): 1710-1716.
- Argyri AA, Zoumpopoulou G, Karatzas K-AG, Tsakalidou E, Nychas G-JE, Panagou EZ, Tassou CC. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. Food Microbiology. 33(2): 282-291.
- Baptista MRRR. 2018. Caracterização do microbioma de queijos tradicionais Portugueses com DOP. Dissertação de mestrado em Microbiologia Aplicada. Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa.
- Batista ENB. 2017. Caracterização microbiológica e físico-química de queijos tradicionais Portugueses com Denominação de Origem Protegida. Dissertação de mestrado em Microbiologia Aplicada. Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa.
- Beresford TP, Fitzsimons NA, Brennan NL, Cogan TM. 2001. Recent advances in cheese microbiology. International Dairy Journal. 11(4-7): 259–274.
- Biomerieux [Internet]. [acedido em 2021 Dez 8]. <https://www.biomerieux.pt/produto/gama-de-galerias-apir>
- Buffa M, Guamis B, Pavia M, Trujillo AJ. 2001. Lipolysis in cheese made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. International Dairy Journal. 11(3): 175–179.
- Cardinali F, Ferrocino I, Milanović V, Belleggia L, Corvaglia MR, Garofalo C, Foligni R, Mannozi C, Mozzon M, Cocolin L, et al. 2021. Microbial communities and volatile profile of Queijo de Azeitão PDO cheese, a traditional Mediterranean thistle-curdled cheese from Portugal. Food Research International. 147: 110537.
- Carlos AR, Santos J, Semedo-Lemsaddek T, Barreto-Crespo MT, Tenreiro R. 2009. Enterococci from artisanal dairy products show high levels of adaptability. International Journal of Food Microbiology. 129(2): 194-199.
- Câmara SC, Dapkevicius A, Riquelme C, Elias RB, Silva CCG, Malcata FX, Dapkevicius MLNE. 2019. Potential of lactic acid bacteria from Pico cheese for starter culture development. Food Science and Technology International. 0 (0): 1-15.
- Câmara SPA, Dapkevicius A, Silva CCG, Malcata FX, Dapkevicius MLNE. 2020. Artisanal Pico cheese as reservoir of *Enterococcus* species possessing virulence and antibiotic resistance properties: implications for food safety. Food Biotechnology. 34(1): 25–41.
- Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A, Łaniewska-Trokenheim Ł. 2017. Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. LWT. 75: 670–676.

- Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. 1998. Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Species. *Journal of Food Protection*. 61(12): 1636-1643.
- Chiesa LM, DeCastelli L, Nobile M, Martucci F, Mosconi G, Fontana M, Castrica M, Arioli F, Panseri S. 2020. Analysis of antibiotic residues in raw bovine milk and their impact toward food safety and on milk starter cultures in cheese-making process. *Lwt – Food Science and Technology*. 131: 109783.
- Cintas LM, Casaus P, Herranz C, Havarstein LS, Holo H, Hernández PE, Nes IF. 2000. Biochemical and Genetic Evidence that *Enterococcus faecium* L50 Produces Enterocins L50A and L50B, the sec-Dependent Enterocin P, and a Novel Bacteriocin Secreted without an N-Terminal Extension Termed Enterocin Q. *Journal of Bacteriology*. 182(23): 6806–6814.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty Sixth Edition. Pennsylvania, USA. CLSI document M100S.
- Codex Standard 283. 1978. Codex general standard for cheese. Codex Alimentarius, FAO/WHO. Rome.
- Comunian R, Daga E, Dupré I, Paba A, Devirgiliis C, Piccioni V, Perozzi G, Zonenschain D, Rebecchi A, Morelli L, et al. 2010. Susceptibility to tetracycline and erythromycin of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods. *International journal of food microbiology*. 138(1-2): 151-156.
- Condalab [Internet]. [acedido em 2021 Fev 9]. <https://www.condalab.com/int/en/dehydrated-culture-media/45-8917-mrs-agar.html>.
- Corroler D, N Desmasures, M Gueguen. 1999. Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51:91–99.
- Cross AS. 2008. What is a virulence factor? *Critical Care*. 12(6): 197.
- Cruz AG, Buriti FCA, Souza CHB, Faria JAF, Saad SMI. 2009. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Food Science & Technology*. 20(8): 344 – 354.
- Cui X, Shi Y, Gu S, Yan X, Chen H, Ge J. 2018. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Artisanal Milk Cheese from Northeast China Against Enteropathogenic Bacteria. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 10: 601–610.
- Çadirci BH, Çitak S. 2005. A Comparison of Two Methods Used for Mesuring Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria. *Pakistan Journal of Nutrition*. 4 (4): 237-241.
- Dalynn Biologicals [Internet]. [Acedido em 2021 Fev 9]. <https://www.dalynn.com/dyn/index.jsp>.

