

**UNIVERSIDADE DO OESTE DE SANTA CATARINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E BIOTECNOLOGIA**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOTECNOLOGIA APLICADA À**  
**AGROINDÚSTRIA E SAÚDE**

**KETLIN SCHNEIDER**

**APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS COM AÇÃO ANTIMICROBIANA EM**  
**QUEIJO MINAS FRESCAL**

**VIDEIRA – SC**

**2016**

**UNIVERSIDADE DO OESTE DE SANTA CATARINA**

**KETLIN SCHNEIDER**

**APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS COM AÇÃO ANTIMICROBIANA EM  
QUEIJO MINAS FRESCAL**

Dissertação entregue ao Programa de Pós  
Graduação em Ciência e Biotecnologia da  
Universidade do Oeste de Santa Catarina, como  
requisito para obtenção do grau de Mestre.

**ORIENTADOR:** Dr. César Milton Baratto

**CO-ORIENTADORA:** Dr.<sup>a</sup> Jane Mary Lafayette Neves Gelinski

**VIDEIRA – SC**

**2016**

Ficha Catalográfica

S359a Schneider, Ketlin

Aplicação de bactérias lácticas com ação antimicrobiana em queijo minas frescal / Ketlin Schneider – 2016.

87f. : tabs. ; figs.

Orientador: Prof. Dr. César Milton Baratto.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Mestrado Acadêmico em Ciência e Biotecnologia, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus Videira – UNOESC, 2016.

1. Bactérias lácticas. 2. Qualidade em alimentos. 3. Queijo minas. 4. Produção de substâncias antimicrobianas I. Título. II. Autor. III

**KETLIN SCHNEIDER**

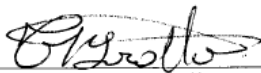
**APLICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁTICAS COM AÇÃO ANTIMICROBIANA  
EM QUEIJO MINAS FRESCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Ciência e Biotecnologia da  
Universidade do Oeste de Santa Catarina,  
como requisito para obtenção do grau de Mestre.

**ORIENTADOR:** Dr. César Milton Baratto  
**CO-ORIENTADORA:** Dr.<sup>a</sup> Jane Mary Lafayette Neves Gelinski

Aprovado em: 23/07/2016

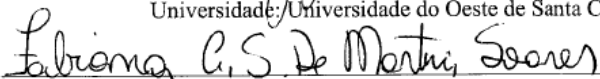
**BANCA EXAMINADORA**



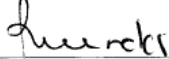
Prof. Dr. César Milton Baratto  
Universidade: Universidade do Oeste de Santa Catarina



Prof. Dra. Jane Mary Lafayette Neves Gelinski  
Universidade: Universidade do Oeste de Santa Catarina



Prof. Dra.: Fabiana Andreia Schafer de Martini Soares  
Universidade do Oeste de Santa Catarina



Dra. Sandra Denise Camargo Mendes  
EPAGRI - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina



Prof. Dra.: Maria Rita Chaves Nogueira  
Universidade do Oeste de Santa Catarina

Dedico este trabalho a minha família,  
por terem acreditado em mim me ajudando e  
encorajando nos momentos de dificuldade.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade do Oeste de Santa Catarina-UNOESC-Campus Videira, ao Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* Mestrado Acadêmico em Biotecnologia, ao UNIEDU/FUMDES-SC, e a CAPES pelo suporte financeiro para realização do projeto de pesquisa e pela concessão de bolsa de estudo.

Agradeço a Deus que por sua infinita bondade e sabedoria criou condições para que a humanidade em sua jornada fosse capaz de contemplar, observar e catalogar seres microscópicos que com sua gama de produção de metabolitos podem vir a oferecer alternativas a utilização de tecnologias agressivas e invasivas responsáveis por desequilíbrios naturais afetando o desenvolvimento de todas as espécies da terra.

A minha família e a Bruna Aparecida Savian pelo incentivo, paciência, amor, carinho e respeito dedicados a mim e a mais essa jornada de minha vida.

Ao meu orientador Dr. Cesar Milton Baratto pela orientação, dedicação e comprometimento com a realização do presente, e por compartilhar seus conhecimentos. As Professoras Dr. Fabiana Andreia Schafer de Martini Soares e a Dr. Jane Mary Lafayette Neves Gelinski pelo auxílio prestado para o desenvolvimento do trabalho. A todos os professores do Programa de Mestrado por compartilharem seus conhecimentos e por sua disponibilidade e dedicação.

Aos colegas pelo conhecimento, angustias e conquistas compartilhadas durante a realização do mestrado agradecer em especial a Cássio Geremia Freire e Fernanda Megiolaro por deixarem os momentos de convivência mais descontraídos e por acreditarem na minha capacidade para realização deste.

Agradeço aos técnicos Daniel, Tainara, Josiane e Susimar e a Coordenadora do Núcleo Biotecnológico Isabel O. Munaro pela confiança e por experiências compartilhadas.

Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós!

*(Francisco Candido Xavier)*

“A grandeza das ações humanas é proporcional à inspiração que as produz. Feliz é aquele que traz dentro de si um Deus, um ideal de beleza a que obedece: ideal de arte, ideal de ciência, ideal de pátria, ideal de virtudes evangélicas. São essas as fontes vivas dos grandes pensamentos e das grandes ações. Todas elas refletem a luz do infinito”. *Louis Pasteur*

## RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo realizar a caracterização tecnológica e molecular de bactérias lácticas com potencial antimicrobiano para a utilização na fabricação de queijo minas frescal. As bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos fermentados coloniais em trabalhos anteriores foram analisadas quanto as suas características morfológicas e bioquímicas, como produção de gás, teste de catalase, produção de diacetil e fermentação de carboidratos; quanto suas características tecnológicas, incluindo crescimento em temperaturas extremas, concentração de NaCl e pH, e produção de substâncias antimicrobianas a partir do método difusão em ágar. Por apresentarem características morfológicas, bioquímicas e tecnológicas foram selecionados 3 isolados para serem avaliados quanto ao seu potencial inibitório de microrganismos patogênicos de alimentos (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Salmonella Typhimurium*) em queijo minas frescal, para isso o *pool* de *Lactobacillus* e os microrganismos testes foram inoculados no queijo, a inibição foi monitorada nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 de armazenamento mediante contagem direta em ágar seletivo dos indicadores. Após, utilizando a mesma metodologia, foi avaliado o potencial de inibição de cada isolado de *Lactobacillus* sp. frente *S. aureus*. A qualidade do queijo produzido com os 3 isolados também foi avaliada, para comparação de parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais foram elaborados 2 tratamentos: T1 (Queijo minas frescal + fermento tipo O) e T2 (queijo minas frescal + *pool de Lactobacillus*). Foram analisados 88 isolados oriundos de produtos cárneos, dos quais 86 apresentaram-se na forma de bacilos e 2 isolados apresentaram-se com a morfologia de cocos, Gram positivos, catalase negativa, não produtores de gás, não produtores de diacetil e capazes de fermentar glicose, lactose, sacarose e sorbitol, 49 dos isolados foram identificados como *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. lindneri*, *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. farciminis* e *W. cibaria*. Cinquenta por cento dos isolados apresentaram atividade frente a pelo menos um dos indicadores utilizados, e: 50% inibiram *E. coli*, 55% *L. monocytogenes*, 57,5% *S. aureus*, 47,5% *Salmonella Typhimurium*, 9,1% dos isolados testados apresentam atividade frente a todos os indicadores testados, dentre esses os isolados LC7 (*L. plantarum*), LC31 (*L. casei*) e LSB09 (*L. plantarum*) apresentaram maior homogeneidade de crescimento nas temperaturas de 10 e 45°C, na presença de 4 e 8%, e nos pHs 2 e 6. Os queijos inoculados com o “*pool de Lactobacillus*” apresentaram diminuição significativa no crescimento dos indicadores no decorrer de 28 dias de armazenamento, nos ensaios com o uso individual dos isolados o tratamento T 11 LSB09

apresentou maior eficácia no controle de *S. aureus* em relação aos demais tratamentos, não ocorreram diferenças significativas no pH dos queijos e na contagem de bactérias lácticas durante o período de armazenamento, os queijos apresentaram parâmetros microbiológicos de acordo com a legislação brasileira, na avaliação sensorial o queijo adicionado do *Pool* de *Lactobacillus* apresentou maiores médias nos atributos avaliados, mas não houve diferença significativa na avaliação sensorial. Os *Lactobacillus* selecionados apresentam condições de ser utilizados como culturas iniciadoras em queijo, pois promovem a melhora na qualidade microbiológica do produto e das características sensoriais de queijo minas frescal.

**Palavras Chaves:** Bactérias Lácticas. *Lactobacillus*. Produção de Substâncias Antimicrobianas. Queijo Minas Frescal. Qualidade em Alimentos.

## ABSTRACT

This study aimed to carry out the technological and molecular characterization of lactic acid bacteria with antimicrobial potential for use in the manufacture of fresh cheese. The isolates were analyzed for their morphological and biochemical characteristics, as gas production, catalase test, diacetyl production and fermentation of carbohydrates; as their technological characteristics, including growth in extreme temperatures, pH and NaCl concentration, and production of antimicrobial substances from the agar diffusion method. 3 *Lactobacillus* sp were selected. to be assessed for their inhibitory potential of pathogenic food microorganisms (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *Salmonella* Typhimurium) in fresh cheese, for that the *Lactobacillus* pool and testing microorganisms were inoculated into the cheese, inhibition was monitored on days 1, 7, 14, 21 and 28 storage by direct counting on agar selective indicators. Then, using the same methodology, was measured the inhibition potential of each isolate of *Lactobacillus* sp. front *S. aureus*. The quality of cheese produced with 3 isolates were also evaluated for comparison of physical-chemical, microbiological and sensory parameters, were developed two treatments: T1 ("*Queijo Minas Frescal*" + Lactic acid starter culture Type mines O) and T2 ("*Queijo Minas Frescal*" + *Lactobacillus* pool). 88 isolates come from meat products were analyzed, of which 86 presented in the form of bacilli and 2 isolates presented with the morphology of cocci, gram positive, negative catalase, not gas producers, not producing diacetyl and capable of fermenting glucose, lactose, sucrose and sorbitol, 49 isolates were identified as *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. casei*, *L. lindneri*, *L. sakei*, *L. curvatus* *L. farciminis* e *W. cibaria*. Fifty per cent of the isolates showed activity against at least one of the indicators, and: 50% inhibited *E. coli*, *L. monocytogenes* 55% 57.5% *S. aureus*, *Salmonella* Typhimurium 47.5%, 9.1% of the isolates tested have activity against all tested indicators, among these isolates LC7 (*L. plantarum*), LC31 (*L. casei*) and LSB09 (*L. plantarum*), although growing homogeneity in temperatures of 10 to 45 ° C, in the presence of 4 and 8%, and at pH 2 and 6 cheeses inoculated with "*Lactobacillus* pool" showed a significant decrease in the growth of the indicators in the course of 28 days of storage in the tests with the single use of separate treatment T11 LSB09 isolate showed greater efficacy in the control of *S. aureus* in relation to other treatments, no significant differences in the pH of the cheese and lactic acid bacteria count during the storage period, the cheeses presented microbiological parameters according to Brazilian law, in sensory evaluation

of cheese added *Lactobacillus pool* had higher averages in the attributes evaluated, but there were no significant differences in sensory evaluation. *Lactobacillus* selected in conditions to be used as starter cultures for cheese, for promoting the improvement in microbiological product quality and sensory characteristics of Minas fresh cheese.

**Key words:** Lactic acid bacteria characterization. Antimicrobial substances production. “*Queijo Minas Frescal*”. Food Quality.

## LISTA DE FIGURAS

Dendograma 1: Árvore filogenética de Bactérias Láticas representando as várias origens ou usos de BAL .....	24
Fluxograma 1: Fluxograma da fabricação do queijo minas frescal adicionado de Bactérias lácticas com atividade antimicrobiana e micro-organismos indicadores para ensaio de inibição. ....	44
Esquema 1: Contagem de bactérias lácticas.....	45
Fotografia 1: Halos de inibição dos isolados LC07 e LC8 frente <i>L. monocytogenes</i> evidenciando a formação de halo definido. ....	52
Gráfico 1: Crescimento dos <i>Lactobacillus</i> isolados nas temperaturas 10°, 37° e 45°C. 53	
Gráfico 2: Crescimento dos isolados nas concentrações de 0%, 4% e 8% de NaCl.....	55
Gráfico 3: Crescimento dos isolados em pHs 2,0, 4,5 e 6,0.....	56
Gráfico 4: Potencial de inibição do <i>pool</i> de <i>Lactobacillus</i> sp. sobre <i>E. coli</i> durante o armazenamento.....	60
Gráfico 5: Potencial de inibição do <i>pool</i> de <i>Lactobacillus</i> sp. sobre <i>L. monocytogenes</i> durante o armazenamento.....	61
Gráfico 6: Potencial de inibição do <i>pool</i> de <i>Lactobacillus</i> sp. sobre <i>Salmonella</i> Typhimuirium durante o armazenamento.....	62
Gráfico 7: Potencial de inibição do <i>pool</i> de <i>Lactobacillus</i> sp. sobre <i>S. aureus</i> durante o armazenamento.....	64
Gráfico 8: Potencial de inibição dos isolados LC07, LC31 e LSB09 sp. sobre <i>S. aureus</i> durante o armazenamento.....	65
Gráfico 9: Valores de pH obtidos durante o período de armazenamento dos Queijos Minas Frescal.....	67
Gráfico 10: Contagem de Bactérias Láticas em queijo minas frescal durante de armazenamento.....	68
Figura 1: Perfil molecular obtida com a técnica de ARDRA/Alu I de <i>Lactobacillus</i> sp. de padrões e de isolados do banco LS.....	71
Figura 2: Exemplo do perfil molecular obtido por ARDRA/AluI de isolados de <i>Lactobacillus</i> spp. do banco LC.....	71
Figura 3: Perfil molecular obtido com a técnica ARDRA/ HinfI para os isolados identificados na técnica ARDRA/AluI como <i>Lacobacillus sakei/curvatus</i> . ....	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Bactérias lácticas isoladas de diversos ambientes, sua aplicação e benefícios promovidos em produtos alimentícios.....	22
Tabela 2: Análise do potencial do <i>Pool</i> de <i>Lactobacillus</i> sp. em inibir patógenos em Queijo Minas Frescal.....	42
Tabela 3: Análise do potencial dos <i>Lactobacillus</i> sp. em inibir <i>S. aureus</i> em Queijo Minas Frescal.....	43
Tabela 4: Análises Microbiológicas do Queijo Minas Frescal.....	46
Tabela 5: Perfil de inibição dos isolados de bactérias lácticas frente aos micro-organismos indicadores utilizados no estudo.....	51
Tabela 6: Média dos halos de inibição dos isolados LC07, LC31 e LSB09 obtidos no antibiograma.....	57
Tabela 7: Média e Desvio Padrão dos Resultados da Avaliação dos Atributos Sensoriais de Queijo Minas Frescal.....	69
Tabela 8: Identificação de <i>Lactobacillus</i> spp. pelas técnicas moleculares de ARDRA e Sequenciamento da região 16S.....	73

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	19
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>19</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
<b>3.1 Bactérias Lácticas</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2 <i>Lactobacillus</i></b> .....	<b>22</b>
3.2.1 Identificação Molecular de <i>Lactobacillus</i> sp. ....	23
3.2.2 Metabolismo Fermentativo dos <i>Lactobacillus</i> sp. ....	26
<b>3.3 Bacteriocinas</b> .....	<b>27</b>
<b>3.4 Emprego de <i>Lactobacillus</i> sp. na Fabricação de Alimentos</b> .....	<b>29</b>
<b>3.4 Aplicação de <i>Lactobacillus</i> para Fabricação de Queijo Minas Frescal</b> .....	<b>31</b>
3.4.1 Micro-organismos Patogênicos Importantes Isolados de Queijo Minas-Frescal ..	33
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	36
<b>4.1 Condições de crescimento e Cultivo de Bactérias do Ácido Láctico</b> .....	<b>36</b>
<b>4.2 Condições de Cultivo e Crescimento dos Micro-organismos Indicadores</b> .....	<b>36</b>
<b>4.3 Caracterização Fenotípica e Bioquímica de Bactérias Lácticas</b> .....	<b>37</b>
4.3.1 Aspectos Morfológicos dos Isoladas .....	37
4.3.2 Prova da Catalase .....	37
4.3.3 Fermentação de Carboidratos .....	37
<b>4.4 Análise da Produção de Substâncias Antimicrobianas</b> .....	<b>38</b>
<b>4.5 Caracterização Tecnológica de <i>Lactobacillus</i> sp.</b> .....	<b>38</b>
4.5.1 Produção de Gás a partir da Glicose .....	39
4.5.2 Tolerância a variações de Temperatura, concentração de NaCl e pH .....	39
4.5.3 Produção de Diacetil .....	40

4.5.4 Resistencia a antibióticos .....	40
<b>4.6 Fabricação do Queijo Minas Frescal Adicionado de Bactérias do Ácido Lático Produtoras de Substâncias Antimicrobianas.....</b>	<b>40</b>
4.6.1 Determinação do potencial das Bactérias Láticas na Inibição de micro-organismo Patogênicos em Queijo Minas Frescal .....	41
4.6.2 Caracterização do Queijo Minas Frescal Adicionado de Bactérias Láticas Produtoras de Substâncias Antimicrobianas.....	45
4.6.3 Avaliação sensorial do Queijo Minas Frescal adicionado de Bactérias Láticas....	46
<b>4.7 Identificação Molecular das Bactérias Láticas .....</b>	<b>47</b>
4.7.1 Extração do DNA .....	47
4.7.2 Amplificação e clivagem do DNA 16S por PCR .....	48
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>5.1 Produção de Substâncias Antimicrobianas.....</b>	<b>50</b>
<b>5.2 Caracterização Tecnológica de <i>Lactobacillus</i>.....</b>	<b>53</b>
<b>5.3 Inibição de <i>Lactobacillus</i> sp. frente a patógenos em modelo de queijo minas frescal .....</b>	<b>59</b>
<b>5.5 Identificação Molecular de <i>Lactobacillus</i> .....</b>	<b>70</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>77</b>
<b>APENDICE A .....</b>	<b>89</b>
<b>APENDICE B.....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>91</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação na melhora da qualidade de vida, prevenção de doenças, diminuição do uso de substâncias conservantes, melhoria da qualidade sensorial de produtos tradicionais, tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas relacionadas à caracterização molecular e tecnológicas de micro-organismos produtores de substâncias com potencial para aplicação como bioconservante, as bactérias lácticas apresentam um grande potencial para a extensão da vida de prateleira de produtos, seu metabolismo produz inúmeros compostos com capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes (DE SOUZA, 2006; HERMMANS, 2013).

Ao longo dos anos a indústria de laticínios vem se adaptando a esta tendência, buscando oferecer ao consumidor alternativas alimentares aliando as características tradicionais dos produtos a novos métodos de conservação, substituindo os conservantes químicos por alternativas naturais (O'CONNOR et al., 2015).

A seleção de um micro-organismo para utilização em um alimento deve estar baseada na observação de três fatores principais: segurança, características funcionais e características tecnológicas. Quanto à segurança, aspectos como a origem, não patogenicidade e resistência aos antibióticos devem ser verificados (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

As bactérias lácticas produzem peptídeos antimicrobianos que normalmente apresentam atividade antibacteriana contra os agentes patogênicos de origem alimentar, bem como bactérias deteriorantes. Portanto, eles têm atraído a maior atenção como ferramentas para bioconservação de alimentos. Em alguns países o uso de bactérias lácticas é amplamente difundido, seja como probióticos ou no processamento de alimentos com o intuito de bioconservação (MESSAOUDI et al., 2013).

As características tecnológicas de interesse estão relacionadas à produção de substâncias aromáticas, manutenção da viabilidade das células no produto ao longo do processo de fabricação, manterem e melhorar as características físico-químicas e microbiológicas do produto, sem causar alterações indesejáveis, inibição de micro-organismos contaminantes, garantir a manutenção da segurança alimentar do produto ao decorrer de sua vida útil (BOYLSTON et al., 2004; CASTRO et al., 2015).

Os produtos lácteos apresentam uma microbiota natural responsável por desenvolver características sensoriais, conservar produtos e auxiliar na manutenção da saúde humana. As

bactérias lácticas apresentam uma elevada capacidade de transformar substratos. E pesquisas têm sido conduzidas na busca de culturas adequadas para fabricação de um determinado produto, ou em função de propriedades específicas como a produção de bacteriocinas (DEEGAN et al., 2006; BOURDICHON et al., 2012).

O queijo minas frescal ocupa o terceiro lugar no ranking de consumo de queijos no Brasil (MIRAGAIA, 2013). Devido a intensa manipulação apresenta uma alta carga microbiana, a população microbiana desses queijos geralmente é considerada patogênica (JAY, 2005).

A aplicação de substâncias antimicrobianas para a conservação de alimentos vem sendo estudada por serem produzidas a partir de micro-organismos de interesse industrial, as bactérias lácticas são amplamente empregadas na produção de alimentos fermentados de origem láctea, o que viabiliza o estudo do emprego dessas substâncias visto que é de interesse da indústria desenvolver alternativas para a conservação de alimentos (PARADA et al., 2007).

O conhecimento e o uso desses fatores combinados em um alimento formam a teoria de obstáculos (LEISTNER, 1992), que permite o controle do prazo de validade, a estabilidade microbiológica, bem como a prevenção da multiplicação e/ou produção de toxinas por micro-organismos patogênicos eventualmente presentes (DE MARTINIS et al., 2002).

A qualidade dos produtos desenvolvidos vai depender do conhecimento sobre os micro-organismos empregados e das características tecnológicas apresentadas pelos mesmos, e o estudo das substâncias produzidas por esses micro-organismos e a maneira como se comportam durante as etapas de elaboração de produtos alimentícios, a sua origem e a identificação molecular para comprovação das suas características (DE MARTINIS et al., 2003; CAMARGO, 2011).

Os mecanismos de resistências de bactérias contaminantes principalmente sobre a ação de antibióticos tem se intensificado nos últimos anos, contribuindo para um aumento na ocorrência de DTAs (Doenças Transmitidas por Alimentos), e dificultando os processos de eliminação desses micro-organismos, as bacteriocinas podem ser utilizadas no combate da proliferação desses micro-organismos, visto que, são substâncias naturais de um determinado grupo de micro-organismos amplamente empregados no processamento de alimentos (PARADA et al., 2007).

Uma série de pesquisas no campo da ciência dos alimentos tem se concentrado em novas tecnologias de conservação e produção de alimentos funcionais, poucos destes métodos

de conservação e produção têm sido implementadas pela indústria de alimentos até agora (DEVLIEGHERE et al., 2004; MESSAOUDI et al., 2013).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o potencial de aplicação de bactérias lácticas com atividade antimicrobiana na fabricação de queijo minas frescal.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Determinar as características relacionadas a critérios tecnológicos dos isolados de *Lactobacillus* sp.;
- Determinar o potencial de atividade antimicrobiana frente aos principais patógenos veiculados por produtos lácteos;
- Identificar as bactérias lácticas utilizando ferramentas de biologia molecular;
- Avaliar o potencial antimicrobiano das bactérias lácteas sobre patógenos durante a produção de queijo minas;
- Fabricar o queijo minas frescal com adição de culturas lácteas selecionadas, avaliando a vida de prateleira do produto;
- Verificar a aceitação do queijo minas frescal adicionados de culturas lácteas produtoras de substâncias antimicrobianas.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Bactérias Lácticas

Os micro-organismos caracterizados como bactérias lácticas, geralmente apresentam-se como Gram positivas, microaerófilas, catalase negativa e usualmente não apresentam motilidade. São muito exigentes, os meios elaborados para seu cultivo devem ser ricos em hidrolisados proteicos, carboidratos, vitaminas e nucleotídeos, o pH geralmente é acidificado, contribuem para a fermentação e degradação de açúcares presentes no leite, seu efeito antagonista impossibilita a procriação de outras bactérias Gram positivas (KLANDER, 1983). É um grupo de bactérias muito utilizado na indústria de alimentos, por ter como principal característica a fermentação da glicose a ácido lático (LIU, 2008; RAIEK, IBRAHIM, 2013).

