



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS ENGENHARIAS E CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CECA
UNIDADE EDUCACIONAL VIÇOSA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

EMMYLLY VICTÓRIA GOMES DE LIMA
GUILHERME VALERIANO SILVA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA CONTRA
MICROORGANISMOS ISOLADOS DE QUEIJO COALHO COMERCIALIZADO EM
ALAGOAS**

VIÇOSA-AL
2022

**EMMYLLY VICTÓRIA GOMES DE LIMA
GUILHERME VALERIANO SILVA**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA CONTRA
MICROORGANISMOS ISOLADOS DE QUEIJO COALHO COMERCIALIZADO EM
ALAGOAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao corpo docente do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Alagoas - UFAL, *Campus* CECA, como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientador(a): Prof. Dr.^a Karla Patrícia Chaves da Silva

Folha de Aprovação

EMMYLLY VICTÓRIA GOMES DE LIMA
GUILHERME VALERIANO SILVA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS PRÓPOLIS VERDE E VERMELHA CONTRA MICROORGANISMOS ISOLADOS DE QUEIJO COALHO COMERCIALIZADO EM ALAGOAS

Trabalho de conclusão de curso
submetido ao corpo docente do curso
de Medicina Veterinária da
Universidade Federal de Alagoas -
UFAL, *Campus* CECA, Unidade
Educativa Viçosa e aprovado em
21/12/2022.



Documento assinado digitalmente

KARLA PATRICIA CHAVES DA SILVA

Data: 02/01/2023 10:09:44-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Orientadora: Prof. Dr.^a Karla Patrícia Chaves da Silva
(Universidade Federal de Alagoas)

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente

JULICELLY GOMES BARBOSA MACEDO

Data: 30/12/2022 11:44:22-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Examinadora Interna: Prof^a Dr.^a Julicelly Gomes Barbosa
(Universidade Federal de Alagoas)



Documento assinado digitalmente

MAYARA DE LIMA COSTA

Data: 29/12/2022 17:07:24-0300

Verifique em <https://verificador.iti.br>

Examinadora Externa: Med. Vet. Mayara de Costa Lima
(Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - UFAL)

DEDICATÓRIA
EMMYLLY VICTÓRIA GOMES DE LIMA

Dedico

A minha mãe Malú e a minha irmã Ellen, mulheres de força, valor e coragem, grandes incentivadoras e apoiadoras dos meus estudos e sonhos, meus maiores exemplos de caráter, honestidade e bondade.

A minha avó amada Helena (*in memorian*), que tanto me ensinou e aconselhou com sua sabedoria e paciência, e ao meu pai do coração Abel (*in memorian*). Ambos foram exemplos de amor à vida e de força em tempos difíceis. Sei o quanto estariam felizes em me ver crescer como ser humano e profissional.

Gratidão por tanto.

DEDICATÓRIA
GUILHERME VALERIANO SILVA

Dedico este trabalho à minha família, em especial minha querida Avó (*in memoriam*), se hoje estou concluindo o curso muito se deve ao incentivo que recebi dela. Que ela esteja feliz e orgulhosa. Dona Vera à senhora, todo meu amor e gratidão, para sempre!

AGRADECIMENTOS

EMMYLLY VICTÓRIA GOMES DE LIMA

Expresso meus sinceros agradecimentos,

A Deus, pela proteção, paciência e força a mim concedidos, e por me guiar pelo caminho do bem.

A mim, por ter superado tantos desafios e não ter desistido dos meus sonhos.

A minha família, principalmente à minha mãe e irmã, por nunca me deixarem desistir e serem minhas maiores incentivadoras, por me ensinarem a ser mais humana e a ter princípios éticos. Gratidão por todo amor, cuidado, preocupação, bondade, apoio, paciência e compreensão. Sem vocês nada disso seria possível.

A minha amada Izabelly, por ser meu porto seguro, pelo o apoio, amor e afeto em todas as fases.

As minhas tias Maria e Solange, e à minha querida Sandreana pelo incentivo.

A minha orientadora e mãe científica, a quem tenho infinita admiração, Prof^a Dr.^a Karla Patrícia, por toda paciência, apoio, conselhos e ensinamentos compartilhados durante a execução deste projeto e de tantos outros.

A todos que fizeram parte da construção deste trabalho direta ou indiretamente (Izabelly Gonçalves, Mariana Soares, Mayara Costa, Guilherme Valeriano, Ferlane, e equipe do laboratório de Doenças Infectocontagiosas da UFAL-Viçosa). Aos amigos de lab Guilherme, Lylían e Helô pelos momentos como membros da minha colônia laboratorial desde os primórdios.

Aos meus amigos Caio Moura e Stephanie Maiane por serem presentes, me escutarem e me apoiarem tanto. A minha amiga Ana Paula Félix por cuidar de mim em tantos momentos, pela escuta e abraços de conforto. Aos amigos que fiz na graduação e em Viçosa por tudo que vivemos, vocês são importantes para mim.

Gratidão e respeito a todos os docentes, em especial aos professores Wilson Porto, Danillo Pimentel, Jonatas Campos e Julicelly Barbosa, aos técnicos, aos colaboradores da Unidade de Ensino Viçosa e demais médicos veterinários que participaram e contribuíram de alguma forma para a minha formação.

Gratidão aos animais que tanto me proporcionam conhecimento todos os dias. Sem eles a medicina veterinária não seria possível.

E por fim, meu carinho e gratidão a todos que torceram por essa conquista.

AGRADECIMENTOS

GUILHERME VALERIANO SILVA

Agradeço a Deus por ter sido meu guia nessa trajetória. Aos meus familiares. Minha avó Verônica Nunes Valeriano, *in memoriam*, pelo amor, pelo incentivo, pelo esforço e sabedoria compartilhada. Meu avô Francisco Valeriano da Silva pelo exemplo de honestidade e hombridade. Minha mãe Kelmanny Kelly Valeriano Nunes por ser minha melhor amiga, responsável pelos melhores conselhos. Aos demais familiares, meu padrasto Flávio, meu tio Jony, minha tia Hellen e minha sobrinha Helena. À minha namorada Julyanna, que tem me apoiado de todas as formas no momento mais difícil da minha vida. Aos amigos que dividiram o fardo das tristezas e o prazer das alegrias durante essa caminhada, minha eterna gratidão à Ana Paula, Keityane, Maria Leda, Carolina, Witley, Felipe e Emmylly. Às pessoas que tive o prazer de conhecer e que foram importantes em determinado momento, Laís e Lylian em especial. Aos professores da Universidade Federal de Alagoas, em especial os Prof Dr. Diogo Ribeiro Câmara, Prof. Wilson Porto, Prof Dr. Danillo Pimentel e à minha orientadora Prof. Dra. Karla Patrícia. À Universidade Federal de Alagoas. Aos grandes amigos de Arapiraca que sempre foram incentivadores, Samuel, Guilherme Luis, Daniel, Matheus e a minha comadre Vânia.

