

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**NATHIÉLI BASTOS DE SOUZA**

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE BACTERIOCINA PRODUZIDA POR *Lactobacillus sakei*: UMA ANÁLISE DE RESISTÊNCIA E APLICAÇÃO EM QUEIJO MINAS FRESCAL**

**Bagé**

**2017**

**NATHIÉLI BASTOS DE SOUZA**

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE BACTERIOCINA PRODUZIDA POR *Lactobacillus sakei*: UMA ANÁLISE DE RESISTÊNCIA E APLICAÇÃO EM QUEIJO MINAS FRESCAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Caroline Costa Moraes

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Manera

**Bagé  
2017**

**NATHIELI BASTOS DE SOUZA**

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE BACTERIOCINA PRODUZIDA POR *Lactobacillus sakei*: UMA ANÁLISE DE RESISTÊNCIA E APLICAÇÃO EM QUEIJO MINAS FRESCAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 11 de dezembro de 2017.

Banca examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Caroline Costa Moraes  
Orientador  
Unipampa – Campus Bagé

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Manera  
Coorientadora  
Unipampa – Campus Bagé

---

Prof. Dr. Fernando Zocche  
Unipampa – Campus Dom Pedrito

---

Prof. Dr. Paulo Fernando Marques Duarte Filho  
Unipampa – Campus Bagé

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

S729a Souza, Nathieli Bastos de  
AÇÃO ANTIMICROBIANA DE BACTERIOCINA PRODUZIDA POR  
Lactobacillus sakei: UMA ANÁLISE DE RESISTÊNCIA E APLICAÇÃO EM  
QUEIJO MINAS FRESCAL / Nathieli Bastos de Souza.  
92 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade Federal do Pampa,  
ENGENHARIA DE ALIMENTOS, 2017.  
"Orientação: Caroline Costa Moraes".

1. Compostos bioativos. 2. Antimicrobiano natural. 3. Bioconservação de produto  
alimentício. 4. Contaminações em queijo Minas Frescal. I. Título.

*A Deus, que guia meus passos, ilumina meus caminhos e me dá força. A minha família por toda a confiança e apoio. A minha mãe que mesmo ausente sempre esteve presente em minha vida me iluminando.*

## AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por iluminar os meus caminhos e me dar forças para lutar atrás dos meus sonhos e ideais, as glórias alcançadas e a vida maravilhosa que ele me deu.

A minha Mãe, que mesmo de longe sempre me amou, cuidou e iluminou meus caminhos. Pelos momentos que vivemos antes da sua partida, pelo aprendizado e amor incondicional. Por ser um exemplo de vida e de profissional que eu sempre pretendo seguir.

Ao meu Pai e Irmão, pela compreensão com minhas ausências e pelo amor incondicional e alegrias que me dão sempre. Todo o esforço e dedicação que sempre desempenharam comigo. Pelo exemplo de dedicação e persistência, pelas preocupações e angústias.

Agradeço ao meu namorado e amigo Francisco, pelo apoio que sempre me deu, pelo carinho e compreensão com minhas ausências. A minha amiga e madrastra Lilian, pelo apoio e carinho que me dá sempre.

A minha orientadora Prof. Caroline e co-orientadora Prof. Ana Paula, pelos ensinamentos preciosos, paciência, dedicação. Pois ao longo destes 5 anos tornaram-se pessoas muito especiais e valiosas para a minha vida pessoal e acadêmica.

A todo o corpo docente da Engenharia de Alimentos, pelos ensinamentos, pela dedicação e lições preciosas que recebi de vocês. Obrigada por tornarem a minha caminhada pela universidade a melhor possível.

A minha equipe de trabalho do Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos, Camila, Guilherme, Luciano, Prof. Caroline, Prof. Ana Paula, Mateus Sicupira e Marília, que ao longo do tempo de convivência se tornaram pessoas especiais, uma família que a Unipampa me deu. Meus agradecimentos ao Luciano Almeida, que sempre foi um amigo e sempre me ajudou muito com as pesquisas e dúvidas.

Meus agradecimentos aos meus Amigos Guilherme, Mateus, Mayke, Erick, Luiza, Stefanie, Renata e Clovis pela parceria de sempre, pelas noites de estudos, os sorrisos, as lágrimas e o companheirismo que fizeram de meus dias mais leves e divertidos. Em especial, um agradecimento à Camila Contessa que ao longo dos anos de formação se tornou minha amiga, companheira de trabalho e de estudos, por aguentar minhas loucuras e me fazer rir nos momentos mais impróprios e improváveis, obrigada pela paciência e por sempre saber o que estou pensando e tentando dizer (hahaha). Esses Amigos que adquiri através da Unipampa que seguirão para a vida.

À Universidade Federal do Pampa e todo o seu corpo docente pela oportunidade de cursar uma graduação e a possibilidade de vislumbrar futuros maiores e superiores.

Meus agradecimentos à banca examinadora, ao prof. Paulo Duarte e Prof. Fernando Zocche, pela disponibilidade de tempo e atenção com o trabalho.

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha, mas o que ele se torna com isso.”

John Ruskin

## RESUMO

Com o aumento da consciência da humanidade com relação à saúde e alimentação, a população vem procurando consumir alimentos naturais com pouco ou nenhum uso de conservantes químicos, mas que atendam às exigências de qualidade e segurança. Com esse viés, o emprego de bacteriocinas na conservação do produto vem ganhando espaço nesse nicho, principalmente no combate de micro-organismos patogênicos que são os principais causadores de intoxicações alimentares. Nesse contexto, a utilização das bacteriocinas é interessante por possuir um apelo natural e por sua já comprovada atividade antimicrobiana contra uma vasta gama de micro-organismos. Assim, neste trabalho objetiva-se analisar uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus sakei*, isolada de salame italiano, quanto à estabilidade com respeito ao pH e temperatura, bem como sua aplicação em um produto alimentício. Para tanto, foi feita uma análise de estabilidade da bacteriocina frente a variações de pH e temperatura, através de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) 2<sup>2</sup>. Foi feita uma análise *in vitro* com os micro-organismos *S. aureus* e *E. coli*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* para posterior aplicação no alimento. Escolheu-se como objeto da avaliação o queijo Minas Frescal, dado à sua alta perecibilidade. Foram feitas 3 formulações de queijo, uma adição da bacteriocina produzida por *Lactobacillus sakei*, outro contendo nisina e um queijo controle, sem adição de conservantes. O queijo produzido seguiu as boas práticas de fabricação e para sua formulação optou-se por utilizar leite cru, adquirido de produtores locais. Como resultado, através do DCCR foi possível observar que os tratamentos 3 (pH 4,6 e T86 °C), 4 (pH 7,0 e T86°C), 6 (pH 7 e T52°C), 8 (pH5,9 e T100°C) e o ponto central 11 (pH 5,9 e T52°C) não apresentaram diferença significativa com média de aproximadamente 100 % de inibição frente ao patógeno *Staphylococcus aureus*, observou-se ainda que para esse micro-organismo os pontos centrais e o tratamento 6 não apresentaram diferenças com  $p > 0,05$ . Já para o patógeno *Escherichia coli*, os tratamentos 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11 não apresentaram variações significativas com média de inibições próximas a 100%. Ilustrando a maior estabilidade da bacteriocina a temperaturas mais elevadas e pH mais próximos à neutralidade. Nas análises *in vitro* observou-se que o tempo de fermentação da BAL interfere na concentração da bacteriocina, porém foi eficiente na inibição dos micro-organismos testados. Quanto às análises de estabilidade microbiológica dos queijos, a bacteriocina utilizada no estudo apresentou ação inibitória diminuindo a contagem de estafilococos coagulase positiva no primeiro dia de armazenamento em aproximadamente 78,85% da contaminação inicial. Mostrando-se eficiente como conservante e sem diferenças significativas com  $p > 0,05$  em relação à utilização de nisina (bacteriocina comercial). Assim, conclui-se que a bacteriocina produzida por *Lactobacillus sakei* isolado de salame italiano apresenta efeito positivo na inibição de patógenos como *S. aureus* e *E. coli*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*. Conclui-se, ainda, que a bacteriocina tem ação potencial para uso como conservante natural em alimentos, como queijos, reduzindo a contagem de estafilococos coagulase positiva em aproximadamente 78,85% da contaminação inicial. A bacteriocina também apresentou estabilidade a elevadas temperaturas e pH próximo ao neutro, mostrando que pode ser utilizada em alimentos que recebam tratamento térmico.

Palavras-Chave: Compostos bioativos; Antimicrobiano natural; Análise de Estabilidade; Bioconservação de produto alimentício.

## RESUMEN

Con el aumento de la conciencia de la humanidad con relación a la salud y alimentación, la población viene tratando de consumir alimentos naturales con poco o ningún uso de conservantes químicos, pero que atiendan a las exigencias de calidad y seguridad. Con ese sesgo, el empleo de bacteriocinas en la conservación del producto viene ganando espacio en ese nicho, principalmente en el combate de microorganismos patógenos que son los principales causantes de intoxicaciones alimentarias. En este contexto, la utilización de las bacteriocinas es interesante por poseer un atractivo natural y por su ya comprobada actividad antimicrobiana contra una amplia gama de microorganismos. Así, en este trabajo se pretende analizar una bacteriocina producida por *Lactobacillus sakei*, aislada de salame italiano, en cuanto estabilidad con respecto al pH y temperatura, así como su aplicación en un producto alimenticio. Para ello, se realizó un análisis de estabilidad de la bacteriocina frente a variaciones de pH y temperatura, a través de Delineamiento Compuesto Central Rotacional (DCCR) <sup>22</sup>. Se realizó un análisis *in vitro* con los microorganismos *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogene* para su posterior aplicación en el alimento. Se eligió como objeto de la evaluación el queso Minas Frescal, dado a su alta perecibilidad. Se realizaron 3 formulaciones de queso, una adición de la bacteriocina producida por *Lactobacillus sakei*, otra conteniendo nisina y un queso control, sin adición de conservantes. El queso producido siguió las buenas prácticas de fabricación y para su formulación se optó por utilizar leche cruda, adquirida de productores locales. Como resultado, el DCCR mostró que los tratamientos 3 (pH 4,6 y T86 ° C), 4 (pH 7,0 y T86 ° C), 6 (pH 7 y T52 ° C), 8 (pH5,9 y T100) (C) y el punto central 11 (pH 5,9 y T52 ° C) no presentaron diferencia significativa con un promedio de aproximadamente el 100% de inhibición frente al patógeno *Staphylococcus aureus*, se observó que para este microorganismo los puntos centrales y el tratamiento 6 no presentó diferencias con  $p < 0,05$ . Para el patógeno *Escherichia coli* los tratamientos 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11 no presentaron variaciones significativas con promedio de inhibiciones cercanas al 100%. Ilustrando la mayor estabilidad de la bacteriocina a temperaturas más elevadas y pH más cerca de la neutralidad. En los análisis *in vitro* se observó que el tiempo de fermentación de la BAL interfiere en la concentración de la bacteriocina, pero ésta fue eficiente en la inhibición de los microorganismos probados. En cuanto a los análisis de estabilidad microbiológica de los quesos, la bacteriocina utilizada en el estudio presentó acción inhibitoria disminuyendo el recuento de estafilococos coagulasa positiva en el primer día de almacenamiento en aproximadamente el 78,85% de la contaminación inicial. La bacteriocina, se muestra eficientes como conservantes y sin diferencias significativas con  $p < 0,05$  en relación al uso de nisina (bacteriocina comercial). Así, se concluye que la bacteriocina producida por *Lactobacillus sakei* aislado de salami italiano, presenta un efecto positivo en la inhibición de patógenos como *S. aureus* y *E. coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*. Se concluye también que la bacteriocina tiene acción potencial para uso como conservante natural en alimentos, como quesos, reduciendo el recuento de estafilococos coagulasa positiva en aproximadamente el 78,85% de la contaminación inicial. La bacteriocina también presentó estabilidad a altas temperaturas y pH cerca del neutro, mostrando que puede ser utilizada en alimentos que reciban tratamiento térmico.

Palabras clave: Compuestos bioactivos; Antimicrobiano natural; Análisis de Estabilidad; Bioconservación de producto alimenticio.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fluxograma de processo de fabricação de queijo Minas Frescal _____	44
Figura 2 - Análise de estabilidade da bacteriocina contra (G+: <i>S. aureus</i> ; G-: <i>E. coli</i> ) _____	48
Figura 3 - Gráfico de Pareto da inibição de <i>S. aureus</i> , e estimativa dos efeitos _____	49
Figura 4 – DCCR 2 <sup>2</sup> de porcentagem de inibição da bacteriocina frente a <i>S. aureus</i> _____	51
Figura 5 - Superfície de resposta gerada através da DCCR 2 <sup>2</sup> frente a <i>S. aureus</i> _____	53
Figura 6-Gráfico de Pareto dos efeitos gerados pelas variáveis sobre a atividade antimicrobiana do composto, frente a <i>E. coli</i> . _____	55
Figura 7 - Perfil de resposta da inibição do <i>E. coli</i> após tratamentos. _____	57
Figura 8 - Superfície de resposta gerada através da DCCR 2 <sup>2</sup> frente a <i>E. coli</i> _____	59
Figura 9 - Queijos produzidos para análise no 1º, 14º e 30º dias de armazenamento. _____	63
Figura 10 - Qualidade microbiológica dos queijos em função dos dias de armazenamento sob refrigeração _____	67
Figura 11 - Placas de Agar Baird Parker para o crescimento de estafilococos nos queijos nas diluições 10 <sup>-1</sup> (0,3 mL e 0,1mL), 10 <sup>-2</sup> e 10 <sup>-3</sup> , respectivamente. _____	69
Figura 12 - Placas de Agar Baird Parker para o crescimento de estafilococos nos queijos nas diluições 10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> e 10 <sup>-3</sup> , respectivamente para confirmação dos resultados _____	70
Figura 13 - Testes bioquímicos para confirmação de <i>Listeria</i> _____	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das bacteriocinas. _____	31
Tabela 2 –Níveis de nisina permitidos para adição em alimentos _____	36
Tabela 3 – Aplicação potencial de bacteriocinas em leite e produtos lácteos. _____	37
Tabela 4 - Matriz para Delineamento Composto Central Rotacional 2 <sup>2</sup> . _____	41
Tabela 5 - Variáveis respostas do experimento com o micro-organismo <i>S. aureus</i> _____	50
Tabela 6 - Variáveis respostas do experimento com o micro-organismo <i>E. coli</i> _____	56
Tabela 7 - Porcentagens de inibição contra os micro-organismos _____	61
Tabela 8 - Dados da análise microbiológica para estafilococos coagulase positiva _____	64
Tabela 9 - Contaminação por coliformes termotolerantes _____	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*  
APHA - American Public Health Association  
ATCC - *American Type Culture Collection*  
BAL – Bactéria Ácido Láctica  
BAM - *Bacteriological Analytical Manual*  
CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono  
DCCR - Delineamento Composto Central Rotacional  
DL<sub>50</sub> – Dose Letal para 50% das Amostras  
DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos  
FDA - *Food and Drug Administration*  
GRAS – *Generally Recognized as Safe*  
MRS - *Man, Rogosa and Sharpes*  
MS – Ministério da Saúde  
NaCl – Cloreto de Sódio  
NaOH – Hidróxido de Sódio  
NCCLS - *National Committee for Clinical Laboratory Standards*  
NMP – Método do Número Mais Provável  
pH – Potencial Hidrogênio Iônico  
UFC – Unidades Formadoras de Colônia  
UI – Unidades Internacionais  
v/v – Volume por Volume