O metabolismo fermentativo desse grupo de bactérias é caracterizado pelo acúmulo de ácidos orgânicos (ácido lático, acético e propiônico) responsáveis pela acidificação e redução do pH do meio, de acordo com o produto final da fermentação de carboidratos, podem ser classificadas em homofermentativas (produto final ácido lático) e em heterofermentativas (produto final ácido lático, etanol e dióxido de carbono), as características do metabolismo fermentativo são importantes para a fabricação de alimentos, geralmente o micro-organismos deve ser adicionado a produtos similares aos quais foram isolados, para melhor adaptação da cultura (DE SOUZA MOTTA, 2015).

O sabor e o aroma dos produtos fermentados estão relacionados com as bactérias lácteas, pois conferem à textura e outras características desejáveis nesses produtos. Produz uma grande diversidade de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, que estão envolvidas na transformação de nutrientes fundamentais em compostos desejáveis (DE SOUZA MOTTA, 2015).

O fato de serem inócuas consideradas como GRAS (geralmente reconhecido como seguro do inglês “*Generally recognized as safe*”), faz com que seu uso para fabricação de produtos alimentícios possa ser viabilizado. O grupo das BAL compõe-se de doze gêneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lastosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pedicoccus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Wessella* (JAY, 2005).

A indústria de alimentos tem interesse em alguns gêneros de bactérias lácticas sendo esses:

- Gênero *Lactococcus*: tem função de cultura iniciadora, principalmente na fabricação de queijo por serem responsáveis pela transformação da lactose em ácido láctico, suas enzimas também contribuem para maturação, estando envolvidos como a proteólise e conversão de aminoácidos em substâncias voláteis, como também são as principais responsáveis pelas características organolépticas do queijo (PERRY, 2004), são cocos gram positivos, homofermentativo, requerem meios de culturas elaborados, crescem a temperaturas de 10°C a 45°C.

- Gênero *Leuconostoc*: muito utilizado na produção de pickles e vegetais fermentados (AQUARONE et. al. 2001), são células esféricas gram positivas, heterofermentativo, a fermentação é restrita a mono e dissacarídeos.

- Gênero *Pediococcus*: muito utilizado como inóculo na indústria de fermentados cárneos, por inibir um grande número de micro-organismos patogênicos contaminantes desses produtos (SCHIFFNER et. al, 1978); são células que ocorrem alternadamente em dois planos com seus ângulos formando tetraedros, a fermentação da glicose produz ácido láctico ou DL (+) – Lactato.

- Gênero *Streptococcus*: são bactérias responsáveis juntamente com as do gênero *Lactobacillus* pela produção do iogurte promovendo a acidificação do leite (NICKERSON et. al. 1978). Os *Streptococcus* são células esféricas ou ovais, ocorrem em pares ou em cadeia, seu metabolismo fermentativo produz ácido láctico, não produzindo gás.

Uma grande diversidade de pesquisas tem sido conduzidas para a utilização de bactérias lácticas como culturas iniciadoras ou coadjuvantes na fabricação de produtos alimentícios (Tabela 1), com o intuito de padronizar os processos produtivos, melhorar a segurança e a qualidade dos produtos, preservando suas características típicas (DE PREZZI, 2014; SOUZA MOTTA, 2015;).

Tabela 1: Bactérias lácticas isoladas de diversos ambientes, sua aplicação e benefícios promovidos em produtos alimentícios

Culturas autoctones	Produto	Benefícios
<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , e <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Bebidas Fermentadas	Produção de ácidos orgânicos e melhor crescimento celular
<i>Lactobacillus</i> e <i>Staphylococcus</i>	Salsicha	Acidificação e redução de microbiota indesejável
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. plantarum</i> e <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	Queijos	Melhoria dos atributos sensoriais do produto
<i>Pediococcus acidilactici</i> e <i>Staphylococcus vitulus</i>	Salsichão e chouriço	Reduz a proliferação de <i>Enterobactereacea</i> e patógenos
<i>L. sakei</i> e <i>S. equorum</i>	Embutidos fermentados	Efeito benéfico nas características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais
<i>S. thermophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> e <i>L. helveticus</i>	Queijo Romano Pecorino	Melhora as características físico-químicas mantendo as características do queijo Romano Pecorino

FONTE: (DE SOUZA MOTTA, 2015).

### 3.2 *Lactobacillus*

Bactérias do gênero *Lactobacillus* apresentam morfologia de bacilos, Gram positivos, microaerófilos, catalase negativa e não apresentam motilidade (GOLDBERG, 1994). Sua utilização em processos fermentativos agroalimentares é devida ao fato de serem inócuas consideradas como GRAS, relacionados com a produção de alimentos de alta e média acidez, da qual podem participar como coadjuvantes da fabricação de leites fermentados, iogurtes e queijos.

Os *Lactobacillus* são empregados na fabricação de produtos lácteos com a função de melhorar a segurança do produto controlando agentes patogênicos pela competição entre eles; aumentar a vida útil do produto através da inibição de micro-organismos deteriorantes; melhorar as propriedades sensoriais e promover benefícios à saúde (ALVES, 2011).

Os fatores intrínsecos e extrínsecos relacionado ao crescimento de *Lactobacillus* são bastante amplos, apresentando capacidade de crescer em diferentes temperaturas e valores de pH, toleram O<sub>2</sub> e diferentes concentrações de NaCl e NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, estas características fisiológicas

são ideais para que seu uso não seja limitado as condições de processamento (DE MARTINS, 2003).

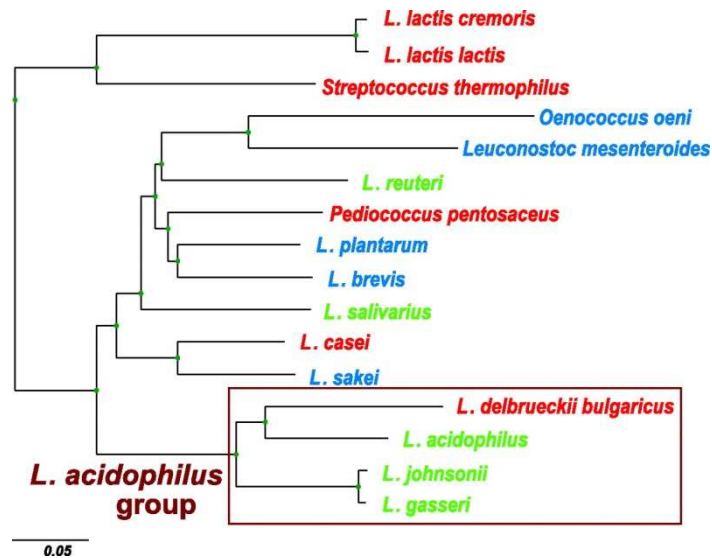
À rápida acidificação produzida na matéria prima e a produção de substâncias antimicrobianas destacando-se os ácidos orgânicos ( $C_3H_6O_3$  e  $CH_3COOH$ ),  $H_2O_2$  e bacteriocinas, pode interferir no desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis nos alimentos, através da competição por oxigênio, competição por sítios de ligação. A vida de prateleira dos alimentos pode ser controlada pelos fatores intrínsecos (pH, sal, conservadores, fatores antimicrobianos naturais) e extrínsecos (período de armazenamento, atmosfera da embalagem), e a utilização desses fatores combinados pode prolongar a vida de prateleira, a estabilidade microbiológica e impedir a produção de toxinas por micro-organismos patogênicos (DE MARTINS, 2003).

A necessidade de controlar bactérias patogênicas, devido à sua capacidade de sobreviver em condições de baixo pH, é um grave problema na produção de fermentados, nos últimos anos as pesquisas para a seleção de culturas com a capacidade de produzir bacteriocinas antagônicas às bactérias patogênicas tem se intensificado com o intuito de manutenção da segurança alimentar (JACOME et al., 2013).

### *3.2.1 Identificação Molecular de Lactobacillus sp.*

Genomas de Bactérias lácticas estão sendo sequenciados e as comparações entre a organização genética e o conteúdo informacional são importantes para a identificação entre os diversos membros desse grupo. Devido a grande importância relacionada à segurança alimentar os micro-organismos empregados em formulações de produtos alimentícios (Figura 1) devem ser identificadas para possibilitar a previsão do seu comportamento, durante o processo tecnológico (YEUNG et al., 2002).

Dendograma 1: Árvore filogenética de Bactérias Lácticas representando as várias origens ou usos de BAL: vermelho para a fermentação de laticínios, azul para outra fermentação, tais como cerveja, vinho, plantas, ou carne, e verde para as bactérias do trato gastrointestinal.



Fonte: LIU et al. (2008)

A identificação do genoma de bactérias lácticas é uma oportunidade para estudo genômico e elucidação das rotas metabólicas de produção de compostos de sabor e aroma, bem como a produção de enzimas envolvidas nos processos de degradação de proteínas e lipídios (LIU et al., 2008).

O sequenciamento da porção genômica do rDNA 16S permite a identificação de diferentes espécies de bactérias lácticas, por ser uma região conservada e comum a diversas espécies (BARATTO et al., 2012).

O estudo molecular de bactérias lácticas no Brasil ainda é incipiente. A diversidade desse grupo de bactérias faz com que diferentes grupos de pesquisa desenvolvam estudos nos mais variados aspectos. Existem vários métodos de tipagem genética de micro-organismos, entretanto estes devem permitir a diferenciação clara entre isolados, e principalmente, deve ter uma elevada reprodutibilidade. Nem todos os métodos moleculares de caracterização são igualmente eficazes, diferindo normalmente na capacidade discriminatória entre os níveis taxonômicos. Como tal, a escolha do método a ser aplicado deve ser feita de acordo com a finalidade pretendida, seja: identificação ou diferenciação, ou outros aspectos como reprodutibilidade, poder discriminatório, custos envolvidos, etc. (SAMBROOK; RUSSEL, 2001; CANHOS et al., 1999; AMANN et al., 1995).

Uma das principais dificuldades em classificar as bactérias por métodos fenotípicos é a capacidade de elas apresentarem diferentes características em diversas condições. Uma forma mais concreta para se identificar as bactérias é a abordagem polifásica que consiste em testes bioquímicos e morfológicos apoiados em métodos de análises moleculares (PRAKASH et al., 2007).

Entre as técnicas baseadas na análise de DNA as modificadas a partir da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR- *Polymerase Chain Reaction*) têm demonstrado boa aplicabilidade para as bactérias lácticas (CUSICK; O'SULLIVAN, 2000; DRAKE et al., 1996; TENOVER et al., 1995), e estão cada vez mais tornando-se simples e utilizadas na maioria dos estudos sobre identificação de micro-organismos de difícil classificação taxonômica, a partir de perfis obtidos por eletroforese (FARBER, 1996).

O uso de técnicas moleculares vem desde alguns anos atrás demonstrando que podem auxiliar na identificação de micro-organismos. Segundo Lee et al. (2008) a amplificação do gene 16S do RNAr seguido do seu sequenciamento tem demonstrado boas vantagens, pois com esse método é possível realizar uma análise filogenética bem detalhada das cepas em questão.

A amplificação da região 16S RNAr permite fazer análises filogenéticas e identificações de espécies mais confiáveis por ter essa região do gene bem conservada e com domínios variados. É possível realizar um alinhamento entre as sequências analisadas, e assim comparar os pares de bases que uma contém e a outra não, dando características diferenciadas entre as espécies (COCOLIN; RANTSIOU, 2007). Pelos genes desta região serem muito conservados e estarem presentes em maior quantidade nas espécies pode-se ter uma maior certeza e precisão quanto a sua caracterização.

Muitas análises moleculares permitem ainda diferenciar isolados da mesma espécie, usando *primers* específicos para cada análise de PCR. A amplificação do gene 16S permite observar a diversidade entre grupos de bactérias investigadas mesmo quando a presença desses organismos é em pequenas quantidades no ecossistema. Estas técnicas possuem importância por possibilitarem uma caracterização dos isolados mais rápida e de maior segurança (COCOLIN; RANTSIOU, 2007).

Existem várias técnicas moleculares que podem ser utilizadas para a caracterização de *Lactobacillus* sp., esses métodos devem permitir a diferenciação das espécies assim como a investigação da presença de proteínas ou genes de importância tecnológica.

O método ARDRA é uma ferramenta comumente empregada para estudar a diversidade microbiana, que se baseia no polimorfismo do DNA. Assim, clones contendo fragmentos do gene 16S rDNA, obtidos através do uso de iniciadores universais ou específicos, são amplificados por PCR e clivados por endonuclease de restrição. A seguir os fragmentos são separados em gel de agarose de alta densidade ou gel de acrilamida. Os perfis resultantes são utilizados para classificar a comunidade em grupos genotípicos específicos ou para a tipagem de linhagens (SKLARZ, 2009).

Esta análise consiste na otimização da reação de amplificação para obtenção de bandas únicas (*amplicon* único) do gene rRNA 16S (JENSEN et al., 1993), e após clivagem com enzimas de restrição.

Ela também tem como princípio do *primer* se ligar a fitas opostas de DNA alvo e ocorrer a amplificação desse segmento entre os dois *primers* adjacentes junto com a enzima Taq polimerase. Os sítios de ligação dos *primers* devem ter certo limite de pares de bases, pois eles não são capazes de percorrer segmentos maiores durante a amplificação (WU et al., 2006).

### 3.2.2 Metabolismo Fermentativo dos *Lactobacillus* sp.

Um dos principais fatores que contribui para a utilização de *Lactobacillus* na fabricação de produtos lácteos fermentados é a produção do ácido lático, e de acordo com o produto final do metabolismo da glicose, os *Lactobacillus* estão agrupados em:

- Homofermentativo: fermenta a glicose pela via glicolítica de Embden- Meyerhof, possuem as enzimas aldolase e hexose isomerase, com deficiência da enzima fosfocetolase

De acordo como Bergey's Determinative Bacteriology, Holt et al. (1996) os *Lactobacillus* homofermentativos, produzem 85% de ácido lático a partir da glicose, a presença da enzima aldolase inibe à formação de gás durante a fermentação, a fermentação direta da glicose a ácido lático, converte  $1 \text{ mol/L}^{-1}$  de glicose em  $2 \text{ mol/L}^{-1}$  de ácido lático.

- Heterofermentativo: fermenta a glicose pela via alternativa da pentose ou hexose monofosfato, produzem a enzima fosfocetolase, porém não produzem as enzimas aldolase e hexose isomerase produzindo além do ácido lático, o dióxido de carbono, o ácido acético e ou etanol.

Os *Lactobacillus* com metabolismo heterofermentativo produzem 1 mol/ mol/L<sup>-1</sup> de ácido láctico; 1 mol/L<sup>-1</sup> de dióxido de carbono e 1 mol/L<sup>-1</sup> de etanol ou ácido acético a partir da glicose.

Tendo enfoque na produção de componentes de aroma e sabor o diacetil é desejável no processo de fabricação de iogurtes e alguns tipos de queijo, empregando os *Lactobacillus* heterofermentativos, já os *Lactobacillus* homofermentativos são empregados principalmente na fabricação de queijos.

### 3.3 Bacteriocinas

Os *Lactobacillus* são amplamente utilizados para a fermentação e preservação de produtos lácteos. Produzem compostos antimicrobianos, sendo essenciais para a garantia da inocuidade e extensão de vida de prateleira.

A grande maioria dessas bactérias produz uma variedade de fatores antagônicos durante o processo fermentativo, tais como substâncias antibióticas, proteínas bactericidas e produtos finais do metabolismo, como o ácido láctico (DEEGAN et al., 2006, BOURDICHON et al., 2012).

As bacteriocinas são proteínas bacterianas com propriedades bacteriostáticas sobre diversas espécies de micro-organismos. Algumas delas do grupo das bactérias lácticas tem sido identificadas e caracterizadas e podem ser divididas em bacteriocinas com espectro inibitório limitado, afetando apenas espécies geneticamente próximas e as com espectro inibitório amplo, podendo afetar diversas espécies de micro-organismos Gram positivos.

São classificadas em lantibióticas e não lantibióticas, de acordo com suas características estruturais. As lantibióticas contém aminoácidos incomuns, tais como deidroalanina, deidrobutirina e anéis de lantionina e as não lantibióticas contém apenas aminoácidos não modificados.

A ação das bacteriocinas depende da ligação a receptores da superfície celular bacteriana, com permeabilização da membrana citoplasmática e formação de canais iônicos que causam o efluxo rápido de componentes celulares de baixo peso molecular. A produção de bacteriocinas é em geral feita por plasmídios, assim como é plasmidial a resistência de

bacteriocinas (FRANCO; LANDGRAF, 2005). Estão distribuídas em 4 classes de acordo com suas características bioquímicas e genéticas:

- Classe I (lantibióticos): é constituída por peptídeos termoestáveis de baixo peso molecular (19 a 38 resíduos de aminoácidos) que apresentam em sua composição aminoácidos raramente encontrados na natureza como lantionina (COTTER; HILL; ROSS, 2005). A principal representante desta classe é a nisina, produzida por algumas linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*.

- Classe II: é composta por peptídeos de baixo peso molecular (< 10 kDa) termoestáveis. Possuem um espectro de inibição limitado. Geralmente apresentam uma estrutura helicoidal anfifílica, a qual permite sua inserção na célula alvo, promovendo a despolarização da membrana e morte celular (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008). As bacteriocinas pertencentes a esta classe encontram-se subdivididas em:

- ✓ Classe II a: é composta por bacteriocinas que apresentam alta especificidade contra *L. monocytogenes*. Seus representantes possuem 37 a 48 resíduos de aminoácidos. Esta classe também é conhecida por família das pediocinas, devido a pediocina ser a predecessora das bacteriocinas dessa classe (AYMERICH; HUGAS; MONFORT, 1998).

- ✓ Classe II b: é constituída por bacteriocinas que requerem a atividade combinada de dois peptídeos, com um mecanismo de ação que envolve a dissipação do potencial de membrana e diminuição da concentração intracelular de ATP. Estes peptídeos apresentam atividade bacteriocinogênica muito baixa se forem empregados individualmente (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

- ✓ Classe II c: as bacteriocinas pertencentes a esta classe apresentam uma união covalente das terminações C e N, resultando em uma estrutura cíclica. São representantes desta classe: a enterocina AS-48, a circularina A e a reutericina 6 (NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008).

- Classe III: esta classe é composta por grandes proteínas (> 30 kDa) que são sensíveis ao tratamento térmico (60-100°C por 15 minutos) e complexas quanto à atividade e à estrutura proteica. O mecanismo de ação destas bacteriocinas se diferencia das demais classes por promover a lise celular através da lise da parede celular do micro-organismo alvo (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

- Classe IV: encontram-se grandes complexos peptídicos contendo carboidrato ou lipídio em sua estrutura. Contudo, Cleveland et al. (2001) acreditam que estes complexos são artefatos de purificação parcial e não uma nova classe de bacteriocinas.

As bacteriocinas mais estudadas são a nisina, a pediocina, e a sakacina produzidas por *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici* e *Lactobacillus sakei*, o estudo da aplicação de culturas produtoras de bacteriocinas com o intuito de realizar a bioconservação tem sido realizada principalmente em produtos lácteos e cárneos fermentados.

A nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus lactis. lactis*, e a única cujo uso em alimentos é autorizado pela “*United States Food and Drug Administration*”(FDA). É utilizada na preservação de alimentos em vários países (FRANCO, LANDGRAF, 2005).

### **3.4 Emprego de *Lactobacillus* sp. na Fabricação de Alimentos**

A bioconservação de alimentos, através da adição de micro-organismos ou de substâncias naturais, é uma alternativa interessante para aumentar a vida de prateleira, garantir a segurança microbiológica, reduzir o uso de aditivos sintéticos, mantendo as características sensoriais e nutricionais de produtos perecíveis. Esta tecnologia de conservação alimentar é amplamente utilizada nos EUA, onde conta com a aprovação da FDA, porém esta tecnologia de conservação não está regulamentada na legislação europeia. A legislação Brasileira prevê o uso de substâncias com ação antimicrobiana na conservação de alguns alimentos de origem animal como fermentados lácteos, entretanto não possui legislação específica para o uso desse tipo de tecnologia (CARVALHO, 2016).

As principais vantagens referentes aos usos desta tecnologia relacionam-se com a menor limitação em relação aos conservantes químicos uma vez que esses micro-organismos ou substâncias naturais já estão naturalmente presentes nos produtos fermentados; não são conhecidas resistências e o impacto ambiental é mínimo já que são rapidamente eliminadas pela cadeia alimentar; possuem um espectro de ação muito definido; a sua atividade é potencializada pelo pH e apresentam um efeito sinérgico com outros agentes metabólicos antimicrobianos; sua utilização é compatível com a rotulagem de produto biológico já que a conservação é obtida sem conservantes químicos nem de síntese (FREIRE, 2010).

O processo de bioconservação pode apresentar como desvantagens a possível alteração das características sensoriais dos produtos alimentícios, pode apresentar custos elevados para produção e desenvolvimento de produtos, micro-organismos e substâncias com atividade antimicrobiana (FREIRE, 2010).

A aplicação de *Lactobacillus* sp. ou de suas substâncias antimicrobianas em um produto com função de bioconservação pode ocorrer com a utilização de técnicas “*in situ*” o micro-organismo desenvolve-se naturalmente no alimento, os *Lactobacillus* sp. produtores de substâncias antimicrobianas estarão sujeitos as condições de processamento do alimento tendo de competir com a microflora natural do alimento sem causar alterações físico-químicas e sensoriais no alimento, também podem competir com micro-organismos patogênicos protegendo o alimento em casos de abuso de temperatura (SAEED, SALAM, 2013).

Na utilização de técnicas “*ex situ*” o crescimento microbiano é controlado e incorporado ao alimento as substâncias antimicrobianas produzidas, as bacteriocinas podem ser adicionadas na forma de concentrados obtidos do crescimento de *Lactobacillus* sp. ou as substâncias podem ser purificadas e adicionadas aos alimentos sendo possível controlar a dose a ser aplicada obtendo resultados mais confiáveis (PEREZ et al., 2014).

Os *Lactobacillus* sp. são empregados na fabricação de produtos de origem láctea, carne e vegetal, sendo os principais produtos fermentados obtidos por seu uso os produtos de origem láctea como leites fermentados, bebidas lácteas e queijos, sua aplicação nesses produtos deve-se a sua ocorrência natural na microbiota do leite e de produtos lácteos, a manutenção das características físico-químicas e microbiológicas durante a vida útil do produto (RESENDE et al., 2011), e o desenvolvimento das características sensoriais do produto durante os processos de fermentação e maturação (LIU et al., 2008; RAIEK; IBRAHIM, 2013).