- Dapkevicius MDLE, Sgardioli B, Câmara SPA, Poeta P, Malcata FX. 2021. Current Trends of Enterococci in Dairy Products: A Comprehensive Review of Their Multiple Roles. *Foods*. 10(4): 821.
- Davison HC, Low JC, Woolhouse MEJ. 2000. What is antibiotic resistance and how can we measure it?. *Trends in microbiology*. 8(12): 554-559.
- De Vuyst L. 2000. Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technology and Biotechnology*. 38(2): 105-112.
- Derrien M, Van Hylckama Vlieg JE. 2015. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends in microbiology*. 23(6): 354-366.
- Dias MRS, Fusieger A, Motta AS. 2019. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from sheep milk for potential use as non-starter cultures. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. 74(1): 197-208.
- Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento rural (DGADR) [Internet]. [Acedido em 2021 Fev 1]. <https://www.dgadr.gov.pt/sustentavel/dop-igp-etg>.
- Domingos-Lopes MFP, Stanton C, Ross PR, Dapkevicius MLE, Silva CCG. 2017. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiology*. 63:178 – 190.
- Dubernet S, Desmasures N, Guéguen M. 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*. 214(2):271–5.
- Eaton TJ, Gasson MJ. 2001. Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(4):1628–35.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0. 2019. [acedido em 2021 Maio 26]. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
- European Food Safety Authority (EFSA). 2016. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 4: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2016. *Efsa J*. 14: 4522.
- Eurostat [Internet]. 2021. [Acedido em 2021 Set 21]. <https://ec.europa.eu/eurostat/web/main/home>.
- Eusébio FN. 2020. Avaliação do potencial de patogenicidade de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos tradicionais Portugueses. Dissertação de mestrado em Microbiologia Aplicada. Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa.
- Evershed RP, Payne S, Sherratt AG, Copley MS, Coolidge J, Urem-Kotsu D, Kotsakis K, Özdoğan M, Özdoğan AE, Nieuwenhuys O, et al. 2008. Earliest date for milk use in the Near East and southeastern Europe linked to cattle herding. *Nature*. 455: 528– 531.
- FAO/WHO. 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, ON, Canada. [Acedido em 2021 Mar 12]. https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf.

- Favaro L, Basaglia M, Casella S, Hue I, Dousset X, Franco BDGM, Todorov SD. 2014. Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. *Food Microbiology*. 38: 228–239.
- Feutry F, Oneca M, Berthier F, Torre P. 2012. Biodiversity and growth dynamics of lactic acid bacteria in artisanal PDO Ossau-Iraty cheeses made from raw ewe's milk with different starters. *Food Microbiology*. 29(1): 33–42.
- Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PLH. 2016. *Fundamentals of Cheese Science*. Second Edition. New York (NY): Springer.
- Freitas AC, Macedo AC, Malcata F. 2000. Review: Technological and organoleptic issues pertaining to cheeses with denomination of origin manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Food Science and Technology International*. 6(5): 351-370.
- Freitas AC, Malcata FX. 2000. Microbiology and Biochemistry of Cheeses with Appellation d'Origine Protégée and Manufactured in the Iberian Peninsula from Ovine and Caprine Milks. *Journal of Dairy Science*. 83(3): 584–602.
- Fuka MM, Wallisch S, Engel M, Welzl G, Havranek J, Schlöter M. 2013. Dynamics of Bacterial Communities during the Ripening Process of Different Croatian Cheese Types Derived from Raw Ewe's Milk Cheeses. *PLoS ONE*. 8(11): e80734.
- Fuka MM, Maksimovic AZ, Tanuwidjaja I, Hulak N, Schlöter M. 2017. Characterization of enterococcal community isolated from an artisan Istrian raw milk cheese: Biotechnological and safety aspects. *Food technology and biotechnology*, 55(3): 368-380.
- Gaglio R, Couto N, Marques C, Lopes MFS, Moschetti G, Pomba C, Settanni L. 2016. Evaluation of antimicrobial resistance and virulence of enterococci from equipment surfaces, raw materials, and traditional cheeses. *International Journal of Food Microbiology*. 236: 107–114.
- Ganesan B, Weimer BC, Pinzon J, Dao Kong N, Rompato G, Brothersen C, McMahon DJ. 2014. Probiotic bacteria survive in Cheddar cheese and modify populations of other lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 116(6): 1642-1656.
- Giraffa G. 2012. Selection and design of lactic acid bacteria probiotic cultures. *Engineering in Life Sciences*. 12(4):1-8.
- Gonçalves MTP, Benito MJ, Córdoba MG, Egas C, Merchán AV, Galván AI, Ruiz-Moyano S. 2018. Bacterial Communities in Serpa Cheese by Culture Dependent Techniques, 16S rRNA Gene Sequencing and High-throughput Sequencing Analysis. *Journal of Food Science*. 83(5): 1333–1341.
- Grujović MŽ, Mladenović KG, Nikodijević DD, Čomić LR. 2019. Autochthonous lactic acid bacteria—presentation of potential probiotics application. *Biotechnology letters*. 41(11): 1319-1331.
- Guerreiro JS, Barros M, Fernandes P, Pires P, Bardsley R. 2013. Principal component analysis of proteolytic profiles as markers of authenticity of PDO cheeses. *Food chemistry*. 136(3-4): 1526-1532.