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 Doenças transmitidas por alimentos (DTA) .....	19
2.2Contaminações microbianas em produtos lácteos .....	20
2.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	21
2.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	22
2.2.3 <i>Salmonella</i> spp.....	23
2.2.4 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	23
2.3 Conservantes de alimentos .....	24
2.4 Bactérias ácido lácticas (BAL) .....	26
2.4.1 <i>Lactobacillus sakei</i> .....	28
2.5 Bacteriocinas .....	29
2.5.1 Classe I: Lantibióticos .....	31
2.5.2 Classe II: Não-Lantibióticos.....	32
2.5.3 Classe III: Proteínas altamente termolábeis.....	32
2.5.4 Classe IV: Bacteriocinas complexas.....	33
2.6 Estabilidade das bacteriocinas .....	33
2.7 Utilização de bacteriocinas em produtos lácteos .....	35
2.7.1 Queijo Minas Frescal.....	37
3METODOLOGIA.....	40
3.1 Obtenção da bacteriocina .....	40
3.2 Delineamento composto central rotacional 2 <sup>2</sup> (DCCR).....	40
3.3 Análises antimicrobianas .....	42
3.3.1 Análises antimicrobianas do DCCR 2 <sup>2</sup> .....	42
3.3.2 Análises <i>in vitro</i> .....	42
3.4 Aplicação de bacteriocina na produção de queijo .....	43
3.4.1 Etapas de produção de queijo Minas Frescal.....	43
3.5.1.2 Etapas do processo produtivo .....	45
3.5 Análises microbiológicas do queijo.....	46
3.6 Análises Estatísticas .....	47
4.1 Análises de Estabilidade da bacteriocina (DCCR 2 <sup>2</sup> ).....	48

4.1.1 Sensibilidade da bacteriocina e sua ação inibitória frente <i>Staphylococcus aureus</i> .	48
4.1.2 Sensibilidade da bacteriocina e sua ação inibitória frente <i>Escherichia coli</i> .....	54
4.2 Análises preliminares <i>in vitro</i> .....	60
4.3 Produção de Queijos.....	62
4.3.1 Contaminação por Estafilococos coagulase positiva em queijo minas frescal.....	64
4.3.2 Contaminação por Coliformes termotolerantes em queijo minas frescal.....	71
4.3.3 Presença de <i>Salmonella</i> em queijo minas frescal.....	73
4.3.4 Presença de <i>Listeria</i> em queijo minas frescal.....	73
5 CONCLUSÃO.....	76
REFERÊNCIAS.....	79

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, os casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) vêm aumentando significativamente. O Ministério da Saúde (MS) atribui esses dados a alguns fatores como o crescente aumento da população, o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala, o deficiente controle de órgãos públicos e privados quanto à qualidade dos alimentos que são ofertados à população, entre outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Essas doenças são infecções ou intoxicações causadas por bactérias ou seus metabólitos, parasitas, vírus ou toxinas (COSTA, 2016). A grande maioria dos agentes etiológicos causadores dessas doenças não são identificados, contudo, dentre os casos que ocorreram no Brasil no período de 2000 a 2015 os micro-organismos *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram os mais comumente encontrados, com uma parcela de 28,3% dos casos apontados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016a).

A população vem procurando consumir mais alimentos naturais, minimamente processados e sem aditivos químicos, esse fato se dá pelo estilo de vida das pessoas que está mudando, ao maior esclarecimento do consumidor sobre os conservantes químicos e a busca por uma alimentação saudável. São de conhecimento público as alergias, as intoxicações e os estudos sobre os efeitos dos conservantes químicos, principalmente os carcinogênicos, além dos casos de DTA. Assim, observa-se a necessidade de tecnologias alternativas na conservação de alimentos, principalmente no combate de micro-organismos patogênicos, que apresentem a mesma eficácia dos métodos convencionais, porém com a utilização de substâncias naturais que não alterem as características do alimento. Nesse contexto, a utilização de bacteriocinas é interessante por possuir um apelo natural e por sua já comprovada atividade antimicrobiana contra uma vasta gama de micro-organismos (SOUZA, 2010).

As bacteriocinas compreendem um diverso e amplo grupo de peptídeos sintetizados ribossomicamente por bactérias, como as bactérias ácido lácticas (BAL), assim, essas tem recebido uma atenção especial por se tratar de um composto naturalmente encontrado em alguns alimentos (FILHO, 2010).

As BAL são consumidas pela população há muitos anos em produtos fermentados, nos quais são adicionadas para a melhora das características sensoriais e para aumento da segurança do produto (SCHNEIDER, 2016).

Na fabricação de queijos maturados, a adição de culturas fermentadoras é uma etapa essencial, pois desenvolve sabores e aromas durante a fase de fermentação e maturação que são desejáveis no produto final. Além dessas, as culturas antagonistas ou culturas protetoras são adicionadas com intuito de inibir o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis, aumentando assim a vida de prateleira do produto, porém sem alterar suas características sensoriais (VIEIRA, 2011).

O queijo é um meio de conservação do leite, pois são gastos em média 10 L para produzir 1 kg de queijo, que ainda é uma forma fácil de consumo das propriedades nutritivas do leite. Por suas vantagens nutritivas e de alta digestibilidade, o queijo possui grande importância nos hábitos alimentares da população brasileira (MARTINS; MOURA, 2010), porém os queijos tipo Minas Frescal, por exemplo, são produtos altamente perecíveis, mesmo em condições de refrigeração porque apresentam uma altíssima umidade (MAPA, 2004) e características nutricionais favoráveis ao crescimento microbiano. É um alimento produzido muitas vezes de forma artesanal e vários micro-organismos como *Salmonella*, *Listeriamonocytogenes*, *Escherichia coli* enteropatogênica e *Staphylococcus aureus* são comumente encontrados no produto e podem estar associados a negligências de práticas de higiene. O *S. aureus* é o patógeno mais preocupante, já que tem uma maior incidência em queijos. Apesar do micro-organismo não ser termoestável, suas enterotoxinas A, B, C, D, E são, de modo que não são destruídas durante o processo de pasteurização ao qual o leite é submetido antes da produção do queijo. Essas toxinas podem causar ação emética e diarreica em humanos (MARTINS, 2012).

Para o controle desses patógenos uma das alternativas seria a utilização de culturas *starters* que alterariam as características intrínsecas do produto impedindo o seu desenvolvimento. O Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade de Queijos Minas Frescal (MERCOSUL, 1996a) indica a utilização da bacteriocina nisina como agente conservante, mas em baixas concentrações do composto o patógeno pode se tornar resistente (MARTINS, 2012). Assim, justifica-se o estudo na busca por outras bacteriocinas que inibam o crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* e que permaneçam inertes a alterações do alimento como alterações de pH, variações de temperatura e concentrações de sais, esta pesquisa se mostra uma promissora estratégia no controle de micro-organismos e na garantia da qualidade de alimentos.

As bacteriocinas produzidas por BAL são uma alternativa em pesquisas com o uso de conservantes naturais, pelo seu já comprovado potencial antimicrobiano. Nessa perspectiva, objetiva-se analisar uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus sakei*, isolada de salame

italiano (pelo grupo de pesquisa) quanto à estabilidade em relação ao pH e à temperatura, bem como sua aplicabilidade em um produto alimentício. Como objetivos específicos para este trabalho o foco será em:

- Determinar a estabilidade térmica e de pH, empregando temperaturas e pHs utilizados industrialmente nos processamentos de alimentos, através de um DCCR 2<sup>2</sup>;
- Adicionar a bacteriocina obtida como conservante durante a elaboração de queijo Minas Frescal;
- Realizar o controle da carga microbiana inicial e a estabilidade microbiana dos queijos produzidos com o uso da bacteriocina estudada neste trabalho, tendo como controles um queijo sem adição de bacteriocina e outro com adição de bacteriocina comercial (nisina).

## 2REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Doenças transmitidas por alimentos (DTA)

As DTA são um problema de saúde pública, pois são transmitidas através de alimentos e/ou água e podem ser causadas por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, príons, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados. O quadro clínico varia muito em relação ao agente etiológico envolvido, alguns podem causar um desconforto abdominal ou, em quadros mais graves, levar a uma desidratação grave, diarreia sanguinolenta e insuficiência renal aguda (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016b).

Segundo a *Centers for disease control and prevention* (CDC), são conhecidas e já foram descritas mais de 250 DTA, na sua maioria doenças infecciosas causadas por variedades de bactérias, vírus e parasitas. Os sintomas clínicos mais comuns são náuseas, vômitos e diarreias que costumam aparecer após de 2-3 dias do consumo do alimento contaminado, na maioria dos indivíduos (CDC, 2016).

O Ministério da Saúde destaca alguns fatores que contribuem para o crescente número de emergências com DTA no mundo, tais como o crescente aumento da população, a existência de grupos mais vulneráveis, o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala, o deficiente controle de órgãos públicos e privados quanto à qualidade dos alimentos que são ofertados à população. Outro fator como um crescente aumento no consumo de alimentos à pronta entrega (*fast foods*), o consumo de alimentos em vias públicas, o aumento do uso de aditivos e a mudança de hábitos alimentares, sem deixar de considerar as mudanças ambientais, a globalização e a facilidade em deslocamento da população, podem acarretar um número significativo de possibilidades para ocorrências de DTA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Um estudo do Ministério da Saúde (2016b) sobre surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil no período de 2007 a 2016 ilustra que, em de 66,9% dos casos de DTA, o alimento responsável pela intoxicação não é identificado. Entretanto, o Ministério aponta que alimentos mistos são responsáveis por 8,9% dos casos, seguido de água, ovos e produtos à base de ovos, leite e seus derivados, (com porcentagem de 2,7%). O mesmo estudo mostra, ainda, que as regiões sudeste e sul são as mais afetadas com esses episódios de surtos alimentares, 43,6 e 24,6% respectivamente, dos casos em todo Brasil.

Dentre os dados analisados pelo Ministério da Saúde nesse período, cerca de 90% dos casos de surtos alimentares são causados por bactérias, entre as quais *Escherichia coli* e *Salmonella*, com aproximadamente 7,3%, seguidas de *S. aureus* (5,7%). Contudo, em de 70,5% dos casos o micro-organismo causador da doença não é identificado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016b).

A produção de alimentos seguros que atendam às exigências legais e às expectativas dos consumidores vem se tornando um desafio para os produtores. As indústrias visam a produção de alimentos inócuos e que apresentem uma elevada vida de prateleira, é de seu interesse a satisfação do cliente, visto que prezam pela saúde e que são conscientes dos possíveis efeitos dos aditivos sintéticos que estão sendo utilizados para conservação de alimentos. Assim, a demanda por produtos de qualidade, livres de conservantes químicos e com uma elevada vida de prateleira, tem se tornado uma busca cada vez mais pertinente (MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011).

## **2.2 Contaminações microbianas em produtos lácteos**

O leite e seus derivados merecem uma atenção especial dos órgãos de fiscalização sanitária, porque são altamente perecíveis e largamente consumidos pela população, principalmente por crianças. A contaminação desses produtos pode ser proveniente do leite *in natura* contaminado por bactérias ou ainda por contaminações referentes ao transporte até a usina beneficiadora, nos entrepostos, após a pasteurização ou durante a manipulação pelo próprio consumidor. No caso de a contaminação estar presente nos derivados de leite, ainda pode ser proveniente da manipulação durante o processamento (BALBANI; BUTUGAN, 2001).

A utilização de leite cru e sem a adição de fermento lácteo para a produção de queijo artesanal fornece ao produto uma diversidade microbiana indesejada proveniente da flora microbiana original da matéria-prima e mesmo das condições higiênico-sanitárias a que esteve submetido. Assim, caracteriza-se um perigo aos consumidores, pois além de micro-organismos deteriorantes podem ainda estar presentes micro-organismos patogênicos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus coagulase positiva* e *Salmonella* spp. (MENEZES et. al., 2009; ZAFFARI et al., 2007).

Estudos apresentam as graves causas de intoxicação por esses micro-organismos como o caso ocorrido na Finlândia entre os anos de 1998 e 1999 no qual um surto de *L. monocytogenes* encontrada em manteiga, causou a morte de 4 pessoas das 80 identificadas com doença causada pela bactéria. Assim como o caso nos Estados Unidos, em 2007, em que a bactéria foi isolada em leite pasteurizado levando à morte três em cada cinco pessoas infectadas (BRUNO et al., 2009; SILVA et al., 1998).

A presença de micro-organismos patogênicos como *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus* coagulase positiva em alimentos indica deficiências de higiene no procedimento e nas etapas de pós-produção. Nessas condições, alguns produtos como manteiga e queijos são caracterizados como impróprios ao consumo humano, com base nos padrões microbiológicos vigentes na Legislação Brasileira (BRASIL, 2001; FONSECA et al., 2016). Todavia, por dificuldade ou falta de fiscalizações sanitárias os produtos continuam sendo comercializados podendo se tornar um problema de saúde pública (APOLINÁRIO; SANTOS; LAVORATO, 2014).

As bactérias do grupo coliformes, sendo totais a 35°C ou termotolerantes a 45°C (*Escherichia coli*), *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus* coagulase positiva são os principais responsáveis por contaminações presentes em queijos frescos (FRANCO; LANDGRAF, 2008, APOLINARIO et al., 2014).

### **2.2.1 Escherichia coli**

Essa bactéria caracteriza-se por ser um bastonete Gram-negativo, aeróbio ou anaeróbio facultativo, não formadora de esporo, desenvolve-se em temperaturas de 7°C a 45°C. Conforme Jay (2005), pode ser dividida em cinco grupos com base nas características das doenças causadas, apresentando-se como *E. coli* enteroagregativas, *E. coli* enteropatogênicas, *E. coli* enterotoxigênicas, *E. coli* enteroinvasivas e *E. coli* enterohemorrágicas. O biosorogrupo patogênico de *E. coli* é importante indicador de contaminação fecal recente, pois não é considerado como integrante da microbiota natural, mostrando assim a presença de patógenos intestinais nos alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2008; GAVA et al., 2008; JAY, 2005).

As doenças causadas geralmente são limitadas à superfície da mucosa podendo se disseminar pelo organismo (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Entre os principais sintomas causados pelo consumo de alimentos contaminados destacam-se diarreias,

vômitos, febre e eliminação de sangue nas fezes, o último sintoma tem gerado grande preocupação por ser ocasionado, grande parte das vezes, por cepas de *E. coli* O157:H7, a qual pertence ao grupo das *E. coli* enterohemorrágica, seus sintomas podem levar à morte principalmente de crianças (FRANCO; LANDGRAF, 2008; RIBEIRO et al., 2006).