O conhecimento do metabolismo dos *Lactobacillus* sp. para sua utilização como cultura bio-protetora é fundamental, visto que estará sujeito as condições de processamento que podem interferir no crescimento e produção de substâncias com efeito antagônico, os micro-organismos devem ser isolados e caracterizados quanto ao crescimento em diferentes condições de temperatura, pH e concentração de NaCl, determinar a concentração mínima inibitória das substâncias produzidas contra patógenos para garantia do efeito inibitório desejado (JACOME et al., 2013).

O uso de bactérias lácticas como cultura iniciadora em produtos fermentados está relacionado a seu metabolismo primário que contribui para a rápida acidificação do produto e conservação durante o tempo de armazenamento (RAIEK, IBRAHIM, 2013), o metabolismo de proteínas e lipídios contribui para a evolução dos componentes de sabor e aroma de diversos fermentados lácteos, principalmente no queijo estão diretamente envolvidas no

desenvolvimento do “*flavor*” no decorrer do processo fermentativo e de maturação (LIU et al., 2008).

Durante o processo fermentativo os micro-organismos utilizados como culturas iniciadoras sofre autólise e nesse processo liberam para o meio extracelular componentes citoplasmáticos, esse processo parece exercer efeitos benéficos na modificação e manutenção dos atributos sensoriais e físico-químicos do produto, principalmente devido a atividade proteolítica exercida no produto (DE SOUZA, 2006).

A microbiota dos queijos contém naturalmente bactérias do gênero *Lactobacillus*, e sua aplicação industrial é de grande importância para a manutenção das características desejáveis do produto e da evolução dos atributos sensoriais durante o processo de maturação, onde esses micro-organismos são responsáveis pela conversão nutrientes fundamentais em componentes do aroma e sabor do produto (HERMMANS, 2013).

Para o desenvolvimento das características dos queijos, o metabolismo proteolítico dos *Lactobacillus* é de fundamental importância, durante o crescimento esses micro-organismos degradam a caseína presente no queijo formando peptídeos e aminoácidos livres que são os principais precursores dos compostos de sabor do queijo (DE SOUZA MOTTA, 2015).

### **3.4 Aplicação de *Lactobacillus* para Fabricação de Queijo Minas Frescal**

O queijo é um produto lácteo concentrado, apresenta elevado valor nutricional e pertence ao grupo de produtos lácteos fermentados. (JAY, 2005; ONG, et al., 2007; ALVEZ et al., 2008; PREZY, 2014.). É um produto de massa crua, com alto teor de umidade (46 a 55%), não maturado, sua vida de prateleira é curta, deve ser consumidos preferencialmente até 28 dias após sua fabricação, por apresentar características que o classificam como um produto altamente perecível mesmo armazenado sob refrigeração (SANGALETTI et al., 2009; REZENDE et al., 2011, PREZY, 2014).

A composição nutricional do queijo minas frescal compreende em proteínas de alto valor biológico, apresenta entre 12 a 18% de proteína, são classificados como queijo macio, semi gordo, com seu teor de gordura variando entre 25 e 44%, apresenta porcentagem de cloreto de sódio de 1,4 a 1,6%, e sua composição apresenta ainda vitaminas lipossolúveis, e

cálcio que possuem um papel fundamental na nutrição humana (SANGALETTI et al., 2009; REZENDE et al., 2011; ANDRADE et al., 2014).

É um queijo com alto teor de umidade (> 55%) e pH pouco ácido entre 5,1 a 5,6, essas características propiciam o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, fazendo com que o produto apresente-se como altamente perecível e comumente associado a doenças transmitidas por alimentos (JAY, 2005; ALVEZ et al., 2008; SANGALETTI et al., 2009; REZENDE et al., 2011; PREZY, 2014; ANDRADE, et al., 2014).

O queijo minas frescal é um excelente meio para o desenvolvimento de micro-organismos, principalmente micro-organismos como coliformes totais e termotolerantes, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp, sendo geralmente o veículo para que esses micro-organismos causem surtos de infecções e intoxicações alimentares (BASTOS, et al., 2001; KOMATSU, 2008).

De acordo com padrões microbiológicos vigentes, da Resolução n.º 12 de 2001 da ANVISA, os queijos com alta umidade (55%), como o Minas Frescal, devem apresentar a seguinte tolerância para amostras representativas:  $5,0 \times 10^2$  UFC de coliforme de origem termotolerante/g,  $5,0 \times 10^2$  UFC de estafilococos coagulase positiva/g e ainda ausência de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* em 25g.

O queijo minas frescal apresenta pH pouco ácido, atividade de água e umidade elevadas e ainda por apresentar baixa concentração de NaCl apresenta-se como um ambiente propício para o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis (JAY, 2005; PREZY, 2014).

O uso de culturas iniciadoras e culturas coadjuvantes vêm sendo estudada para melhoria da qualidade microbiológica no queijo minas frescal, tradicionalmente esse queijo é produzida com culturas mesofílicas (*Lactococcus lactis*) que promovem a formação de ácidos ao longo do processo de fermentação e armazenamento do produto, o uso de culturas de *Lactobacillus* (ALVES et al, 2011; HERMMANS, 2013; PREZZI, 2014) como coadjuvantes tem sido estudada principalmente para a melhoria do aspecto microbiológico, provocando também melhorias das características sensoriais e físico químicas do queijo minas frescal.

### 3.4.1 Micro-organismos Patogênicos Importantes Isolados de Queijo Minas-Frescal

Bactérias do grupo dos coliformes, *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, são os principais bioindicadores de contaminação presente em queijos frescos, existe uma grande preocupação em relação a inocuidade de queijos, por veicularem micro-organismos patogênicos como a *Listeria monocytogenes* (FRANCO, LANDGRAF, 2008, APOLINARIO et al., 2014).

Os principais micro-organismos contaminantes patogênicos relatados em casos de infecções veiculadas por queijos são:

• **Coliformes a 30°C (totais):** micro-organismos pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, apresentam-se como bastonetes Gram negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, fermentam lactose com formação de ácido e gás em 24 - 48 h/ 35°C (JAY, 2005).

**Coliformes a 45°C (termotolerantes):** pertencem a família *Enterobacteriaceae*, apresentam-se como bastonetes Gram negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, fermentam lactose com formação de ácido e gás exclusivamente em 24 h/ 44,5°C-45°C, nesse grupo apresentam-se patógenos de origem alimentar de origem não fecal como *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiellae* de origem fecal *Escherichia coli* (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A contaminação proveniente do grupo dos coliformes é responsável por alterações, como fermentações incomuns e estufamento prévio dos queijos ocasionando mudanças em aspectos sensoriais como cor e textura (GEORGES, 2015).

• ***Escherichia coli*:** bastonete Gram negativo pertencente a família *Enterobacteriaceae*, aeróbio ou anaeróbio facultativo, pode desenvolver-se a temperaturas de 7°C a 45°C, importante patógeno de origem alimentar, com sintomas variados dependendo do sorotipo presente (JAY, 2005, FRANCO, LANDGRAF; 2008).

A *E. coli* apresenta seis linhagens patogênicas *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* aderente-difusa (DAEC) e *E. coli* enteroagregativa, doenças causadas por linhagens patogênicas de *E. coli* geralmente são limitadas à superfície da mucosa podendo disseminar pelo organismo. Os sintomas variar entre diarreias, vômitos, febre, eliminação de sangue nas

fezes, até a instalação da Síndrome Urêmica Hemolítica (FRANCO; LANDGRAF, 2008; JAY, 2005).

• ***Staphylococcus aureus***: apresentam-se na forma de cocos Gram positivos, podem ocorrer sozinhos ou agrupados em pares ou cadeias irregulares, são quimiorganotróficos, aeróbios facultativos, catalase positiva, oxidase negativa, redutores de nitrito (FERREIRA, 2015).

São veiculados pelo ar e podem estar presentes na poeira, esgoto, água, leite, alimentos ou equipamentos, superfícies de ambientes de manipulação de alimentos, nos seres humanos e animais (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Desenvolvem-se em temperaturas entre 7 a 48°C, sendo a temperatura ótima de crescimento compreendida entre 30 a 37°C, apresenta crescimento em concentrações de NaCl de até 10%, em faixas de pH incluídas entre 4,0 a 10 (FORSYTHE, 2002).

As intoxicações alimentares causadas por esse patógeno são relacionadas com a habilidade de produzir toxinas em condições de temperaturas entre 10 a 48°C, pH 4,5 a 9,6. A principal doença relacionada à ingestão de toxinas produzidas por *S. aureus*. Para a produção de toxinas nos alimentos é necessário uma contagem de células superior a 10<sup>5</sup> UFC/g de alimento (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2008; APOLINARIO et al., 2014).

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das DTA mais preeminentes no mundo, causada pela ingestão de enterotoxinas pré-formadas nos alimentos, normalmente a presença do patógeno é detectada em produtos fermentados de origem animal (FERREIRA, 2015).

• ***Salmonella spp***: Este patógeno constitui-se em um dos principais micro-organismos associados a enfermidades causadas por alimentos contaminados durante o processamento da matéria prima ou por más condições de higienização do ambiente e por contaminação cruzada de equipamentos e manipuladores. São bastonetes Gram negativos, apresentam motilidade, não esporulados, não capsulados, não fermenta lactose, crescem a temperatura ótima de 37°C, são anaeróbias facultativas e produzem gás a partir da glicose (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005; (FRANCO; LANDGRAF, 2008; APOLINARIO et al., 2014).

O gênero *Salmonella* é dividido em dois grandes grupos: *Salmonella entérica* e *Salmonella bongori*. A *Salmonella entérica* possui seis subespécies da qual a subespécie I é a que apresenta a quantidade de 2500 sorovares identificados e compreende os sorogrupos de A a H. Sua temperatura ideal se dá em torno de 37°C com um pH em torno de 7,0. Cepas dos

sorogrupos de A, B, C1, C2, D e E são as que causam aproximadamente 99% das infecções em ser humanos e animais de sangue quente (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005).

• ***Listeria monocytogenes***: A *Listeria monocytogenes* pertence ao gênero *Listeria*, sendo a mais patogênica entre as demais espécies pertencentes ao grupo. Apresentam-se na forma de bacilos ou cocobacilos apresentando diâmetro entre 0,5 a 2,0µm, pode apresentar-se na forma de cadeias contendo entre 3 e 5 células (GRAY, KILLINGER, 1966), não esporulados, catalase positiva, oxidase negativa e apresenta β-hemolise em ágar sangue, apresenta crescimento em condições de aerobiose, anaerobiose e em meios com concentração de CO<sub>2</sub> de até 10%, sua virulência pode ser explicada pela presença de fatores de adesão que permitem a interação com os ácidos teicóicos da membrana plasmática da célula hospedeira. é um micro-organismo psicofílico crescendo em temperaturas de refrigeração, compreendendo temperaturas entre 1 a 45°C, sendo sua temperatura ótima de crescimento nas temperaturas de 30 a 37°C.

Apresenta baixa resistência ao tratamento térmico sendo facilmente eliminada no processo de pasteurização do leite (BARANCELLI, 2011). Condições de temperatura entre 20 e 25°C há o desenvolvimento do flagelo peritríquio fazendo com que o micro-organismo desenvolva motilidade (GRAY; KILLINGER, 1966).

Fatores como pH e concentrações elevadas de NaCl não impedem o desenvolvimento de *Listeria monocytogenes*, há relatos na literatura que indicam o crescimento em uma faixa de pH que compreende uma faixa entre 4,4 a 9,6, sendo o pH ótimo para o cultivo de *Listeria monocytogenes* compreendido entre 7,0 a 7,5. Outro fator associado ao desenvolvimento de *Listeria monocytogenes* nos alimentos é sua tolerância a altas concentrações de NaCl sendo possível observar o crescimento de *Listeria monocytogenes* em concentrações de até 10 % NaCl (JACQUET et al., 1995).

Apresenta 13 sorotipos, 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, “7”, a sorotipagem de *Listeria monocytogenes* é baseada nos antígenos somáticos (O) e flagelar(H), os sorotipos que ocorrem em maior frequência em doenças transmitidas por alimentos são os sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c, e em casos clínicos os principais sorotipos isolados são os 1<sup>a</sup>, 1b e 4b, representando aproximadamente 90% dos casos de infecção por *Listeria monocytogenes*. Os isolados clínicos representam uma maior taxa de letalidade em doses baixas (TORRES et al., 2005).

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Condições de crescimento e Cultivo de Bactérias do Ácido Lático**

Os isolados cultivados de *Lactobacillus* sp. pertencentes ao Laboratório de Microbiologia da Unoesc-Videira, foram obtidos a partir de produtos cárneos da região BORDIGNON (2005); GATTI (2007); DEBASTIANI (2012) , selecionados aleatoriamente para o ensaio de ação antimicrobiana, os micro-organismos encontram-se em um banco de linhagens com os *Lactobacillus* sp. Essas linhagens, assim como os padrões, estão preservados em glicerol 25% e são mantidas em freezer a -20°C.

Os isolados foram cultivados em caldo MRS. A reativação e cultivo dos isolados foi realizado inoculando 1 mL do material armazenado, incubado sob condições de microaerofilia a 35°C/ 24 h.

Após a incubação os tubos que apresentaram crescimento foram inoculados por estriamento em ágar MRS em e incubados a 30°C/24 h sob microaerofilia para obtenção de colônias isoladas puras.

### **4.2 Condições de Cultivo e Crescimento dos Micro-organismos Indicadores**

Os indicadores utilizados no presente estudo são pertencentes a coleção de micro-organismos ATCC (*American Type Culture Collection*): *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella* Typhimurium (ATCC14028) para cultivo, e o cultivo de *Listeria monocytogenes* Scott A realizados em meio caldo BHI.

Para o cultivo inocula-se uma colônia pura isolada da cultura previamente crescida em ágar BHI em 5mL de caldo BHI, para *E. faecalis*, *E. coli*, *S. aureus* e *S. Typhimurium* incubados a 37°C por 24 h e para *L. monocytogenes* a incubação realizou-se a 30°C por 24 h. Para posterior utilização nos ensaios de atividade antimicrobiana.

### 4.3 Caracterização Fenotípica e Bioquímica de Bactérias Láticas

#### 4.3.1 Aspectos Morfológicos dos Isoladas

Os cultivos purificados incubados em Ágar MRS foram submetidos à coloração de Gram para observação da Morfologia e diferenças estruturais da parede celular.

A partir da observação em microscópio óptico, quando apresentarem aspectos morfológicos de bacilos ou cocos Gram positivos, foram testados quanto a produção da enzima catalase (REZENDE et al., 2011).

#### 4.3.2 Prova da Catalase

Uma alçada de uma colônia típicas crescida em ágar MRS (30°C/24h) foi transferida para uma lâmina de microscopia e adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3%, de evidenciado o borbulhamento imediato a reação será positiva, caso o borbulhamento não ocorra a reação será negativa (DUARTE et al. ,2016).

#### 4.3.3 Fermentação de Carboidratos

Os isolados Gram positivos catalase negativa foram testados quanto a capacidade de fermentar carboidratos, 1 mL das culturas dos isolados tiveram seu pH ajustado para 7 utilizando-se NaOH 0,1 mol/L, foram semeados em 5mL de caldo vermelho de fenol adicionado de 0,01% dos açúcares glicose, lactose, sacarose e sorbitol.

Os tubos foram incubados a 37°C por 48h. A modificação da coloração do meio para amarelo indica a fermentação do carboidrato, caso não ocorra modificação na coloração do meio indica que não ocorreu a fermentação.

#### 4.4 Análise da Produção de Substâncias Antimicrobianas

A verificação da atividade antimicrobiana de bactérias do ácido lático foi realizada utilizando o método de difusão em ágar, permitindo uma análise mais completa com a produção de compostos que se formarão na placa de Petry frente aos patógenos em estudo, os ensaios foram realizados em triplicata para maior confiabilidade dos resultados.

Para a avaliação do potencial de substâncias antimicrobianas, em particular a de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas, foi utilizado a metodologia *Well diffusion assay* (difusão em poços), segundo Schillinger e Lucke (1989) foram utilizados 100µL de cultura indicadora (*E. coli*, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Salmonella* Typhimurium).

Os indicadores previamente crescidos em caldo BHI foram inoculados pelo método de semeadura em profundidade em ágar BHI. Após a solidificação foram perfurados poços de 6 mm de diâmetro onde ocorreu a adição de 70 µL do sobrenadante da centrifugação (5min a 1000 rpm) do caldo das culturas de bactéria láctica previamente crescidas em caldo MRS.

O pH das culturas foi ajustado para 5,5-6,0 com NaOH 2N. Como controle positivo um poço foi completado com 70 µL de solução de nisina contendo 100 µI (Nisaplin, Applin&Barret, Inglaterra) e como controle negativo, 70 µL caldo MRS estéril.

A incubação realizou-se a 37°C por 24 horas para *E. coli*, *E. faecalis*, *Salmonella* Typhimurium e *S. aureus* e para *Listeria monocytogenes*, incubação a 30°C por 24 horas. Durante a incubação, a substância produzida pela bactéria láctica testada difundiu-se pelo ágar, inibindo o crescimento do indicador e formando um halo ao redor do orifício, caso a substância tenha caráter inibidor do crescimento da cultura indicadora.

#### 4.5 Caracterização Tecnológica de *Lactobacillus* sp.

Os isolados selecionados a partir das técnicas anteriores foram avaliados quanto as suas características tecnológicas, deu-se ênfase às características relacionadas ao produto ao qual as culturas em estudo foram adicionadas, a partir da avaliação do crescimento em:

extremos de temperatura, pH e diferentes concentrações de sal, formação de gás a partir da glicose, produção de diacetil.

#### *4.5.1 Produção de Gás a partir da Glicose*

Para observar a produção de gás a partir da glicose foi utilizado caldo MRS (glicose 20 g/L, proteose peptona 10g/L, extrato de carne 8g/L, extrato de levedura 4g/L, polisorbato 80 1 ml/ L, fosfato dipotássio 2g/L, acetato de sódio 5g/L, citrato diamônio 5g/L, sulfato magnésio 0,2g/L, e sulfato manganês 0,05g/L), contendo tubos de Durhan invertidos para a coleta do gás produzido pela fermentação, determinada pela inoculação ao nível de 10% da cultura, previamente reativada em caldo MRS e incubada a 37°C sob agitação, por 24h, decorrido esse tempo foi observada a presença ou ausência de gás.

#### *4.5.2 Tolerância a variações de Temperatura, concentração de NaCl e pH*

A tolerância a extremos de temperatura, concentração NaCl e pH foi determinada pelo inóculo ao nível de 1% da cultura crescida em caldo MRS, foi transferido 1 mL da cultura para tubos contendo caldo MRS com concentração de 0%, 4% e 8% de NaCl, incubados a 30°C/24h, os isolados foram incubados a temperaturas de 10°, 37°C e 45°C /24 h, os teste de pH foram realizados a partir do cultivo dos isolados em pH 2,0, 4,5 e 6,0 o crescimento foi determinado por espectrofotometria a 520 nm e contagem com resultados expressos em UFC/mL.

Para a determinação das unidades formadoras de colônia para o crescimento em diferentes temperaturas, concentração de NaCl e pHs, foi realizada pela regressão linear dos valores de UFC, em relação a densidade óptica através da equação  $y = 2e-08x + 0,0774$ ,  $R = 0,9514$  (POFFO, 2011).

Os resultados foram avaliados pelo teste de Tukey a 5% de significância utilizando o software estatístico Statistica ® 10 para Windows.

#### 4.5.3 Produção de Diacetil

A produção de diacetil foi determinada por um *mixing* de 1mL das culturas inoculada a 1% e incubada por 24 horas a 30°C, com 0,5 mL de  $\alpha$ -naftol (1% em 96% de etanol) e 0,5 mL de hidróxido de potássio a 16%. O *mixing* foi incubado a 30°C por 10 min, quando ocorre a formação de um halo púrpura no topo de tubo a reação será positiva, caso o halo apresente coloração amarelada a reação é considerada negativa.

#### 4.5.4 Resistência a antibióticos

Os isolados LC07, LC31 e LSB09 foram selecionados por critérios tecnológicos para a fabricação do queijo minas frescal e ensaio de inibição frente a patógenos, o perfil de resistência a antibióticos foi obtido utilizando a metodologia de disco difusão descrita por Kirby e Bauer (1966). Utilizando a série de discos Multifar 15 Série Gram-Positiva (CEFAR-Diagnostica, Brasil), com os antibióticos Cefalotina, Clindamicina, Eritromicina, Oxacilina, Penicilina G, Vancomicina, Amicacina, Ampicilina, Ceftazidima, Ciprofloxacino, Cotrimoxazol, Cloranfenicol, Gentamicina, Tetraciclina e Tobramicina.

### **4.6 Fabricação do Queijo Minas Frescal Adicionado de Bactérias do Ácido Lático Produtoras de Substâncias Antimicrobianas**

As culturas lácteas previamente selecionadas foram os isolados de *Lactobacillus* sp. LC07, LC31 e LSB09 devido ao perfil de inibição de patógenos e critérios tecnológicos relacionados às condições em que serão expostas durante o processo de fabricação do queijo minas frescal.

Primeiramente, os isolados de bactérias lácticas foram avaliados quanto ao potencial de inibição de micro-organismos patogênicos em Queijo Minas Frescal. Após o Queijos Minas Frescal, produzido com a adição dessas bactérias, foi avaliado quanto a parâmetros físico-químico, microbiológicos e sensoriais. Comparando com o queijo produzido com fermento comercial mesofílico tipo O (Docina ®).

#### *4.6.1 Determinação do potencial das Bactérias Lácticas na Inibição de micro-organismo Patogênicos em Queijo Minas Frescal*

Nesta análise foram realizados dois planejamentos: primeiro, foi avaliado o potencial do *Pool* de *Lactobacillus* pré-selecionados (LC07, LC31 e LSB09) em inibir o crescimento dos micro-organismos testes patogênicos (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Salmonella* Typhimurium) inoculados no queijo minas frescal (Tabela 2); em um segundo momento, foi avaliado o potencial de cada *Lactobacillus* sp. individualmente, em inibir *S. aureus* (Tabela 3).

Para fabricação dos queijos foram utilizados 50 L de leite pasteurizado, totalizando 12 peças que foram fracionadas em 60 porções de 50 g embaladas separadamente para utilização nos dias decorrentes das análises.

O leite foi aquecido a 35°C, neste foi adicionado 6mL de solução de CaCl<sub>2</sub> a 50%. Neste momento foram adicionados os *Lactobacillus* com atividade antimicrobiana (*o pool* ou cada isolado individualmente, conforme o experimento) ou fermento comercial mesofílico tipo O (Docina ®) na proporção de 10% do volume total de leite utilizado para a fabricação do queijo. A mistura foi incubada em estufa a 35°C para manutenção da temperatura ideal para ação das enzimas formadoras do coalho e para a multiplicação da cultura, após o processo de coagulação foi realizado o corte da massa em cubos de 2 cm de aresta, realizando a etapa de mexedura que tem por finalidade a dessoragem, o processo de mexedura deve ser realizado lentamente até total exsudação do soro do interior dos grão da coalhada (Figura 2) (FURTADO,1994) Referenciar

Após a dessoragem parcial da massa foi realizado o processo de enformagem e prensagem para retirada do soro e compactação da massa, na superfície dos queijos foi inoculado as culturas indicadoras de acordo com os tratamentos.

Para a obtenção do *Pool* de *Lactobacillus* sp., os 3 isolados foram inoculados em caldo MRS incubado a 37°C/ 24h em jarra de anaerobiose. Após o crescimento, foi transferido 1mL ( $3,00 \times 10^8$  UFC/mL) desse *pool* para 10mL de caldo MRS, seguida de incubação a 37°C por 20h. Para inoculação no queijo, os inóculos foram obtidos em 200 mL de leite desnatado reconstituído (0,5%) e incubado a 37°C/ 24 h, após o pré-inóculo foi adicionado ao leite para fabricação do queijo minas frescal de acordo com os tratamentos (FURTADO,1994) .