Aos que não foram citados, mas de alguma forma contribuíram nesta etapa da minha vida.

Muito obrigado!

RESUMO

Objetivou-se neste estudo isolar e identificar bactérias do gênero *Staphylococcus* spp., da família *Enterobacteriaceae* e fungos do gênero *Candida* spp. de amostras de queijo coalho comercializados em Alagoas. Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica frente aos antimicrobianos convencionais e do extrato hidroalcoólico das própolis verde e vermelha alagoanas. Foram obtidas oito amostras de queijo coalho comercializados em supermercados nas regiões do estado de Alagoas, mais especificamente de Maceió, Região Metropolitana e Sertão. As amostras foram obtidas e encaminhadas sob refrigeração, em caixas isotérmicas ao Laboratório de Microbiologia e Doenças Infecciosas de Medicina Veterinária localizado na Universidade Federal de Alagoas (UFAL). As amostras foram processadas no pré-enriquecimento não seletivo em água peptonada e posteriormente para isolamento das colônias bacterianas e fúngicas foram utilizados Plate Count Agar (PCA), Ágar sangue, MacConkey, Cetrimide e Candida. As colônias isoladas foram classificadas de acordo com suas características fenotípicas. Após a identificação das bactérias e fungos, foram realizados os testes de sensibilidade antimicrobiana *in vitro*. Obtiveram-se os extratos hidroalcoólicos de própolis *in natura* verde e vermelha que possuíam em sua composição álcool neutro (grau alimentício) em uma concentração de 59%, água em concentração de 30% e própolis *in natura* verde e vermelha na concentração de 11%. Realizou-se os testes através da técnica de disposição dos discos de antimicrobianos em meio Ágar Mueller Hinton. O queijo coalho comercializado no estado de Alagoas, está contaminado por microrganismos de grande importância, produtores de potentes toxinas e com capacidade de desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos. A detecção de microrganismos de origem fecal nos queijos, acende um alerta para os erros e contaminação do produto no processo de produção, transporte ou armazenamento. O consumo desses queijos é um risco para a saúde humana. Os antibióticos indicados para tratamento de infecção de origem alimentar, causada pelo consumo de queijo coalho, são meropenem e norfloxacina. Também observa-se um nível de resistência, no geral, elevado aos antibióticos, o que é um risco para a saúde pública. Os extratos das própolis verde e vermelha são promissores antimicrobianos.

Palavras-chave: *Candida* spp, *Enterobacteriaceae*, queijo coalho, saúde única, antibiograma e antifungograma.

ABSTRACT

The objective of this study was to isolate and identify bacteria of the genus *Staphylococcus* spp, of the *Enterobacteriaceae* family and fungi of the genus *Candida* spp from samples of coalho cheese sold in Alagoas. Evaluate the antibacterial and antifungal activity compared to conventional antimicrobials and the hydroalcoholic extract of green and red propolis from Alagoas. Eight samples of coalho cheese sold in supermarkets in regions of the state of Alagoas were obtained, more specifically in Maceió, Metropolitan Region and Sertão. The samples were obtained and sent under refrigeration, in isothermal boxes to the Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases of Veterinary Medicine located at the Federal University of Alagoas (UFAL). The samples were processed in non-selective pre-enrichment in peptone water and later for isolation of bacterial and fungal colonies Plate Count Agar (PCA), Blood Agar, MacConkey, Ceftrimide and *Candida* were used. Isolated colonies were classified according to their phenotypic characteristics. After identifying the bacteria and fungi, *in vitro* antimicrobial sensitivity tests were performed. The hydroalcoholic extracts of green and red propolis *in natura* were obtained with neutral alcohol (food grade) in a concentration of 59%, water in a concentration of 30% and green and red propolis *in natura* as concentration of 11%. These tests were performed using the technique of placing antimicrobial discs in Mueller Hinton Agar medium. The coalho cheese marketed in the state of Alagoas is contaminated by microorganisms of great importance, producers of potent toxins and capable of developing resistance to antimicrobials. The detection of microorganisms of fecal origin in cheese samples generates an alert for errors and contamination of the product in the production, transport or storage process. The consumption of these cheeses is a risk to human health. The antibiotics indicated for the treatment of food-borne infections caused by the consumption of coalho cheese are meropenem and norfloxacin. There is also a generally high level of resistance to antibiotics, which is a risk to public health. Green and red propolis extracts are promising antimicrobials.

Keywords: *Candida* spp, *Enterobacteriaceae*, Coalho Cheese, Single Health, Antibiogram, Antifungigram.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Amostras de queijo coalho em água peptonada em incubação na estufa bacteriológica.....	17
Figura 2 - Amostras de queijo coalho semeadas em Placas de Petri contendo Ágar MacConkey, Ágar Sangue e Ágar Candida sendo incubadas em estufa bacteriológica.....	18
Figura 3 - Isolados bacterianos e fúngicos oriundos de queijos coalho em caldo BHI prontos para incubação.....	18
Figura 4 - Microscopia de <i>Staphylococcus</i> spp. isolado de amostra de queijo coalho e corado pela técnica de Gram.....	21
Figura 5 - <i>Candida</i> spp. isolados de amostras de queijo coalho. A: Crescimento de colônias de <i>Candida</i> spp. em meio ágar candida; B: microscopia de <i>Candida</i> spp. isolada de amostra de queijo coalho.....	22
Figura 6 - Placa de antibiograma após 24 horas de incubação contendo discos de antibióticos e seus halos de inibição bacteriana.....	24
Figura 7 - Placa com discos de própolis verde e vermelha mostrando halos de inibição bacteriana.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Frequência da sensibilidade das bactérias isoladas de queijo coalho comercializados em Maceió, região Metropolitana e Sertão de Alagoas frente aos antimicrobianos convencionais e frente aos extratos de própolis verde e vermelha.....	25
Tabela 2 - Frequência da sensibilidade a antimicrobianos de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas de queijo coalho comercializados em Maceió, região Metropolitana e Sertão de Alagoas	25
Tabela 3 - Frequência da sensibilidade a antimicrobianos de <i>Enterobacteriaceae</i> isoladas de queijo coalho comercializados em Maceió, região Metropolitana e Sertão de Alagoas.....	26
Tabela 4 - Medida de halos (mm) de própolis verde e vermelha na inibição do crescimento de <i>Candida</i> spp.....	27
Tabela 5 - Frequência da sensibilidade e resistência fúngica frente aos extratos de própolis verde e vermelha.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI - Brain Heart Infusion