- Guiné RPF, Florença SG. 2020. The Science behind Traditional Products: The Case of Portuguese Cheeses. *International Journal of Food Engineering*. 6(2): 45-51.
- Hammam ARA, Ahmed MSI. 2019. Technological aspects, health benefits, and sensory properties of probiotic cheese. *SN Applied Sciences*. 1(9): 1113.
- Herreros MA, Fresno JM, Prieto MJG, Tornadijo ME. 2003. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *International Dairy Journal*. 13(6): 469-479.
- Hollenbeck BL, Rice LB. 2012. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *enterococcus*. *Virulence*. 3(5): 421-569.
- Homayouni A, Ansari F, Azizi A, Pourjafar H, Madadi M. 2020. Cheese as a potential food carrier to deliver probiotic microorganisms into the human gut: A review. *Current Nutrition & Food Science*. 16(1): 15-28.
- Instituto Nacional de Estatística (INE) [Internet]. 2020. [Acedido em 2021 Jul 27]. www.ine.pt.
- ISO 6887-5 (2020). Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination — Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products. International Organization for Standardization, Switzerland.
- Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Barrett JB. 2004. Use of a Genus- and Species-Specific Multiplex PCR for Identification of Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 42(8):3558– 65.
- Jahansepar A, Sharifi Y, Aghazadeh M, Rezaee MA. 2019. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from clinical samples and traditional cheese types in the Northwest of Iran: antimicrobial susceptibility and virulence traits. *Archives of Microbiology*. 202(4):765-772.
- Karimi R, Mortazavian AM, Cruz AG. 2011. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. 91(3):283 – 308.
- Ke D, Picard FJ, Martineau F, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron M. 1999. Development of a PCR Assay for Rapid Detection of Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(11):3497–3503.
- Kongo JM, Gomes AM, Malcata FX, McSeeney PLH. 2009. Microbiological, biochemical and compositional changes during ripening of São Jorge – a raw milk cheese from the Azores (Portugal). *Food Chemistry*. 112(1): 131-138.
- König H, Uden G, Fröhlich J. 2009. Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine. First Edition. Heidelberg: Springer – Verlag Berlin Heidelberg.
- Leroi F, Fall PA, Pilet MF, Chevalier F, Baron R. 2012. Influence of temperature, pH and NaCl concentration on the maximal growth rate of *Brochothrix thermosphacta* and a bioprotective bacteria *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. *Food Microbiology*. 31 (2): 222-228.

- Lopes MDFS, Simões AP, Tenreiro R, Marques JJF, Crespo MTB. 2006. Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *International journal of food microbiology*. 112(3): 208-214.
- Lorenzo JM, Muneke PE, Dominguez R, Pateiro M, Saraiva JA, Franco D. 2018. Main groups of microorganisms of relevance for food safety and stability: general aspects and overall description. In *Innovative technologies for food preservation*. First Edition. Academic Press. p. 53-107.
- Macián MC, Chenoll E, Aznar R. 2004. Simultaneous detection of *Carnobacterium* and *Leuconostoc* in meat products by multiplex PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 97(2):384–94.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, et al. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*. 18(3): 268-281.
- Maldonado-Barragán A, Caballero-Guerrero B, Jiménez E, Jiménez-Díaz R, Ruiz-Barba JL, Rodríguez JM. 2009. Enterocin C, a class IIb bacteriocin produced by *E. faecalis* C901, a strain isolated from human colostrum. *International Journal of Food Microbiology*. 133(1-2): 105–112.
- Margalho LP, Feliciano MD, Silva CE, Abreu JS, Piran MVF, Sant'Ana AS. 2020. Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of nonstarter lactic acid bacteria regarding technological, biopreservative, and safety properties—Insights through multivariate analysis. *Journal of Dairy Science*. 18194.
- Margalho LP, Jorge GP, Noletto DAP, Silva CE, Abreu JS, Piran MVF, Brocchi M, Sant'Ana AS. 2020. Biopreservation and probiotic potential of a large set of lactic acid bacteria isolated from Brazilian artisanal cheeses: From screening to in product approach. *Microbiological Research*. 242: 126622.
- Martins APL, Belo AT, Vasconcelos MM, Fontes AL, Pereira EA, Belo CC. 2009. Characterisation of production system of Niza cheese (PDO): Effect of sheep breed on milk composition and coagulation properties. *Options Méditerranéennes, Série A, Séminaires Méditerranéens*. 91: 221-225.
- Martín-Platero AM, Valdivia E, Maqueda M, Martínez-Bueno M. 2009. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *International journal of food microbiology*. 132(1): 24-32.
- Martínez-Bueno M, Valdivia E, Gálvez A, Coyette J, Maqueda M. 1998. Analysis of the gene cluster involved in production and immunity of the peptide antibiotic AS-48 in *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiology*. 27(2): 347–358.
- McSweeney PLH. 2004. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 57(2-3): 127–144.
- McSweeney PL, Sousa MJ. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Le Lait*. 80(3): 293-324.
- Meng Z, Zhang L, Xin L, Lin K, Yi H, Han X. 2018. Technological characterization of *Lactobacillus* in semihard artisanal goat cheeses from different Mediterranean

- areas for potential use as nonstarter lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*. 101(4): 2887 – 2896.
- Millar BC, Jiru X, Moore JE, Earle JAP. 2000. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *Journal of Microbiological Methods*. 42(2): 139–147.
- Moraes PM, Perin LM, Todorov SD, Silva Jr A, Franco BDGM, Nero LA. 2012. Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. *Journal of Applied Microbiology*. 113(2): 318-328.
- Morandi S, Silvetti T, Miranda Lopez JM, Brasca M. 2015. Antimicrobial Activity, Antibiotic Resistance and the Safety of Lactic Acid Bacteria in Raw Milk Valtellina Casera Cheese. *Journal of Food Safety*. 35(2): 193-205.
- Mormile A, Barile M, Mercogliano R, Johansson P, Björkroth KJ, Aponte M, Murru N. 2015. Dynamics of lactic acid bacteria in “Pecorino di Tramonti”—a ewe’s milk cheese—with particular emphasis on enterococci: a preliminary study. *Annals of Microbiology*. 66(1): 179–185.
- Nieto-Arribas P, Seseña S, Poveda JM, Chicón R, Cabezas L, Palop L. 2011. *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: Biodiversity, technological and safety aspects. *Food Microbiology*. 28(5): 891-899.
- Oxoid [Internet]. [accedido em 2021 Fev 9]. http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0817&c=UK&lang=EN.
- Ozturkoglu-Budak S, Wiebenga A, Bron PA, Vries RP. 2016. Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 237: 17-27.
- Özkan ER, Demirci T, Akin N. 2021. In vitro assessment of probiotic and virulence potential of *Enterococcus faecium* strains derived from artisanal goatskin casing Tulum cheeses produced in central Taurus Mountains of Turkey. *LWT*. 141: 110908.
- Papademas P, Bintsis T. 2017. Global cheesemaking technology: cheese quality and characteristics. First Edition. John Wiley & Sons.
- Paula ACL, Medeiros JD, De Azevedo AC, de Assis Chagas JM, Da Silva VL, Diniz CG. 2018. Antibiotic resistance genetic markers and integrons in white soft cheese: aspects of clinical resistome and potentiality of horizontal gene transfer. *Genes*. 9(2): 106.
- Pereira CI, Gomes EO, Gomes AMP, Malcata FX. 2008. Proteolysis in model portuguese cheeses: Effects of rennet and starter culture. *Food Chemistry*. 108(3): 862-868.
- Pereira CI, Graça JA, Ogando NS, Gomes AMP, Malcata FX. 2009. Bacterial dynamics in model cheese systems, aiming at safety and quality of portuguese -style traditional ewe's cheeses. *Journal of food protection*. 72(11): 2243-2251.