*Lactobacillus* com atividade antimicrobiana (*Pool* de *Lactobacillus* contendo LC07, LC31 e LSB09) a concentração celular final adicionado aos queijos foi de  $1,15 \times 10^{10}$  UFC/mL (Tabela 2). Já para o ensaio de inibição frente *S. aureus* os isolados LC07 ( $7,58 \times 10^8$  UFC/mL), LC31 ( $1,51 \times 10^8$  UFC/mL) e o LSB09 ( $2,01 \times 10^8$  UFC/mL) foram inoculados em 10 mL de caldo MRS incubados a 37°C/20 h.

Tabela 2: Análise do potencial do *Pool* de *Lactobacillus* sp. em inibir patógenos em Queijo Minas Frescal

Tratamento	Pool <i>Lactobacillus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. momocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S.</i> <i>Typhimurium</i>
T1*	--	$6,81 \times 10^5$	--	--	--
T2	$1,15 \times 10^{10}$	$6,81 \times 10^5$	--	--	--
T3*	--	--	$5,35 \times 10^5$	--	--
T4	$1,15 \times 10^{10}$	--	$5,35 \times 10^5$	--	--
T5*	--	--	--	--	$1,47 \times 10^5$
T6	$1,15 \times 10^{10}$	--	--	--	$1,47 \times 10^5$
T7*	--	--	--	$1,47 \times 10^5$	--
T8	$1,15 \times 10^{10}$	--	--	$1,47 \times 10^5$	--

Os valores compreendem a concentração em UFC adicionados para cada microrganismo nos tratamentos.

Os experimentos foram realizados em duplicata.

(\*) Queijos elaborados como controle positivo do crescimento foi utilizado como inóculo para a fermentação do queijo o fermento mesofílico tipo O (Docina ®)

Após, foi realizado o segundo experimento, analisando-se a ação individual de cada um dos isolados sobre o *S. aureus* conforme delineamento apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Análise do potencial dos *Lactobacillus* sp. em inibir *S. aureus* em Queijo Minas Frescal

<b>Tratamento</b>	<b><i>Lactobacillus</i> (UFC)</b>	<b><i>S. aureus</i> (UFC)</b>
T9	B09 (7,80 x10 <sup>8</sup> )	1,47x10 <sup>5</sup>
T10	LC07 (6,50 x10 <sup>10</sup> )	1,47x10 <sup>5</sup>
T11	LC31(7,80 x10 <sup>8</sup> )	1,47x10 <sup>5</sup>
T12	-	1,47x10 <sup>5</sup>

Os valores compreendem a concentração em UFC adicionados para cada microrganismo nos tratamentos.

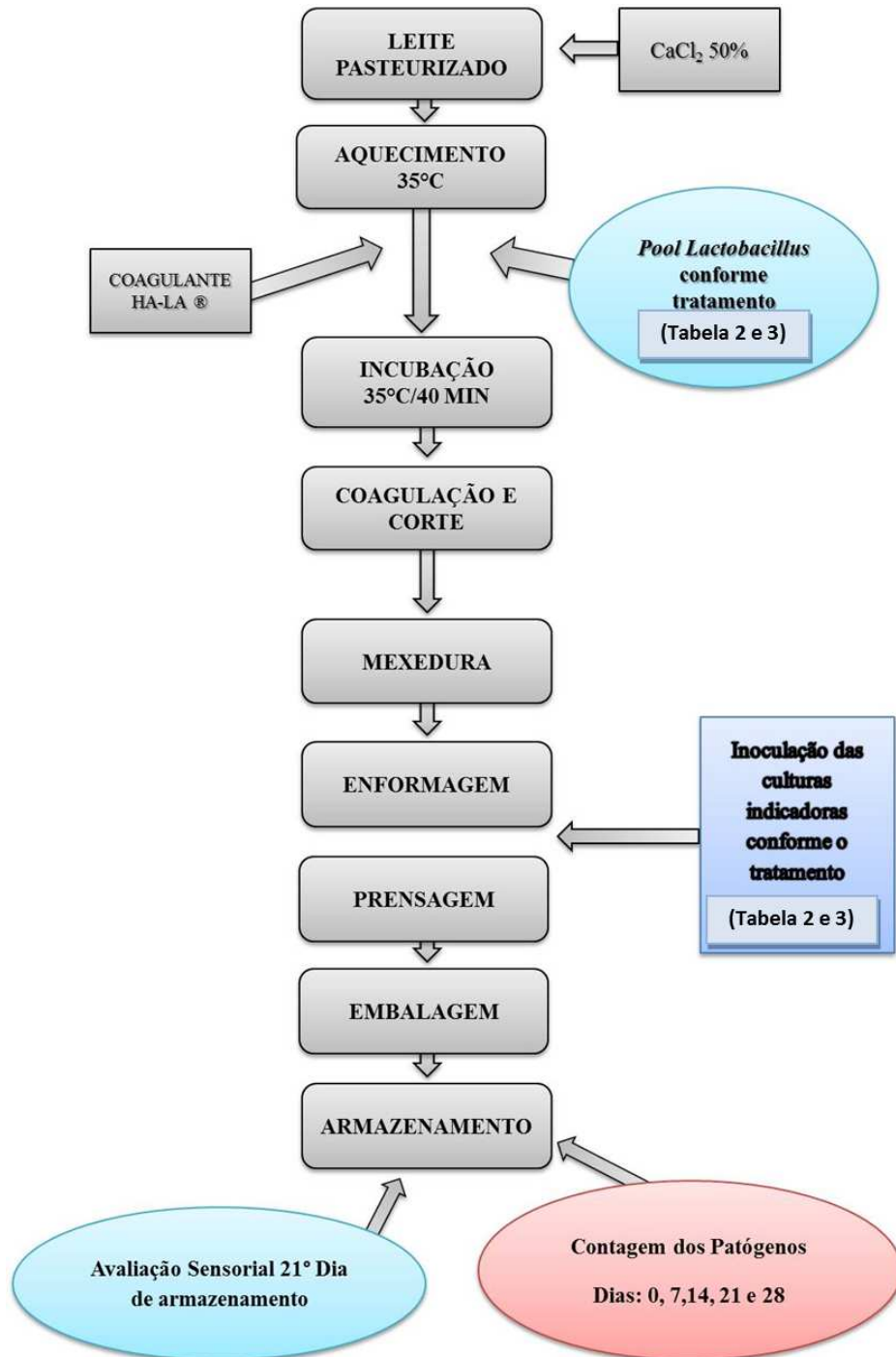
Os experimentos foram realizados em duplicata.

Um controle adicional foi realizado com a inoculação do *Pool* de *Lactobacillus*, consistindo no controle negativo do desenvolvimento dos indicadores, e para o acompanhamento do desenvolvimento dos isolados durante o período de armazenamento.

Foram inoculados 100 µL dos micro-organismos indicadores na superfície dos queijos de acordo com os tratamentos delineados na Tabela 2 e na Tabela 3.

O produto foi embalado e armazenado geladeira a temperatura de 10°C ± 2°C por 28 dias onde foram realizadas as análises microbiológicas para contagem de *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Salmonella* Typhimurium, e contagem de bactérias lácticas conforme representado no Fluxograma 1.

FLuxograma 1: Fluxograma da fabricação do queijo minas frescal adicionado de Bactérias lácticas com atividade antimicrobiana e micro-organismos indicadores para ensaio de inibição.



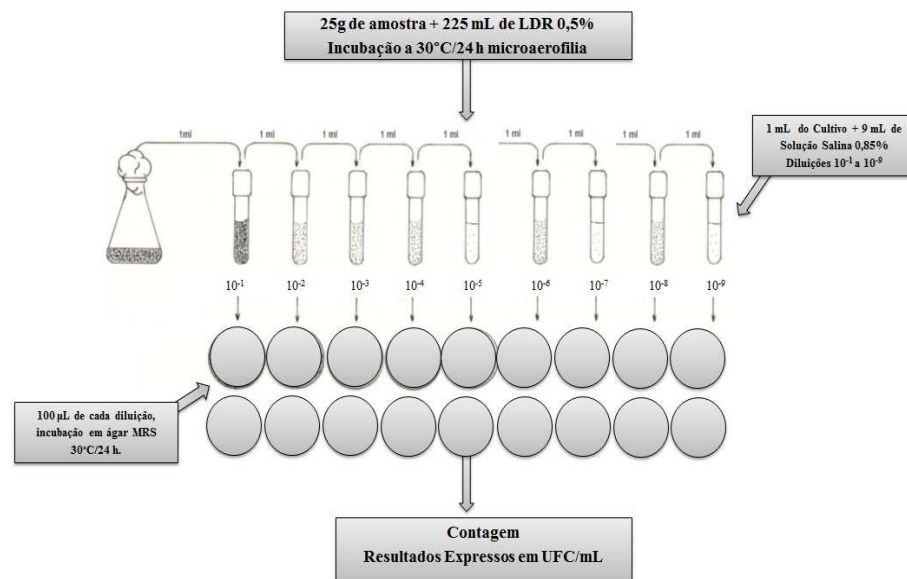
Fonte: Autor (2016).

A contagem foi realizada pela semeadura direta conforme Silva et al. (1998). Foram homogeneizado 10 g do queijo em 90 mL de água peptonada. Volumes de 0.1ml da amostra e de cada diluição foram semeados em profundidade em ágar seletivo (*E. coli* (ágar EMB), *L.*

*monocytogenes* (ágar ALOA), *S. aureus* (ágar Baird Parker) e *Salmonella* Typhimurium (ágar XLD)). As placas foram incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. Para posterior contagem, os resultados obtidos nas contagens durante 28 dias foram expressos em UFC/10g do produto. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Para contagem de bactérias lácticas foi homogeneizado 10 g da amostra de queijo em 90 mL de água peptonada, a contagem foi realizada pelo plaqueamento em profundidade em ágar M 17, seguido de incubação em jarra de anaerobiose a 37°C por 48 horas (IDF, 1997). Todos os testes foram realizados em duplicata para maior confiabilidade dos resultados. Os resultados das contagens de bactérias lácticas durante os 28 dias de armazenamento do produto foram analisados por ANOVA e teste de Tukey a 5 % de significância.

Esquema 1: Contagem de bactérias lácticas



Fonte: IDF (1997)

#### 4.6.2 Caracterização do Queijo Minas Frescal Adicionado de Bactérias Lácticas Produtoras de Substâncias Antimicrobianas

Como parâmetro físico-químico de acompanhamento durante o armazenamento foram realizadas análise de pH nos dias 0, 1, 7, 14, 21 e 28. Para acompanhamento da relação das

alterações de pH com a manutenção das culturas lácticas protetoras e das características sensoriais do produto.

As análises microbiológicas para assegurar a qualidade microbiológica do produto foram analisadas de acordo com a metodologia descrita em BRASIL, 2003, e os microorganismos analisados encontram-se descritos na Tabela 4, os resultados foram analisados de acordo com BRASIL, 2001.

Tabela 4: Análises Microbiológicas do Queijo Minas Frescal

<b>Análises Microbiológicas</b>	
<b>Análise</b>	<b>Método*</b>
<b>Mesófilos</b>	Contagem em Placas (PCA)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>Coliformes Totais e Termotolerantes</b>	Número mais Provável

\* Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água  
Fonte: BRASIL, 2003.

#### 4.6.3 Avaliação sensorial do Queijo Minas Frescal adicionado de Bactérias Lácticas

A análise sensorial foi conduzida no Laboratório de Nutrição da Universidade do Oeste de Santa Catarina 24 horas após a fabricação do produto, e no 21º dia de armazenamento, o painel sensorial foi composto de 50 provadores não treinados, que receberam a amostra do queijo adicionado do pool de *Lactobacillus* (amostra 002) e a amostra de queijo minas frescal produzido com fermento biológico tipo O (amostra 001) juntamente com a ficha de avaliação.

O teste de aceitação foi aplicado usando escala hedônica de 5 pontos sendo: 1- para não aprovei o produto e 5- para aprovei o produto. O teste envolvendo a formulação avaliou os seguintes parâmetros: aparência, cor, odor, textura e sabor.

Os resultados da análise sensorial foram avaliados estatisticamente através de ANOVA e teste de média de Tukey a 5% de significância utilizando o software STATISTICA 10.

## 4.7 Identificação Molecular das Bactérias Láticas

Para análise molecular foi utilizada a técnica de ARDRA, a técnica utilizada foram construídos e analisados os perfis moleculares e comparados com as referências (padrões), possibilitando a determinação das linhagens.

Para a realização da técnica foi procedida a extração do DNA genômico dos isolados, a amplificação do rDNA 16S e a clivagem com endonuclease de restrição (VENTURA et al., 2000).

### 4.7.1 Extração do DNA

Após a caracterização morfológica e bioquímica, os isolados que apresentarem características potenciais para utilização como cultura bioprotetora em produtos lácteos, os micro-organismos foram inoculados em caldo MRS para os cultivos e em seguida realização extração de DNA conforme SAMBROOK e RUSSEL (2001), com algumas modificações.

Após a confirmação do crescimento, as culturas foram transferidas para um microtubo de microcentrífuga de 2mL par centrifugação a 5.000 rpm durante 5min.

O sobrenadante foi descartado, e as células ressuspensas em 500 $\mu$ L de solução TE (10mM Tris 25Mm EDTA pH 8) ou FTA (solução para extração). Adiciona-se 25 $\mu$ L de solução estoque de lisozya (50 $\mu$ g/mL) incubado a 37°C por aproximadamente 30 min.

Foi adicionado 15 $\mu$ L de proteinase K e procedida uma nova incubação por 30 min. a uma temperatura de 37°C. Adiciona-se 60 $\mu$ L de SDS 20% ou o dobro de SDS 10%, mistura-se sob leve agitação e incuba-se a 60°C em banho maria por cerca de 15min. Procedeu-se a adição de 500 $\mu$ L de fenol-clorofórmio agitando vigorosamente em agitador tipo vórtex seguido de centrifugação a 10.000 rpm durante 10min. Depois transferiu-se a fase aquosa para outros microtubos de 2mL e adicionando-se 400 $\mu$ L de fenol-clorofórmio, agitando em vórtex vigorosamente. Centrifuga-se a 10.000rpm por mais 10min. Transfere-se uma alíquota de aproximadamente 500 $\mu$ L com micropipeta, da parte superior (aquosa) para microtubos de

1,5mL, adicionando-se 10µL de NaCl 5M (concentração final de 0,1M) e procede-se a precipitação dos ácidos nucléicos com 2 volumes de etanol absoluto (1mL) e coloca-se por cerca de 1h em freezer a temperatura aproximada de -20°C. Procede-se nova centrifugação a 10.000 rpm durante 20min, descarta-se o sobrenadante e o precipitado de ácidos nucléicos foram lavados com 500µL de etanol 70% gelado. Deixa-se secar a temperatura ambiente ou em microtubos abertos por aproximadamente 5min em estufa a 37°C, procede-se a dissolução em 60µL de TE.

Acrescenta-se 2µL de RNase em cada microtubo incubado a temperatura ambiente por cerca de 10min.

Os DNAs extraídos dos isolados foram analisados em eletroforese de gel de agarose a 1%. O material foi estocado a uma temperatura de -20°C, para posteriormente ser utilizado na amplificação pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

#### 4.7.2 Amplificação e clivagem do DNA 16S por PCR

Para a realização da técnica de ARDRA foi amplificada a região do rDNA 16S dos isolados de *Lactobacillus* spp. e seguida por clivagem com endonuclease de restrição Alu I (AGCT). Dessa forma, primeiramente foi obtido um perfil de bandas dessa região de rDNA 16S para cada espécie padrão de *Lactobacillus* spp. (*L. sakei* ATCC 15521, *L. plantarum* ATCC 8014, *L. casei* ATCC 393, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. delbrueckii subsp. lactis* ATCC 7830, *L. brevis* ATCC 367, *L. lendneri*, *L. curvatus* L442 e *L. fermentus* ATCC 9338), e depois obtidos os perfis de bandas dos isolados e comparados com os padrões para confirmação da espécie.

Na amplificação do gene 16S rRNA, os *primers* utilizados foram os *primers* universais FD1 (5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3') e RP2 (5' -GGCTACCTTGTTACGACTT – 3') (WEISBURG et al., 1991).

Na reação foi utilizado 15,3µL de água estéril, 2,5µL de Tampão 10X, 1µL de primer Forward e 1µL de Reverse (25 pmol/µL), 1µL de cloreto de magnésio (50 mM), 2µL de dNTPs (1 mM), 1,25µL de DMSO e 2µL de DNA molde (50 ng/µL) e adicionou-se 0,2µL da enzima Taq (5 U), para um volume final de 25µL. Foi realizado um controle negativo (sem DNA).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador da marca *Thermo EletronCorp* modelo HBSP02110. Sendo as condições para a reação de amplificação: 96°C por 5 minutos; 35 ciclos a 94°C por 40 segundos; 50°C por 1 minuto; e 72°C por 1 minuto e 30 segundos. No último estágio da reação será realizado um ciclo de 72°C por 10 minutos e 4°C por 10 minutos.

Os produtos da amplificação foram analisados em eletroforese de gel de agarose a 1%. Os amplicons obtidos do DNAr 16S sofrerão clivagem com enzimas de restrição AluI (Fermentas). Após a reação de PCR os fragmentos gerados de DNA serão separados por eletroforese em gel de agarose 3%, visualizados em luz ultravioleta e fotografado com câmara para fotografia de gel (*PhotoCapt Software* version 12,5 for Windows – *Vilber lourmad*).

Os isolados que não foram identificados pela técnica de ARDRA tiveram a região do DNAr sequenciadas para determinar a espécie. Os *amplicons* foram purificados (SAMBROOK, RUSSEL, 2001) e enviados para sequenciamento para a empresa prestadora deste serviço Luwing Biotec (<http://ludwigbiotec.com.br/>; UFRGS). A quantidade de DNA e *primer* para sequenciamento seguiu as condições determinadas pela empresa. A qualidade das bases obtidas foram avaliadas pelo programa Phred Phap antes das mesmas serem comparadas com as sequências disponíveis no GenBank usando o programa BLAST (Altschul et al., 1997; NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram reativadas 88 isolados obtidos a partir de produtos cárneos da região (GATTI, 2007; BORDIGNON, 2005; DEBASTIANI, 2012; BARATTO, 2012) que estavam armazenados em freezers pertencentes aos Laboratórios de Biotecnologia de Microorganismos na Agroindústria I e II. Os isolados foram inoculados em caldo MRS e incubados em jarras de anaerobiose a 35°C / 24h.

As culturas reativadas foram inoculadas em ágar MRS incubado a 35°C/ 24h sob condições de anaerobiose, para confirmação da pureza do isolado foi procedido à coloração diferencial de Gram e a prova da catalase.

Os isolados que se encontravam contaminados foram descartados do presente estudo, para maior confiabilidade dos resultados.

Todos os isolados puros testados apresentaram-se como Gram positivos, catalase negativa, 86 dos isolados estudados apresentavam morfologia em forma de bacilos, e 2 isolados como cocos.

### 5.1 Produção de Substâncias Antimicrobianas

Os isolados que apresentaram características morfológicas e fenotípicas adequadas foram testados através do método de difusão em poços para a capacidade de produzir substâncias inibitórias do crescimento dos principais micro-organismos patogênicos (Tabela 2) veiculados por queijos frescos (FRANCO; LANDGRAF, 2008; APOLINARIO et al., 2014).

Dos 88 isolados testados 40 apresentaram atividade frente a pelo menos um dos indicadores utilizados, desses 50% inibiram *E. coli*, 55% inibiram o crescimento de *L. monocytogenes*, 57,5% inibiram *S. aureus*, 47,5% inibiram o crescimento de *Salmonella* Typhimurium, e 20% dos 40 isolados apresentaram atividade frente a todos os indicadores utilizados no estudo. Na tabela 3 estão representados apenas as que apresentaram atividade antimicrobiana ao menos para um dos micro-organismos testes.

Tabela 5: Perfil de inibição dos isolados de bactérias lácticas frente aos micro-organismos indicadores utilizados no estudo

Isolado	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. Typhimurium</i>
	Tamanho halo (mm)				
LC01		-	2	-	2
LC05	-	-	4	-	-
LC07	1	3	3	1	1
LC08	1	1	-	2	-
LC11	1	1	2	1	1
LC12	-	1	-	2	-
LC13	1	1	1	1	-
LC18	1	-	1	-	1
LC19	1	1	1	-	-
LC20	1	2	2	1	1
LC21	-	2	1	1	1
LC22	-	1	1	1	1
LC23	2	1	1	1	1
LC24	-	1	-	1	1
LC25	1	-	-	1	1
LC28	-	2	1	1	1
LC31	1	2	1	1	1
LC32	-	-	1	1	1
LC33	1	-	1	1	-
LC34	-	1	-	1	1
LC35	-	-	-	2	-
LC38	-	-	-	1	-
LC39	-	3	-	-	-
LC42	1	-	-	-	-
LC43	1	-	-	-	-
LCA2	1	2	1	1	1
LCA7	-	-	1	-	-
LCA10	-	-	-	1	-
LCA14	1	1	4	1	1
LCA32	-	-	1	-	-
LSB01	1	2	-	-	1
LSB05	-	2	-	-	-
LSB06	-	2	3	-	-
LSB09	2	3	4	2	1
LS1.2	2	-	-	-	1
LS2.2	1	1	2	3	-
LS3.9	-	-	5	-	-
LS5.2	1	-	-	-	-
LS7.5	1	-	-	-	-
LS8.1	-	2	4	1	-
LS20.3	1	-	3	3	-

LC: *Lactobacillus* sp. isolados por Debastiani (2012).

LCA: isolados de *Lactobacillus* sp. Baratto (2012).

LS: isolados de *Lactobacillus* sp., Gatti (2007) e Bordignon (2010).

-: não apresenta halo de inibição.

Os isolados em destaque apresentaram atividade frente a todos os indicadores testados.

Os halos de inibição apresentaram diâmetro entre 1 e 5mm, sendo que os isolados que apresentaram halos de tamanho entre 1 e 4 mm caracterizam como inibição fraca dos patógenos em estudo, o isolado LS3.9 apresentou halo de inibição com 5mm de diâmetro

frente *L. monocytogenes* apresentando inibição média, isso deve-se a utilização do sobrenadante sem o processo de concentração do extrato proteico e a neutralização dos ácidos produzidos pela cultura, em estudos realizados por Neto et al. (2005), Chioda et al. (2007) e Costa (2012) observaram halos de inibição com maiores tamanhos atribuindo-os a presença de ácidos orgânicos e outras substâncias inibitórias do crescimento microbiano. A exclusão do ácido promove a inibição por bacteriocinas e peróxido de hidrogênio (DE MARTINIS, 2001), isso pode ser evidenciado pela formação do halo de inibição definido como pode ser observado na Fotografia 1.

Fotografia1: Halos de inibição dos isolados LC07 e LC8 frente *L. monocytogenes* evidenciando a formação de halo definido.



Fonte: Autor (2016).

A atividade antimicrobiana dos isolados verificada estão em concordância com resultados obtidos por Neto et al. (2005) que demonstraram a ação antagonista de *Lactobacillus* spp. Frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli*. Chioda et al. (2007) também observaram ação antagonista de algumas bactérias lácticas contra *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 e *S. aureus*.