PCA - Plate Count Agar

UFAL - Universidade Federal de Alagoas

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - Graus Celsius

g - Grama

µg - Micrograma

mcg - Micrograma

µl - Microlitro

ml - Mililitro

mm - Milímetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1. Materiais e métodos.....	17
2.1.1 Obtenção e processamento do queijo coalho.....	17
2.1.2 Identificação bacteriana e fúngica.....	18
2.1.3 Própolis verde e vermelha.....	19
2.1.4 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	19
2.1.5 Avaliação da atividade antifúngica.....	19
2.2. Resultados e discussão.....	21
3. CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

O queijo coalho é um produto típico da região nordeste, faz parte dos hábitos alimentares da população local e sua produção representa uma atividade de importância econômica e social (NASSU; MACEDO; LIMA, 2006). Define-se por queijo coalho o queijo obtido pela coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas, e comercializado normalmente com até 10 dias de fabricação (BRASIL, 2001). Boa parte da produção desse alimento é proveniente da fabricação artesanal em propriedades rurais de pequeno porte, pequenas e médias indústrias onde as boas práticas de fabricação muitas vezes são negligenciadas, gerando um produto de baixa qualidade higiênico-sanitária que pode veicular microrganismos patogênicos ao consumidor (FERREIRA et al., 2008; SILVA et al., 2014; ARAÚJO, 2017).

A contaminação do queijo pode ocorrer através do uso de matéria-prima inadequada, como o leite cru, utensílios não higienizados, do ambiente de processamento e acondicionamento inadequado (BORGES, 2008; DE OLIVEIRA et al., 2020). Dentre os principais microrganismos contaminantes estão as bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. e da família *Enterobacteriaceae* (TEIXEIRA, 2010; SANTOS, 2019). Microrganismos como fungos também podem ser responsáveis pela contaminação de queijos, principalmente os fungos do gênero *Candida* spp., que foi relatado em tanques de refrigeração e latões de propriedades leiteiras (MELVILLE et al., 2022), em amostras de queijo minas frescal e queijo coalho (SILVA, 2003; ALMEIDA, 2011), e em de queijos produzidos na Serra da Canastra-MG (SILVA, 2020),

Os produtos naturais possuem ampla aplicação terapêutica por apresentarem atividade antimicrobiana e antifúngica frente a diferentes microrganismos e por serem uma alternativa para o tratamento de inúmeras doenças infecciosas (SCHMITT et al., 2011 e PINTO; PRADO; CARVALHO, 2011).

A própolis é uma mistura de substâncias que as abelhas coletam de diferentes partes das plantas e depositam em seus ninhos, objetivando vedar as entradas da colméia (DAUGSCH et al, 2008; LOTTI et al.,2010). A composição da própolis é um reflexo direto das características fitogeográficas presentes ao redor da colméia (RUSSO et al., 2002), variando de acordo com a flora e sazonalidade regional, o que pode influenciar em suas atividades farmacológicas e potencial de ação (SFORCIN et al., 2000; KUMAZAWA et al., 2004). Existem 13 diferentes tipos de própolis

catalogadas no Brasil, sendo esta variação decorrente da biodiversidade e das dimensões geográficas do país (DAUGSCH et al., 2008).

A própolis verde é considerada a mais comum, porém em 2005 foi descoberta a própolis vermelha e desde então diversos estudos têm indicado um grande potencial terapêutico, destacando-se as atividades antiinflamatória, antimicrobiana e antioxidante (FROZZA et al., 2013). Quando se avalia a atividade antibacteriana da própolis vermelha, verifica-se que o extrato obtido das regiões brasileiras possui melhor ação biológica em comparação aos resultados obtidos com extratos norte-americanos (BASTOS et al., 2008). A própolis vermelha brasileira da região Nordeste apresenta atividade antimicrobiana frente à espécie bacteriana *Staphylococcus aureus*, em concentrações próximas a 2,5 µg/ml (DAUGSCH et al., 2008). Vários medicamentos com ação antifúngica para o tratamento de doenças causadas pela *Candida* spp. encontram-se no mercado, dentre estes os mais utilizados são fluconazol, itraconazol e nistatina. Entretanto, o uso da própolis como medicamento pode ser uma alternativa aos demais tratamentos.

Portanto, avaliar a capacidade deste produto em eliminar bactérias e fungos presentes em alimentos é importante para comprovar seus efeitos benéficos e adotar medidas para seu uso na rotina, uma vez que os antibióticos e antifúngicos naturais apresentam efeitos colaterais e oferecem riscos de resistência microbiana.

Objetivou-se neste estudo isolar e identificar bactérias do gênero *Staphylococcus* spp, da família *Enterobacteriaceae* e fungos do gênero *Candida* spp de amostras de queijo coalho comercializados em Alagoas. Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica frente aos antimicrobianos convencionais e do extrato hidroalcoólico das própolis verde e vermelha alagoanas.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1 Obtenção e processamento do queijo coalho

Foram obtidas oito amostras de queijo coalho, escolhidas aleatoriamente, comercializados em supermercados nas regiões do estado de Alagoas, mais especificamente de Maceió, Região Metropolitana e Sertão. As amostras foram coletadas em suas embalagens originais, mantidas refrigeradas em caixas isotérmicas e transportadas ao Laboratório de Microbiologia e Doenças Infecciosas de Medicina Veterinária localizado na Universidade Federal de Alagoas (UFAL) - Unidade Educacional Viçosa.