- Pereira CI, Graça JA, Ogando NS, Gomes AMP, Malcata FX. 2010. Influence of bacterial Dynamics upon the final characteristics of model Portuguese traditional cheeses. *Food Microbiology*. 27(3): 339 – 346.
- Pereira CI, Franco MI, Gomes AMP, Malcata FX. 2011. Microbiological, rheological and sensory characterization of Portuguese model cheeses manufactured from several milk sources. *Food Science and Technology*. 44(10): 2244 – 2252.
- Perin LM, Belviso S, Bello BD, Nero LA, Cocolin L. 2017. Technological properties and biogenic amines production by bacteriocinogenic lactococci and enterococci strains isolated from raw goat's milk. *Journal of Food Protection*. 80(1): 151-157.
- Pimentel LL, Semedo T, Tenreiro R, Crespo MTB, Pintado MME, Malcata FX. 2007. Assessment of safety of enterococci isolated throughout traditional Terrincho cheesemaking: virulence factors and antibiotic susceptibility. *Journal of food protection*. 70(9): 2161-2167.
- Pisano MB, Fadda ME, Deplano M, Corda A, Cosentino S. 2006. Microbiological and chemical characterization of Fiore Sardo, a traditional Sardinian cheese made from ewe's milk. *International Journal of Dairy Technology*, 59(3): 171–179.
- Plessas S, Bosnea L, Alexopoulos A, Bezirtzoglou E. 2012. Potential effects of probiotics in cheese and yogurt production: A review. *Engineering in Life Sciences*. 12(4): 1-9.
- Produtos tradicionais portugueses [Internet]. [Acedido em 2021 Fev 1]. <http://tradicional.dgadr.pt/pt/>.
- Raposo A, Pérez E, Faria CT, Ferrús MA, Carrascosa C. 2017. Food spoilage by pseudomonas spp.—an overview. *Food borne pathogens and antibiotic resistance*. 41-58.
- Ray B. 2001. *Fundamental food microbiology*. Third Edition. Florida: CRC Press.
- Rao V, Rao LG. 2016. Antimicrobial Effect of Probiotics against Common Pathogens. In: *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*. Toronto: IntechOpen. Chapter 10. p. 191 – 221.
- Regulamento (UE) nº 1151/2012 de 21 de Novembro. Regimes de qualidade dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia* nºL343. Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia. Bruxelas.
- Reis PJM, Malcata FX. 2011. Current state of Portuguese dairy products from ovine and caprine milks. *Small Ruminant Research*. 101 (1-3): 122-133.
- Ribeiro SC, Coelho MC, Todorov SD, Franco BDGM, Dapkevicius MLE, Silva CCG. 2014. Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico cheese an artisanal cow's milk cheese. *Journal of applied microbiology*. 116(3): 573-585.
- Ribeiro SC, O'Connor PM, Ross RP, Stanton C, Silva CCG. 2016. An anti-listerial *Lactococcus lactis* strain isolated from Azorean Pico cheese produces lacticin 481. *International Dairy Journal*. 63: 18–28.