A utilização de *Lactobacillus*, com ação comprovada frente a micro-organismos patogênicos na fabricação de produtos fermentados de origem animal promovem uma melhora na segurança alimentar, tornando esses produtos mais seguros aos consumidores. Quando estas linhagens exibem também outras características tecnológicas, sua potencial

aplicação na indústria de alimentos é ampliado, o que favorece tanto as pesquisas acadêmicas quanto o desenvolvimento de produtos em nível industrial (COSTA, 2012).

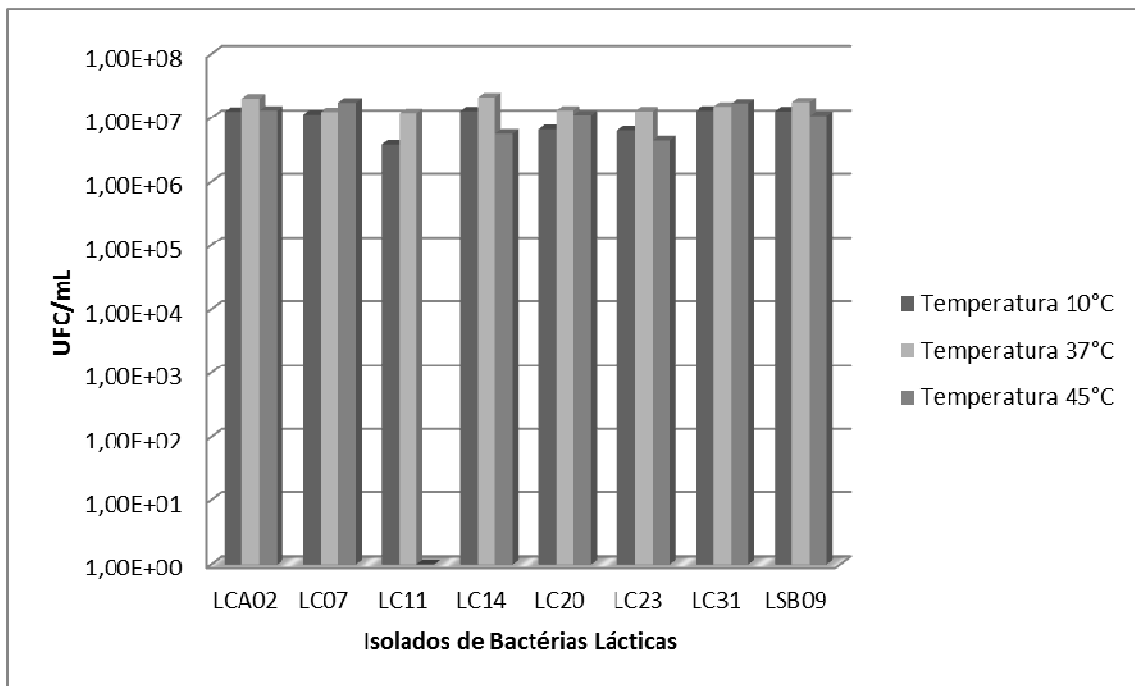
## 5.2 Caracterização Tecnológica de *Lactobacillus*

A caracterização tecnológica foi realizada nos isolados LCA02, LC07, LC11, LCA14, LC20, LC23, LC31 e LSB09 os quais apresentaram atividade antimicrobiana frente a todos os micro-organismos testados.

Determinando o crescimento nas temperaturas de 10°C, 37°C e 45° foi possível observar que a temperatura de 37°C houve um maior crescimento dos isolados, e o menor crescimento foi apresentado na temperatura de 45°C (Gráfico 1).

O crescimento na temperatura de 37°C apresentou diferença significativa de crescimento em relação as demais temperaturas, sendo que entre as temperaturas de 10°C e 45°C os isolados demonstraram melhor crescimento a temperatura de 10°C

Gráfico 1: Crescimento dos *Lactobacillus* isolados nas temperaturas 10°, 37° e 45°C.



Fonte: Autor (2016).

Entre os isolados os maiores crescimentos foram apresentados pelos isolados; LC31 ( $1,31 \times 10^7$  UFC/mL) a temperatura de  $10^\circ\text{C}$ , LCA14 ( $2,09 \times 10^7$  UFC/mL) a temperatura de  $37^\circ\text{C}$  e o isolado LC07 ( $1,74 \times 10^7$  UFC/mL) a temperatura de  $45^\circ\text{C}$ . O menor crescimento foi observado no isolado 11,  $10^\circ\text{C}$  ( $3,87 \times 10^6$  UFC/mL), a  $37^\circ\text{C}$  ( $1,2 \times 10^7$  UFC/mL) e na temperatura de  $45^\circ\text{C}$  o isolado não apresentou crescimento.

Ao estudarem o crescimento de bactérias lácticas em diferentes temperaturas Ishikawaa et al. (2003) e Poffo et al. (2011) observaram um crescimento significativo a temperatura de  $37^\circ\text{C}$  em relação ao crescimento a  $10^\circ\text{C}$  e  $45^\circ\text{C}$  corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho.

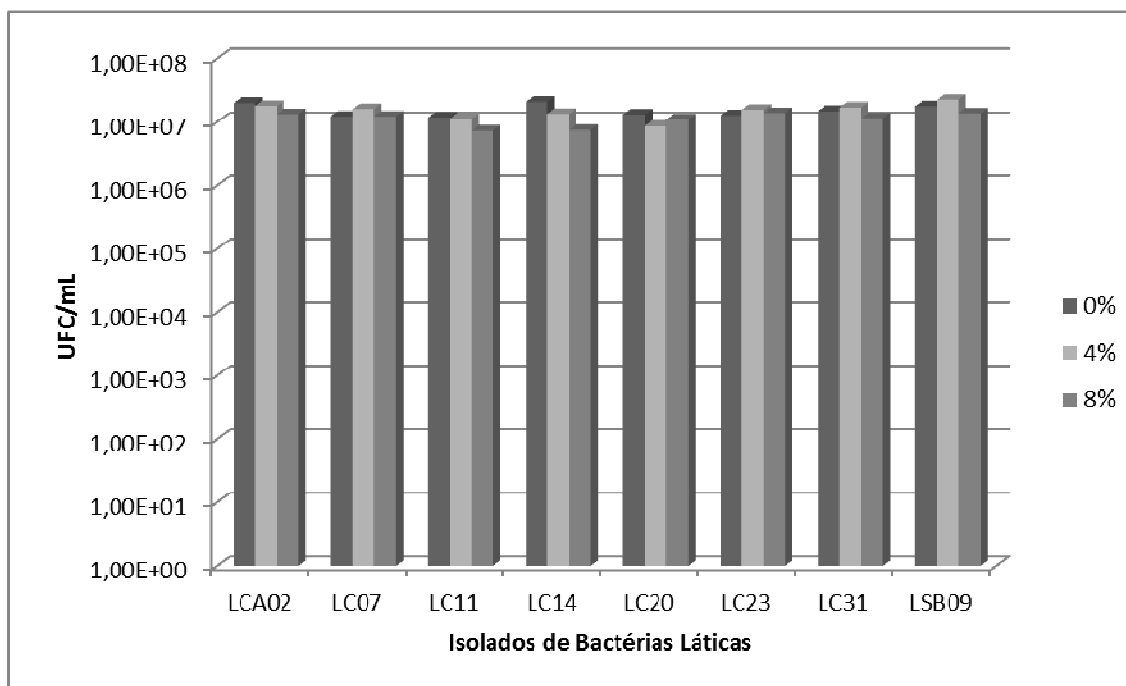
A temperatura é um fator importante, pois determinados produtos, como o queijo pode passar por processos de defumação e refrigeração, onde altas e baixas temperaturas podem exercer efeito bactericida nestes micro-organismos, ou diminuir a capacidade de produzir substâncias antimicrobianas (SCHILLINGER, 1996).

A capacidade de crescerem em temperaturas de  $10^\circ\text{C}$  e  $45^\circ\text{C}$  é um fator importante para o desenvolvimento de *Lactobacillus* em produtos fermentados, favorecendo a competição por nutrientes no período de armazenamento do produto, diminuindo o crescimento de micro-organismos patogênicos. Causando um efeito de proteção em produtos fermentados expostos a abusos de temperatura durante o período de armazenamento (VÁSQUEZ et al., 2009).

Quando submetidos as concentração de 0, 4 e 8% de NaCl os isolados apresentaram crescimento em todas as concentrações a quais foram submetidas, sendo o tratamento de 0% quando comparada as demais concentrações teve crescimento significativo, comparando os crescimentos a concentração de 4% foram superiores as 8% (Gráfico 2).

Nas diferentes concentrações foram observados os maiores crescimentos no isolado LC14 ( $2,08 \times 10^7$  Log UFC/mL) a 0% de NaCl, no isolado LSB09 ( $2,25 \times 10^7$  log UFC/mL) a 4% e o isolado LC23 ( $1,39 \times 10^7$  UFC/mL), o isolado LC11 apresentou menor crescimento a 0% ( $1,19 \times 10^7$  UFC/mL) e 8% ( $7,27 \times 10^6$  UFC/mL) e o isolado LC20 ( $8,67 \times 10^7$  UFC/mL) apresentou menor crescimento a concentração de 8%.

Gráfico 2: Crescimento dos isolados nas concentrações de 0%, 4% e 8% de NaCl



Fonte: Autor, (2016).

Os micro-organismos pertencentes ao grupo das bactérias lácticas principalmente os *Lactobacillus* apresentam tolerância a presença de altas concentrações de NaCl, sendo considerados micro-organismos halotolerantes, podem desenvolver-se em concentrações de até 10% NaCl, e seu crescimento pode ser limitado em baixas concentrações de NaCl (POFFO et al., 2011), tendência não confirmada no presente estudo onde os micro-organismos estudados apresentaram crescimento significativo na ausência do NaCl.

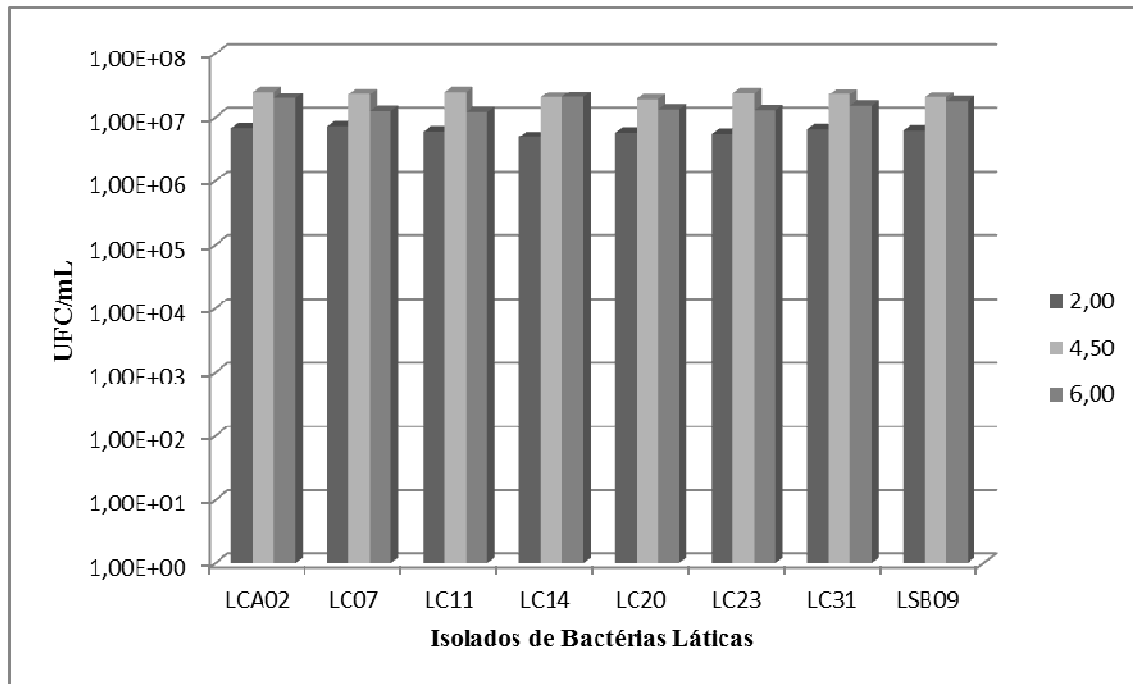
O NaCl é utilizado como componente das características organolépticas e aplicado como conservante de produtos alimentícios, sua presença é um fator limitante no crescimento microbiano, atua como uma barreira para o crescimento de patógenos, o fato dos *Lactobacillus* isolados crescerem em diversas concentrações de NaCl favorece o seu desenvolvimento em relação aos patógenos, o fato de não afetar o crescimento dos isolados beneficia sua aplicação em produtos onde o NaCl é utilizado (GUTIERREZ et al., 1995).

O pH onde o melhor crescimento foi apresentado foi o de 4,5, seguido do pH6,0 e com menor crescimento o pH 2,0, a diferença significativa foi apresentado no pH 4,5 devido a este ser o pH ideal de crescimento dos isolados (Gráfico 3).

Os isolados LC07 ( $7,32 \times 10^6$  UFC/mL), LC11 ( $2,53 \times 10^7$  UFC/mL) e LCA14 ( $2,09 \times 10^7$  UFC/mL) apresentaram maior crescimento nos pHs 2,0, 4,5 e 6,0 respectivamente e os

isolados LCA14 ( $4,92 \times 10^6$  UFC/mL) , LC20 ( $1,90 \times 10^7$  UFC/mL) e LC07 ( $1,25 \times 10^7$  UFC/mL) obtiveram um menor crescimento nos pHs 2,0, 4,5 e 6,0 respectivamente.

Gráfico3: Crescimento dos isolados em diferentes valores de pHs 2,0, 4,5 e 6,0.



Fonte: Autor, (2016).

Os *Lactobacillus* são considerados micro-organismos acidúricos, desenvolvendo-se melhor em produtos com pH ácido, o pH também pode ser determinante para o crescimento desses micro-organismos em diferentes condições de processamento de produtos fermentados, e pode também determinar a utilização dos mesmos como cultura probiótica em alimentos (ALVES et al., 2011).

O pH atua como fator limitante do crescimento ou manutenção da viabilidade celular de *Lactobacillus*, a exposição a variações de pH pode afetar o desenvolvimento de substâncias antimicrobianas e afetar as condições de competir com micro-organismos patogênicos. Dessa forma, os lactobacilos que apresentarem crescimento satisfatório em condições extremas estes possuem potenciais para utilização como culturas protetoras em alimentos, principalmente por apresentarem características de crescimento que permitam competir diretamente por substrato com micro-organismos patogênicos (OLIVEIRA et al., 2012).

Os isolados LC07, LC31 e B09 apresentaram crescimento similar nas características tecnológicas testadas *in vitro* apresentando características desejáveis para sua aplicação como

culturas protetoras sendo assim selecionados para a produção dos queijos, os isolados foram testados quanto ao perfil de resistência frente a 15 antibióticos.

Os isolados LC07 e LSB09 (Tabela 6) apresentaram resistência aos antibióticos ciprofloxacina, amicacina, vancomicina, penicilina, oxalicina e cefalotina, o isolado LC31 apresentou resistência ciprofloxacina, amicacina, penicilina, oxacilina e cefalotina.

Tabela 6: Média dos halos de inibição dos isolados LC07, LC31 e LSB09 obtidos no antibiograma

Antibiótico	R	I	S	LC07	LC31	LSB09
<b>Ciprofloxacina (CIP)</b>	≤15	16-20	≥21	0,66	15,5	15,66
<b>Tetraciclina (TET)</b>	≤14	15-18	≥18	28,33	38,66	47
<b>Tobracina (TOB)</b>	≤9	10-11	≥12	11,66	13,33	15
<b>Amicacina (AMI)</b>	≤14	15-16	≥17	13	15	15,57
<b>Ampicilina (AMP)</b>	≤16	--	≥17	29	34,33	24,44
<b>Ceftazidima (CAZ)</b>	≤14	15-17	≥18	23,66	21,66	20
<b>Cloranfenicol (CLO)</b>	≤16	16-20	≥21	40	41,33	36,66
<b>Sufazotrin (SUT)</b>	≤12	13-17	≥18	33,34	30	25,33
<b>Gentamicina (GEM)</b>	≤12	13-14	≥15	19,33	20	15
<b>Vancomicina (VAN)</b>	≤09	10-11	≥12	5,67	20	0
<b>Penicilina (PEN)</b>	≤19	--	≥20	4,33	0,67	0
<b>Oxacilina (OXA)</b>	≤10	11-12	≥13	0,36	0,67	0
<b>Cefalotina (CFL)</b>	≤14	15-17	≥18	12,66	7,66	7
<b>Eritromicina (ERI)</b>	≤13	14-17	≥18	33,33	46,67	34
<b>Clindamicina</b>	≤14	15-20	≥21	36,66	40	29,33

R: Valores de tamanho de halo em mm para determinar a resistência ao antibiótico, I: Valores de tamanho de halo em mm para determinar sensibilidade intermediária ao antibiótico. S: Valores de tamanho de halo em mm para determinar a sensibilidade ao antibiótico.

A média dos tamanhos dos halos em mm obtidos no teste de sensibilidade nos isolados testados.

Fonte: Autor (2016)

Em estudos conduzidos por Cebeci e Gürakan (2003) e Danielsen e Wind (2003) observaram a resistência de *Lactobacillus* a penicilina, e Zhou et al. (2005) a cefalotina, em contrapartida Temmerman et al. (2003) e Cebeci e Gürakan (2003) observaram a sensibilidade de *Lactobacillus* sp. a antibióticos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos. A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em linhagens de *Lactobacillus* dá-se principalmente pela impermeabilidade da parede celular, visto que não apresentam atividade de  $\beta$ -lactamases (CHARTERIS et al., 1998).

Os isolados apresentaram resistência ou sensibilidade intermediária a amicacina, antibiótico pertencente à classe dos amiloglicosídeos, a resistência a essa classe de

antibióticos por BAL também foi observada por Charteris et al. (1998); Danielsen e Wind (2003); Temmerman et al. (2003) e Zhou et al. (2005). Essa classe de antibióticos possui forte atividade em micro-organismos aeróbios, pois esses apresentam alto potencial de membrana facilitando a entrada desses antibióticos por processos eletroforéticos ou por algum mecanismo ainda não elucidado, já os micro-organismos anaeróbios geralmente apresentam resistência a essa classe que pode ser explicada pelo baixo potencial de membrana em ambientes anaeróbios, a impermeabilidade da membrana impede a ação desses antibióticos, dessa forma micro-organismos anaeróbios como os *Lactobacillus* possuem resistência intrínseca a essa classe de antimicrobianos (ELKIN; MULLIS, 2004).

A resistência frente à vancomicina foi observada nos três isolados testados, a resistência a esse antibiótico glicopeptídico em *Lactobacillus* foi observada em trabalhos conduzidos por Cebeci e Gürakan (2003); Danielsen e Wind (2003) e Temmerman et al. (2003). A alteração do sítio de ligação do antibiótico ao peptídeoglicano da parede celular desses micro-organismos reduz a afinidade do antibiótico com a parede celular do micro-organismo, esse mecanismo de resistência está associado a micro-organismos como os *Lactobacillus* que apresentam resistência intrínseca a vancomicina (WRIGHT, 2003). A utilização de *Lactobacillus* resistentes à vancomicina tem sido utilizada há anos pela indústria de alimentos, não existindo a indicação de esses serem capazes de transferir a resistência a outros micro-organismos (MATTILA-SANDHOLM et al., 1999).

Os isolados apresentaram resistência a ciprofloxacina antibiótico pertencente a classe das quinolonas, essa resistência deve-se ao fato de ocorrerem mutações nas enzimas DNA girase e topoisomerase IV, principais alvos para a ação desses antibióticos (BERGER-BÄCHI; ROHRER, 2002).

Linhagens de *Lactobacillus* isolados de produtos artesanais frequentemente apresentam multirresistência a antibióticos, esse fato é devido à resistência natural desses micro-organismos frente ao agente ou pela transferência genética via conjugação (JUSTO, 2013), fatores intrínsecos como a estrutura da parede celular e suas propriedades metabólicas corroboram com a resistência desses micro-organismos a diversas classes de antimicrobianos, a impermeabilidade tem sido o mecanismo de resistência observado com maior frequência (CHARTERIS et al., 1998), entretanto para alguns antimicrobianos esses mecanismos ainda não foram esclarecidos em bactérias do gênero *Lactobacillus* (KASTNER et al., 2006).

Apesar de demonstrarem resistência a antibióticos o uso de *Lactobacillus* sp isolados de produtos artesanais tem sido aplicados em produtos alimentícios sem apresentarem riscos

de transferências de resistências para micro-organismos patogênicos (CHARTERIS et al., 1998, JUSTO, 2013), visto que os mecanismos de resistência elucidados até o presente conferem o status de resistência intrínsecas relacionadas principalmente a impermeabilidade da parede celular desses micro-organismos, são necessários realizar estudos para o detalhamento do perfil dos genes envolvidos na resistência apresentadas pelos isolados para definição de suas origens e o comportamento dessa resistência em produtos alimentícios para que não ocorra transferências das resistências apresentadas para micro-organismos patogênicos.

### **5.3 Inibição de *Lactobacillus* sp. frente a patógenos em modelo de queijo minas frescal**

A análise do desenvolvimento dos patógenos em queijo minas frescal foi realizado através do método de contagem direto em ágar seletivo nos dias de armazenamento 0 (inóculos adicionados aos queijos), 1, 7, 14, 21 e 28.

No experimento para determinação do potencial dos *Lactobacillus* sp. em inibir *E. coli*, o tratamento 1 (T1) consistiu na adição de *E. coli* sem a presença do *Pool* de *Lactobacillus* que apresentou contagem final após 28 dias de armazenamento de  $3,40 \times 10^4$  UFC/10 g de queijo com redução de 1 log de UFC/10g do produto em relação ao inóculo ( $6,81 \times 10^5$ ). Em comparação com o tratamento 2 (T2) onde foi realizada a adição de *E. coli* + *Pool* de *Lactobacillus* no 28º dia de armazenamento apresentou redução de 2 log em UFC/10 g de produto, foi possível evidenciar a redução gradativa das contagens ao decorrer do armazenamento.

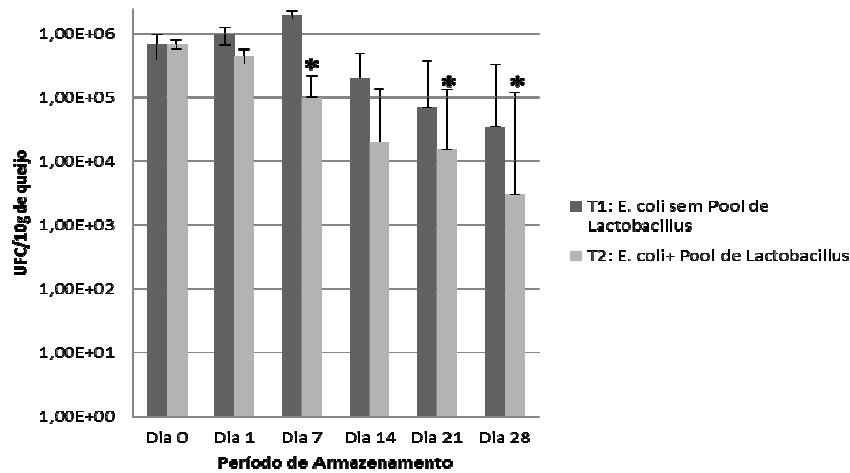
A redução do crescimento no T2 foi superior ao observado no T1 a partir do 7º dia de armazenamento (Gráfico 4) foi possível evidenciar diferenças significativas entre os tratamentos no teste média de Tukey a 5% evidenciando a capacidade de reduzir as contagens de *E. coli* em queijo minas frescal.