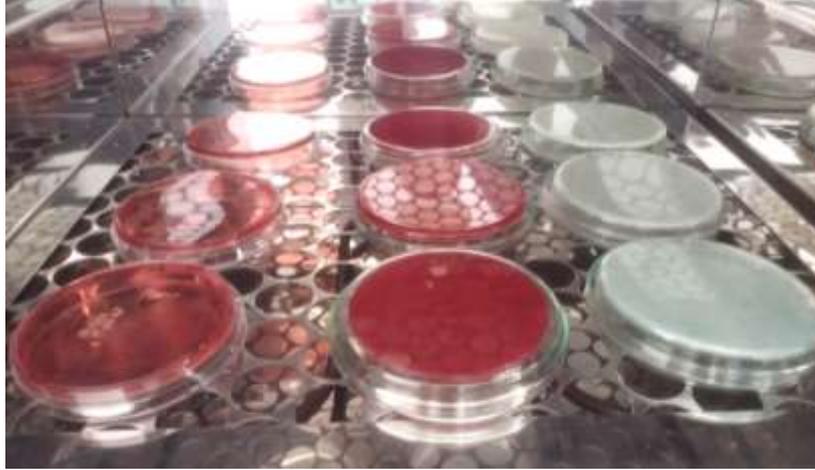
De cada amostra de queijo coalho foram pesadas 25g, adicionadas a 225ml de água peptonada e incubadas em estufa bacteriológica (Figura 1) por 24 horas a 37°C. Após esse período, foi semeado por esgotamento com alça de platina 0,1 ml desta solução em placas de Petri contendo os meios de cultura Plate Count Agar (PCA), Agar sangue, MacConkey, Cetrimide e Candida, posteriormente, as placas semeadas foram incubadas em estufa bacteriológica (Figura 2) por até 48 horas a 37°C para o isolamento dos agentes bacterianos e fúngicos.

Figura 1: Amostras de queijo coalho em água peptonada em incubação na estufa bacteriológica



Fonte: arquivo pessoal.

Figura 2: Amostras de queijo coalho semeadas em Placas de Petri contendo Ágar MacConkey, Ágar Sangue e Ágar Candida sendo incubadas em estufa bacteriológica.



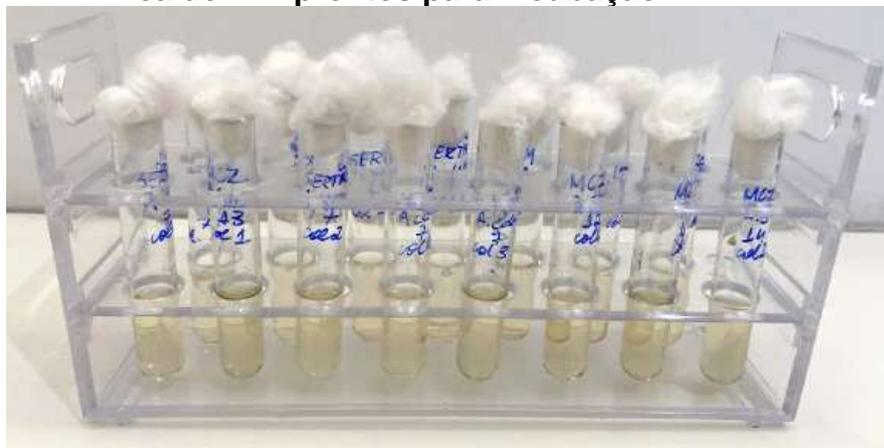
Fonte: arquivo pessoal.

2.1.2 Identificação bacteriana e fúngica

A identificação dos agentes foi realizada pela técnica de coloração de Gram e características morfológicas, tintoriais e fenotípicas seguindo a metodologia de Koneman et al. (2008).

Os espécimes bacterianos e fúngicos isolados e identificados foram inoculados em caldo Brain Heart Infusion- BHI (Figura 3), incubados a 37°C por 24 horas e utilizados para realização dos testes de sensibilidade.

Figura 3: Isolados bacterianos e fúngicos oriundos de queijos coalho em caldo BHI prontos para incubação.



Fonte: arquivo pessoal.

2.1.3 Própolis verde e vermelha

Os extratos hidroalcoólicos comerciais de própolis verde e vermelha *in natura* possuíam em sua composição álcool neutro (grau alimentício) em uma concentração de 59%, água em concentração de 30% e própolis verde e vermelha *in natura* na concentração de 11%.

O volume das frações bioativas da própolis verde e vermelha foram testados utilizando discos de papel filtro de 6mm esterilizados em autoclave, onde foram aplicados 30 µL de própolis verde e vermelha em cada disco, posteriormente foram colocados em estufa de circulação de ar contínuo a 37°C por 30 minutos para secagem e evaporação do álcool neutro.

2.1.4 Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana da própolis vermelha e verde foi realizada pelo método de difusão de discos em Ágar. As amostras foram semeadas em placas de Petri contendo meio Ágar Mueller Hinton. Os discos de papel filtro foram colocados na superfície do ágar e as placas incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Foram considerados sensíveis à própolis os espécimes nos quais não se observaram crescimento ao redor do disco no meio de cultura e os halos que se formaram foram medidos em milímetros para análise dos resultados.

Também foi utilizado, para efeito de avaliação e comparação, oito antibióticos, sendo eles: cloranfenicol 30 mcg, norfloxacin 10 mcg, cefalotina 30 mcg, cefadroxil 30 mcg, penicilina, meropenem, amoxicilina com ácido clavulânico 30 mcg e tetraciclina 30 mcg, dispostos de forma equidistante em cada placa contendo meio Ágar Mueller Hinton. As amostras foram incubadas a 37°C por 24 horas, após esse período realizou-se a medição dos halos de inibição.