### **2.2.2 Staphylococcus aureus**

Apresentam-se na forma de cocos Gram-positivos, podendo ocorrer sozinhos ou agrupados em pares ou cadeias irregulares, aeróbios facultativos, coagulase positiva, catalase positiva, oxidase negativa, redutores de nitratos, não formadores de esporos, com temperatura ótima de crescimento na faixa entre 30 a 37°C, porém desenvolvem-se em temperaturas de 10 a 48°C e são capazes de se multiplicar em concentrações de 7,5% a 20% de cloreto de sódio (GAVA et al., 2008).

Trata-se de uma das espécies de maior interesse na microbiologia de alimentos por provocar intoxicações de origem alimentar bastante frequentes, algumas cepas têm a capacidade de produzir enterotoxinas termoestáveis em condições de temperatura de 10 a 48°C, pH de 4,5 a 9,6, e desenvolvem-se ainda em valores de atividade de água de 0,83 e 0,99. Esse micro-organismo é comum nas mucosas nasal e oral do homem e de certos animais, chegando ao alimento principalmente devido às falhas na higiene pessoal e durante a manipulação do alimento (APOLINARIO; SANTOS; LAVORATO, 2014; GAVA et al., 2008; NETO, 2002).

As intoxicações alimentares causadas por estafilococos são uma das principais DTA no mundo e são causadas pela ingestão de enterotoxinas pré-formadas nos alimentos (FERREIRA, 2015). As enterotoxinas estafilocócica são altamente estáveis ao calor assim como são resistentes à ação de proteases gastrointestinais como a pepsina e a tripsina, o que garante sua integridade durante a passagem pelo sistema gastrointestinal. Essa resistência à temperatura faz com que essas enterotoxinas não sejam destruídas com o processo de cocção padrão, contudo o processo de pasteurização destrói as células biologicamente ativas de *S. aureus*, o que não acontece no caso das enterotoxinas já formadas (FRANCO; LANDGRAF, 2008; ASAO et al., 2003).

Os principais sintomas da intoxicação são náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia, dores de cabeça e queda de pressão e, em casos mais graves, a hipotermia e a síndrome do choque tóxico. Esses sintomas surgem cerca de seis horas

após o consumo do alimento contaminado e podem durar de 24 a 48 horas (CHAPAVAL et al., 2008; JAY, 2005).

### **2.2.3 *Salmonella spp***

São bastonetes Gram-negativos, exibem motilidade, não esporulados, não encapsulados, não fermentam a lactose, crescem em temperatura ótima de 37°C e pH em torno de 7, são aeróbias facultativas e produzem gás durante a fermentação da glicose (FRANCO; LANDGRAF, 2008; APOLINARIO et al., 2014). Esse micro-organismo é um dos principais causadores de enfermidades causadas por alimentos que são contaminados durante o processamento da matéria prima ou por más condições higiênico-sanitárias do ambiente ou ainda por contaminações cruzadas através de equipamentos ou manipuladores (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005).

Dentre as subclasses da *Salmonella* encontra-se a subclasse entérica, na qual está a *Salmonella typhi*, que causa a febre tifoide, caracterizada por febre contínua e grave hemorragia intestinal, que se não for tratada pode ser fatal. De modo geral, outros sorotipos de *Salmonella* causam em adultos apenas uma enterocolite, mas em crianças apresenta efeitos mais graves (NOGUEIRA, 2009).

A legislação brasileira estabelece a necessidade de ausência de *Salmonella* nos alimentos (BRASIL,2001). Os estudos de Feitosa (2009) mostraram a presença de *Salmonella* em 9% das amostras de queijo coalho e 15% nas amostras de queijo manteiga analisadas, assim a presença dessa bactéria nos produtos os classifica como impróprios ao consumo. Igualmente, como os estudos de Borges (1990) indicaram que a bactéria se manteve estável em queijos contaminados por longos períodos, o que ressalta a importância do controle microbiológico desses produtos.

### **2.2.4 *Listeria monocytogenes***

Estas bactérias são bacilos ou coco bacilos, Gram-positivos que podem apresentar diâmetro de 0,5 a 2 µm, não formadores de esporos, catalase positiva, oxidase negativa, crescem em condições de aerobiose, anaerobiose e em condições de até 10% de CO<sub>2</sub>, multiplicam-se em amplas faixas de temperatura, crescendo em condições de refrigeração, em temperaturas entre 1 e 45°C, porém com temperatura ótima de crescimento de 30 a 37°C. Não apresentam alta resistência a tratamentos térmicos, sendo facilmente eliminadas durante a pasteurização do leite, porém fatores

como pH e concentrações elevadas de NaCl não impedem o seu desenvolvimento (BARRANCELLI, 2011; GAVA et. al., 2008).

A ingestão desse micro-organismo pode levar a casos de infecções alimentares, denominadas listeriose, caracterizadas principalmente por septicemia, meningite e meningoencefalite, nos casos mais graves com índice considerável de mortes em casos não tratados. Em casos de mulheres grávidas a listeriose pode afetar a placenta e o feto, levando ao aborto. Assim, esse micro-organismo desperta uma atenção especial das autoridades responsáveis do controle sanitário e dos pesquisadores, visando novos conhecimentos que contribuam para o controle e possível redução dos casos de surtos (KABUKI, 2004).

Esse micro-organismo já foi encontrado em leite cru, queijo mole, carnes frescas ou congeladas, frango, frutos do mar e produtos vegetais (JAY, 2005). Vários casos de listeriose no mundo já foram relatados, dentre os quais um surto em Massachusetts envolvendo cinco pessoas, que causou a morte de três idosos, associado ao consumo de leite pasteurizado (CDC, 2008). Na Suécia, em 2001, 48 pessoas apresentaram gastroenterite após o consumo de queijo fresco preparado com leite cru, foi constatada a causa por contaminação por *L. monocytogenes* (CARRIQUEMAS et al., 2003).

### **2.3 Conservantes de alimentos**

Os alimentos podem ser contaminados por uma enorme variedade de micro-organismos que podem ser provenientes do solo, água, utensílios, do trato gastrointestinal de homens e animais, dentre outros meios de contaminação. Destacam-se os micro-organismos deteriorantes que podem causar alterações químicas, pois durante sua atividade metabólica utilizam os compostos dos alimentos como fonte de energia comprometendo a qualidade sensorial (aparência, odor, sabor, textura) do produto; e os micro-organismos patogênicos que contaminam o alimento por vias externas, causando no indivíduo que consumir o alimento contaminado infecções ou intoxicações (OS CONSERVANTES..., [2016]).

Grande parte dos alimentos são naturalmente perecíveis e necessitam de algum agente que durante o processamento, o armazenamento e a distribuição o protejam da deterioração microbiana (MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011). Nesse sentido, o uso de conservantes tem sido uma alternativa para prolongar a vida de prateleira de muitos produtos, como por exemplo os sais de cura (como os nitritos e nitratos de

sódio e de potássio) que são largamente utilizados no processamento de produtos cárneos, pois além de conservantes contra bactérias, auxiliam na fixação de cor e na cura do produto (OLIVEIRA; ARAÚJO; BORGIO, 2005), contudo esses compostos já foram identificados como possíveis carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos pela presença das nitrosaminas formadas durante o processamento dos alimentos (CÂMARA, 2006).

Por tais motivos e por diversos casos de alergias e intoxicações geradas por agentes químicos utilizados na conservação de alimentos, estes vem recebendo aversão por parte do mercado consumidor (MOREIRA et al., 2005). Assim, o *Codex Alimentarius* estabelece para a maioria dos aditivos alimentares uma dose de ingestão diária aceitável, com o objetivo de diminuir a utilização de aditivos a níveis essenciais para o efeito esperado (MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011).

Os conservantes químicos ou agentes químicos de conservação exercem a função de causar danos à microbiota contaminante presente com o intuito de inibir ou retardar alterações provocadas por elas, por enzimas e ainda por agentes físicos. Esses agentes químicos podem ser utilizados individualmente ou ainda associados a métodos físicos (GAVA et al., 2008). Para a escolha correta do agente antimicrobiano a ser utilizado é necessário se levar em conta o espectro antimicrobiano alvo, as características químicas e propriedades físicas do alimento, as condições de armazenamento e de controle da qualidade do alimento (AGENTES..., 2010).

Dentre os mais importantes conservantes químicos destacam-se os seguintes: ácido benzoico e parabenos, ácido sórbico e cítrico, os propionatos, dióxido de enxofre e sulfitos, nitratos e nitritos e outros (JAY, 2005). Segundo Cotter et al. (2005), o consumo excessivo de alimentos conservados quimicamente pode provocar perturbações no equilíbrio fisiológico do ser humano, por esse e por outros fatores como o estilo de vida, a população tem optado por consumir mais alimentos naturais, ou com o mínimo de processamento possível.

Alguns alimentos, mesmo em seu estado natural, apresentam atividade antimicrobiana pela presença de agentes conservadores. Alguns exemplos como é o caso do leite fresco, no qual são encontradas enzimas lactoperoxidases que após reagirem ao tiocianato na presença de peróxido de hidrogênio formam compostos antimicrobianos, assim como outros alimentos como peixes, ovos e leite (que contêm a lisozima, a qual causa a degradação da parede celular e lise celular microbiana em soluções hipotônicas) e outros alimentos que apresentam compostos antimicrobianos

naturais. Ainda podem ser considerados conservantes naturais as especiarias como cravo da Índia, canela, tomilho (JACXSENS et al., 2002). Alguns micro-organismos produzem substâncias inibidoras ou letais a outros organismos que podem também estar presentes naturalmente em alimentos, dentre as quais destacam-se as bacteriocinas, o peróxido de hidrogênio e os ácidos orgânicos (JAY, 2005).

Estudos apontam as bacteriocinas produzidas por BAL como um interessante composto a ser utilizado devido a seu potencial de bioconservação podendo atuar no aumento da vida de prateleira de produtos industrializados, suprimindo a adição de agentes químicos que podem ser prejudiciais à saúde (ONDA et al., 2003; NASCIMENTO et al., 2008; ALEGRIA, 2010; ROSA et al., 2002a).

A bioconservação refere-se à utilização de micro-organismo com ação antagônica ou de seus metabólitos para inibir ou destruir micro-organismos indesejáveis nos alimentos, aumentando assim a vida de prateleira e segurança dos produtos (CHEN; HOOVER, 2003).

#### **2.4 Bactérias ácido lácticas (BAL)**

As BAL são caracterizadas por serem bactérias Gram-positivas não formadoras de esporos, desprovidas de citocromo, catalase e oxidase negativa, anaeróbias tolerantes, fastidiosas, tolerantes aos ácidos e a concentrações relativamente altas de sal, com o metabolismo estritamente fermentativo com ácido láctico como principal produto final da fermentação do açúcar, não reduzem nitratos e nitritos e necessitam de meios complexos para o desenvolvimento, além de serem dependentes da fermentação de açúcares para obtenção de energia (AXELSSON, 1998; ALEXSSON, 2004).

Por ser amplamente distribuída na natureza, por exemplo, na água, nos solos, nas plantas e no trato gastrointestinal de humanos e animais, conseqüentemente é encontrada em produtos alimentícios de origem animal (como carnes, derivados lácteos e fermentados) em conservas de vegetais e bebidas fermentadas (BRUNO; CARVALHO, 2009; SCHLEIFER; LUDWIG, 1995).

Dentre as BAL mais importantes destacam-se os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* e *Bifidobacterium* (KLEIN et al., 1998).

Essas bactérias ácido lácticas podem ser agrupadas com base no produto final do metabolismo da glicose sendo divididas em homofermentativas e heterofermentativas. A primeira classificação refere-se àquelas que produzem ácido láctico como único produto da fermentação da glicose, produção que é feita através da via glicolítica ou *Embden-Meyerhof* formando ácido pirúvico como intermediário importante, que origina o ácido láctico pela ação da enzima lactato desidrogenase. Ou ainda essas bactérias podem ser classificadas como heterofermentativas, as quais produzem quantidades molares iguais de lactato, dióxido de carbono e etanol a partir de hexoses, a ação que causa a degradação da glucose através da via oxidase das pentoses fosfatadas, tendo como importantes compostos intermediários, o ácido pirúvico e o aldeído acético (CARR et al., 2012; JAY, 2005; GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

As BAL podem ainda ser divididas pela temperatura ótima de crescimento em mesófilas e termófilas, com temperatura ótima, respectivamente, em 30°C e 42°C (FOX et al., 2000).

A partir de suas características fermentativas podem ser utilizadas na fabricação de alimentos com dois objetivos, como culturas *starter* ou fermentadoras. São empregadas na produção de alimentos fermentados como queijos, leites fermentados, iogurte, vinhos, pães e conservas vegetais, em que a utilização de BAL heterofermentativas nestes produtos tem, acima de tudo, o viés da produção de compostos flavorizantes formados durante o processo de conversão de hexose em pentose, produzindo substâncias aromáticas como os aldeído e diacetil, além do desenvolvimento de características como textura e *flavour* (CARR et al., 2012; CHARLIER et al., 2009; JAY et al., 2005).

Pode ser utilizada ainda com o objetivo de melhorar a segurança microbiológica e, em consequência, estender a vida de prateleira do produto. Isso porque além de ocasionar o decréscimo do pH utilizando as fontes fermentescíveis promove um ambiente inóspito ao desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes e/ou patogênicos. Ainda podem produzir compostos antimicrobianos, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, ácidos graxos de cadeia curta, reuterina, diacetil e algumas cepas são capazes de sintetizar compostos antimicrobianos de natureza proteica, denominados bacteriocinas (GÁLVEZ et al., 2007; HOLZAPFEL; GEINSEN; SCHILLINGER, 1995; SHAH; DAVE, 2000).

Segundo a *Food and Drug Administrative* (FDA), os antimicrobianos naturais utilizados como conservantes de alimentos devem ser produzidos por micro-organismos GRAS (*Generally recognized as safe*) e como muitas espécies de BAL apresentam esse status, elas têm sido extensamente estudadas para a produção de bacteriocinas (ROSA; FRANCO, 2002b).

#### **2.4.1 *Lactobacillus sakei***

Desde 2013, o grupo de estudos do Laboratório de Microbiologia e Toxicologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa vem trabalhando com isolamento de bactérias ácido lácticas de produtos alimentícios. Dentre os isolados, observou-se que a maior produção de bacteriocina com potencial de inibição contra *S. aureus* e, principalmente, contra *E. coli* foi a isolada de salame italiano comercial. Tal micro-organismo foi posteriormente enviado para análise de identificação na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas e identificada pela como uma cepa de *Lactobacillus sakei*.