Nos dias 1,7, 14, 21 e 28 de armazenamento foi possível evidenciar que o T2 ao qual foi adicionado o *Pool* de *Lactobacillus* apresentou uma redução maior nas médias das contagens ( $1,00 \times 10^5$  UFC/10g) do patógeno em relação ao T1 *E. coli* sem a presença do *Pool* de *Lactobacillus*, ( $1,95 \times 10^6$  UFC/10g), sendo que no sétimo dia de armazenamento pode ser

observado que o *Pool* de *Lactobacillus* promoveu um efeito inibitório significativo do crescimento de *E. coli* em relação ao tratamento T1.

Ao avaliar o efeito antagônico de *L. acidophilus* sobre *E. coli*, Alves (2010) observou a diminuição de 3 ciclos logarítmicos do indicador durante o tempo de armazenamento não sendo esse capaz de eliminar totalmente o micro-organismo, como no presente trabalho, Souza (2006) ao estudar a evolução de bactérias do grupo coliformes termotolerantes em queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus* constatou a inibição do contaminante, o mesmo não ocorrendo em queijos fabricados pelo processo tradicional. Chioda et al. (2007) constataram que bactérias do gênero *Lactobacillus* sp. apresentam potencial de uso na indústria de alimentos para o controle de *E. coli*.

Gráfico 4: Potencial de inibição do *pool* de *Lactobacillus* sp. sobre *E. coli* durante o armazenamento



\*: diferença significativa pelo teste de média de Tukey a 5% entre os tratamentos T1 e T2 nos dias de armazenamento 1, 7, 14, 21 e 28.

Fonte: Autor (2016).

O potencial de inibição de *L. monocytogenes* pelo *Pool* de *Lactobacillus* foi realizado pela comparação das contagens dos patógenos obtidas no tratamentos 3 (T3 *L. monocytogenes* sem a presença do *Pool* de *Lactobacillus*) utilizado como controle positivo do crescimento do patógeno e no tratamento 4 (T4 *L. monocytogenes* + *Pool* de *Lactobacillus*).

O T3 apresentou contagem de  $2,10 \times 10^4$  UFC/10g no 28º dia de armazenamento ocorrendo a diminuição de 1 log de UFC no decorrer do armazenamento, já no T4 (*L. monocytogenes* + *Pool* de *Lactobacillus*) a contagem final foi de  $3,00 \times 10^1$  UFC/10g diminuindo 4 log de UFC nos 28 dias de armazenamento.

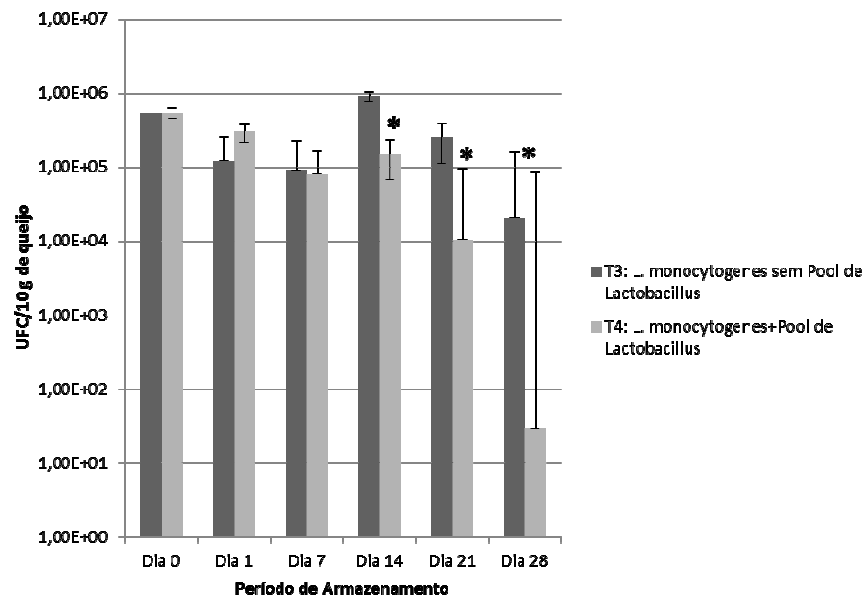
No 14º dia de armazenamento foi possível observar a maior diferença nas contagens do patógeno entre os tratamentos, o T4 onde houve a adição do *Poll* de *Lactobacillus*

apresentou uma redução na contagem em relação ao T3 evidenciando a capacidade inibitória do crescimento de *L. monocytogenes* pelo *Pool de Lactobacillus*.

Os tratamentos T3 e T4 (Gráfico 5) diferiram-se significativamente no teste de significância a 0,05% ( $p \leq 0,01$ ) essa redução evidencia que a adição do *Pool de Lactobacillus* controlou o crescimento de *L. monocytogenes* durante o armazenamento. No teste de médias de Tukey a 5% os tratamentos no dia 7 não apresentaram diferença significativa, já os tratamentos nos dia 1, 14, 21 e 28 apresentaram diferenças significativas entre si.

Segundo Prezzi (2014), ao estudar o comportamento *L. monocytogenes* em queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus rhamnosus* não foi possível observar a inibição de *L. monocytogenes*. Já Hermanns (2013), ao observar o comportamento de *L. monocytogenes* em queijo minas frescal adicionado de cultura bacteriocigênica, observou a diminuição de 1 ciclo logarítmico até o 14º dia de armazenamento, no decorrer do armazenamento as contagens mantiveram-se constantes. A ação de culturas bacteriocigênicas sobre *L. monocytogenes* promove o controle do crescimento celular com efeito bacteriostático sobre o crescimento, mas não é capaz de eliminar totalmente o patógeno (FURTADO, 2010).

Gráfico 5: Potencial de inibição do *pool de Lactobacillus* sp. sobre *L. monocytogenes* durante o armazenamento

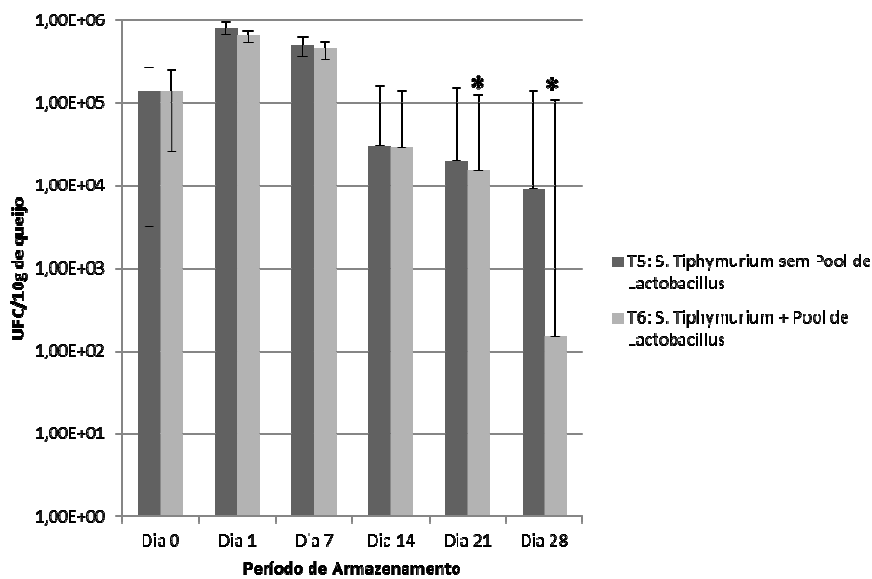


\*: diferença significativa pelo teste de média de Tukey a 5% entre os tratamentos T3 e T4 nos dias de armazenamento 1, 14, 21 e 28.

Fonte: Autor (2016).

O crescimento de *Salmonella* Typhimurium foi analisado no decorrer dos 28 dias de armazenamento, o T5 (*Salmonella* Typhimurium sem adição do *Pool* de *Lactobacillus*) apresentou um decréscimo de 2 log de UFC no decorrer do tempo de armazenamento, chegando a contagem de  $9,00 \times 10^3$  UFC/10 g de produto, no final do 28º dia de armazenamento, já o T6 (*Salmonella* Typhimurium + *Pool* de *Lactobacillus*) apresentou contagem de  $1,50 \times 10^3$  UFC/ 10g do produto, reduzindo 2 log de UFC em relação ao inóculo (Gráfico 6).

Gráfico 6: Potencial de inibição do *pool* de *Lactobacillus* sp. sobre *Salmonella* Typhimurium durante o armazenamento



\*: diferença significativa pelo teste de média de Tukey a 5% entre os tratamentos T5 e T6 nos dias de armazenamento 21 e 28.

Fonte: Autor (2016).

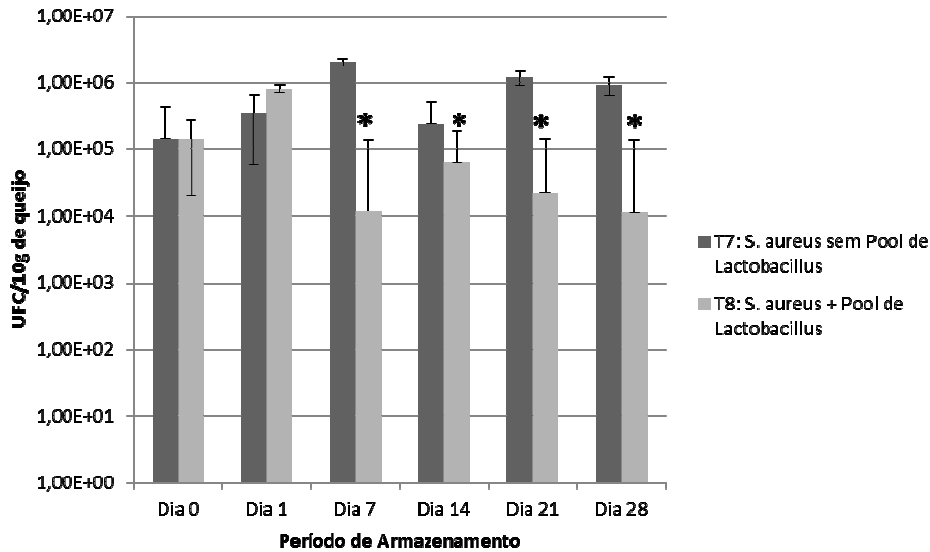
No 1º e 7º dia de armazenamento os tratamentos T5 e T6 não diferiram-se estatisticamente ocorrendo uma elevação das contagens em relação ao inóculo adicionado no dia 0 em ambos os tratamentos, a partir do 14º dia de armazenamento ocorreu a diminuição das contagens, no 21º e 28º dia de armazenamento pode ser evidenciado uma redução significativa das contagens do patógeno no T6 em relação ao T5.

Entre os tratamentos houve diferença significativa ( $p \leq 0,005$ ), evidenciando que a redução na contagem de *Salmonella* Typhimurium quando em presença do *Pool* de *Lactobacillus* demonstrando um efeito inibitório sobre o patógeno ao longo do armazenamento.

Chateau et al. (1993) avaliaram a atividade inibitória in vitro de *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* e *L. pseudoplantarum* frente à *Salmonella* Typhimurium demonstrando a eficiência do uso de *Lactobacillus* para o controle do crescimento do patógeno. Barros et al. (2009) ao estudarem a atividade antimicrobiana in vitro de *Lactobacillus salivarius* observaram a inibição á *Salmonella* in vitro, não foram encontrados dados referente a inibição de *Lactobacillus* frente a *Salmonella* em queijo minas frescal.

O potencial de inibição do *Pool de Lactobacillus* sp. sobre *S. aureus* constituiu em dois tratamentos, o tratamento 7 (T7) inoculado com *S. aureus* controle positivo do crescimento e o tratamento 8 (T8) onde foi inoculado *S. aureus* e o *Pool de Lactobacillus* sp., As contagens obtidas nos T7 (*S. aureus* sem adição do *Pool de Lactobacillus*) apresentou crescimento durante os 28 dias de armazenamento com contagem de  $9,20 \times 10^5$  UFC/10g no 28° dia de armazenamento, no T8 (*S. aureus* + *pool de Lactobacillus*) ocorreu redução nas contagens para  $1,10 \times 10^4$  diminuindo 1,9 log de UFC no decorrer do armazenamento.

A maior redução das contagens (Gráfico 7) pode ser observada no 7° dia de armazenamento onde o tratamento T8 (*S. aureus* + do *Pool de Lactobacillus*) apresentou redução significativa na contagem do patógeno em relação ao tratamento T7, a mesma tendência pode ser observada nos dias 14,21 e 28 onde o T8 apresentou redução significativa das contagens em relação ao tratamento T7.

Gráfico 7: Potencial de inibição do *pool* de *Lactobacillus* sp. sobre *S. aureus* durante o armazenamento

\*:diferença significativa pelo teste de média de Tukey a 5% entre os tratamentos T7 e T8 nos dias de armazenamento 7, 14, 21 e 28.

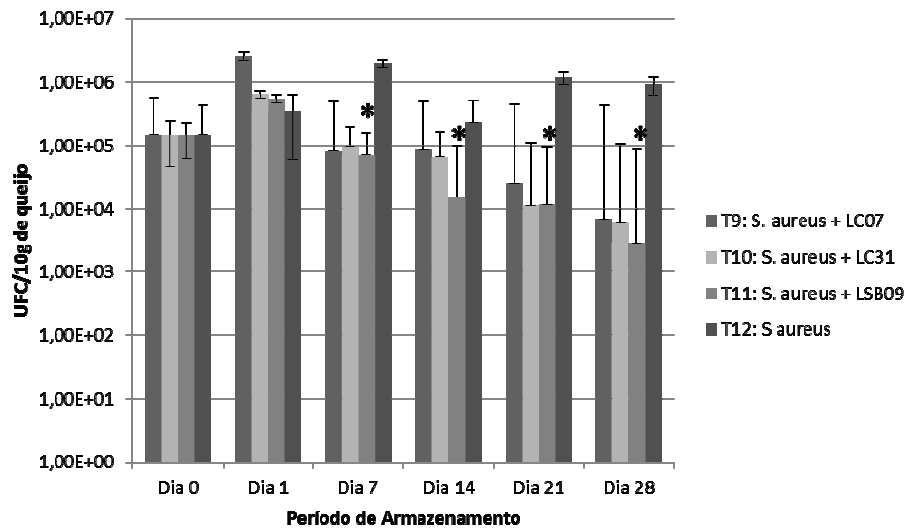
Fonte: Autor (2016).

Com a finalidade de avaliar o potencial de inibição dos *Lactobacillus*, individualmente, sobre o crescimento de *S. aureus*, foi realizado um novo experimento. Neste, cada tratamento constituiu na adição, em separado, dos isolados e comparados o seu efeito no crescimento do microrganismo teste, entre si, com o *Pool* de *Lactobacillus* e sem a adição desses.

O ensaio de inibição de *S. aureus* frente aos isolados constituiu em 4 tratamentos, o tratamento 9 (T9) foi realizado adicionando *S. aureus* + isolado LC07, o tratamento 10 (T10) consistiu na inoculação de *S. aureus*+ isolado LC31, e ao tratamento 11 (T11) foi adicionado *S. aureus* + isolado LSB09.

Nos tratamentos T7 (*S. aureus*+ LC07), T8 (*S. aureus*+ LC 31) e T9 (*S. aureus* + LSB09) foi possível observar uma diminuição de 2 log de UFC no decorrer do armazenamento (Gráfico 8), sendo as contagens no 28º dia de armazenamento apresentando no T7  $6,85 \times 10^3$  UFC/10g, no T8  $5,95 \times 10^3$  UFC/10g e no T9  $2,85 \times 10^3$  UFC/ 10 g de produto.

Gráfico 2: Potencial de inibição dos isolados LC07, LC31 e LSB09 sp. sobre *S. aureus* durante o armazenamento.



\*: diferença significativa pelo teste de média de Tukey a 5% entre os tratamentos T7 e T8 nos dias de armazenamento 1, 7, 14, 21 e 28.

Fonte: Autor (2016).

Ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos no teste de significância a 0,05% ( $p \leq 0,005$ ), demonstrando a diminuição das contagens de *S. aureus* nos tratamentos onde foram adicionados os *Lactobacillus*.

No primeiro dia de armazenamento ocorreu um aumento nas contagens do patógeno em todos os tratamentos (Gráfico 8), sendo que o tratamento T9 onde ocorreu a inoculação do isolado LC07 as contagens de *S. aureus* apresentaram crescimento superior ao tratamento T7 utilizado como controle do crescimento do patógeno, o mesmo efeito não foi observado nos tratamentos T10 (LC31) e T11 (LSB09), o aumento da contagem pode ser devido ao fato das células de *Lactobacillus* terem sido inoculadas indiretamente ao leite necessitando de um período de adaptação do metabolismo as condições de armazenamento do produto.

A partir do 7º dia de armazenamento ocorreu uma redução gradual das contagens de *S. aureus* nos tratamentos com os isolados T9, T10 e T11 em relação ao tratamento T7, demonstrando o efeito inibitório do crescimento de *S. aureus* no decorrer do armazenamento.

No 21º e 28º dia de armazenamento foi possível observar uma maior diminuição das contagens do patógeno nos tratamentos T9, T10 e T11 em relação ao tratamento controle, o isolado LSB09 apresentou um efeito inibitório mais efetivo em relação aos demais isolados.

No 1º dia de armazenamento o tratamento T9 (*S. aureus* + LC07) apresentou crescimento do patógeno superior aos tratamentos T8 (*S. aureus* + Pool de *Lactobacillus*), e aos tratamentos T10 (*S. aureus* + LC31) e T11 (*S. aureus* + LSB09). No 7º dia de

armazenamento (Gráfico 8) o tratamento T8 apresentou menores contagens em relação ao tratamento T11, as menores contagens podem ser observadas nos tratamentos T10 e T9 respectivamente. A partir do 14º dia de armazenamento o tratamento T11 apresentou menores contagens do patógeno em relação aos tratamentos T8, T9 e T10, tendo como contagem final no 28º dia de armazenamento  $2,85 \times 10^3$  UFC/10g de queijo, reduzindo 1,4 log de UFC/10g de queijo.

As menores contagens foram obtidas quando houve a utilização individual dos *Lactobacillus*, onde o T9 (*S. aureus* + LSB09) apresentou uma redução final superior das contagens de *S. aureus* em relação aos demais tratamentos em um período de armazenamento de 28 dias.

O efeito inibitório de *Lactobacillus* sobre bactérias patogênicas pode variar de acordo com a produção de substâncias inibitórias do crescimento microbiano sendo que o efeito pode ser atribuído à competição por substrato.

Ao avaliar a ação inibitória de *L. rhamnosus* sobre *S. aureus*, Prezzi (2014) inoculou *S. aureus* na concentração de  $1,0 \times 10^5$  UFC/g de queijo e uma cultura de *Lactobacillus rhamnosus* na concentração de  $1,0 \times 10^9$  UFC/g de queijo e observou um crescimento para  $5,8 \times 10^6$  UFC/mL do patógeno no 21º dia de armazenamento demonstrando que não houve o controle do patógeno pela bactéria láctica no decorrer de 21 dias de armazenamento. Martins (2012) observou um efeito inibitório durante o armazenamento de queijo Minas Frescal de *S. aureus* na presença de *Lactococcus lactis* associado às bacteriocinas Nisina e Bovicina HC5, não demonstrando efeito inibitório quando o micro-organismo foi aplicado sem associação das bacteriocinas.

A aplicação de *Lactobacillus* para o controle de patógenos resultou numa diminuição das contagens ao longo do armazenamento, não sendo totalmente eficaz em nenhum dos tratamentos o uso de culturas bacteriocinogênica “in situ” pode sofrer interferências na produção de bacteriocinas devido ao fato de esta estar interagindo com outros micro-organismos, que podem limitar a disponibilidade de nutrientes, fazendo com que ocorra uma diminuição na produção de substâncias antimicrobianas (SCHILLINGER, 1996).

A diminuição das contagens pode dar-se pela produção de substâncias antimicrobianas como as bacteriocinas, mas também pode ter ocorrido devido ao fato dos patógenos utilizados no presente estudo e os *Lactobacillus* competirem por substrato no produto (PREZZI, 2014).

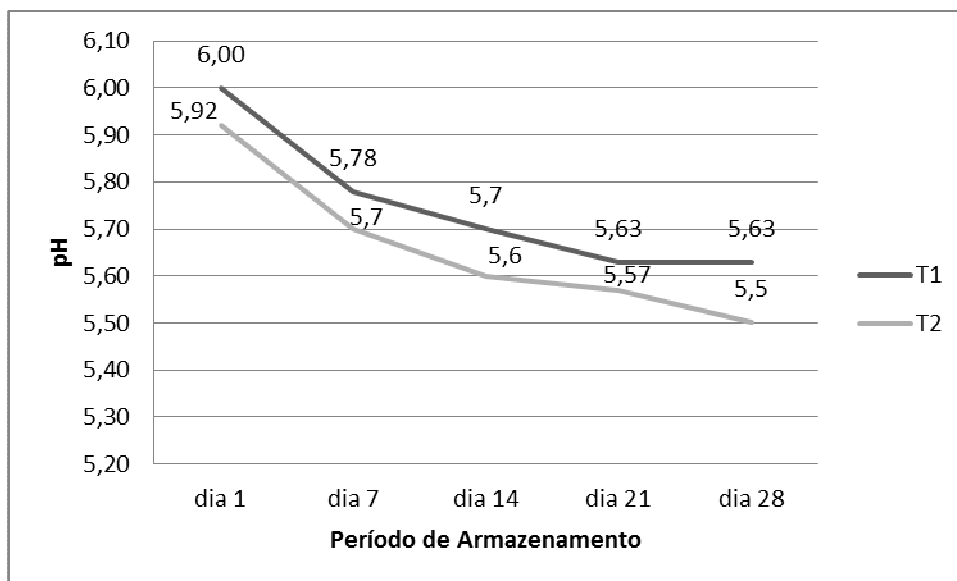
Após as análises de inibição os *Lactobacillus* sp. foram avaliados quanto sua influência na qualidade sensorial do queijo. Desta forma, foram elaboradas 2 formulações de

queijos para fins comparativos, o T1 consistiu em queijo minas frescal fabricado de maneira tradicional com cultura mesofílica tipo O (DOCINA ®), e o T2 consistiu na fabricação do queijo minas frescal adicionado do *Pool* de *Lactobacillus* (LC07, LC31 e LSB09), os tratamentos foram submetidas a análise de pH durante o período de 28 dias armazenamento e análises microbiológicas (Contagem de Bactérias Lácticas, Mesófilos Aeróbios Totais, *Staphylococcus* sp., e coagulase positiva, Coliformes totais e termotolerantes, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*).

Como parâmetro físico-químico o pH foi selecionado por estar correlacionado ao desenvolvimento de *Lactobacillus* em produtos fermentados (JAY, 2005), não foi possível observar diferenças significativas entre os tratamentos (T1: queijo minas frescal, T2: queijo minas frescal adicionado de *Pool* de *Lactobacillus*).

Ocorreu a diminuição gradativa do pH do 1° ao 28° dia de armazenamento, os valores podem ser observados na Figura 13, no T1 o valor de pH obtido no 1° dia de armazenamento equivaleu a 6,00 e no 28° a 5,63, apresentando redução de 0,37, no T2 o valor de pH apresentado no 1° dia foi de 5,92 e no 28° dia de 5,5 apresentando redução do pH de 0,47 durante o armazenamento, é possível evidenciar desde o 1° dia de armazenamento uma maior formação de ácidos no queijo adicionado do *Poll* de *Lactobacillus* (T2).