2.1.5 Avaliação da atividade antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica da própolis verde e vermelha foi realizada pelo método de difusão em Ágar, onde as amostras foram semeadas em placas de Petri contendo meio ágar Mueller Hinton e Ágar sangue e posteriormente incubadas a 37°C por 24 horas. Foram considerados sensíveis à própolis os espécimes nos quais

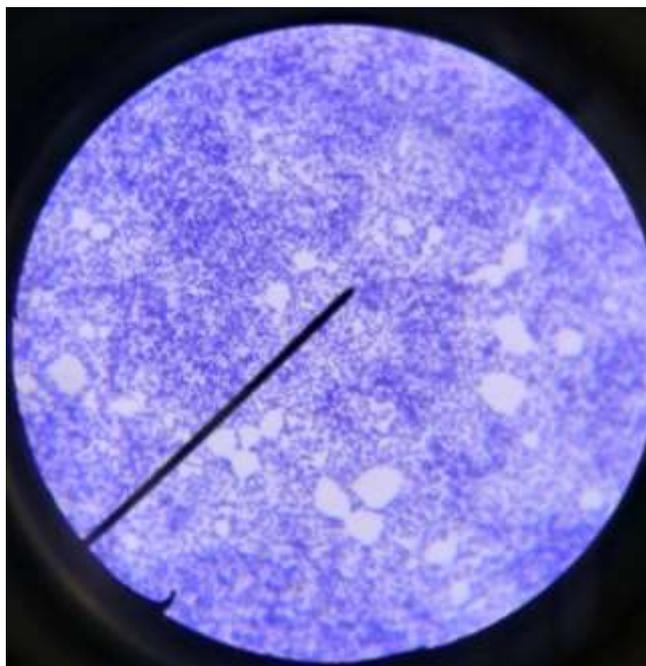
não se observaram crescimento ao redor do disco no meio de cultura e os halos que se formaram foram medidos em milímetros para análise. Halos acima de 6mm foram considerados sensíveis à própolis, de acordo com Glehn e Rodrigues (2012).

Os resultados foram analisados com base no estudo de frequências relativas e absolutas.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

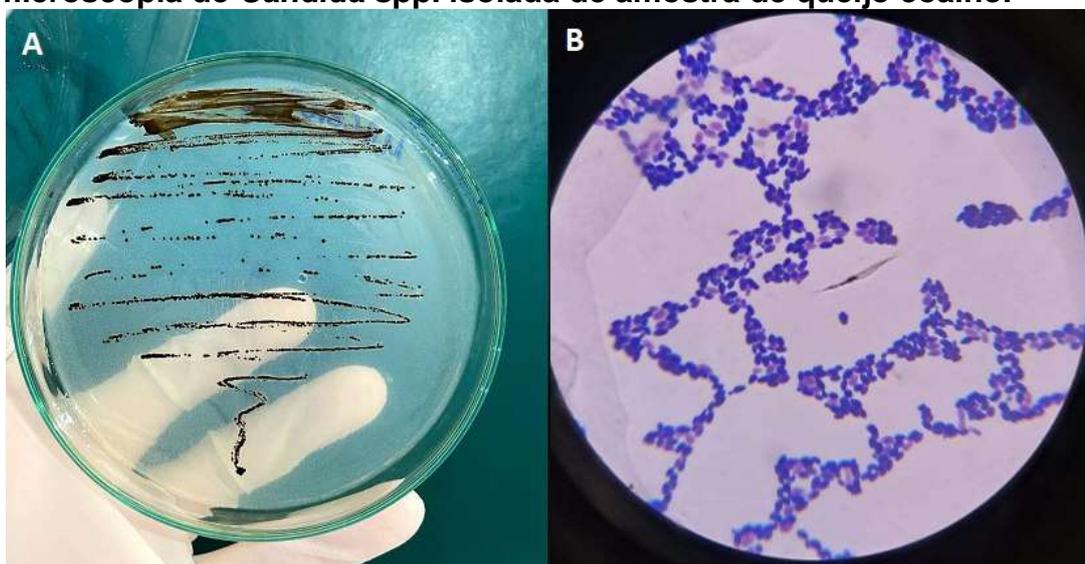
Das oito amostras de queijo coalho foram isolados 41 microrganismos, sendo identificadas 30 amostras bacterianas distintas, dentre elas as mais frequentes pertenciam à família *Enterobacteriaceae* 53,66% (22/41) e *Staphylococcus* spp (Figura 4) 7,32% (3/41). Foram identificadas também 11 leveduras caracterizadas como *Candida* spp (Figura 5), observando-se uma elevada frequência deste microrganismo 26,83% (11/41).

Figura 4: Microscopia de *Staphylococcus* spp. isolado de amostra de queijo coalho e corado pela técnica de Gram.



Fonte: arquivo pessoal.

Figura 5 - *Candida* spp. isolados de amostras de queijo coalho.
A: Crescimento de colônias de *Candida* spp. em meio ágar candida; B: microscopia de *Candida* spp. isolada de amostra de queijo coalho.



Fonte: arquivo pessoal.

As bactérias da família *Enterobacteriaceae* fazem parte da microbiota gastrointestinal, podendo estar presentes também no solo, água e ambiente. Estes microrganismos são considerados como indicadores de qualidade higiênico-sanitária e estão envolvidos no processo de deterioração dos alimentos, tendo importância por serem patogênicos e causarem infecções alimentares que podem ser graves (FERRAZ, 2009; TEIXEIRA, 2010). Os queijos analisados apresentaram alta frequência destes agentes, vários estudos sobre a qualidade microbiológica do queijo coalho apontam contaminação superior aos limites estabelecidos pela legislação, o que indica provável desconformidade higiênico-sanitária da matéria-prima utilizada e das boas práticas de manipulação e fabricação desses produtos (PEIXOTO, 2007; CAVALCANTE, 2007).

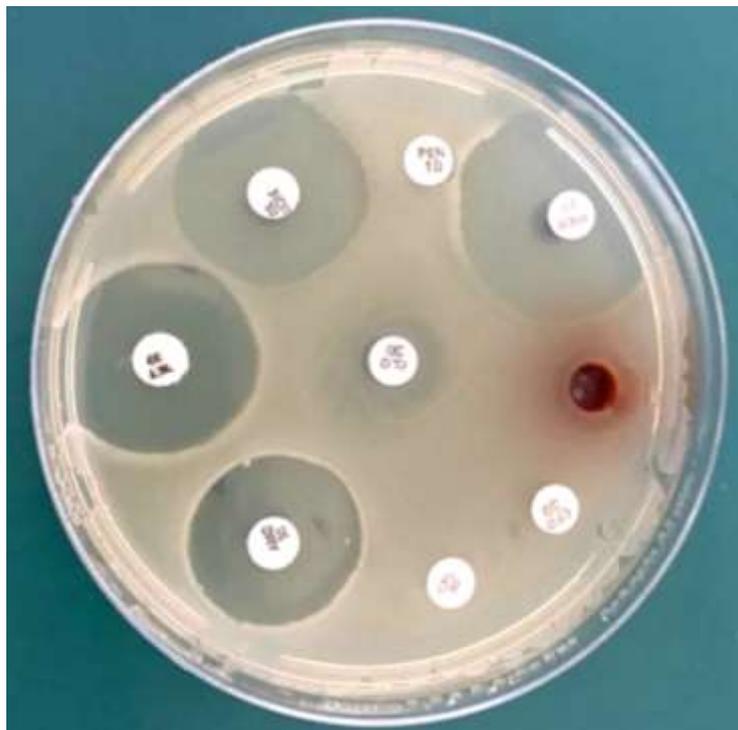
Staphylococcus são bactérias que pertencem à microbiota normal da pele e mucosas dos seres humanos e animais, estão amplamente distribuídas no ambiente e são comumente responsáveis por intoxicações alimentares (PRADO et al., 2015). No presente estudo observa-se que a presença desses microrganismos corrobora com o que é descrito por diversos autores no sentido desses agentes se enquadrarem como os principais responsáveis por surtos de intoxicação alimentar, devido a facilidade de transmissão aos alimentos por meio dos manipuladores, principalmente durante o processamento do queijo. (TEIXEIRA, 2010; PRADO et al., 2015). Embora