- Roberts D, Greenwood M. 2003. Enumeration of microorganisms. In: Practical food microbiology. Third Edition. Oxford: Blackwell. Chapter 5. p. 105-129.
- Rocha PAB. 2019. Characterization of bacteria isolated from Portuguese traditional cheeses. Dissertação de mestrado em Microbiologia Aplicada. Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa.
- Rocha PAB, Marques JM, Barreto AS, Semedo-Lemsaddek T. 2021. *Enterococcus* spp. from Azeitão and Nisa PDO-cheeses: Surveillance for antimicrobial drug resistance. *LWT*. 154: 112622.
- Rocha R, Velho MV, Santos J, Fernandes P. 2021. Serra da Estrela PDO Cheese Microbiome as Revealed by Next Generation Sequencing. *Microorganisms*. 9 (10): 2007.
- Rodríguez-Rojas A, Rodríguez-Beltrán J, Couce A, Blázquez J. 2013. Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *International Journal of Medical Microbiology*. 303(6-7): 293–297.
- Ruiz-Moyano S, Gonçalves dos Santos MTP, Galván AI, Merchán AV, González E, de Guía Córdoba M, Benito MJ. 2019. Screening of autochthonous lactic acid bacteria strains from artisanal soft cheese: probiotic characteristics and prebiotic metabolism. *LWT – Food Science and Technology*. 114: 108388.
- Russo N, Caggia C, Pino A, Coque TM, Arioli S, Randazzo CL. 2018. *Enterococcus* spp. in ragusano PDO and pecorino siciliano cheese types: a snapshot of their antibiotic resistance distribution. *Food and Chemical Toxicology*. 120: 277-286.
- Salque M, Bogucki PI, Pyzel J, Sobkowiak-Tabaka I, Grygiel R, Szmyt M, Evershed RP. 2013. Earliest evidence for cheese making in the sixth millenium bc in nothern Europe. *Nature*. 493(7433): 522 – 525.
- Santos MTPGD, Benito MJ, Córdoba MG, Alvarenga N, Herrera SRMS. 2017. Yeast community in traditional Portuguese Serpa cheese by culture-dependent and-independent DNA approaches. *International journal of food microbiology*. 262: 63-70.
- Saraiva J, Baptista P. 2003. Higiene Pessoal na indústria alimentar. Forvisão–consultoria em formação integrada, Guimarães. http://www.esac.pt/noronha/manuais/manual_1_hig.pessoal.pdf.
- Sant'Anna FM, Acurcio LB, Alvim LB, Castro RD, Oliveira LG, Silva AM, Nunes ÁC, Nicoli JR, Souza MR. 2017. Assessment of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Minas artisanal cheese produced in the Campo das Vertentes region, Brazil. *International Journal of Dairy Technology*. 70(4): 592-601.
- Sánchez-Hidalgo M, Maqueda M, Gálvez A, Abriouel H, Valdivia E, Martínez-Bueno M. 2003. The Genes Coding for Enterocin EJ97 Production by *Enterococcus faecalis* EJ97 Are Located on a Conjugative Plasmid. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(3): 1633–1641.
- Scharlab [Internet]. 2017. [acedido em 2021 Fev 9]. https://www.scharlabmagyarorszag.hu/katalogus/01-579_TDS_EN.pdf.

- Semedo T, Santos MA, Lopes MF, Marques JJF, Crespo MT, Tenreiro R. 2003. Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus?. *Systematic and applied microbiology*. 26(1): 13-22.
- Semedo T, Santos MA, Martins P, Lopes MFS, Marques JJF, Tenreiro R, Crespo MTB. 2003. Comparative Study Using Type Strains and Clinical and Food Isolates to Examine Hemolytic Activity and Occurrence of the Cyl Operon in Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(6):2569–76.
- Serio A, Paparella A, Chaves-López C, Corsetti A, Suzzi G. 2007. *Enterococcus* Populations in Pecorino Abruzzese Cheese: Biodiversity and Safety Aspects. *Journal of Food Protection*. 70(7): 1561–1568.
- 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(7): 459-464.
- Settanni L, Moschetti G. 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*. 27(6): 691-697.
- Soares-Santos V, Barreto AS, Semedo-Lemsaddek T. 2015. Characterization of Enterococci from Food and Food-Related Settings. *Journal of Food Protection*. 78(7): 1320–1326.
- Statista [Internet]. [Acedido em 2021 Set 20]. <https://www.statista.com/>.
- Suzzi G, Caruso M, Gardini F, Lombardi A, Vannini L, Guerzoni ME, Andrighetto C, Lanorte MT. 2000. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). *Journal of Applied Microbiology*. 89(2): 267-274.
- Templer SP, Baumgartner A. 2007. Enterococci from appenzeller and schabziger raw milk cheese: antibiotic resistance, virulence factors, and persistence of particular strains in the products. *Journal of food protection*. 70(2): 450-455.
- Torres C, Alonso CA, Ruiz-Ripa L, León-Sampedro R, Del Campo R, Coque TM. 2018. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. of animal origin. *Microbiology spectrum*. 6(4): 6-4.
- Touret T, Oliveira M, Semedo – Lemsaddek T. 2018. Putative probiotic lactic acid bacteria isolated from sauerkraut fermentations. *PLOS ONE*. 13 (9).
- Valenzuela AS, ben Omar N, Abriouel H, López RL, Veljovic K, Cañamero MM, Topisirovic MKL, Gálvez A. 2009. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control*. 20(4): 381-385.
- Van Duin D, Paterson DL. 2016. Multidrug-Resistant Bacteria in the Community. *Infectious Disease Clinics of North America*. 30(2): 377–390.
- Worthington RJ, Melander C. 2013. Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria. *Trends in Biotechnology*. 31(3): 177–184.
- Wu H-J, Wang AH-J, Jennings MP. 2008. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*. 12(1): 93–101.

- Yadav R, Shukla P. 2017. An overview of advanced technologies for selection of probiotics and their expediency: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57(15):3233-3242.
- Yeluri Jonnala BR, McSweeney PLH, Sheehan JJ, Cotter PD. 2018. Sequencing of the cheese microbiome and its relevance to industry. *Frontiers in microbiology*. 9: 1020.

ANEXOS

Anexo 1

Tabela 11 – Diâmetro dos halos de inibição (mm) dos 203 isolados em estudo sobre *Listeria monocytogenes*, pelo método *spot on lawn*.