Gráfico 9: Valores de pH obtidos durante o período de armazenamento dos Queijos Minas Frescal



T1: Queijo minas frescal elaborado com fermento mesofílico tipo O.

T2: Queijo minas frescal elaborado com o *Pool* de *Lactobacillus*

Fonte: Autor (2016).

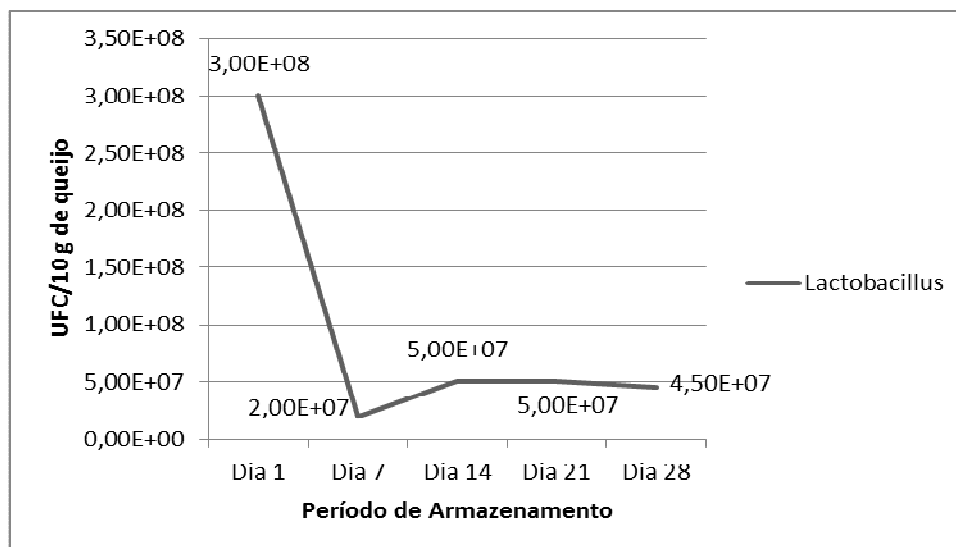
A diminuição do pH durante o período de armazenamento tem efeito inibidor da microbiota patogênica (PREZZI, 2014), proporcionando uma barreira para o desenvolvimento da microbiota indesejável.

Os parâmetros microbiológicos avaliados estão de acordo com o que preconiza a legislação brasileira (BRASIL, 2011), o T1 apresentou contagem *Staphylococcus* sp. foi de  $4,05 \times 10^2$  UFC/25g sem a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva,  $7,5 \times 10^2$  NMP/25g de Coliformes termotolerantes sem a presença de *E. coli*, ausência de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* em 25g do produto, o T2 apresentou contagem de *Staphylococcus aureus* foi de  $8 \times 10^1$  UFC/25g sem presença de *Staphylococcus* coagulase positiva, e contagem de Coliformes termotolerantes  $3,9 \times 10^2$  sem a presença de *E. coli*, ausência de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* em 25g do produto, os dois tratamentos encontram-se de acordo com a legislação vigente.

A contagem de bactérias lácticas foi realizada no T2 para estudar o comportamento dos *Lactobacillus* durante o período de 28 dias de armazenamento do queijo minas frescal. Não ocorreu diferença significativa da contagem de bactérias lácticas ao longo do armazenamento, ao decorrer do armazenamento houve redução gradativa das contagens de bactérias lácticas (Gráfico 10).

Resultados semelhantes foram obtidos por Buriti (2005) e Alves (2011), ao realizarem contagens de *L. acidophilus*, observaram que as contagens permaneceram sem diferença significativa e as células permaneceram viáveis ao decorrer de 21 dias de armazenamento.

Gráfico 10: Contagem de Bactérias Lácticas em queijo minas frescal durante de armazenamento.



Valores expresso em UFC/25g de queijo minas frescal  
Fonte: Autor (2016).

A manutenção da viabilidade celular durante o período de armazenamento é importante para a manutenção do metabolismo dos *Lactobacillus* contribuindo para a síntese de substâncias antimicrobianas e competição por nutrientes frente a patógenos, Melhorando a segurança e qualidade microbiológica do produto (VAZQUES et al., 2009).

A análise sensorial foi realizada por 50 provadores não treinados avaliando os atributos aparência, sabor, cor, aroma e textura (Tabela 7). O queijo adicionado do Pool de *Lactobacillus* (A002) apresentou médias globais superiores ao queijo minas frescal (A001) em todos os atributos avaliados.

Entre os atributos avaliados o atributo textura apresentou maior variação entre as médias das amostras avaliadas (Tabela 7), o atributo com maior nota foi o atributo aparência, as menores médias foram conferidas ao atributo sabor.

Tabela 7: Média e Desvio Padrão dos Resultados da Avaliação dos Atributos Sensoriais de Queijo Minas Frescal

Atributos	A001	A002
<b>Aparência</b>	4,1±0,82	4,76±0,42
<b>Sabor</b>	3,5±1,07	4,06±1,07
<b>Cor</b>	4,18±0,83	4,42±0,70
<b>Aroma</b>	3,94±0,96	4,38±0,86
<b>Textura</b>	3,74±0,97	4,4±1,03

A001 Queijo minas frescal

A002 Queijo minas frescal adicionado do *Pool de Lactobacillus*

Em todos os quesitos avaliados, em média, os parâmetros apresentaram nota maior para o queijo A002 elaborado com o *Pool de Lactobacillus* em relação ao queijo A001 elaborado com fermento comercial (cultura mesofílica tipo O). Entretanto, não foi possível evidenciar diferenças significativas entre as amostras analisadas, o que sugere que a adição do *Pool de Lactobacillus* não interferiu significativamente nos parâmetros sensoriais avaliados.

Alves et al. (2011) ao avaliar os atributos sensoriais de queijos adicionados de *Lactobacillus acidophilus* verificou uma melhoria nas qualidades sensoriais do produto, em relação a queijos não adicionados de *Lactobacillus acidophilus*, o mesmo foi descrito por Buriti et al. (2005) ao avaliar queijos adicionados de culturas probióticas verificou uma maior aceitação destes.

Queijos adicionados de culturas de *Lactobacillus* exercem alterações positivas nos atributos sensoriais, principalmente os relativos a sabor e textura de queijos frescos, a produção de substâncias inibitórias do crescimento microbiano diminuem o processo de

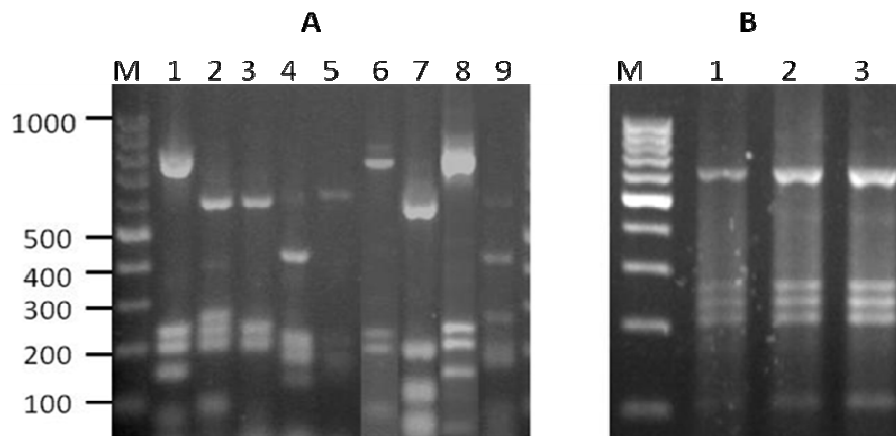
deterioração do produto ao longo do armazenamento tornando as características sensoriais mais estáveis (SOUZA, 2006).

O metabolismo lipídicos e proteolíticos de linhagens de *Lactobacillus* favorecem o desenvolvimento de substâncias responsáveis pelo desenvolvimento de atributos sensoriais no decorrer do armazenamento (LIU et. al., 2008). A melhora dos atributos sensoriais de queijos adicionados de *Lactobacillus* pode ser atribuído a produção de ácido lático e substâncias do metabolismo secundário como o acetaldeído (ALVES et al., 2011).

### **5.5 Identificação Molecular de *Lactobacillus***

Foram realizadas as análises dos 46 isolados pertencentes ao banco de bactérias lácticas LC (DEBASTIANI, 2012) e de 3 isolados pertencentes ao banco de bactérias lácticas LS (BORDGNON, 2005; GATTI, 2007, ). Após a amplificação do gene RNAr 16S, estes foram clivados com endonuclease de restrição que reconheçam sítios com quatro nucleotídeos, pois favorece para encontrar mais sítios de clivagem e detectar o polimorfismo com mais eficiência (VENTURA et al., 2000), e especialmente o caso da enzima Alu I que é comprovadamente eficiente na identificação de *Lactobacillus spp.* (BARATTO et al., 2012), utilizando para fins comparativos o perfil molecular obtido com padrões (Figura 1).

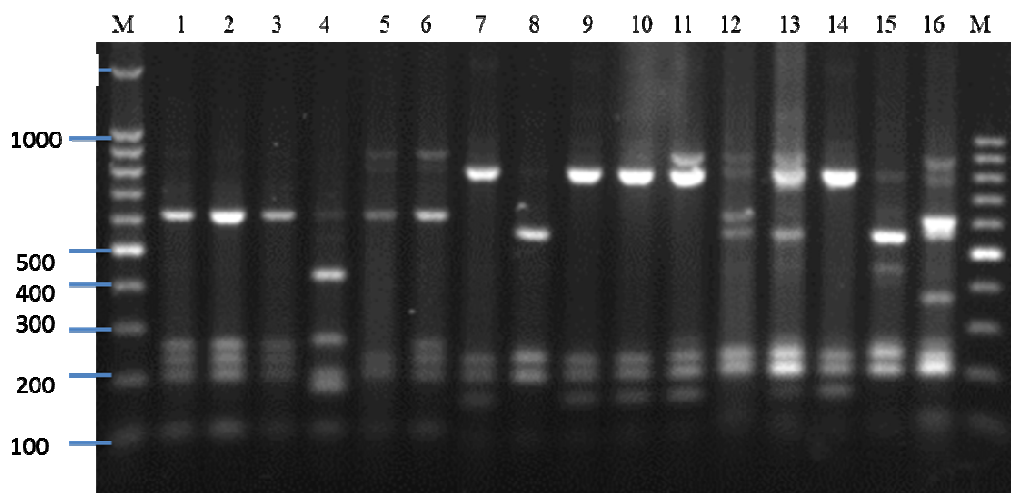
Figura 3: Perfil molecular obtida com a técnica de ARDRA/Alu I de *Lactobacillus* sp. de padrões e de isolados do banco LS.



No **Painel A** seguem nas canaletas: M – Marcador Ladder 100; 1 - *L. sakei* ATCC 15521, 2- *L. plantarum* ATCC 8014, 3 - *L. casei* ATCC 393, 4 - *L. acidophilus* ATCC 4356, 5 - *L. delbrueckii subsp. lactis* ATCC 7830, 6 - *L. brevis* ATCC 367, 7 - *L. lendneri*, 8 - *L. curvatus* L442 and 9 – *L. fermentus* ATCC 9338. **Painel B** seguem: M - Marcador Ladder 100, 1- isolado LSB09 (*L. plantarum*), 2 - isolado LSB06 (*L. plantarum*), 3 - isolado LSB01 (*L. plantarum*).

Os perfis moleculares dos isolados, obtidos com a técnica, estão apresentados na Figura 16. A partir da análise de ARDRA/Alu I, pode-se identificar a maioria dos isolados.

Figura 2: Exemplo do perfil molecular obtido por ARDRA/AluI de isolados de *Lactobacillus* spp. do banco LC.



Ordem das canaletas: M (marcador Ladder 100 pb) e segue os isolados: 1-LC02, 2- LC07 , 3- LC 25, - LC 26, 5- LC 31, - LC35, - LC37, - LC38 , 9- LC39, 10- LC40, 11- LC41, 12 LC28, 13- LC42, 14- LC42, 15- LC38 e 16- LC442.

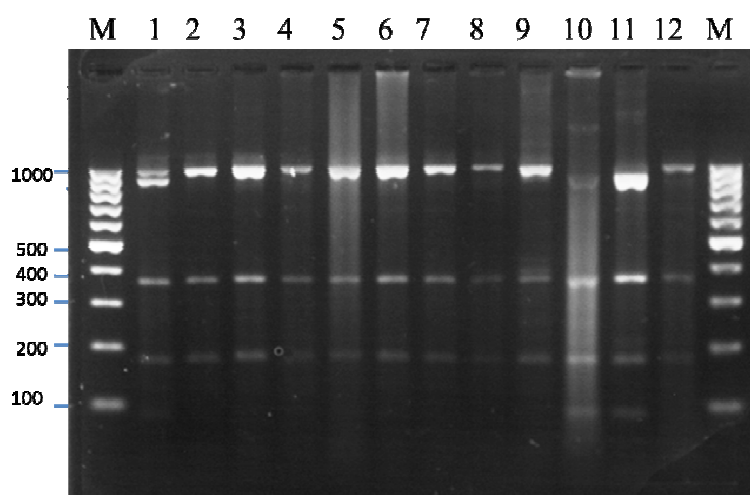
Isolados LC (DEBASTIANI, 2012).

Os isolados que apresentaram identificação *Lactobacillus sakei/curvatus* foram analisados pela técnica de ARDRA/HinfI (Figura 2), a análise com a enzima de restrição

HinFI propiciou a diferenciação dos isolados que apresentaram o perfil *Lactobacillus sakei/curvatus*, os resultados estão exemplificados na tabela 9.

Apenas três dos isolados (LC10, LC28 e LC38) não foram identificados pela técnica, por apresentarem perfis moleculares diferentes dos padrões utilizados, assim foi realizado o sequenciamento parcial do gene de rDNA 16S, onde o isolado 10, com padrão molecular 1, foi identificado como *Lactobacillus farciminis*, enquanto os isolados 28 e 38, com Padrão 2, foram identificados como *Weissella cibaria*, uma bactéria ácido láctica pertencente a família *Leucosnotocaceae*.

Figura 3: Perfil molecular obtido com a técnica ARDRA/ HinFI para os isolados identificados na técnica ARDRA/AluI como *Lactobacillus sakei/curvatus*.



Ordem das canaletas: M (marcador), 1 - padrão de *Lactobacillus curvatus*, 2 - padrão de *Lactobacillus sakei*, segue os isolados: 3 - LC 1, 4 - LC 3, 5 - LC 4, 6 - LC 6, 7 - LC 13, 8 - LC 14, 9 - LC 36, 10 - LC 37, 11 - LC 43, 12 - LC 45.

Fonte: Autor (2016).

Com a análise dos 49 isolados obteve-se os seguintes resultados de identificação: 2,04% foram identificados como *L. farciminis*, 2,04% como *L. lindneri*, 4,08% identificados como *L. brevis*, 4,08% foram classificados como *L. fermentum*, 4,08% dos isolados são *L. casei*, 4,08% pertencem à espécie *W. cibaria*, 8,16% são *L. curvatus*, 28,57% foram identificados como *L. sakei*, 40,77% são *L. plantarum*, o perfil de identificação dos isolados pode ser observado na Tabela 8. Os demais isolados utilizados nos experimentos estão sendo identificados.

De acordo com Miteva et al. (2001), a técnica ARDRA, embora seja uma ferramenta altamente confiável para identificação de espécies de *Lactobacillus*, proximidades

filogeneticamente entre espécies, como por exemplo, *L. sakei* e *L. curvatus* se mostra limitada para distinguir entre uma espécie e outra, sendo necessário realizar o sequenciamento para melhor definição das espécies.

Os isolados LSB01, LSB06 e LSB09 (Figura 1) foram identificados pela técnica ARDRA/AluI e identificados como *L. plantarum*. Não sendo possível até o presente identificar os isolados LSB05, LS7.5 e LS20.3.

Tabela 8: Identificação de *Lactobacillus* spp. pelas técnicas moleculares de ARDRA e Sequenciamento da região 16S

<b>Isolado</b>	<b>Identificação</b>	<b>Isolado</b>	<b>Identificação</b>
LC1	<i>L. sakei</i>	LC26	<i>L. fermentum</i>
LC2	<i>L. plantarum</i>	LC27	<i>L. brevis</i>
LC3	<i>L. sakei</i>	LC28	<i>W. cibaria</i>
LC4 <sup>▲</sup>	<i>L. sakei</i>	LC29	<i>L. casei</i>
LC5	<i>L. sakei</i>	LC30	<i>L. brevis</i>
LC6	<i>L. sakei</i>	<b>LC31</b>	<b><i>L. casei</i></b>
<b>LC07</b>	<b><i>L. plantarum</i></b>	LC32	<i>L. plantarum</i>
LC8	<i>L. casei</i>	LC33	<i>L. plantarum</i>
LC9	<i>L. sakei</i>	LC34	<i>L. plantarum</i>
LC10 <sup>*</sup>	<i>L. farciminis</i>	LC35	<i>L. plantarum</i>
LC11	<i>L. sakei</i>	LC36	<i>L. sakei</i>
LC12	<i>L. sakei</i>	LC37	<i>L. curvatus</i>
LC13	<i>L. sakei</i>	LC38	<i>W. cibaria</i>
LC14	<i>L. sakei</i>	LC39	<i>L. curvatus</i>
LC15	<i>L. plantarum</i>	LC40	<i>L. curvatus</i>
LC16	<i>L. plantarum</i>	LC41	<i>L. sakei</i>
LC17	<i>L. plantarum</i>	LC42	<i>L. sakei</i>
LC18	<i>L. plantarum</i>	LC43	<i>L. curvatus</i>
LC19	<i>L. plantarum</i>	LC44	<i>L. plantarum</i>
LC20	<i>L. lindineri</i>	LC45	<i>L. sakei</i>
LC21	<i>L. plantarum</i>	LC442	<i>L. plantarum</i>
LC22	<i>L. plantarum</i>	LSB01	<i>L. plantarum</i>
LC23	<i>L. fermentum</i>	LSB06	<i>L. plantarum</i>
LC24	<i>L. plantarum</i>	<b>LSB09</b>	<b><i>L. plantarum</i></b>
LC25	<i>L. plantarum</i>		

<sup>▲</sup> Espécies identificadas pela técnica ARDRA/HinfI, <sup>\*</sup> Espécies identificadas pelo sequenciamento da região 16S. Os isolados em destaque foram utilizados para fabricação de queijos para os experimentos.

Ao realizar a caracterização molecular de *Lactobacillus* sp. isolados de salsichas suínas, Dias et al. (2013) verificaram que *L. sakei*, *L. curvatus* e *L. plantarum* foram as principais espécies isoladas desses fermentados, no presente trabalho os *Lactobacillus* sp. *L. plantarum*, *L. sakei* foram as principais espécies isoladas, Nguyen et al. (2013) identificaram *Lactobacillus* sp. em produtos cárneos fermentados Vietnamitas identificaram 29,7% dos isolados como *L. plantarum*, 23% como *L. farciminis*, 0,7% como *L. fermentum*, 5% como *L. brevis* e 0,7% *W. cibaria* espécies similares as identificadas no presente estudo.

Ao estudarem a diversidade genética de bactérias lácticas nativas de salsichas cruas fermentadas tradicionais do Vietnam, Tran et al. (2011) observaram que 67% dos isolados foram identificados como *L. plantarum*, 9,5% como *Lactobacillus brevis* e 1,4% como *L. farciminis* espécies semelhantes as identificadas no presente estudo.

O conhecimento da diversidade microbiana nativa de produtos de origem artesanal pode contribuir para auxiliar no acompanhamento do desenvolvimento das características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais de produtos fermentados, além de contribuir para a previsão da vida de prateleira do produto e o desenvolvimento de novos métodos de conservação e produção de produtos fermentados (TRAN et al., 2011).

O uso de *L. plantarum* e *L. casei* pertencem ao grupo tem demonstrado características interessante principalmente para a utilização como cultivos adjuntos para a fabricação de queijos principalmente na melhoria dos aspectos sensoriais.

O *L. plantarum* apresenta uma variedade de genes que permitem sua adaptação a diversas condições que os alimentos são expostos durante seu processo de fabricação, ocorre em concentrações elevadas em diversos alimentos fermentados, sua aplicação como cultura iniciadora apresenta grande importância principalmente em fermentados lácteos, pois contribuem para o desenvolvimento das características físico-químicas e sensoriais auxiliando nos processos de conservação desses produtos (BERGAMINI et. al., 2013), por apresentarem metabolismo heterofermentativo facultativo os *Lactobacillus plantarum* produzem altas concentrações de ácido láctico evidenciando um potencial para aplicação como cultura adjunta do processo fermentativo na produção de queijos e leites fermentados (CASTRO et al., 2016).

O *Lactobacillus casei* é um micro-organismo utilizado como probiótico veiculado por produtos lácteos principalmente os leites fermentados (BURITI, SAAD, 2007). São micro-organismos frequentemente isolados em queijos na etapa de maturação, dessa forma não são consideradas culturas iniciadoras nesses processos, são culturas adjuntas que contribuem com a formação de compostos de sabor e aroma através da sua atividade proteolítica, são

amplamente distribuídos em ambientes de processamento de alimentos, por isso podem ser isolados de produtos artesanais (BRUNO, CARVALHO, 2009). *Lactobacillus casei* podem ser aplicados para promoção da conservação e segurança de produtos fermentados por apresentarem atividade antimicrobiana contra micro-organismos patogênicos, contaminantes e deteriorantes de alimentos (BURITI, SAAD, 2007).

A associação de *L. plantarum* e *L. casei* pode propiciar melhorias nos aspectos microbiológicos e sensoriais de produtos como o queijo minas frescal, principalmente na manutenção da segurança alimentar por propiciarem um efeito inibitório e controle do crescimento de micro-organismos patogênicos como pode ser evidenciado no presente estudo.

## 6 CONCLUSÃO

Nos ensaios de atividade antimicrobiana *in vitro* 40 isolados apresentaram atividade frente a pelo menos um dos indicadores utilizados, 50% inibiram *E. coli*, 55% inibiram o crescimento de *L. monocytogenes*, 57,5% inibiram *S. aureus*, 47,5% inibiram o crescimento de *Salmonella* Typhimurium, e 8 dos 40 isolados apresentaram atividade frente a todos os indicadores utilizados no estudo.

Oito isolados foram selecionados para a caracterização tecnológica, destacando-se nos critérios de seleção os isolados LC07 (*Lactobacillus plantarum*), LC31 (*Lactobacillus casei*) e LSB09 (*Lactobacillus plantarum*).

No ensaio de inibição de microrganismos patogênicos em queijo ocorreu uma diminuição significativa na contagem desse micro-organismos nos queijos adicionados do *Pool* de *Lactobacillus*, as contagens de *S. aureus* e *E. coli* apresentaram diminuição desde o 7 dia de armazenamento, as contagens de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* apresentaram diminuição das contagens a partir do 14º dia de armazenamento, ao final dos 28 dias de armazenamento o *Pool* de *Lactobacillus* apresentou resultados mais efetivos frente à *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes*. Quando avaliado o potencial de inibição de cada um dos isolados LC07, LC31, LSB09 e do *Pool* de *Lactobacillus* frente a *S. aureus* o isolado LSB09 apresentou maior potencial inibitório em relação aos demais isolados e ao *Pool* de *Lactobacillus*.