O gênero *Lactobacillus* caracteriza-se por ser Gram-positivo, com forma de bacilos, não formadores de esporos. São estritamente fermentativos, aerotolerantes ou anaeróbios, acidúricos ou acidófilos e necessitam de meios complexos para seu desenvolvimento. Dentre as bactérias presentes nesse gênero destacamos o *Lactobacillus sakei* (BARBOSA, 2009). Rosa et al. (2002a) verificaram que uma das bacteriocinas produzidas por “*L. sakei* 2a”, isolada e denominada como Sakacina 2a, é um peptídeo pertencente à classe IIa (classe de não-Lantibióticos), apresentando resistência à temperatura nas condições de 60 min a 60°C, 20 min a 100°C e 15 min a 121°C. O modo de ação dessa bacteriocina é o mesmo das demais bacteriocinas do grupo IIa, formando poros na membrana citoplasmática de células sensíveis. Portanto esse motivo e por outras características apresentadas, essa bacteriocina apresenta um bom potencial como bioconservante, podendo ser utilizada no controle de *Listeria monocytogenes* em alimentos.

Mortvedt et al. (1995) observaram que a produção de lactocina S por uma cepa de *Lactobacillus sakei* e a sua atividade no meio de cultura é dependente da fase de crescimento da bactéria, do pH, da aeração do meio de cultura e da presença de etanol. Os autores observaram ainda que a sua maior atividade se dá no início da fase estacionária do crescimento da cultura em temperatura de 30°C. Quando cultivado em

fermentador com controle de pH em 5,0, observou-se a produção de 2000 a 3000 unidades de bacteriocinas por mL, o que representa um aumento de oito a dez vezes em relação à cultura fermentada sem controle de pH.

Rosa et al. (2002a) encontraram a Sakacina 2a como produto do metabolismo de uma cepa de *L. sakei*, assim como Mortvedt et al. (1995) que encontrou Lactocina S com ação contra *Listeria monocytogenes* e Roman et al. (1993) que descrevem como bacteriocinas produzidas por cepas de *L. sakei* Sakacina P, Sakacina A, Sakacina M e Lactocina S, todas com potencial de ação inibitória contra *Listeria monocytogenes* e outros micro-organismos.

## 2.5 Bacteriocinas

As bacteriocinas por serem sintetizadas por bactérias presentes naturalmente em alimentos, principalmente lácticas, apresentam um grande potencial de alternativa tecnológica na substituição de aditivos sintéticos na conservação dos alimentos, permitindo a oferta de alimentos seguros e de grande aceitabilidade pelos consumidores (LEROY; DEVUST, 2004).

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados nos ribossomos da célula de várias bactérias e secretadas por diversas vias. Geralmente são resistentes ao calor, de modo que muitas espécies desses peptídeos se tornam uma das primeiras linhas de defesa e parte da imunidade das células (CLEVELAND et al., 2001; KLAENHAMMER, 1993). Esses peptídeos antimicrobianos podem apresentar um espectro de ação pequeno, inibindo bactérias taxonomicamente semelhantes ao seu micro-organismo produtor. Esse fenômeno ocorre pelo fato das bacteriocinas agirem contra organismos que competem no mesmo nicho ecológico de sua bactéria produtora (COTTER et al., 2005; MAROTI et al., 2011). O espectro de inibição das bacteriocinas ainda pode ser bem elevado, inibindo uma grande variedade de bactérias como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e outros micro-organismos patogênicos (COTTER et al., 2005; MILLS et al., 2011).

Esses metabólitos não apresentam toxicidade a células eucarióticas e além de possuir diferentes espectros de ação, diferem dos antibióticos por serem agentes proteicos de rápida digestão pelas proteases do trato digestivo de humanos (ROSSI et al., 2008). O mecanismo de ação das bacteriocinas é por muitos autores discutido.

Contudo dentre as teorias propostas, o principal é a formação de poros transitórios ou canais iônicos na membrana citoplasmática das células de micro-organismos susceptíveis que causam a dispersão total ou parcial da força motriz de prótons, geralmente esse mecanismo não afeta as bactérias Gram-negativas devido à presença de uma membrana externa mais densa composta de lipopolissacarídeos, o que a torna impermeável a grande parte das moléculas (ARQUÉS et al., 2011).

As bacteriocinas são geralmente inativadas por enzimas proteolíticas externas ou ainda as enzimas presentes no trato gastrointestinal humano (de origem pancreática), por exemplo a tripsina e a  $\alpha$ -quimiotripsina, essa característica as torna bastante interessantes quanto ao seu uso como bioconservantes em alimentos visto que não alteram a ecologia do sistema gástrico (HERMANNNS, 2013).

Dentre as bacteriocinas já estudadas a mais conhecida é a nisina, produzida por 35 linhagens de *Lactococcus lactis subsp. lactis*, a capacidade de produzi-la está geneticamente relacionada com o poder de fermentação da sacarose (NISINA..., [2016]) sendo considerada uma substância segura e não tóxica, com uma DL<sub>50</sub> de 6,950 g/kg similar ao de cloreto de sódio quando administrada oralmente (JOZALA et al., 2007). Sua condição como GRAS foi atribuída em 1988 pelo FDA e desde então tem sido aplicada largamente na indústria de alimentos em vários países como conservante natural de produtos lácteos (MELO et al., 2005; NASCIMENTO, 2007).

Essas bacteriocinas podem ser adicionadas ao alimento de três maneiras principais: através de adição de culturas lácteas bacteriocinogênicas utilizadas como culturas *starters* em alimentos fermentados em substituição das culturas tradicionais utilizadas; adjunta às culturas *starters* tradicionais; ou ainda por aplicação direta como bacteriocina purificada (NASCIMENTO, 2007; NASCIMENTO et al., 2008).

Várias classificações para as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas já foram propostas, leva-se em consideração neste estudo aquela proposta por Nes et al. (2007) que descreveram quatro classes baseadas nos critérios de organismo produtor, tamanho molecular, propriedades físicas, estrutura química, modo de ação, etc. Assim, são denominadas conforme a Tabela 1, que apresenta uma síntese da classificação das bacteriocinas.

Tabela 1 – Classificação das bacteriocinas.

<b>Classes/Subclasses</b>	<b>Características</b>	<b>Exemplos</b>
<b>I: Lantibióticos (&lt;5kDa)</b>	Ia	Moléculas afastadas e positivamente carregadas Nisina Subtilina
	Ib	Corresponde às bacteriocinas de cadeias globulares, com estrutura mais rígida carregadas negativamente ou sem cargas Mersacidina Lacticina 3147
	Ic	Com baixa atividade inibitória SapB
<b>II: Peptídeos termoestáveis, não-lantibióticos (&lt;10kDa)</b>	IIa	Grupo tipo pediocina Pediocina PA-1 Sakacina A e P
	IIb	Bacteriocinas com dois componentes Lactococina G e F
	IIc	Bacteriocinas sem peptídeo sinal Enterocina EJ97
	IId	Outras bacteriocinas Enterocina B
<b>III: Peptídeos de cadeia longa, termolábeis (&gt;30kDa)</b>	IIIa	Bacteriolíticas Enterolisina A
	IIIb	Não bacteriolíticas Enterocina Bc-48
<b>IV: Bacteriocinas complexas</b>	Estrutura cíclica Enterocina AS-48 Gassericina A	

Fonte: Adaptado de López et al., (2011).

### **2.5.1 Classe I: Lantibióticos**

É composta de bacteriocinas designadas como lantibióticos, os quais são peptídeos pequenos de 19-38 aminoácidos estáveis ao calor e com peso molecular inferior a 5 kDa. As bacteriocinas que compõem essa classe são produzidas por uma gama de bactérias Gram-positivas, que após sintetizadas pelos ribossomos sofrem uma grande modificação. Apresentam aminoácidos como a tionina e a metalantionina, que são produzidos após a desidratação enzimática de serina e treonina e reação desses desidratados com as cisteínas (HASSAN et al., 2012; LÓPEZ et al., 2011).

A classe I ainda se divide conforme a sua estrutura química e atividade antimicrobiana, em Ia Ib e Ic, a primeira caracteriza-se por moléculas afastadas com carga positiva que despolariza a membrana das células alvo causando a formação de poros na membrana citoplasmática, dentre as bacteriocinas desse grupo o principal exemplo é a nisina (LÓPEZ et al., 2011). O tipo Ib corresponde às bacteriocinas de cadeias globulares, com estrutura mais rígida e carregadas negativamente ou sem cargas, apresentam como ação antagonica através de alterações nas reações enzimáticas e são essenciais ao metabolismo celular. A última subclasse das bacteriocinas lantibióticas é a Ic, é composta de peptídeos com baixa atividade

inibitória contra outros micro-organismos (LÓPEZ et al., 2011; NES et al., 2007; PARADA et al., 2007).

### **2.5.2 Classe II: Não-Lantibióticos**

São caracterizados por serem pequenos peptídeos catiônicos, com peso molecular menor que 10kDa, não apresentam aminoácidos modificados, de caráter hidrofóbico e termoestáveis. Podem apresentar de 25-60 aminoácidos, trata-se da maior classe, dividida em 4 subclasses (LÓPEZ et al., 2011).

Subclasse IIa: as bacteriocinas pertencentes a essa subclasse têm geralmente um espectro limitado de ação microbiana, contudo apresentam uma elevada atividade contra *Listeria monocytogenes*, são consideradas como bacteriocinas do tipo pediocina, pois a Pediocina PA-1 é a principal representante do grupo, seguida por sakacinas A e P, leucocina A, bavaricina MN, curvacina A, entre outras (LÓPEZ et al., 2011; MARTIN, 2012).

Subclasse IIb: representada por bacteriocinas que necessitam dois peptídeos diferentes para apresentar ação inibitória, pois quando analisados separadamente apresentam pouca ou nenhuma atividade inibitória, assim a ação é dependente da ação complementar dos dois compostos (HASSAN et al., 2012, LÓPEZ et al., 2011; MARTIN, 2012). Neste grupo estão a lactococina G e as plantaricinas EF e JK e sua ação se dá por meio da formação de poros na membrana das células alvo (MARTIN, 2012; PARADA et al., 2007).

Subclasse IIc: é composta por um grupo que não apresenta peptídeo sinal (sequência *leader*), não apresenta modificações pós-transcricionais (KAWAI et al., 2004; LÓPEZ et al., 2011). Conforme Martins et al. (2012), a subclasse IIc é composta por peptídeos ativados por tiol que necessitam de resíduos de cisteína reduzida para tornar-se ativos.

Subclasse IId: inclui todas as demais bacteriocinas lineares que não são modificadas (HASSAN et al., 2012; LÓPEZ et al., 2011).

### **2.5.3 Classe III: Proteínas altamente termolábeis**

Essa classe têm a presença de peptídeos maiores, com peso molecular acima de 30kDa e com características termolábeis, são exemplos helveticina J, helveticina V-1829, acidofilina e lactacinas A e B (MARTINS et al., 2012). Subdividida em III é composta por enzimas bacteriolíticas, denominadas como bacteriolisinas, com efeito

lítico, que causam a morte de estirpes sensíveis pela lise celular. Ao contrário das classificadas no grupo IIIb que não apresentam ação lítica (LÓPEZ et al., 2011; NES et al., 2007).

#### **2.5.4 Classe IV: Bacteriocinas complexas**

Ligações peptídicas entre as duas extremidades da molécula (N e C) formam peptídeos circulares que constituem essa classe, são capazes de formar grandes complexos com outras macromoléculas. Diferentemente da grande maioria apresentada, algumas bacteriocinas que compõem o grupo apresentam ação contra uma vasta gama de bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas (NES et al., 2007).

A biossíntese das bacteriocinas ocorre durante a fase exponencial de crescimento microbiano atingindo um máximo da sua produção durante o meio ou fim dessa fase ou ainda durante o início da fase estacionária. A máxima produção da substância ainda é favorecida pelo cultivo sob condições de crescimento menos favoráveis, pois como o composto é uma das primeiras linhas de defesa da bactéria produtora, ela a produz como mecanismo de defesa quando submetida a estresses em condições como temperatura subótima, pH ácido, presença de compostos potencialmente tóxicos e microbiota competitiva, entre outros fatores (VUYST et al., 1996; ZAMFIR et al., 2000).

## **2.6 Estabilidade das bacteriocinas**

A atividade das bacteriocinas é influenciada pela composição química e condições físicas dos alimentos, não sendo uniforme e constante a sua atividade. A ligação de bacteriocinas com componentes dos alimentos, a sua absorção a células ou proteínas, a atividade de proteases e ou outras enzimas podem vir a reduzir atividade da bacteriocina (BALCIUNAS et al., 2013). Esses peptídeos ainda podem ser afetados por condições de processamento, armazenamento do produto, como o pH e temperatura (DEEGAN et al., 2006; GRANDE et al., 2006).

Conforme estudos de Balciunas et al., (2013), os níveis de contaminação dos alimentos também influenciam significativamente na eficiência inibitória das bacteriocinas, caso a contaminação inicial seja muito alta, a atividade inibitória da

bacteriocina não é capaz de prevenir o desenvolvimento de micro-organismos contaminantes.

Daeschel (1992) cita como fatores que podem afetar a eficácia das bacteriocinas na sua aplicação em alimentos os seguintes parâmetros:

- Micro-organismos patogênicos ou deteriorantes resistentes às bacteriocinas;
- Condições que podem desestabilizar a atividade biológica das proteínas:
  - Enzimas proteolíticas não específicas;
  - Oxidação;
  - Metais pesados;
  - Excessiva agitação, formação de espuma;
  - Descongelamento;
- Interação com componentes do alimento;
- Inativação por outros aditivos alimentares;
- Efeitos do pH:
  - Solubilidade;
  - Atividade ótima em determinadas faixas de pH;
- Temperatura.

Delgado et al. (2007), afirmam que a partir da constatação da complexidade dos alimentos um melhor conhecimento das interações desses fatores com a produção de bacteriocinas ainda é necessário.

Deegan et al. (2006) avaliaram que deve ser considerado como critério significativo na eficiência das bacteriocinas, à sua resistência a tratamentos térmicos, o qual é usualmente utilizado no processamento de alimentos que pode causar a perda da atividade de peptídeo bioativo. Assim como características químicas como pH e teor de gorduras também podem influenciar significativamente na escolha da bacteriocina a ser utilizada.

Nos estudos de Moreno et al. (2008) é relatado que as bacteriocinas são relativamente estáveis ao aquecimento de alimentos ácidos, indicando que são bem adaptadas ao meio de desenvolvimento das bactérias produtoras, contudo, os autores verificaram uma perda de aproximadamente 25-30% de atividade de nisina quando analisada em alimentos de baixa acidez (pH 6,1 a 6,9) ou alta acidez (pH 3,3 a 4,5) após tratamento térmico de 121°C por 30 minutos.

Hurst (1981) observou em seu estudo que a solubilidade da nisina é extremamente dependente do pH, pois em pH 2,5 sua solubilidade é de 12%, apesar disso quando é feito um aumento no potencial hidrogeniônico para pH 5,0 sua solubilidade sofre um decréscimo para 4%, e é praticamente insolúvel a pH neutro ou alcalino. Quanto à estabilidade ao calor, suporta processo de esterilização (121°C/15min) em pH 2,5 sem sofrer perdas na sua atividade, porém quando o seu pH é elevado para 5,0 ocorre uma perda de 40% da sua atividade, queda ainda maior quando o processo é feito em pH 6,8 apresentando uma queda de até 90% da atividade da bacteriocina (DAESCHEL, 1992). Conforme Liu e Hansen (1990), a inativação da molécula de nisina em meio alcalino pode ocorrer por consequência de desnaturação, modificação química ou ambas.