BAL				<i>Enterococcus</i> spp.						<i>Lactococcus</i> spp.					
2016	H	2017	H	2016	H	2017	H	2019	H	2016	H	2017	H	2018	H
A1.3	7	A1.6	11	A1.4	3	A1.6	4,5	A1.1	4	A1.8	4	A1.5	0	A1.11	4
A1.4	4	A1.7	13	A1.20	3	A1.10	4	A1.2	4	A1.20	6	A1.9	0	A1.46	3
A1.6	4	A1.23	12	A1.33	4	A1.12	3	A1.6	4	A1.47	11	A1.10	0	A4.6	4
A1.34	5	A3.4	4	A1.38	4	A1.15	4	A1.7	0	A1.42	5	A1.18	0	A4.10	5
A1.38	6	A3.8	15	A1.40	4,5	A1.24	0	A1.9	10	A2.28	4	A1.20	0		
A2.7	6	A5.4	7	A1.47	0	A1.27	4	A1.10	0	A2.42	5	A1.22	0		
A2.27	4	A5.5	13	A1.64	4	A1.29	4	A1.17	4	A2.60	6,5	A2.1	0		
A2.42	4	A5.6	13	A2.37	3	A2.9	4	A1.20	4	A3.4	6	A2.6	0		
A2.56	5	A5.23	13	A2.48	4	A2.17	4,5	A1.33	3	A3.6	6,5	A2.12	0		
A3.14	5	A5.30	5	A3.4	3	A2.21	0	A2.7	4	A3.20	0	A2.15	0		
A3.18	6	N9.4	15	A3.10	4	A3.7	0	A2.18	11	A3.7	4	A2.17	0		
A3.23	4	N9.16	13	A3.34	4,5	A3.9	7	A2.20	12	A3.31	6	A2.21	0		
A3.30	6	N10.4	15	A3.45	0	A3.12	6,5	A2.21	0	A4.8	4,5	A3.11	0		
A3.35	4	N10.11	20	A3.64	0	A3.24	5,5	A2.25	10	A4.60	5	A3.17	0		
A4.9	5	N10.24	6	A4.5	4	A3.28	4	A3.2	8	A5.4	0	A4.2	0		
A4.28	4			A4.19	5	A4.4	3	A3.7	4	A5.8	4	A4.21	0		
A4.44	6			A4.28	4	A4.6	6	A3.12	0	A5.31	8	A4.42	0		
A4.45	5			A4.61	4	A4.15	4	A3.20	3	A5.56	4,5	A5.4	0		
A4.50	4			A5.2	4	A4.29	4	A3.30	3	N9.1	6	A5.9	0		

A5.17	3	A5.17	4	A5.1	4	A3.31	2	N9.8	7	A5.15	0
A5.19	8	A5.37	0	A5.12	3	A4.7	0	N9.14	6	A5.20	0
A5.26	5	A5.56	3	A5.18	6	A4.10	3	N9.48	7,5	N9.1	0
A5.27	4	N9.9	4	N9.3	4	A4.11	0	N10.7	6	N9.5	0
A5.39	4	N9.25	5	N9.10	8	A4.14	0	N10.17	6	N9.14	5
A5.55	5	N9.33	4	N9.16	8	A4.15	3	N10.56	6,5	N10.3	0
N9.4	5	N9.48	5	N9.17	6	A4.16	5			N10.24	0
N9.15	3	N10.7	4	N10.8	3	A4.21	0			N10.29	4
N9.16	9	N10.10	0	N10.14	0	A4.28	0				
N9.37	8	N10.19	4	N10.15	5	A4.31	0				
N9.44	9	N10.21	4	N10.16	0	N9.1	3				
N10.4	7	N10.46	6	N10.27	7	N9.22	0				
N10.15	17	N10.56	4			N10.14	4				
N10.16	5					N10.17	0				
N10.31	3					N10.26	0				
N10.36	3										

Legenda: H – diâmetro do halo de inibição em milímetros.

Anexo 2

Tabela 12 – Perfil de resistência a antibióticos de 43 isolados de BAL, *Enterococcus* spp. e *Lactococcus* spp..