Ocorreu uma melhoria das características do queijo A002 adicionado do *Pool* de *Lactobacillus* evidenciando que quando utilizado, o *Pool* agregou valor as características sensoriais do produto, mesmo não havendo diferenças significativas em relação ao queijo fabricado com cultura láctea mesofílica comercial.

Os 49 isolados pertencentes aos bancos LC e LS identificados até o presente foram identificados principalmente como *L. brevis*, *L. casei*, *L. plantarum* e *L. sakei* *L. curvatus* *L. lindineri*, *L. farciminis* e *W. cibaria*.

Os isolados apresentaram características de controlar o crescimento de microrganismos patogênicos melhorando as características sensoriais de queijo minas frescal.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, C. C. et al. Utilização de *Lactobacillus acidophilus* e de acidificação direta na fabricação de queijo de minas frescal. **Arq. bras. med. vet. zootec**, v. 63, n. 6, p. 1559-1566, 2011.
- ALVES, L.L. et al.. Avaliação Sensorial de *Cream Cheeses* Potencialmente Simbióticos Utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta. **Alimentos e Nutrição. Araraquara**. v.19, n.4, p. 409-416, out./dez. 2008.
- AMANN, R. I., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, 59: 143-169, 1995.
- ANDRADE, CRG. et al.. Propriedades Probióticas *in vitro* de *Lactobacillus spp.* Isolados de Queijos Minas Artesanais da Serra da Canastra - MG. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.66, n.5, p.1592-1600, 2014.
- APOLINARIO, T.C.C. et al.. Avaliação da Qualidade Microbiológica do Queijo Minas Frescal Produzido por Laticínios do Estado de Minas Gerais. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 69, n. 6, p. 433-442, nov/dez, 2014.
- BARATTO, C. M. et al. Molecular and phenotypic characterization of *Lactobacillus curvatus* isolated from handmade Brazilian salami. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 11721-11723, 2012.
- BARROS, M. R. et al. Avaliação *in vitro* da atividade inibitória de *Lactobacillus spp.*, isolados do ingluvío e cecos de aves sobre *Salmonella*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 863-868, 2009.
- BARRANCELLI, G.V. et al.. *Listeria monocytogenes*: Ocorrência em Produtos Lácteos e suas Implicações em Saúde Pública. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.78, n.1, p.155-168, jan./mar., 2011.
- BASTOS, M. do S.R. et al.. Inspeção em uma indústria produtora de queijo tipo coalho no estado do Ceará, visando a implantação das boas práticas de fabricação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 57, p.130-136, 2001.

BERGAMINI, C. V.. et al. Growth, survival, and peptidolytic activity of *Lactobacillus plantarum* I91 in a hard-cheese model. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 9, p. 5465-5476, 2013.

BERGER-BÄCHI, B.; ROHRER, S.. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. **Archives of Microbiology**, v. 178, n. 3, p. 165-171, 2002.

BELCHIOR, F. O ingrediente do lácteo saudável. **Leite e Derivados**, São Paulo, v. 13, n. 76, p. 54-64, 2004.

BIELECKA, M.; et al.. Selection of probiotics and prebiotics for symbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Research International.**, Amsterdam, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002.

BOYLSTON, T. D. *et al.*. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal*, v.14, n.5, p.375-87, 2004.

BORDIGNON JUNIOR, S., et al. Scientific note: Antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from artisan italian salami. **Brazilian Journal of Food Technology (Online)**, v. 13, p. 18-22, 2010.

BRASIL. ANVISA(Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/ Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos, 2011.

BRASIL (2001) Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº. 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2001.

BRASIL, Instrução Normativa nº. 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18/09/2003. Seção 1, p. 14. Disponível em: . Acesso em: 20 abr. 2011.

BRASIL. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: II – Métodos físicos e químicos. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal / Brasília, 1981.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 10/01/2001. Seção 1, p. 45-53. Disponível em: . Acesso em: 20 fev. 2011.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. Microbiota láctica de queijos artesanais. **Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos**. 2009.

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, S.M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *Int. Dairy J.*, v. 15, p.1279-1288, 2005.

BURITI, F. C. A., SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 57, n. 4, p. 373, 2007.

CAMARGO, R.J.. **Ação de Bacteriocinas de Bactérias Lácticas no Controle de *Listeria monocytogenes* e no Aumento da Vida de Prateleira de Mortadela Fatiada**. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2011.

CANHOS, V. P., MANFIO, G. P., VAZOLLER, R. F., PELLIZARI, V. H. Diversidade do Domínio Bacteria. In: Carlos Alfredo Joly; Carlos Eduardo de Mattos Bicudo. (Org.). Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. 1 ed. São Paulo: **FAPESP**, 1999, v. 1, p. 1-14.

CARVALHO, A.S. et al.. Relevant Factors for the Preparation of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria. **International Dairy Journal**. v. 14, nº 10, p. 835-847, October, 2004.

CASTRO, J. M., M.. “Biocheese: A Food Probiotic Carrier,” **BioMed Research International**, vol. 2015, Article ID 723056, 11 pages, 2015. doi:10.1155/2015/723056

CASTRO, R. D. et al. Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Journal of Dairy Science**, 2016.

CEBECI, A. ; GÜRAKAN, C.. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. **Food Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 511-518, 2003.

CHARTERIS, William P. et al. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **Journal of Food Protection®**, v. 61, n. 12, p. 1636-1643, 1998.

CHATEAU, N.; CASTELLANOS, I.; DESCHAMIS, A.M. Distribution of pathogen inhibition in the Lactobacillus isolation of a commercial probiotic consortium. **J. Appl. Bacteriol.**, v.74, p.36-40, 1993.

CHAVAN, M. (eds) **Evolution and Ecology of Bacteriocins** Springer Inc. New York, p. 45-92, 2007.

CHIODA, T. P. et al.. Inibição do crescimento de Escherichia coli isolada de queijo “Minas Frescal” por Lactobacillus acidophilus. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 37, n. 2, p. 583-585, 2007.

COCOLIN, L., RANTSIOU, K. Sequencing and expression analysis of sakacin genes in *Lactobacillus curvatus* strains. **Appl Microbiol Biotechnol.** v.76 (6): 1403-11, 2007.

CORTEZ, N. M. et al. Lactobacillus acidophilus antagonistic action against pathogenic strains inoculated in the fermented milk/Ação antagonista de Lactobacillus acidophilus frente a estirpes patogênicas inoculadas em leite fermentado. **Journal of bioenergy and food science**, v. 3, n. 1, 2016.

COSTA, Giselle Nobre et al. Atividade antimicrobiana de Lactobacillus e Bifodobacterium frente a micro-organismos patogênicos “in vitro”. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p. 1839-1846, 2012.

COSTA, N.M.B; ROSA, C.O.B. Alimentos Funcionais: componentes bioativos e efeitos. 1. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2010.

CUSICK, S. M., O’SULLIVAN, D. J. Use of a Single, Triplicate Arbitrarily Primed-PCR Procedure for Molecular Fingerprinting of Lactic Acid Bacteria. **Appl. Env. Microbiol.**, 55 (5): 2227-223, 2000.

DANIELSEN M.; WIND A.. Susceptibility of Lactobacillus spp. to antimicrobial agents. **International journal of food microbiology**, v. 82, n. 1, p. 1-11, 2003.

DEEGAN, L.H., et.al.. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1058–1071, 2006.

DE MARTINIS, E.C.P., et al.. Bioconservação de Alimentos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 29, n.1: 114-119, 2003.

DE MARTINIS E.C.P., et al. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. **Braz J Microbiol**, 32(1), 32-37, 2001.

DEVI, S.M.; *et.al.*. In situ production of pediocin PA-1 like bacteriocin by different genera of lactic acid bacteria in soymilk fermentation and evaluation of sensory properties of the fermented soy curd. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 11, p. 3325-3332, oct, 2012.

DE SOUZA, C H B.. Influência de uma cultura starter termofílica sobre a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e as características de queijo minas frescal probiótico. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2006.

DE SOUZA MOTTA, Amanda; GOMES, Melina Da Silva Mesquita. Propriedades tecnológicas e funcionais de bactérias lácticas: a importância destes micro-organismos para alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 3, p. 172-184, 2015.

DEVLIEGHERE, F.; *et.al.*. New preservation technologies: Possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 4, p. 273-285, apr., 2004.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20141864>

Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm). Acesso em: 13/05/2011.

DIAS, F. S., RAMOS, C. L., SCHWAN, R. F.. Characterization of spoilage bacteria in pork sausage by PCR-DGGE analysis. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 33, n. 3, p. 468-474, 2013.

DRAKE, M., SMALL, C. L., SPENCE,. K. D., SWANTSON,. B. G. Rapid detection and identification of *Lactobacillus* spp. in dairy products by using the polimerase chain reaction. **Journal of Food Protection**. v.59 (10) : 1031-1036, 1996.

ELKINS, C. A.; MULLIS, L. B.. Bile-mediated aminoglycoside sensitivity in *Lactobacillus* species likely results from increased membrane permeability attributable to cholic acid. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7200-7209, 2004.

EJTAHED, H.S. *et.al.*. Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.7, p.3288-3294, 2011. Acesso em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21700013> . Acesso em: set/2015. doi: 10.3168/jds.2010-4128. 2011. [ [Links](#) ]

FAO/WHO Working Group. **Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.

FARBER, J.M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **J. Food Prot.**, v.59, p.1091-1101, 1996.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**/ Stephen J Forsythe; tradução Maria Carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt-Porto Alegre:Arimed,2002.

FRANCO, B. D. G de M.; LANDGRAF, M. Micro-organismos patogênicos de importância em alimentos. In: **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. cap.4, p. 48-60.

FURTADO, M.M.; NETO, J.P.M. *Tecnologia de queijos*: manual técnico para produção industrial de queijos. São Paulo: Dipemar,1994. 118p.

FURTADO, D.N.. Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e sua aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em queijo frescal de cabra. Dissertação- Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

GARCIA, G.R.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; MEDEIROS, A.P. *et al.* Inibição do crescimento de bactérias patogênicas por *Lactobacillus acidophilus*. **Rev. Port. Cienc. Vet.**, v.101, p.263-268, 2006.

GATTI, D. J. ; DALBÓ, M. A ; BASSO, Marcos Fernando ; SCHUHLI, G. ; GELINSKI, J. M. L. N..Análise de DNA ribossomal 16S de cepas de bactérias lácticas. In: IV SINGEEL - Simpósio de Genética, Ecologia e Evolução e III Workshop de Pós-graduação em Biologia Evolutiva, 2009, Ponta Grossa-PR. **Anais...I V SINGEEL** -Simpósio de Genética, Ecologia e Evolução e III Workshop de Pós-graduação em Biologia Evolutiva, 2009. v. Unico. p. 01-05.

GOLDBERG, I. (Ed). *Designer Foods, Pharmafoods, Nutraceuticals. Functional Foods*, New York : Chapman & Hall Inc., cap. 9,14 e 20, 1994.

GRAY, M. L.; KILLINGER, A. H.. *Listeria monocytogenes* and Listeric Infections. **Bacteriol Rev** 1966; 30: 309-382.

HANSEN, E.B.. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 119 – 131. 2002.

HENG, N.C.K.; *et.al.*. The Diversity of Bacteriocins Produced by Gram-Positive Bacteria. In: RILEY, M.A.

HERMANNNS, Gislaine. Potencial bacteriocinogênico e probiótico de bactérias lácticas isoladas de leite e queijos artesanais. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2013.

HEYNDRICKX, M., *et.al.* Applicability Of Combined Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) Patterns in Bacterial Phylogeny and Taxonomy. **Journal of Microbiological Methods**, v. 26, n. 2, p. 247-259. Aug, 1996.

HOLT, J. G., KRIEG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual determinative bacteriology**. 9. ed.: Williams & Wilkins, Baltimore, 787p,1994.

ISHIKAWA, M. et al. *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. Nov. Sp. Nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 711-720, 2003.

JACQUET, C.; *et.al.*. Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.6, p.2242-2246, 1995.

JENSEN, M. A.; *et.al.*. Rapid Identification of Bacteria on the Basis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Ribosomal DNA Spacer Polymorphisms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 945-952. Apr, 1993.

JUSTO T H. et al. Resistência de *Lactobacillus* sp. isolados de salames artesanais produzidos na Região Sul do Brasil a antibióticos. **Vet. e Zootec.** 2013 jun.; 20(2): 285-295.

KASTNER, S. et al. Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 145-155, 2006.

KLANDER, O., Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Ant van Leuw.*, v.49,p.209-224, 1983.

KOMATSU, S. R. Origem dos queijos minas artesanais produzidos em Uberlândia-MG e Ocorrência de *Staphylococcus coagulase positiva*. 2008. 48p. Dissertação (mestrado em Veterinária) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008. Disponível em: <<http://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/1824/1/OrigemQueijosMinas.pdf>> Acesso em: nov/2015.

LEISTNER, L. Food preservation by combined methods. **Food Research International**, v. 25, n. 2, p. 151-158, 1992.

LIU, M. et al. Comparative genomics of enzymes in flavor-forming pathways from amino acids in lactic acid bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 15, p. 4590-4600, 2008.

LOLLO, P.C.B. *et.al.*. Probiotic yogurt offers higher immune-protection than probiotic whey beverage. **Food Research International**, v.54, n.1, p.118-124, 2013. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399691300330X>. Acesso em: ago/2015. doi: 10.1016/j.foodres.2013.06.003.

MARAGKOUDAKIS, P.A. *et.al.*. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**,v. 16, n. 3, p. 189-199, 2006.

MARTINS, Evandro et al. Associação de bacteriocinas e bactérias lácticas para inibição de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas frescal. 2012.

MATTILA-SANDHOLM, Tiina; MÄTTÖ, Jaana; SAARELA, Maria. Lactic acid bacteria with health claims—interactions and interference with gastrointestinal flora. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 1, p. 25-35, 1999.

MATTILA-SANDHOLM, T.; *et.al.*.Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2-3, p. 173-182, 2002.

MENDES, H. B.; *et.al.* Prospecção Tecnológica Sobre Probióticos Oriundos de Microorganismos Presentes no Leite Humano. **Caderno de Prospecção**, Salvador, v. 8, n. 3, p. 479-494, jul./set. 2015.

MESSAOUDI, S.; *et.al.*. *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 296-304, dec, 2013.

NABAVI, S. *et.al.*. Effects of probiotic yogurt consumption on metabolic factors in individuals with nonalcoholic fatty liver disease. **Journal Dairy Science**, v.97, p.7386-7393, 2014.

NGUYEN, D. T. et al. A culture-dependent and -independent approach for the identification of lactic acid bacteria associated with the production of nem chua, a Vietnamese fermented meat product. **Food Research International**, v. 50, p. 232-240, 2013.

OLIVEIRA, M. N. de; *et.al.* Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 38, n. 1, jan./mar. 2002.

ONG, L.; *et.al.*. Chemical analysis and sensory evaluation of Cheddar cheese produced with *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* or *Bifi dobacterium* sp. **International Dairy Journal**, v.17, n.8, p.937-345, 2007.

PARADA, J.L.; *et.al.* Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 50, n. 32: 521-542, Maio 2007.

PANCHENIAK, E. F. R.. **Isolamento, Seleção, Caracterização Bioquímica e Molecular para a Produção e Avaliação do Potencial Probiótico de *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001 em Suínos**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

PRAKASH, O.; VERMA, M.; SHARMA, P.; KUMAR, M.; KUMARI, K.; SINGH, A.; KUMARI, H.; JIT, S.; GUPTA, S. K.; KHANNA, M.; LAL, R. Polyphasic approach of bacterial classification – An overview of recent advances. **Indian J. Microbiol.**47:98-108, 2007.

PREZZI, Lúgia Eleonor. **Efeito da adição de *Lactobacillus rhamnosus* em queijos Minas frescal sobre as contagens de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes***. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2014

REZENDE, M.F.S.; *et.al.*. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidoláticas. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 63, n.6, p.1567-1573, 2011.

ROSA, L. J. B.; *et.al.*. Viability of probiotic micro-organism *Lactobacillus acidophilus* in dairy chocolate dessert and its action against foodborne pathogens. **Ciência Rural**, Santa Maria, Online, set. 2015. Acesso em: out/2015.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 42, n. 1, jan./mar., 2006.

SANGALETTI, N.; *et.al.*. Estudo da vida útil de queijo Minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v 29, n. 2, p. 262-269, abr.-jun. 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSEL. D. W. Molecular cloning: a Laboratory manual, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York : CSHL, 2001.

SCHIFFNER, E.. HAGEDORN, W.. OPPEL, K.. **Cultivos Bacterianos en las Industrias Carnicas**. p. 3-66. Zaragoza: Acribia, 1978.

SCHILLINGER, U.; *et.al.*. *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 12, p. 1289-1297, 2005.

SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M.. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: approaching a definition. **American Journal Clinic Nutrition**, v. 73, p. 361-364. 2001.

SHORI, A.B.. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. **Trends in Food Science & Technology**, v, 41, n. 1, p. 37-48, jan, 2015.

SILVA, M.C.D.; *et.al.*. Avaliação de Métodos para a Detecção de *Listeria monocytogenes* em Queijos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** [online]. 1998, vol.18, n.2, pp. 150-155. ISSN 1678-457X. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611998000200001>.

SKLARZ, M. Y.; *et.al.*. *Evaluating amplified rDNA restriction analysis assay for identification of bacterial communities Antonie van Leeuwenhoek*, 2009.

SOUZA, Cínthia Hoch Batista de. **Influência de uma cultura'starter'termofílica sobre a viabilidade de'Lactobacillus acidophilus'e as características de queijo minas frescal probiótico**. 2006. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

TEMMERMAN, R. et al. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. **International journal of food microbiology**, v. 81, n. 1, p. 1-10, 2003.

TEMMERMAN, R.; *et al.* Culture-Independent Analysis of Probiotic Products by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. **Applied Environmental Microbiology**. v. 69, n. 1, p. 220-226. Jan, 2003.

TENOVER, F., ARBEIT, R. D., GOERING, R. V., MICKELSEN, P. A., MURRAY, B. E., PERSING, D. H., SWAMINATHAN, B. Interpretinf chromosomal DNA Restriction Patterns Ptroduced by Pulsed-field Gel electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain typing. **J. Clin. Microbiol.**, 33(9): 2233-2239, 1995.

TORREZ, K.; *et.al.*. Patogenesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonotico emergente. **MVZ-Córdoba**. N° 10:(1), p. 511-543. 2005.

TORTORA, G.J., FUNKE, B. R., CASE, C. **Microbiology: an inroduction**. ed 6. Porto Alegre: Artes Médicas, 2003.

TRAN, K. T.M. et al. Distribution and genetic diversity of lactic acid bacteria from traditional fermented sausage. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 338-344, 2011.

VÁSQUEZ S M., HÉCTOR S. M, SANDRA Z. B. Use of Antimicrobial Substances Produced by Acid Lactic Bacterias on Meat Conservation. *Rev Chil Nutr* 2009;36(1):64-71.

VENTURA, M. *et al.* Rapid amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) identification of *Lactobacillus* spp. isolated from fecal and vaginal samples. **Systematic Applied Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 504–509, dez., 2000.

WU, X. Y.; *et al.* Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. **Journal of Microbiological Methods**. v. 64, n. 1, p. 107-119. Jan, 2006

YEUNG, O.S.; *et.al.* Species-specific identification of commercial probiotic strains. **Journal of Dairy Science**. v. 85, n. 5, p. 1039-1051. May, 2002.

ZHOU, J. S. et al. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **International journal of food microbiology**, v. 98, n. 2, p. 211-217, 2005.

## APENDICE A

### TESTE DE ACEITAÇÃO – QUEIJO MINAS FRESCAL

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Prove cuidadosamente a amostra recebida e utilizando a escala de 1 a 5 (5: Gosta extremamente; 4: Gosta; 3: Indiferente; 2: Desgosta moderadamente; 1: Desgosta extremamente) atribua um grau para cada um dos atributos abaixo, marcando-o com um “X”:

Amostra: \_\_\_\_\_

Aparência: (1) (2) (3) (4) (5)

Sabor: (1) (2) (3) (4) (5)

Cor: (1) (2) (3) (4) (5)

Aroma: (1) (2) (3) (4) (5)

Textura: (1) (2) (3) (4) (5)

Amostra: \_\_\_\_\_

Aparência: (1) (2) (3) (4) (5)

Sabor: (1) (2) (3) (4) (5)

Cor: (1) (2) (3) (4) (5)

Aroma: (1) (2) (3) (4) (5)

Textura: (1) (2) (3) (4) (5)

Comentários: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## APENDICE B

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu \_\_\_\_\_ declaro que fui satisfatoriamente esclarecido pelo pesquisador, em relação à minha participação no projeto de pesquisa “Aplicação de *Lactobacillus* produtores de substâncias antimicrobianas na bioconservação de queijo minas frescal”, na qualidade de provador do produto. Sei que a função dos provadores é, durante a sessão de avaliação, medir a intensidade das características sensoriais de aroma, gosto, sabor e textura em amostras de queijo minas frescal. Tendo inteira consciência de que a ingestão de tal produto não trará nenhum risco à minha saúde, por se tratar de um alimento consumido habitualmente.

Entendo que poderei, a qualquer momento, entrar em contato com o pesquisador responsável (cel. 88632085, email: schneiderketlin@gmail.com), caso haja algum efeito inesperado que possa prejudicar meu estado de saúde físico e/ou mental. Entendo que minha participação não envolverá quaisquer custos, e que, ao participar, estarei colaborando para o desenvolvimento de uma dissertação de mestrado e o aperfeiçoamento de um profissional. Além disso, não coloco qualquer objeção quanto ao uso dos dados originados neste projeto para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras. Desta forma, sem ter sido submetido a qualquer tipo de pressão ou coação, concordo voluntariamente e expresso meu total consentimento em participar do projeto.

Videira, \_\_\_\_/\_\_\_\_ de  
2016.

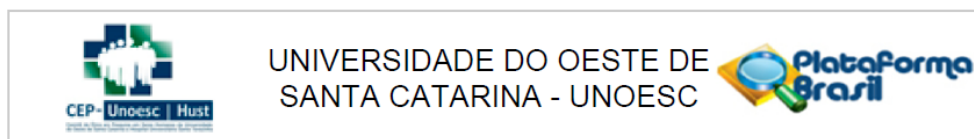
---

Assinatura do Participante

---

Ketlin Schneider  
Pesquisador Responsável

## ANEXO A



### COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Potencial aplicação de Lactobacillus sp. como antimicrobiano em queijo minas frescal

**Pesquisador:** César Milton Baratto

**Versão:** 1

**CAAE:** 55804216.9.0000.5367

**Instituição Proponente:** FUNDACAO UNIVERSIDADE DO OESTE DE SANTA CATARINA

#### DADOS DO COMPROVANTE

**Número do Comprovante:** 039511/2016

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO UNIVERSIDADE DO OESTE DE SANTA CATARINA

Informamos que o projeto Potencial aplicação de Lactobacillus sp. como antimicrobiano em queijo minas frescal que tem como pesquisador responsável César Milton Baratto, foi recebido para análise ética no CEP Universidade do Oeste de Santa Catarina - UNOESC em 05/05/2016 às 16:45.

**Endereço:** Rua Getúlio Vargas, nº 2125, Centro Administrativo  
**Bairro:** Flor da Serra **CEP:** 89.600-000  
**UF:** SC **Município:** JOACABA  
**Telefone:** (49)3551-2012 **Fax:** (49)3551-2004 **E-mail:** cep@unoesc.edu.br