a frequência desses agentes não tenha ocorrido de forma significativa, o que pode ser explicado pelo fato de serem termossensíveis, ainda assim pode haver a presença de suas toxinas que são resistentes ao processamento térmico, ou seja, são termoestáveis e ainda assim podem causar toxinfecções (FERRAZ, 2009).

Uma bactéria importante para a saúde pública, com risco de causar doença grave e com elevada capacidade de resistência antibacteriana foi identificada nas amostras de queijo, *Pseudomonas* spp. (2,43%). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que superbactérias causam cerca de 700 mil mortes anualmente. As bactérias como *Pseudomonas* são oportunistas em humanos. Quando esses microrganismos apresentam resistência, muitas vezes, não se consegue controlar a infecção e há risco de óbito, sendo um risco para a saúde humana o consumo de queijo contaminado por eles (CCI/ENSP, 2021).

O gênero *Candida* é composto por leveduras que vivem como comensais na microbiota de homens e animais. Infecções por *Candida* spp. em animais são pouco frequentes. No entanto, nos últimos anos, tem sido observado um aumento considerável de relatos de infecções por essas leveduras (BRITO et al., 2009). Esse agente tem ganhado relevância nas produções leiteiras no Brasil, tendo sua prevalência variando entre 1% à 38,5% (SAAB et al., 2014; MARTINS et al., 2010; DA CUNHA et al., 2016; WUNDER JR, 2007), acendendo o alerta para produtores e consumidores. Em humanos a atividade desses fungos varia bastante, desde infecções localizadas à infecções sistêmicas que, muitas vezes, resultam no óbito do paciente acometido (COELHO e OLIVEIRA ALVIM, 2018).

Figura 6: Placa de antibiograma após 24 horas de incubação contendo discos de antibióticos e seus halos de inibição bacteriana.



Fonte: arquivo pessoal.

Para realização do antibiograma (Figura 6) foram utilizadas 23 amostras. Dessas 23 amostras o antibiótico que teve maior espectro de ação na inibição do crescimento bacteriano foi a norfloxacina com 95,65% (22/23) e meropenem com 91,30% (21/23) de atividade contra as bactérias testadas.

Observou-se também que as bactérias apresentaram elevada resistência aos antibióticos penicilina 95,65% (22/23) e cefadroxil 82,60% (19/23), como mostra a tabela 1.

Além do antibiograma com antibióticos convencionais, foi realizado o teste da atividade antibacteriana dos extratos das própolis verde e vermelha (Figura 7). Para a realização foram selecionadas 16 amostras bacterianas viáveis para serem avaliadas no antibiograma com a utilização de discos de própolis verde e vermelha produzidos no Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

Tabela 1 - Frequência da sensibilidade das bactérias isoladas de queijo coalho comercializados em Maceió, região Metropolitana e Sertão de Alagoas frente aos antimicrobianos convencionais e frente aos extratos de própolis verde e vermelha.

ANTIBIÓTICOS	Sensível (%)	Intermediário (%)	Resistente (%)
Cloranfenicol	78,27 (18/23)	8,69 (2/23)	13,04 (3/23)
Norfloxacina	95,65 (22/23)	0	4,35 (1/23)
Penicilina	4,35 (1/23)	0	95,65 (22/23)
Cefalotina	39,13 (9/13)	13,04 (3/23)	47,83 (11/23)
Cefadroxil	8,70 (2/23)	8,70 (2/23)	82,60 (19/23)
Meropenem	91,30 (21/23)	0	8,70 (2/23)
Amoxicilina com clavulanato	78,26 (18/23)	0	21,74 (5/23)
Tetraciclina	52,17 (12/23)	17,39 (4/23)	30,44 (7/23)
EXTRATOS	Sensível (%)	Intermediário (%)	Resistente (%)
Própolis Verde	18,75 (3/16)	0	81,25 (13/16)
Própolis Vermelha	12,5 (2/16)	0	87,5 (14/16)

Fonte: elaborado pelos autores.

Dentre as bactérias isoladas no antibiograma com fármacos convencionais, foram identificadas duas amostras de *Staphylococcus* spp., sendo essas sensíveis ao cloranfenicol, norfloxacina, cefalotina, amoxicilina, respectivas com sensibilidade de 100% (2/2), apresentando resistência apenas contra cefadroxil e penicilina, ambas com resistência de 100% (2/2), como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2 - Frequência da sensibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. isoladas de queijo coalho comercializados em Maceió, região Metropolitana e Sertão de Alagoas.

<i>Staphylococcus</i> spp.	Sensível (%)	Intermediário (%)	Resistente (%)
Cloranfenicol	100 (3/3)	0	0
Norfloxacina	100 (3/3)	0	0
Penicilina	0	0	100 (3/3)

Cefalotina	100 (2/2)	0	0
Cefadroxil	0	0	100 (3/3)
Meropenem	66,67% (2/3)	0	33,33% (1/3)
Amoxicilina com Clavulanato	100 (2/2)	0	0
Tetraciclina	66,67% (2/3)	0	33,33 (1/3)

Fonte: elaborado pelos autores.