		AMP	AUG	C	CIP	CN	DA	E	K	LEV	LZD	QD	S	TE	TEC	VA
BAL	2016	A1.3	S/I	S/R		R/R	S/I	S/I	R/R				R/R	R/T		S/S
		A2.7	S/I	S/I		S/I	R/R	S/I	I/S				R/R	R/R		S/S
		A3.14	S/I	S/I		R/R	S/I	S/I	I/S				R/R	R/R		S/S
		A4.44	S/I	S/I		R/I	I/R	S/I	I/S				R/R	R/R		S/S
		A5.19	S/I	S/I		R/R	I/R	S/I	S/S				R/R	R/R		S/S
		N9.16	S/I	R/R		S/I	S/I	S/S	S/S				R/R	S/I		R/R
	2017	N10.15	S/I	R/R		R/I	S/I	S/I	R/R				R/R	S/I		R/R
		A1.7	S/R	S/R		S/I	S/I	S/I	R/R				S/S	S/I		R/R
		A3.8	S/I	S/I		S/I	S/S	S/I	R/R				I/S	S/S		R/R
		A5.23	S/R	S/I		R/R	S/I	S/I	R/R				R/R	S/I		R/R
		N9.4	S/S	S/S		S/I	S/I	S/S	R/R				R/R	I/R		R/R
<i>Enterococcus</i> spp.	2016	A1.40	S/-	S/S	S/-	S/S	S/S	S/-		S/-	S/-	R/R	S/S	R/-	S/S	S/-
		A2.48	S/-	S/S	S/-	S/S	S/S	S/-		S/-	S/-	S/R	S/R	R/-	S/S	I/-
		A3.34	S/-	S/S	S/-	S/S	S/S	I/-		S/-	S/-	I/R	S/R	R/-	S/S	I/-
		A4.19	S/-	S/S	S/-	R/R	S/S	I/-		S/-	S/-	I/R	S/S	R/-	S/S	I/-
		A5.17	S/-	S/S	R/-	S/S	S/S	S/-		R/-	S/-	I/R	S/S	R/-	S/S	I/-
		N9.25	S/-	S/S	R/-	S/S	R/R	I/-		S/-	R/-	I/R	S/R	R/-	S/R	R/-
	2017	N10.46	S/-	S/S	S/-	S/S	S/S	S/-		S/-	S/-	I/R	S/S	R/-	S/S	S/-
		A1.6	S/-	S/S	S/-	S/S	S/S	S/-		S/-	S/-	S/R	S/S	S/-	S/S	S/-
		A2.17	S/-	S/S	S/-	S/S	S/S	I/-		S/-	S/-	R/R	S/R	R/-	S/S	S/-
		A3.9	S/-	S/S	S/-	I/S	S/S	I/-		I/-	I/-	I/R	S/R	S/-	S/R	R/-
		A4.6	S/-	S/S	S/-	S/S	S/S	S/-		S/-	S/-				S/S	S/-
		A5.18	S/-	S/S	R/-	I/S	S/S	R/-		S/-	S/-	R/R	R/R	R/-	S/R	R/-
	2019	N9.10	S/-	S/S	I/-	I/S	S/S	I/-		S/-	S/-	S/S	S/S	R/-	S/S	S/-
		N10.27	S/-	S/S	S/-	I/S	S/S	I/-		S/-	S/-	S/S	S/S	S/-	S/S	S/-
		A1.9	S/-	R/R	R/-	R/R	S/S	R/-		I/-	S/-	R/R	S/R	R/-	I/R	R/-
		A2.20	S/-	S/S	S/-	I/S	S/S	I/-		I/-	I/-	I/R	R/R	R/-	S/R	R/-
		A3.2	S/-	S/S	S/-	I/S	S/S	I/-		S/-	S/-	R/R	S/R	R/-	I/R	R/-
		A4.16	S/-	S/S	S/-	I/S	S/S	I/-		S/-	S/-	R/R	S/R	S/-	S/R	I/-
<i>Lactococcus</i> spp.	2016	N9.1	S/-	S/S	R/-	I/S	S/S	R/-		S/-	S/-	R/R	S/R	R/-	S/R	I/-
		N10.14	R/-	S/S	S/-	I/S	S/S	I/-		S/-	R/-	I/R	S/S	S/-	S/S	I/-
		A1.47	S/R		R/R		R/S	S/R	R/R				R/R	S/I		S/S
		A3.6	S/I		S/I		S/S	S/R	R/R				R/R	S/I		S/S
	2017	A5.31	S/R		S/R		R/R	R/R	R/R				R/R	R/R		R/S
		N9.48	S/I		S/R		S/S	S/R	R/R				R/R	S/I		S/S
		N9.14	S/I		S/I		R/R	R/R	R/R				R/R	S/I		S/I
		N10.29	S/I		S/R		S/I	S/I	R/R				R/R	S/I		S/S
	2018	A1.11	S/I		S/S		S/S	S/R	S/S				S/S	S/I		R/R
		A4.10	S/I		S/I		S/S	S/S	R/R				S/S	S/I		R/R

Legenda: CLSI/ EUCAST para *Enterococcus* spp. e Charteris/Touret para BAL e *Lactococcus* spp.. AMP – ampicilina; AUG - amoxicilina/ácido clavulânico; C – cloranfenicol; CIP – ciprofloxacina; CN – Gentamicina; DA – clindamicina; E – eritromicina; K – canamacina; LEV – Levofloxacina; LZD – Linezolide; QD – Quinupristina/ Dalfoprostina; S – estreptomicina; TE – Tetraciclina; TEC – teicoplanina; VA – vancomicina. S – Sensível; I – Intermédio; R – Resistente.

Anexo 3

Tabela 13 – Compilação dos vários estudos realizados para os 43 isolados.

			Potencial tecnológico					Potencial probiótico		Potencial de patogenicidade		
			Capacidade de acidificação do leite	Capacidade lipolítica	Capacidade proteolítica (mm)	Diferentes [NaCl]	Diferentes temperaturas	Bílis 0,5% (p/v)	Potencial antimicrobiano (mm)	Capacidade gelatinolítica (mm)	Capacidade hemolítica	Fenótipo de resistência
BAL	2016	A1.3	5	-	-	+++	+++	+	7	-	α	C - CN - K - S - TE
		A2.7	5	-	-	+++	+++	+	6	-	α	DA - S - TE
		A3.14	5	-	-	+++	+++	+	5	-	α	CN - S - TE
		A4.44	5	-	-	+++	+++	+	6	-	λ	CN - DA - S - TE
		A5.19	5	-	-	+++	+++	-	8	-	α	CN - DA - S - TE
		N9.16	5	+	+	+++	+++	+	9	-	α	C - K - S - VA
		N10.15	5	+	+	+++	+++	+	17	-	α	C - CN - K - S - VA
	2017	A1.7	5	+	+	+++	+++	+	13	-	α	AMP - C - K - VA
		A3.8	5	-	-	+++	+++	++	15	-	λ	K - VA
		A5.23	5	-	-	+++	+++	++	13	-	α	AMP - CN - K - S - VA
		N9.4	5	+	+	+++	+++	++	15	-	α	K - S - VA
		N10.11	5	-	+	+++	++	+	20	-	α	X
Enterococcus spp.	2016	A1.40	6	-	+	+++	+++	+++	4,5	-	α	QD - TE
		A2.48	5	-	+	+++	+++	+++	4	-	α	QD - S - TE
		A3.34	5	-	+	+++	+++	+++	4,5	-	α	QD - S - TE
		A4.19	5	-	+	+++	+++	+++	5	-	α	CIP - QD - TE
		A5.17	5	-	+	+++	+++	+++	4	-	α	C - LEV - QD - TE
		N9.25	5	-	+	+++	+++	+++	5	-	α	C - CN - LZD - QD - S - TE - TEC - VA
		N10.46	5	-	+	+++	+++	+++	6	-	α	QD - TE
	2017	A1.6	5	+	+	+++	+++	+++	4,5	-	α	QD