## **2.7 Utilização de bacteriocinas em produtos lácteos**

Nos últimos anos, as pessoas estão se preocupando mais com os riscos que constituem a presença de aditivos químicos e de micro-organismos patogênicos nos alimentos, o que estimula o interesse por conservantes naturais (BALCIUNAS et al, 2013).

Através da capacidade das bacteriocinas em inibir o desenvolvimento de micro-organismos, permite assim a sua aplicação a diversos alimentos, já sendo descritas diferentes aplicações em leite e seus derivados, vegetais e frutas enlatadas, carnes, pescados e bebidas alcoólicas. Estes compostos bioativos podem ser produzidos durante a fermentação por bactérias utilizadas como culturas *starter* (ECKNER,1992).

No Brasil, a legislação vigente autoriza a utilização de nisina como conservante natural em queijos e requeijão na concentração de 12,5 mg/kg de produto (BRASIL, 1996; MAPA, 1997; MERCOSUL, 1996a; MERCOSUL, 1996b). Na Tabela 2 é possível visualizar os valores máximos da utilização de nisina em diversos países.

Tabela 2 –Níveis de nisina permitidos para adição em alimentos

<b>Países</b>	<b>Alimentos em que é permitido o uso de nisina</b>	<b>Nível máximo (UI/g)</b>
<b>Argentina</b>	Queijo processado	500
<b>Austrália</b>	Queijo, queijo processado, tomates enlatados	Sem limite
<b>Bélgica</b>	Queijo	100
<b>Brasil</b>	Queijos, requeijão	500
<b>EUA</b>	Queijo processado e pasteurizado	10000
<b>França</b>	Queijo processado	Sem limite
<b>Holanda</b>	Queijo industrializado, queijo processado, queijo ralado	800
<b>Inglaterra</b>	Queijo, alimentos enlatados, creme	Sem limite
<b>Itália</b>	Queijo	500
<b>México</b>	Sem descrição	500
<b>Peru</b>	Sem descrição	Sem limite
<b>Rússia</b>	Queijo processado dietético, vegetais enlatados	8000

Fonte: Adaptado de CLEVELAND *et al.* (2001), Brasil(1996); Mercosul (1996a); Mercosul (1996b)

De acordo com O’Sullivan *et al.* (2007), as duas principais aplicações das bacteriocinas na indústria de produtos lácteos com intuito de influência sobre a microbiota contaminante são aprimorar a qualidade dos produtos lácteos e garantir a segurança do alimento por meio de inibição de micro-organismo patogênicos.

A Tabela 3 mostra as principais aplicações potenciais de bacteriocinas no leite e em produtos lácteos, considerados por Gálvez *et al.* (2008).

Tabela 3 – Aplicação potencial de bacteriocinas em leite e produtos lácteos.

Etapas do processo	Função da bacteriocina no processo
<b>Produtos/matéria prima</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Redução do crescimento microbiano em leite cru;</li> <li>• Inativação das bactérias mesofílicas no leite em combinação com outros processos.</li> </ul>
<b>Produtos fermentado</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inibição da formação de gás pelo <i>C. tyrobutyricum</i> em queijos duros e semi-duros;</li> <li>• Inibição das bactérias patogênicas e tóxicas (<i>L. monocytogenes</i>, <i>B. cereus</i>, <i>S. aureus</i>) nos queijos e na superfície do queijo;</li> <li>• Inativação das bactérias mesófilas e da formação de endosporos em queijo em combinação com pressão hidrostática elevada;</li> <li>• Controle da acidificação no iogurte e outros produtos fermentados;</li> <li>• Uso de estirpes produtoras de bacteriocinas como culturas <i>starter</i> ou adjuntas para inibir as bactérias patogênicas e deteriorantes no queijo e em outros produtos lácteos fermentados;</li> <li>• Acelerar a cura dos queijos através da liberação de enzimas intracelulares bacterianas;</li> <li>• Uso de culturas <i>starter</i> produtoras de bacteriocinas para inibir a microflora das BAL não <i>starter</i> adventícias/acidentais no queijo.</li> </ul>
<b>Produtos processados</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inibição dos produtores de endosporos em queijo processado e em outros produtos lácteos processados;</li> <li>• Inibir a <i>L. monocytogenes</i> nos produtos lácteos após contaminação pós-processamento.</li> </ul>

Fonte: Adaptado de Gálvez et al. (2008).

### **2.7.1 Queijo Minas Frescal**

Como os produtos lácteos, e principalmente o queijo, são largamente vinculados às intoxicações alimentares causadas por micro-organismos patogênicos é preciso uma atenção especial a essas questões. Já que o uso de BAL é comum na indústria de produtos lácteos, sobretudo em produtos fermentados, o uso de bacteriocinas como conservantes naturais nesses produtos se torna muito interessante (SIQUEIRA et al., 2010). Conforme Ross et al. (2002), o maior benefício das bacteriocinas evidenciado na indústria de produtos lácteos é a eficiência de bacteriocinas como a nisina, contra *Clostridium botulinum* e *Listeria monocytogenes*.

O queijo Minas Frescal é um dos queijos mais populares produzidos e consumidos no Brasil, o que é causado pela elaboração simples, pelo alto rendimento

em relação a outros tipos de queijos e à grande aceitabilidade por parte do mercado brasileiro (VIEIRA, 2011).

Entende-se por queijo Minas Frescal o produto fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou enzimas coagulantes apropriadas, complementado ou não com ação de bactérias lácticas específicas, o produto não é prensado, nem maturado e seu armazenamento não deve ser em temperaturas superiores a 8°C conforme Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos (BRASIL, 1996).

Conforme Carvalho (2003), por apresentar muito alta umidade, utilizar temperaturas de 32-35°C no processamento, não ser submetido à cura e apresentar uma baixa concentração de sal, se torna um produto favorável ao desenvolvimento de patógenos. Essas condições podem se tornar mais favoráveis ao desenvolvimento dos micro-organismos patogênicos e deteriorantes quando os queijos são produzidos com leite cru, sem o emprego de tecnologia adequada e de boas práticas de fabricação. Apesar da legislação brasileira estabelecer a utilização de leite pasteurizado para sua produção (BRASIL, 1997), é frequente a comercialização dos produtos artesanais produzidos com leite cru (ORTOLANI et al., 2009).

De acordo com a Portaria nº 352 de 04 de setembro de 1997 do MAPA, posteriormente alterada pela Instrução Normativa nº 4, de 1 de março de 2004 do MAPA, o queijo Minas Frescal é classificado como um queijo semi-gordo, com teores de lipídeos variando de 25,0 a 44,9%, de muito alta umidade (superior a 55%), a ser consumido fresco (BRASIL, 1997; BRASIL, 2004). Produto de massa crua e vida de prateleira curta, preferencialmente deve ser consumido em até 28 dias após a fabricação (PREZZI, 2014; REZENDE et al., 2011).

Segundo Furtado (1999), o pH do produto obtido por coagulação através da utilização de fermentos está entre 5,0 e 5,3 ou um pH de 6,1 a 6,3 para o produto obtido pelo uso de acidificação com ácido láctico.

Segundo essas características, esse tipo de queijo mostra-se um excelente meio para o desenvolvimento de micro-organismo, principalmente o grupo dos coliformes totais e termotolerantes, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp, sendo geralmente o veículo de surtos alimentares causados por infecções ou intoxicações alimentares (BASTOS et al., 2001; KOMATSU, 2008). De acordo com a Resolução nº 12 de 2001 da ANVISA (BRASIL, 2001), que estabelece padrões microbiológicos, os queijos com alta umidade como o Minas Frescal, devem

apresentar contagem máxima de  $5,0 \times 10^2$  NMP de coliforme de origem termotolerantes por grama,  $5,0 \times 10^2$  UFC de estafilococos coagulase positiva por grama e ainda ausência de *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes* em 25g de amostra.

Como muitos surtos de doenças vinculadas a alimentos investigadas no país envolvem produtos lácteos e dentre esses foram associados principalmente ao consumo de queijo do tipo Minas Frescal, Minas padrão e de queijo coalho (BORGES et al., 2008), assim, observa-se a necessidade de um controle dos contaminantes pois além de gerar perdas econômicas para as indústrias, apresentam risco à saúde pública (FEITOSA et al., 2003). Portanto, a utilização de técnicas mais eficientes no controle desses patógenos se torna essencial no processo de produção de queijo Minas Frescal e o uso de bacteriocinas como conservantes naturais se mostra interessante além do apelo do conservante natural atualmente demandado pelos consumidores, esses compostos apresentam eficiência no controle de patógenos em queijos (VOULGARI et al., 2010).

### **3METODOLOGIA**

#### **3.1 Obtenção da bacteriocina**

Para a obtenção da bacteriocina foi utilizada uma bactéria ácido láctica isolada de salame italiano pelo grupo de pesquisa e identificada como *Lactobacillus sakei*, pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Esse micro-organismo é produtor da bacteriocina de interesse no estudo e seu cultivo foi feito em meio líquido de caldo *Man, Rogosa and Sharpe* (MRS) próprio ao desenvolvimento de bactérias ácido lácticas.

Para esse fim, primeiramente a BAL criopreservada a -14°C em tubo com 2,5 mL de meio MRS com 20% de glicerol (v/v) foi descongelada e então feito um aumento de escala para 10 mL do mesmo caldo em tubo de ensaio. O conteúdo foi mantido à temperatura de 32°C em estufa bacteriológica por 24 horas para desenvolvimento das células. Após esse tempo foi feito um novo aumento de escala para um frasco Erlenmeyer de 250 mL com aproximadamente 200 mL de caldo MRS. O frasco foi mantido a 32°C por mais 24 horas em agitador orbital com agitação de 150 rpm (SOUZA et al., [2016]).

Durante a fermentação do caldo a bactéria produz alguns compostos como ácido láctico, que causa a diminuição do pH do meio e bacteriocinas produzidas como meio de defesa.

Para garantir que o extrato a ser utilizado não apresente células de BAL é necessária sua remoção, o que foi feito por centrifugação a 5500 rpm por 15 min a 4°C. Após esse tempo o sobrenadante foi separado e denominado de “Extrato livre de células” (ELC) e o precipitado foi descartado. O extrato bruto foi denominado por não receber nenhum tratamento e ser obtido apenas da remoção das células do extrato fermentado. Todo o material, exceto o extrato, utilizado nas análises foi esterilizado em autoclave vertical, por 15 min a 121°C.

#### **3.2 Delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup> (DCCR)**

Para uma análise mais completa do extrato obtido, foi realizado um delineamento composto central rotacional 2<sup>2</sup> (DCCR) conforme Rodrigues e Iemma

(2005), no qual os parâmetros analisados foram a temperatura e o pH e a variável resposta foi a inibição causada pela bacteriocina frente aos micro-organismos *E. coli* e *S. aureus*. Esses experimentos estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Matriz para Delineamento Composto Central Rotacional 2<sup>2</sup>.

Tratamentos	Variáveis independentes			
	pH Codificado	pH Real	T (°C) Codificada	T (°C) Real.
1	-1	4,5	-1	18
2	+1	7,0	-1	18
3	-1	4,59	+1	86
4	+1	7,0	+1	86
5	-1,41	4,0	0	52
6	+1,41	7,5	0	52
7	0	5,9	-1,41	4
8	0	5,9	+1,41	100
9	0	5,9	0	52
10	0	5,9	0	52
11	0	5,9	0	52

Fonte: Autora, 2017.

O extrato bruto proveniente da fermentação da bactéria ácido láctica apresenta um baixo pH (aproximadamente 4,5), proporcionado por uma produção de ácido láctico durante a fermentação, assim, foi testada a resistência da bacteriocina à degradação por variações de pH pelo método descrito na AOAC (2006) através de adição de HCl (1M), ou NaOH (1M) para ajustar o pH do meio a valores variando de pH 4,0 a 7,5, valores que foram escolhidos pela proximidade ao pH inicial do extrato e o pH da neutralidade, com ajuste em pHmetro de bancada com bulbo esterilizado por álcool 70%. O extrato foi mantido no pH estudado por 24 horas com posterior ajuste para neutralidade (pH 7,0), para que o pH muito ácido não causasse a inibição dos micro-organismo durante as análises antimicrobianas.

Para as variações de temperatura, o extrato bruto foi submetido a variações de 4°C (temperatura de armazenamento de produtos refrigerados) até a temperatura de 100°C. Todas as condições foram mantidas por 24 horas em estufa bacteriológica.

### **3.3 Análises antimicrobianas**

#### **3.3.1 Análise antimicrobianas do DCCR 2<sup>2</sup>**

Para obtenção dos resultados de inibição dos micro-organismos patogênicos em relação à ação da bacteriocina no teste do delineamento experimental foram realizadas análise em microplacas conforme metodologia descrita pela NCCLS (2003), na qual descreve que para cada poço da microplaca deverá ser adicionado de 145 µL de caldo Müller Hinton, 135 µL de extrato a ser analisado e 20 µL de cultura microbiana contaminante, para o delineamento foram utilizadas as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 12598 e *Escherichia coli* ATCC 11229, como patógenos contaminantes. Para comparativo de crescimento total da microbiota contaminante foi feita uma triplicata de poços denominados branco, nos quais o extrato foi substituído por caldo MRS, mesmo meio de cultura ao qual a bacteriocina dos extratos estava dispersa.

As leituras foram feitas em leitora de microplacas em absorvância na faixa de 630 nm, no tempo de 0 hora (logo após a inoculação dos micro-organismos), e após 16 horas, durante esse tempo a microplaca foi mantida em estufa bacteriológica a 35°C.

A porcentagem de inibição do micro-organismo contaminante foi calculada em relação ao branco (100% de crescimento), assim, quanto maior a porcentagem de inibição, maior será a eficiência do composto bioativo em relação ao contaminante.

#### **3.3.2 Análises in vitro**

Outra análise em microplacas realizada no estudo foi a análise em vitro da ação da bacteriocina aos micro-organismos que a legislação brasileira exigem para queijos do tipo Minas Frescal, assim antes da aplicação das bacteriocina nos queijos, foi feita esta análise *in vitro* na qual foi testada a ação inibitória contra os micro-organismos do grupo coliformes termotolerantes (representado pela *Escherichia coli* ATCC 11229, neste teste) do grupo dos estafilococos coagulase positiva (representado pela cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 12598), da *Salmonella* (isolada de um alimento) e da *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Essas análises foram realizadas com o extrato bruto. Realizadas conforme a mesma metodologia utilizada no item 3.3.1.