Foram avaliadas quanto ao perfil de sensibilidade no antibiograma com fármacos convencionais 17 amostras de *Enterobacteriaceae*, os antibióticos que tiveram o maior efeito contra as *Enterobacteriaceae* foi a norfloxacina com 94,12% (16/17) e meropenem 94,12% (16/17), seguido de amoxicilina 70,59% (12/17) e cloranfenicol 70,59% (12/17). As *Enterobacteriaceae* apresentaram maior perfil de resistência à penicilina 94,12% (16/17) e cefadroxil 82,36 (14/17). Estes dados estão expostos da tabela 3.

Tabela 3 - Frequência da sensibilidade a antimicrobianos de *Enterobacteriaceae* isoladas de queijo coalho, comercializados em Maceió, região Metropolitana e Sertão de Alagoas.

<i>Enterobacteriaceae</i>	Sensível (%)	Intermediário (%)	Resistente (%)
Cloranfenicol	70,59 (12/17)	11,76 (2/17)	17,65 (3/17)
Norfloxacina	94,12 (16/17)	0	5,88 (1/17)
Penicilina	5,88 (1/17)	0	94,12 (16/17)
Cefalotina	23,53 (4/17)	11,76 (2/17)	64,71 (11/17)
Cefadroxil	5,88 (1/17)	11,76 (2/17)	82,36 (14/17)

Meropenem	94,12 (16/17)	0	5,88 (1/17)
Amoxicilina com Clavulanato	70,59 (12/17)	0	29,41 (5/17)
Tetraciclina	47,06 (8/17)	23,53 (4/17)	29,41 (5/21)

Fonte: elaborado pelos autores.

Dentre as própolis avaliadas a própolis verde foi a que apresentou melhor atividade antibacteriana, sendo eficiente em 18,75% (3/16) das amostras bacterianas, a vermelha apresentou uma utilidade menor contra bactérias, sendo responsável por inibir 12,5% (2/16) das bactérias testadas. A moderada atividade pode estar relacionada à concentração da própolis, ao solvente utilizado e a espécie de própolis utilizada, como descrito por Queiroz et al. (2021), e Silva et al. (2006), os quais não observaram nenhuma atividade antimicrobiana com os extratos etanólicos de própolis testados.

Figura 7: Placa com discos de própolis verde e vermelha mostrando halos de inibição bacteriana.



Fonte: arquivo pessoal.

Foram avaliadas quanto ao perfil de sensibilidade aos extratos de própolis verde e vermelha um total de sete amostras fúngicas. O resultado obtido no antifungigrama está representado na Tabela 4, demonstrando que o fungo *Candida* spp. sofre ação fungistática dos extratos hidroalcoólicos de própolis verde e vermelha, observados por meio da formação de halos, nos quais as médias dos diâmetros dos halos foram referência para os demais parâmetros. Observou-se que o extrato de própolis vermelha mostrou maior média de diâmetro de halo, o que significa maior ação sobre o fungo *Candida* spp.

Tabela 4 - Medida de halos (mm) de própolis verde e vermelha na inibição do crescimento de *Candida* spp.

Própolis	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7
Verde	10	7	0	0	7	6	0
Vermelha	13	8	0	7	7	0	8

O percentual de sensibilidade das amostras as própolis verde e vermelha está descrito abaixo na Tabela 5, onde das sete amostras cinco foram sensíveis a própolis vermelha (71,40%) e quatro foram sensíveis a própolis verde (57,14%).

Tabela 5 - Frequência da sensibilidade e resistência fúngica frente aos extratos de própolis verde e vermelha.

Própolis	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7	FR %/FA
Verde	S	S	R	R	S	S	R	57,14 (4/7)
Vermelha	S	S	R	S	S	R	S	71,40 (5/7)

Bittencourt et al., (2014), encontraram em seu estudo halos com tamanho entre 9,65 a 13,18 mm contra *Candida albicans*, assim como Bispo Junior et al. (2012), que encontraram excelentes resultados em sua pesquisa, onde evidenciaram a ação antifúngica da própolis vermelha, demonstrando efeito inibitório mesmo em baixas concentrações.

As pesquisas sugerem que a atividade antimicrobiana da própolis pode estar relacionada diretamente à presença de compostos fenólicos e flavonóides, onde a maior concentração desses compostos bioativos determina uma maior atividade

antimicrobiana (ALENCAR et al., 2007). Os flavonoides são os principais marcadores químicos encontrados na própolis e diversos autores já relatam sua relação com diversas atividades biológicas (SIQUEIRA et al., 2014).

3. CONCLUSÕES

O queijo coalho comercializado nos supermercados de Maceió, Região metropolitana e Sertão do estado de Alagoas, estão contaminados por microrganismos de grande importância, dentre eles alguns produtores de potentes toxinas e com capacidade de desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos. A detecção de microrganismos de origem fecal nos queijos, acende um alerta para os erros e contaminação do produto no processo de produção, transporte ou armazenamento. O consumo desses queijos é um risco para a saúde humana.

De acordo com o teste de sensibilidade realizado com antibióticos convencionais, os fármacos indicados para tratamento de infecção de origem alimentar, causada pelo consumo de queijo coalho, são meropenem e norfloxacin. Também observa-se um nível de resistência, no geral, elevado aos antibióticos, o que é um risco para a saúde pública, estando relacionado a utilização indiscriminada dessas drogas. Apesar da moderada atividade antibacteriana da própolis verde e vermelha, os extratos são promissores, devendo ser avaliados em outras concentrações, especialmente por se tratar de um produto natural e sem efeitos adversos ou colaterais quando utilizados como prebióticos ou antibióticos.

Identifica-se que as linhagens do fungo *Candida spp.* isoladas de queijos tipo coalho se mostram susceptíveis aos extratos avaliados, evidenciando a ação fungistática das própolis verde, o que foi ainda mais evidenciada na própolis vermelha. Podendo ser indicado nas infecções alimentares de origem fúngica, trata-se de um extrato natural com amplo espectro antifúngico

ALENCAR, Severino Matias de et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 278-283, 2007.

ALMEIDA, Aliny Costa de. **Caracterização de leveduras isoladas de queijos de coalho**. 2011. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

ARAÚJO, Rayane Maria da Silva. Pesquisa de coliformes totais e coliformes termotolerantes em queijos tipo coalho produzidos com leite cru na região do agreste paraibano. 2017. 23 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/1898/1/RMSA01082017.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2022.