		A2.17	5	+	+	+++	+++	+++	4,5	-	α	QD - S - TE
		A3.9	5	+	+	+++	+++	+++	7	-	α	QD - S - TEC - VA
		A4.6	6	-	+	+++	+++	+++	6	-	α	-
		A5.18	5	+	+	+++	+++	+++	6	-	α	C - E - QD - S - TE - TEC - VA
		N9.10	5	-	+	+++	+++	+++	8	-	α	TE
		N10.27	5	-	+	+++	+++	+++	7	-	α	-
	2019	A1.9	5	+	+	+++	+++	+++	10	10	α	AUG - C - CIP - E - QD - S - TE - TEC - VA
		A2.20	5	+	+	+++	+++	+++	12	-	α	QD - S - TE - TEC - VA
		A3.2	6	+	14	+++	+++	+++	8	17	α	QD - S - TE - TEC - VA
		A4.16	5	-	13	+++	+++	+++	5	20	β	QD - S - TEC
		N9.1	5	-	+	+++	+++	+++	3	-	β	C - E - QD - S - TE - TEC
		N10.14	5	-	+	+++	+++	+++	4	-	α	AMP - LZD - QD
<i>Lactococcus</i> spp.	2016	A1.47	5	-	+	+++	+++	+++	13	-	λ	AMP - C - CN - DA - E - K - S
		A2.60	5	+	-	X	X	X	7	-	X	X
		A3.6	5	-	-	+++	+++	+++	6,5	-	α	DA - E - K - S
		A4.60	5	-	-	X	X	X	5	-	X	X
		A5.31	6	-	-	+++	+++	+++	8	-	α	AMP - C - CN - DA - E - K - S - TE - VA
		N9.48	5	-	-	+++	+++	+++	7,5	-	β	C - DA - E - K - S
		N10.56	6	-	-	X	X	X	6,5	-	X	X
	2017	N9.14	5	-	+	+++	+++	+++	5	-	α	CN - DA - E - K - S
		N10.29	6	-	-	+++	+++	+++	4	-	α	C - E - S
	2018	A1.11	6	+	-	+++	+++	+	4	-	α	DA - VA
		A4.10	6	+	+	+++	+++	+	5	-	α	K - VA

Legenda: amarelo – isolados selecionados para avaliação do potencial probiótico; vermelho – isolados β -hemolíticos; verde – isolados com halo de inibição superior a 10 mm e isolados positivos na capacidade lipolítica e proteolítica. X - Existiu algum problema na multiplicação do isolado; para a capacidade gelatinolítica, lipolítica e proteolítica: - negativo; + positivo; para bilis, diferentes concentrações NaCl e temperaturas: + atividade fraca; ++ atividade intermédia; +++ atividade forte. AMP – ampicilina; AUG - amoxicilina/ácido clavulânico; C – cloranfenicol; CIP – ciprofloxacina; CN – Gentamicina; DA – clindamicina; E – eritromicina; K – canamacina; LEV – Levofloxacina; LZD – Linezolid; QD - Quinupristina/ Dalfoprostina; S – estreptomicina; TE – Tetraciclina; TEC – teicoplanina; VA – vancomicina. Azul - isolados considerados resistentes segundo EUCAST (2021); Laranja – isolados considerados resistentes segundo Touret et al. (2018). Preto – isolados considerados resistentes segundo EUCAST (2021) e CLSI (2016) para enterococos e segundo Charteris et al. (1998) e Touret et al. (2018) para BAL e lactococos; Verde – isolados considerados resistentes segundo Charteris et al. (1998); Vermelho - isolados considerados resistentes segundo CLSI (2016).

Anexo 4

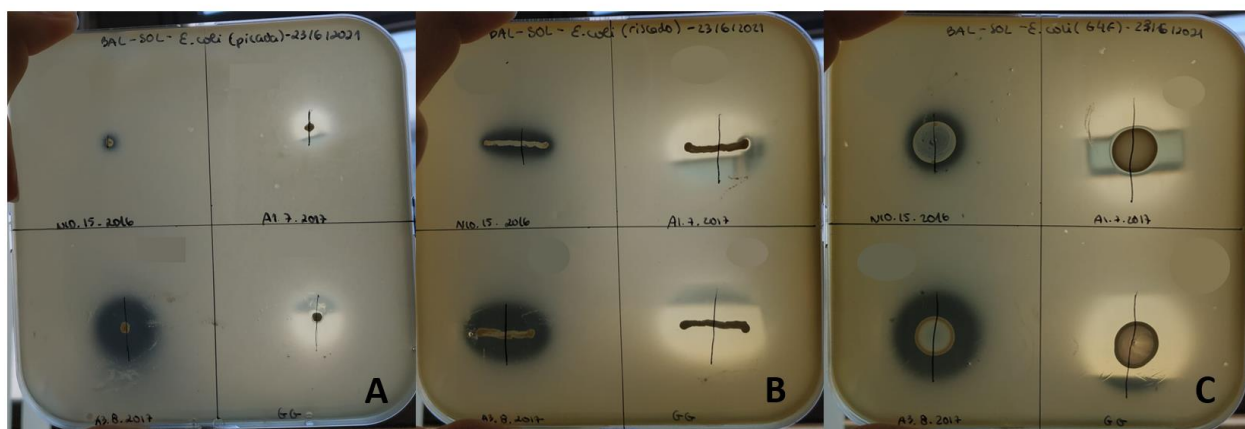


Figura 12 - Exemplo de halos de inibição obtidos pelo método *spot on lawn* por picada (A), riscado (B) e gota (C).