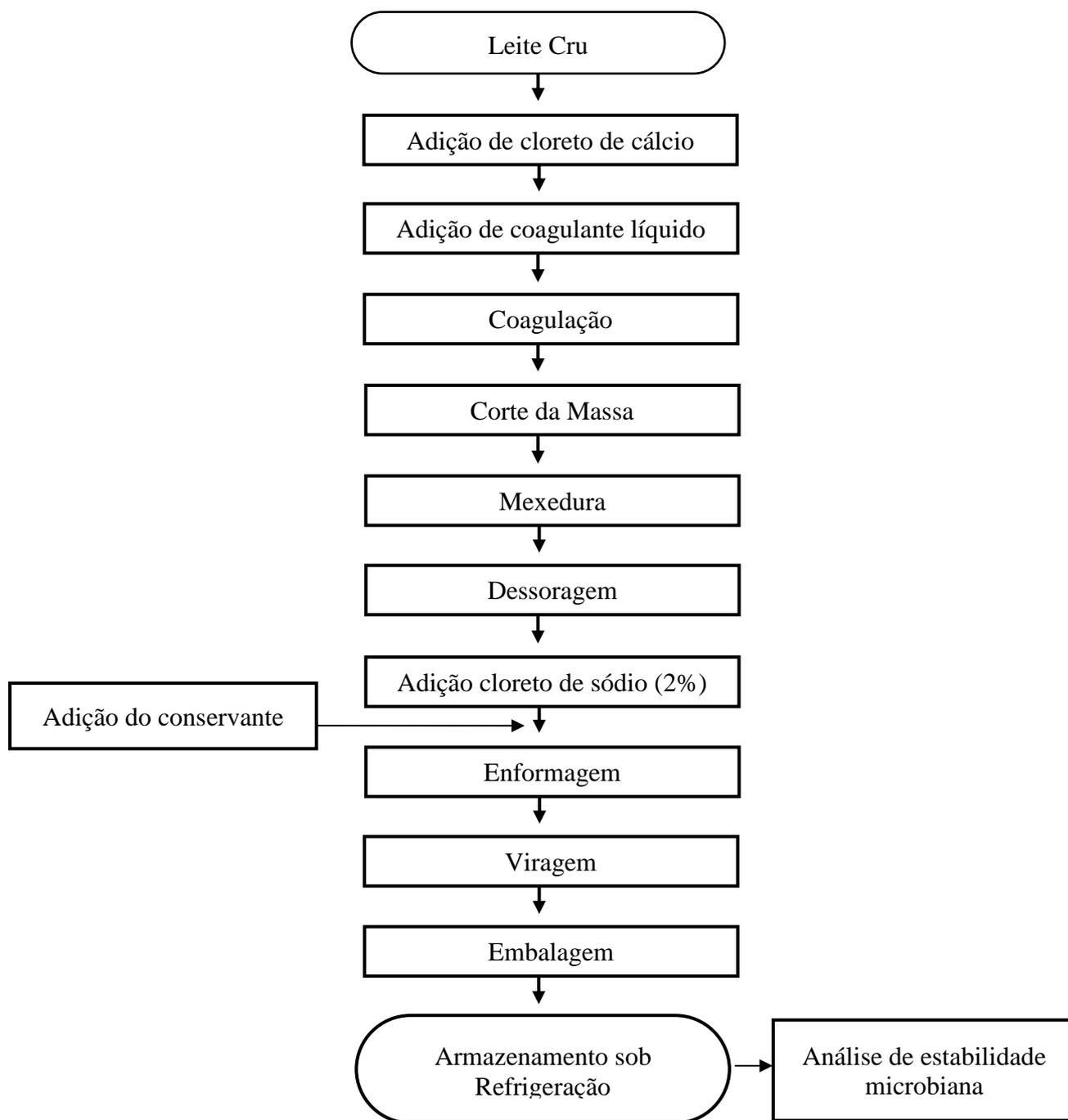
### **3.4 Aplicação de bacteriocina na produção de queijo**

A produção de queijo Minas Frescal com leite cru e com adição ou não de bacteriocinas foi feita baseada no fluxograma de processo apresentado na Figura 1. Inicialmente foram produzidos 3 queijos teste, todos com uso de leite cru como base láctea, dos quais um queijo controle sem a adição da bacteriocina, um queijo com aplicação da bacteriocina e um último para comparações com aplicação de Nisina (Globalnisin na marca Globalfood) na concentração de 12,5 mg/g de queijo. Para confirmação dos resultados, baseados no mesmo processo de produção, foram elaboradas uma triplicata de queijos com bacteriocina e uma triplicata sem a aplicação da bacteriocinas para novas análises de estabilidade microbiológica.

#### **3.4.1 Etapas de produção de queijo Minas Frescal**

A seguir estão apresentadas as etapas do processo produtivo dos queijos e uma descrição mais detalhada de cada etapa do processo, ilustradas da Figura 1.

Figura 1 – Fluxograma de processo de fabricação de queijo Minas Frescal



Fonte: Adaptado de FELICIO (2013).

### 3.5.1.2 Etapas do processo produtivo

Leite Cru: O leite foi obtido de um leiteiro local da cidade de Bagé, mantido sob refrigeração até o momento do uso.

Adição de cloreto de cálcio: Mesmo não tendo sido utilizado o leite pasteurizado, o cloreto de cálcio foi adicionado para auxiliar na formação do coágulo, na proporção de 0,03%.

Adição de coagulante líquido: Para adição do coagulante no leite foram seguidas as recomendações do fabricante do coagulante (Enzima quimosina microbiana – *Arpergillus niger var. awamori* da marca HA-LA): para cada litro de leite utilizado foi adicionado 8 mL de coagulante. Tomou-se o cuidado para adicionar o coagulante apenas quando o leite estivesse na faixa de temperatura entre 30-35°C (temperatura ótima de atuação), acrescentando-o aos poucos e com agitação leve e constante para homogeneização. Após adicionar o coagulante o leite foi mantido em repouso absoluto por 40 min até o momento do teste do coágulo.

Coagulação: A coagulação completa do leite após a adição do coagulante enzimático foi obtida após 40 min, decorrido esse tempo o leite, antes líquido, havia adquirido uma consistência mais sólida e formando uma massa que se separa do soro. Após esse período foi feito o teste do coalho, com auxílio de uma faca fez-se um corte na massa coagulada e, na base do corte a faca foi inserida na transversal do corte e a massa foi forçada para cima, apresentando a formação de uma fenda retilínea sem fragmentação da massa. Após esse teste foi feito então o corte da massa.

Corte da massa: O corte da massa formada foi feito na direção vertical e horizontal com auxílio de uma faca (na substituição de liras) formando cubos de aproximadamente 1,5 a 2 cm<sup>2</sup>.

Mexedura: Foi feita logo após passar 3 min de repouso da massa cortada, feita para quebra dos cubos do coalho para obtenção de dimensões menores que auxiliem na saída do soro da massa. Assim, foi feita a agitação durante 1 min, a cada 10 min de processo até atingir a completa precipitação dos glóbulos de massa formado, esse processo durou aproximadamente 40 min à temperatura de 41°C, ajustada e mantida em banho termostático.

Dessoragem: Essa etapa baseia-se na separação do soro da massa de grânulos coagulados. Assim, foi separado a maior quantidade de soro possível da massa no canto do pote utilizado para coagulação. Nesse momento, adicionou-se o cloreto de sódio e o conservante quando conveniente.

Adição de cloreto de sódio: A adição do cloreto de sódio na massa foi feita na sequência da dessoragem, pois se adicionado em etapas anteriores haveria perda do sal junto ao soro. Foi adicionado 2% de sal para a quantidade de massa de queijo obtida, que foi bem distribuído pela massa do queijo e então adicionado o conservante natural.

Adição da bacteriocina: Foi produzido um queijo controle (sem adição da bacteriocina), outro com a adição da bacteriocina produzida pelo *Lactobacillus sakei* e por último um queijo com adição da bacteriocina nisina para comparação já que esta é a única bacteriocina permitida pela legislação brasileira para utilização em alimentos. Foi adicionada 10 mL de ELC contendo a bacteriocina produzida pela BAL. Já para a adição da nisina utilizou-se 12,5 mg/L (concentração permitida pela Legislação brasileira, para aplicação em alimentos), de nisina liofilizada, assim para melhor homogeneização na massa, essa foi dissolvida em 10 mL do mesmo leite utilizado na produção dos queijos e adicionada a massa da mesma forma que o volume de extrato bruto adicionado no outro queijo.

Enformagem: A enformagem da massa dos queijos foi feita em formas nas quais foram adicionadas aproximadamente 150 g de massa e prensada levemente para saída do soro. Após a dessoragem os queijos atingiram um peso aproximado de 80 g cada.

Viragem: A viragem foi feita até completar 30 min de enformagem e feita a cada 10 min. Os queijos foram mantidos a 4°C durante o processo.

Embalagem: Após 3 horas de enformagem os queijos foram embalados em sacos de polipropileno próprio para suportar pressões de vácuo. Foi feita a identificação das embalagens e o armazenamento sob refrigeração.

Armazenamento sob refrigeração: Para aumento da vida de prateleira do produto o mantivemos sob refrigeração a 4°C, para simular o processo comercial de armazenamento.

### **3.5 Análises microbiológicas do queijo**

Para a avaliação da estabilidade dos queijos, feitas no 1º, 14º e 30º de refrigeração foi feita uma confirmação dos resultados com a produção de uma triplicata de queijos controle e triplicata de queijos com adição de bacteriocina para validação dos resultados encontrados, nos quais foram feitas as mesmas análises dos queijos teste.

As análises microbiológicas dos queijos foram baseadas na RDC 12/2001 da ANVISA que descreve as análises necessárias e os limites máximos de micro-organismo para produtos como queijo de alta umidade: umidade 55%, incluindo os queijos de coalho com umidade correspondente, Minas Frescal, Muçarela e outros, elaborados por coagulação enzimática, sem a ação de bactérias lácticas. Essa resolução prevê que os micro-organismos que devem ser analisados para o produto são: Coliformes termotolerantes (45°C), *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* e Estafilococos coagulase positiva.

- Análises de Coliformes totais e termotolerantes foram feitas baseadas no método da American Public Health Association (APHA) do número mais provável (NMP) (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

- Análises de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* feitas através do método da *Food and Drug Administration* (FDA) descrito no *Bacteriological Analytical Manual* (BAM) (ANDREWS; HAMMACK, 2007; HITCHINS, 2003).

- Os testes de Estafilococos coagulase positiva feitos pelo método de contagem direta em placas da APHA (LANCETTE; BENNETT, 2001).

### 3.6 Análises Estatísticas

Com a matriz construída para o delineamento experimental, foram feitas as análises de ANOVA do modelo e a avaliação dos efeitos das variáveis propostas sobre a resposta da bacteriocina. Para uma análise desses efeitos foram construídos gráficos de Pareto, perfil de resposta e superfícies de resposta, para um nível de confiança de 90% para os dois micro-organismos propostos. As respostas de porcentagem de inibição do delineamento experimental foram submetidas a teste Tukey com 95% de confiança entre os resultados para os dois micro-organismos testados.

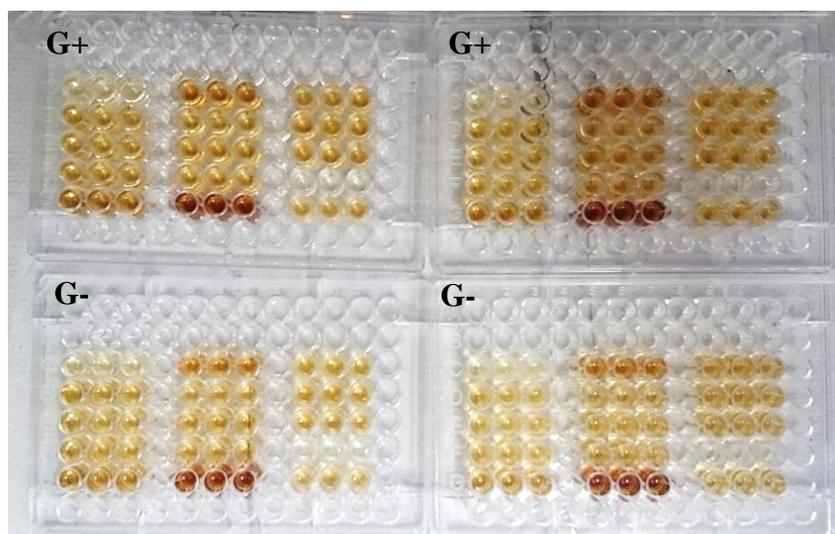
Para as análises dos queijos foram avaliados os resultados através de teste Tukey com 95% de confiança.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Análises de Estabilidade da bacteriocina (DCCR 2<sup>2</sup>)

Para análise da estabilidade da bacteriocina às diferenças de pH e temperatura do meio foram realizados os ensaios da matriz do delineamento ilustrada na Tabela 4 no item 3.2. Na figura 2, está ilustrada a análise de microplacas realizadas para o delineamento experimental na qual se observa que a coloração dos extratos submetidos a elevadas temperaturas foi modificada, provocando uma caramelização dos açúcares presentes no caldo MRS.

Figura 2 - Análise de estabilidade da bacteriocina contra (G+: *S. aureus*; G-: *E. coli*)

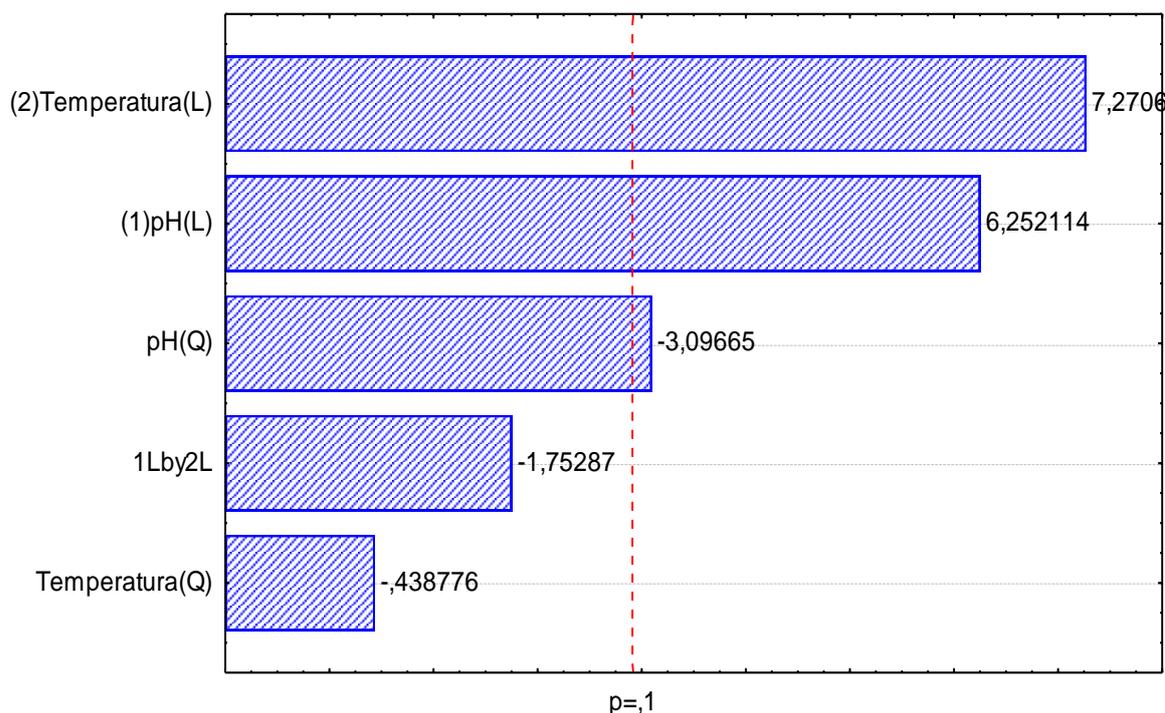


Fonte: Autora, 2017

A mudança na coloração dos extratos pode proporcionar mudanças na coloração dos produtos produzidos com a adição desse extrato. Necessitando assim de uma extração do composto proteico do meio de cultivo (caldo MRS).