BASTOS, Esther Margarida AF et al. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against *Paenibacillus* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, n. 3, p. 273-281, 2008.

BISPO JUNIOR, Walfrido et al. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 1, p. 3-10, 2012.

BITTENCOURT, Felipe Oliveira et al. Avaliação da atividade antifúngica de formulações semi-sólidas contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v. 10, n. 10, 2014.

BORGES, Maria de Fátima et al. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. Boletim do centro de pesquisa de processamento de alimentos, v. 26, n. 1, p. 70-86, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26/06/2001. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2001.

BRITO, Erika Helena Salles de et al. Candidose na medicina veterinária: um enfoque micológico, clínico e terapêutico. **Ciência rural**, v. 39, p. 2655-2664, 2009.

CAVALCANTE, José Fernando Mourão et al. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Food Science and Technology**, v. 27, p. 205-214, 2007.

CCI/ENSP. Detecção de bactérias resistentes a antibióticos triplicou na pandemia. 2021. Disponível em: <<https://informe.ensp.fiocruz.br/noticias/52476>>.

COELHO, Andrea Melo; DE OLIVEIRA ALVIM, Haline Gerica. OCORRÊNCIA DE CANDIDÍASE NO HOMEM: UMA REVISÃO PARA INFORMAÇÃO DA POPULAÇÃO MASCULINA. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 1, n. 3, p. 09-16, 2018.

DA CUNHA, Adriano França et al. Prevalência, etiologia e fatores de risco de mastite clínica em rebanhos leiteiros de Viçosa-MG. *Acta Veterinária Brasilica*, v. 10, n. 1, p. 48-54, 2016.

DAUGSCH, Andreas et al. Brazilian red propolis—chemical composition and botanical origin. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 5, n. 4, p. 435-441, 2008.

DE OLIVEIRA, K. A. et al. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no Município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 435-440, 2020.

FERRAZ, Marcelo Augusto. Monitoramento de *Enterobacteriaceae* e *Staphylococcus* spp. na linha de produção de leite em pó de uma indústria de laticínios de Minas Gerais utilizando metodologias tradicional e rápida. 2009.

FERREIRA, Wilson Luiz et al. Avaliação da qualidade físico-químicos do queijo coalho comercializado no município de Barreiros-PE. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial: Universidade Federal do Paraná -UTFPR, Paraná*, v. 02, n. 01, p. 127-133, 2008.

FROZZA, Caroline Olivieri da Silva et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and chemical toxicology**, v. 52, p. 137-142, 2013.

GLEHN, E. A. V.; RODRIGUES, G. P. S. Antifungigrama para comprovar o potencial de ação dos extratos vegetais hidroglicólicos sobre *Candida* sp.(Berkhout). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 435-438, 2012.

KONEMAN, Elmer W.; ALLEN, Stephen. **Koneman. Diagnóstico Microbiológico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas**. Ed. médica panamericana, 2008.

KUMAZAWA, Shigenori; HAMASAKA, Tomoko; NAKAYAMA, Tsutomu. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329-339, 2004.

LOTTI, Cinzia et al. Chemical constituents of red Mexican propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2209-2213, 2010.

MARTINS, Rodrigo Prado et al. Prevalência e etiologia infecciosa de mastite bovina na microrregião de Cuiabá-MT. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 181-187, 2010.

MELVILLE, Priscilla Anne et al. Ocorrência de fungos em leite cru proveniente de tanques de refrigeração e latões de propriedades leiteiras, bem como de leite comercializado diretamente ao consumidor. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, p. 295-301, 2022.

NASSU, Renata Tieko; MACEDO, Benemária Araújo; LIMA, Márcia Helena Portela. Queijo de coalho. 2006.

PEIXOTO, Andreza Mendonça dos Santos; PRAÇA, Everardo Ferreira; DE GÓIS, Wilson Alves. A potencialidade microbiológica de coagulação do coalho líquido artesanal. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, 2007.

PINTO, Luciana de Matos Alves; PRADO, Ney Robson Taironi do; CARVALHO, Lucas Bragança de. PROPRIEDADES, USOS E APLICAÇÕES DA PRÓPOLIS. Revista Eletrônica de Farmácia, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 76-100, 29 set. 2011. Universidade Federal de Goiás. <http://dx.doi.org/10.5216/ref.v8i3.15805>.

PRADO, Renata Resende et al. *Staphylococcus* spp.: importantes riscos à saúde pública. **Pubvet**, v. 9, p. 348-399, 2015.

QUEIROZ, Ana Paula Marques de et al. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE PRÓPOLIS: UMA REVISÃO. Revista Ciência (In) Cena: TEMAS LIVRES, Salvador, Ba, v. 1, n.13, p. 42-55, nov. 2021.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, v. 73, p. S21-S29, 2002.

SAAB, Andreia Bittar et al. Prevalência e etiologia da mastite bovina na região de Nova Tebas, Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 2, p. 835-843, 2014.

SANTOS, Jaline Guimarães. Análise microbiológica do queijo coalho produzido por usuários da fazenda da esperança em Lagarto – Sergipe. 2019. TCC (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Sergipe, Lagarto, 2019.

SCHMITT, Esther K. et al. Natural products as catalysts for innovation: a pharmaceutical industry perspective. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, n. 4, p. 497-504, 2011.

SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 73, n. 1-2, p. 243-249, 2000.

SIQUEIRA, Anderson Lessa et al. Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 43, p. 359-366, 2014.

SILVA, João Marcos Maia. Micobiota core de queijos de leite cru produzidos na região da Serra da Canastra. 2020.

SILVA, Juliana Victorino da. Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em diferentes amostras de queijo tipo minas frescal. 2003.

SILVA, Luana Cortez da et al. Ocorrência de *Escherichia coli* potencialmente causadoras de toxi-infecções alimentares em queijos coalho e ricota comercializados no sudeste do Brasil. **Resumos MICROAL**, 2014.

SILVA, Rosilene Agra da et al. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1842-1848, nov. 2006.

TEIXEIRA, Ana Flávia Machado. Doenças microbianas de origem alimentar. *Academia de Ciência e Tecnologia*, v. 3, p. 1-8, 2010.

WUNDER JR, Elsio Augusto. Mastite bovina: avaliação microbiológica do leite, com ênfase nas leveduras isoladas de casos de mastite clínica e subclínica, na região do planalto médio-RS, em 2005 e 2006. 2007.