#### 4.1.1 Sensibilidade da bacteriocina e sua ação inibitória frente *Staphylococcus aureus*

A Figura 3 mostra o gráfico de Pareto, gerado após construção da matriz do modelo em programa para análise estatística.

Figura 3 - Gráfico de Pareto da inibição de *S. aureus*, e estimativa dos efeitos

Fonte: Autora, 2017

O gráfico de Pareto gerado permitiu avaliarmos que as variáveis de temperatura quadrática e a interação entre as variáveis não são significativas no processo, a um nível de significância de 90% para esse nível de significância a variável de temperatura apresenta maior efeito sobre a variável resposta. A partir da constatação das variáveis significativas ou não no estudo, as que não interferem na resposta foram desprezadas para construção da equação do modelo, que está ilustrada na Equação 1 e utilizada para cálculo da porcentagem da inibição estimada pelo modelo. Esse modelo gerado após os parâmetros serem desconsiderados, apresenta um  $R^2$  de 0,81176, assim o modelo é capaz de explicar 81% do comportamento do experimento e efeitos significativos para todos os parâmetros da equação, porém o pH quadrático apresenta efeito negativo sobre a porcentagem de inibição.

$$\% \text{ Inibição} = 87,904 + 12,067(pH) - 6,837(pH^2) + 14,033(\text{temperatura}) \quad (1)$$

Na Tabela 5, é possível ver que a porcentagem de inibição real, encontrada no experimento e a porcentagem de inibição estimada pelo modelo matemático, assim como o desvio padrão percentual entre os dados.

Tabela 5 - Variáveis respostas do experimento com o micro-organismo *S. aureus*

Tratamentos (pH; T)	Variável dependente		Desvio Relat. (%)
	Inibição (%) Real	Inibição (%) Estim.	
<b>1 (4,5; 18)</b>	57,2 ±2,8 <sup>a</sup>	54,96	±1,65
<b>2 (7,0; 18)</b>	74,2 ±3,4 <sup>b</sup>	79,10	±5,46
<b>3 (4,5; 18)</b>	100,0±4,8 <sup>c</sup>	83,03	±16,96
<b>4 (7,0; 86)</b>	100,0±4,6 <sup>c</sup>	107,16	±7,16
<b>5 (4,0; 52)</b>	46,4 ±6,1 <sup>a</sup>	57,29	±26,51
<b>6 (7,5; 52)</b>	97,0±1,6 <sup>cd</sup>	91,32	±8,67
<b>7 (5,9; 4)</b>	68,7 ±3,3 <sup>b</sup>	68,11	±2,18
<b>8 (5,9; 100)</b>	100,0±4,5 <sup>c</sup>	107,69	±7,69
<b>9 (5,9; 52)</b>	88,2 ±6,2 <sup>d</sup>	87,90	±4,69
<b>10 (5,9; 52)</b>	86,9 ±2,8 <sup>d</sup>	87,90	±0,75
<b>11 (5,9; 52)</b>	91,1±1,9 <sup>cd</sup>	87,90	±7,42

**Nota:** Letra iguais representam valores de inibição sem diferenças significativas com  $p < 0,05$ , em teste Tukey.

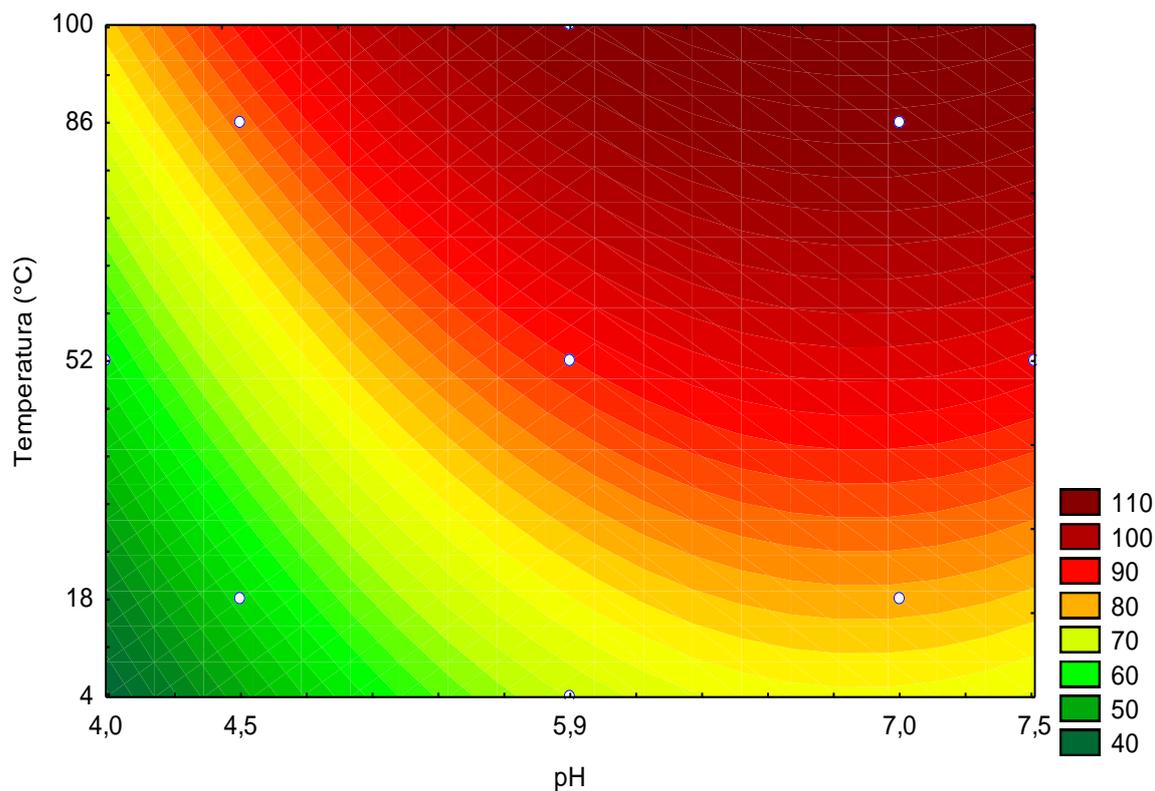
Fonte: Autora, 2017.

Através da Tabela 5 é possível observar que o modelo experimental, expressos como “%Inibição estimada” apresenta uma previsão dos valores de porcentagem de inibição produzidos pela bacteriocina frente ao *S. aureus*, apresentando erro relativo percentual baixo para a maior parte dos resultados obtidos. Assim observa-se que para a inibição do *S. aureus*, os tratamentos 3 (pH 4,6 e T86 °C), 4 (pH 7,0 e T86°C), 6 (pH 7 e T52°C), 8 (pH5,9 e T100°C) e o ponto central 11 (pH 5,9 e T52°C) não apresentaram diferença significativa com média de aproximadamente 100 % de inibição frente ao patógeno. Para esse experimento verifica-se que os pontos centrais e o tratamento 6 não apresentaram diferenças com  $p > 0,05$ .

Assim, os 5 tratamentos (3, 4, 6, 8, 11) não apresentaram diferenças significativas na porcentagem de inibição são os mais recomendados para armazenamento da bacteriocina para posterior aplicação, inibindo praticamente todos os micro-organismos viáveis presentes no meio e ilustrando a eficiência da bacteriocina mesmo em condições de elevada temperatura e variações no pH.

Esses resultados de porcentagem de inibição podem ser melhor analisados através do perfil de resposta na Figura 4 e através da superfície gerada a partir da equação do modelo na Figura 5.

Figura 4 – DCCR 2<sup>2</sup> de porcentagem de inibição da bacteriocina frente a *S. aureus*



Fonte: Autora, 2017

Através do perfil de resposta observa-se que a bacteriocina produzida pelo *Lactobacillus sakei*, após 24 horas de armazenamento sob as condições de tratamento, manteve-se ativa contra o *S. aureus* em todas as faixas de pH (4,0 – 7,5), e toda a faixa de temperatura aplicada (4 – 100°C). Contudo, apresenta maior estabilidade quando utilizadas temperatura de 100°C para pH 5,9 e para temperaturas menores, 86°C, a pH 4,5 e 7,0 e temperatura de 52°C a pH de 5,9 e 7,0.

Observa-se ainda que a bacteriocina não permanece completamente estável em temperatura de 4°C - pH 5,9 e 18°C - pH 4,5, pois com esses tratamentos o extrato apresentou menores valores de inibição dos patógenos mostrando que houve uma degradação ou desestabilização do composto após as 24 horas.

Com a elevação da temperatura de armazenamento da bacteriocina observa-se uma conservação de sua ação inibitória, ficando nítida a desestabilização da mesma a temperaturas menores que 52°C principalmente a pH mais ácidos. Apesar da desestabilização do composto a baixas temperaturas, em nenhum dos tratamentos a bacteriocina perdeu completamente sua ação inibitória e mesmo em condições

desfavoráveis apresenta um poder de inibição de 46,5% do crescimento de *S. aureus*, para o tratamento 5.

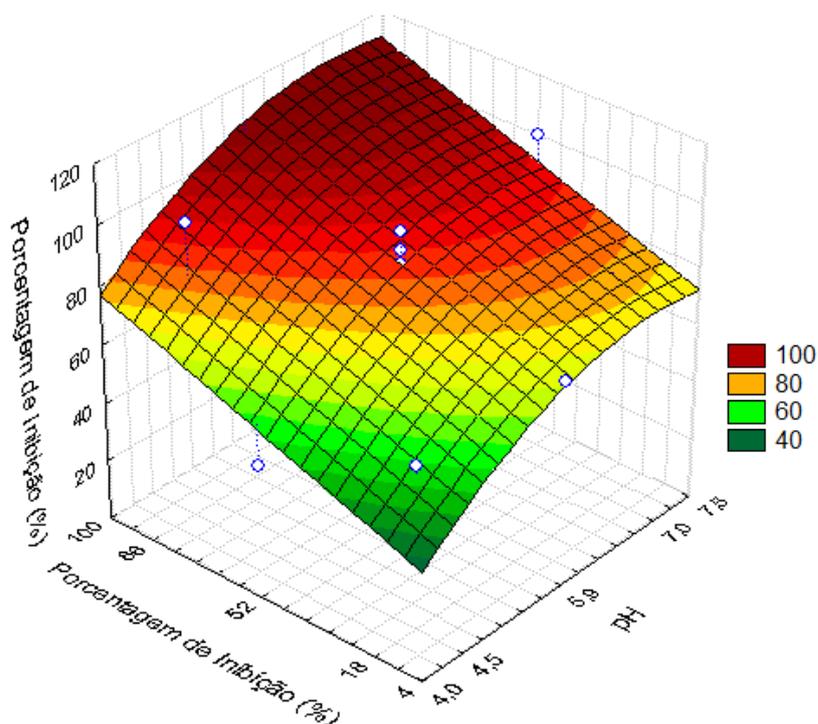
Os resultados encontrados no estudo de Todorov et al. (2011) que analisaram uma bacteriocina produzida por “*Lactobacillus sakei* R1333” corroboram com os resultados encontrados no estudo, pois os autores observaram que permanecia estável após tratamento térmico a 100°C durante 120 min. a um pH de 5,5.

Loureiro (2015) quando avaliou a produção de uma bacteriocina por um “*L. plantarum* B391” observou que sua atividade não é afetada pela variação de pH do meio pois foi variado de 3,95 – 8,09. Contudo, a bacteriocina foi sensível ao tratamento térmico, pois quando associado à variação de pH inativou a bacteriocina por completo em pH acima de 5,03.

Estudos realizados com uma nisina produzida por “*Lactobacillus lactis* WNC20” demonstraram que tem atividade a valores de pH baixos (3 a 5) quando submetida a 121°C durante 15 minutos, contudo a pH neutro ( $\geq 7,0$ ) verificou-se perda total da sua atividade (NOONPAKDEE et al., 2003).

Assim, através do comparativo com as bacteriocinas estudadas pelos autores citados, a bacteriocina produzida por *Lactobacillus sakei* isolado no estudo se mostra mais estável a uma ampla faixa de pH e temperatura não sendo inativada, nos tratamentos testados. Ainda, apresenta uma estabilidade muito alta a elevadas temperaturas, podendo ser aplicada a alimentos com pH mais neutro e que possam receber algum tipo de tratamento térmico como no leite.

Figura 5 - Superfície de resposta gerada através da DCCRR 2<sup>2</sup> frente a *S. aureus*



Fonte: Autora, 2017

A superfície de resposta gerada explica o mesmo comportamento visto da superfície ilustrada na Figura 4, em que os valores de inibição se encontram mais concentrados acima do ponto central, de 0 até 1,41 (variável codificada) para os dois parâmetros analisadas. Observa-se ainda que os pontos abaixo do ponto central apresentam valores de inibição reduzidos e assim esses tratamentos não devem ser utilizados para armazenamento da bacteriocina antes de sua utilização como conservante.

O parâmetro de temperatura tem maior influência na estabilidade da bacteriocina, ao longo dos tratamentos e esse fato pode ser observado quando percorresse o eixo y da superfície na Figura 4 e observa-se para um valor fixo de pH que é uma maior variação de coloração em relação à temperatura do processo. Como a bacteriocina produzida pela BAL não é conhecida não se sabe qual a característica que é influenciada pela temperatura, que faz com que essa interfira na ação do composto.

A resistência de bacteriocinas a elevadas temperaturas já vem sendo estudada e López et al. (2011) descrevem que as bacteriocinas da classe dos não-lantibióticos, subclasse IIc, possuem uma estrutura globular compacta composta de porções

helicoidais repetidas ao redor de um núcleo hidrofóbico, essa característica as torna mais resistentes e altamente estáveis a altas temperaturas, maiores variações de pH e ação proteolítica.

Assim como López et al. (2011), nos experimentos realizados no presente trabalho foi possível observar a estabilidade da bacteriocina à elevação de temperatura e pH, pois quando utilizados os tratamentos com temperaturas mais elevadas associado a pH mais próximos da neutralidade a bacteriocina apresentou um comportamento estável. Assim é possível se ter uma ideia de que, a bacteriocina produzida pelo micro-organismo utilizado no estudo, faz parte do grupo IIc, pois este é o único grupo das bacteriocinas descritas atualmente que tem a característica de termoestabilidade, pois as demais subclasses descritas López et al. (2011), não apresentam essa característica.

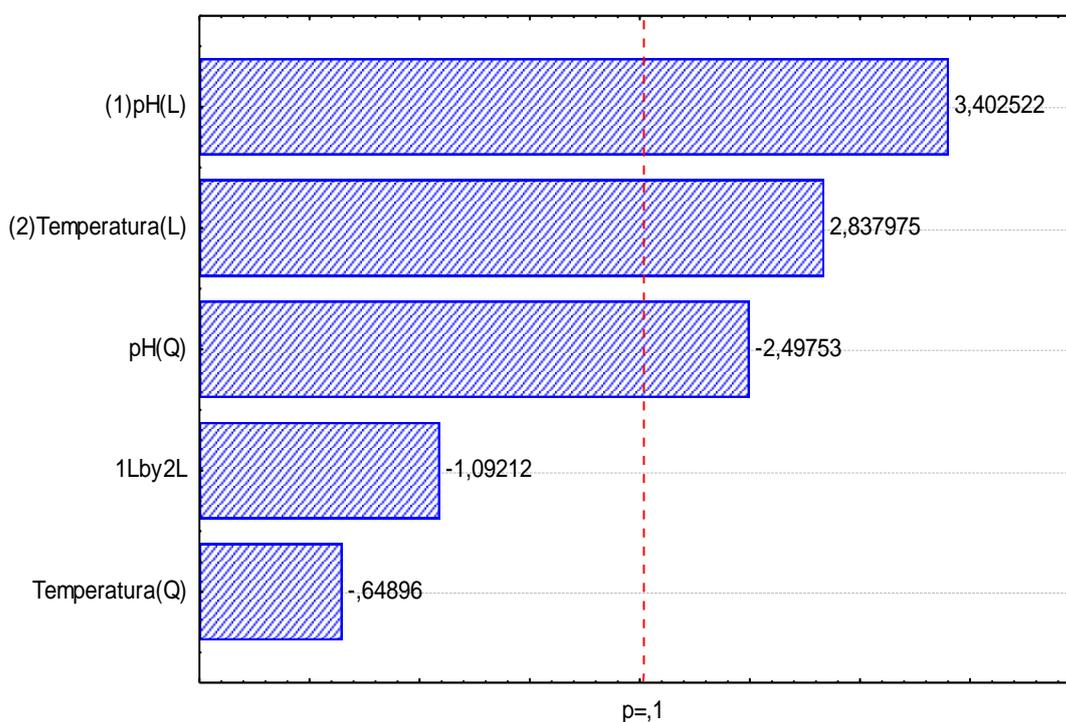
Através da superfície de resposta gerada é possível observar que os dois parâmetros analisados têm interferência direta na atividade antimicrobiana da bacteriocina, a um nível de significância de 90%.

Moreno et al. (2000), descrevem que a maioria das bacteriocinas têm melhor estabilidade de sua atividade em pH de ácido a neutro, sendo praticamente inativadas a pH 8,0. Contudo, Liu e Hansen (1990) apresentam que a inativação da nisina em meio alcalino pode ser consequência de desnaturação proteica, modificações químicas ou ainda por combinações de ambos os fatores.

#### **4.1.2 Sensibilidade da bacteriocina e sua ação inibitória frente *Escherichia coli***

Assim como para o micro-organismos gram positivo, foi avaliada a atividade microbiana da bacteriocina frente a um micro-organismo gram negativo, neste caso a *E. coli*. Após a construção da matriz no programa foi observado que haviam variações significativas entre os parâmetros analisadas com  $p < 0,1$ , ilustrados através do gráfico de Pareto (Figura 6) gerado para estes resultados.

Figura 6-Gráfico de Pareto dos efeitos gerados pelas variáveis sobre a atividade antimicrobiana do composto, frente a *E. coli*.



Fonte: Autora, 2017.

Após análise do gráfico gerado observa-se que todas as variáveis que encontram antes da linha de significância não apresentam efeito significativo sobre o sistema a um nível de confiança de 90%. Assim os parâmetros de temperatura quadrática e a interação entre pH e temperatura foram ignorados para construção da Equação 2, que dará origem à superfície de resposta. Os demais parâmetros apresentaram efeitos significativas no processo com  $p < 0,1$ . Sendo assim considerados para a construção da equação que descreve o modelo.

$$\% \text{ Inibição} = 95,547 + 11,180(\text{pH}) - 9,051(\text{pH}^2) + 9,325(\text{temperatura}) \quad (2)$$

Na equação gerada é possível observar que apenas o parâmetro de pH quadrático tem efeito negativo na equação causando uma diminuição de ordem quadrática na porcentagem de inibição do composto. Os demais parâmetros apresentam efeitos positivos na equação da porcentagem de inibição, porém diferentemente da equação 1 gerada para a inibição do *S. aureus* a variável com maior efeito positivo na ação inibitória é o pH linear. Tendo como base a equação 2, foram

calculados os parâmetros de inibição estimados e o desvio padrão entre as situações real e estimada do processo, esses dados estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6 - Variáveis respostas do experimento com o micro-organismo *E. coli*

Tratamentos	Variável dependente		Desvio Relat. (%)
	Inibição (%) Real	Inibição (%) Estim.	
<b>1 (4,5; 18)</b>	70,0 ± 4,2 <sup>a</sup>	54,9	±17,7
<b>2 (7,0; 18)</b>	83,1 ± 5,1 <sup>b</sup>	79,1	±9,1
<b>3 (4,5; 18)</b>	100,0 ± 3,6 <sup>c</sup>	83,0	±16,9
<b>4 (7,0; 86)</b>	100,0 ± 2,4 <sup>c</sup>	107,2	±7,1
<b>5 (4,0; 52)</b>	49,2 ± 2,3 <sup>d</sup>	57,3	±12,0
<b>6 (7,5; 52)</b>	100,0 ± 2,7 <sup>c</sup>	91,3	±8,6
<b>7 (5,9; 4)</b>	79,4 ± 1,6 <sup>b</sup>	68,1	±14,8
<b>8 (5,9; 100)</b>	100,0±12,5 <sup>c</sup>	107,7	±7,6
<b>9 (5,9; 52)</b>	97,4 ± 7,6 <sup>c</sup>	87,9	±12,0
<b>10 (5,9; 52)</b>	93,9 ± 2,6 <sup>c</sup>	87,9	±6,3
<b>11 (5,9; 52)</b>	99,3 ± 4,5 <sup>c</sup>	87,9	±12,0

Nota: Letra iguais representam valores de inibição sem diferenças significativas com  $p < 0,05$ , em teste Tukey.

Fonte: Autora, 2017.

Através da Tabela 6, verifica-se que os tratamentos 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11 não apresentaram diferenças significativas entre eles com nível de significância de 95% em teste Tukey, observa-se ainda que todos estes tratamentos foram nos quais a bacteriocina apresentou maior estabilidade durante o armazenamento. Destaca-se o tratamento 5 (pH 4,0 e T 52°C) em que o composto apresentou maior degradação, pois após 24 h de processo a bacteriocina apresentou ação de redução do crescimento microbiano em apenas 49,2±2,3% crescimento total dos micro-organismo no meio. Porém, observa-se que mesmo com esta desestabilização o composto não perdeu completamente seu poder antimicrobiano contra *E. coli*.

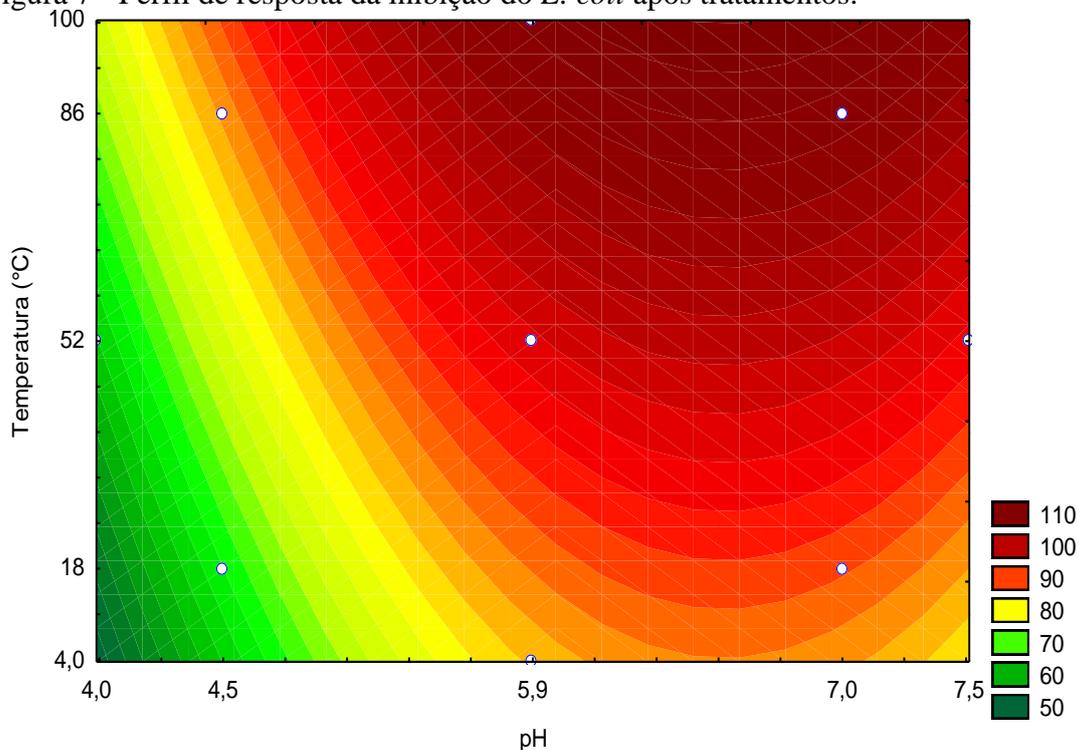
A Tabela 6 permite ainda uma análise da porcentagem de inibição estimada pelo modelo, que se adaptou bastante com a realidade dos resultados, apresentando valores de no máximo desvio relativo entre a variável real e a estimada de 17,7%, não obstante, para os tratamentos com maior porcentagem de inibição o maior desvio relativo foi de 16,9% para o tratamento 3. Assim, a equação proposta para o modelo apresenta um valor de  $R^2$  igual a 0,79376, após os parâmetros não significativos serem ignorados.

Através do exposto, observa-se a eficácia da bacteriocina produzida frente aos micro-organismos *E. coli*, visto ser de membrana celular gram negativa, e conforme Jay (2005), essa membrana celular é uma barreira a macromoléculas e solutos hidrofóbicos, que dificulta a permeação da membrana. Possibilitando verificarmos que a bacteriocina estudada tem grande poder de permeação nesse tipo de membrana.

Através do proposto, foi possível observar que a bacteriocina produzida pelo *Lactobacillus sakei*, utilizada no estudo, é diferente da bacteriocina produzida por uma cepa de “*Lactobacillus sakei* 1” e uma produzida por “*Lactobacillus sakei* ATCC 15521”, analisada por Costa (2016). Em seus estudos, essa autora não observou halos de inibição de *Escherichia coli* para nenhuma das bacteriocinas analisadas, contudo descreve que a ausência de inibição de *E. coli* já era esperada, visto que os micro-organismos Gram-negativos são comumente resistentes às substâncias inibidoras como as bacteriocinas, devido à presença de uma membrana protetora que forma a camada mais externa do envoltório celular.

As relações entre variações de pH e temperatura podem ser melhor visualizadas e analisadas através do perfil de resposta, Figura 7 e da superfície de resposta gerada através da equação do modelo ilustrado na Figura 8.

Figura 7 - Perfil de resposta da inibição do *E. coli* após tratamentos.



Fonte: Autora, 2017.

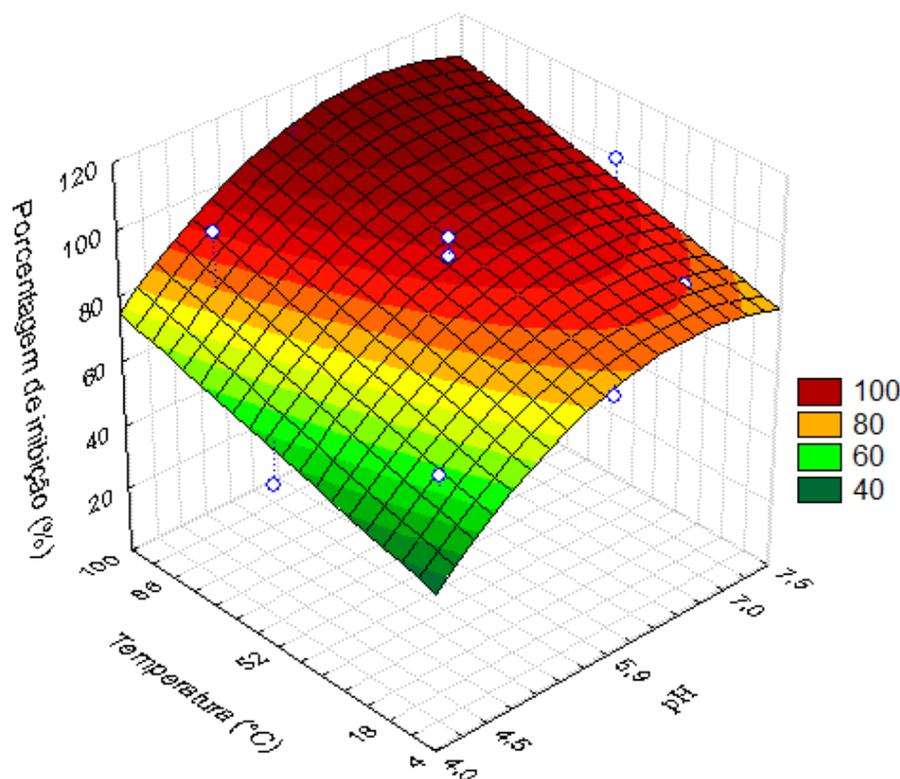
A partir do perfil de resposta gerado, observa-se que a ação da bacteriocina frente a *E. coli* após os tratamentos realizados é mais influenciada pelo pH da amostra, pois no eixo x do gráfico ocorre uma maior variação na coloração que quando comparado ao perfil gerado para o micro-organismo *S. aureus*. Observa-se que alguma característica do composto é influenciada diretamente pelo pH do meio. No entanto, ainda assim todos os tratamentos empregados para o armazenamento da bacteriocina foram efetivos na inibição do micro-organismo e apenas o tratamento 5 diminuiu a ação inibitória abaixo de 50% de inibição.

Observa-se que os resultados obtidos foram para um tempo de 24 horas de processo, que extravasa o tempo de processamento normal de alimentos, assim verifica-se a eficácia da bacteriocina mesmo após tanto tempo de processo. Os resultados de Camargo (2011) corroboram com os obtidos nesta análise, apesar do tempo de processo do autor (2 horas) ser extremamente inferior ao utilizado no experimento. O autor obteve em seus estudos uma estabilidade térmica de bacteriocinas isolados de amostras de mortadela, quando às bacteriocinas foram submetidas a temperaturas de 4°C, 25°C, 30°C, 37°C, 45°C, 60°C, 80°C e 100°C por 2 horas.

Loureiro (2015) também constatou estabilidade térmica da bacteriocina produzida por "*Lactobacillus plantarum* B391" quando submetida a tratamentos com temperaturas de 4°C, 22°C, 37°C e 44°C durante 44 dias. Apesar do tempo de armazenamento ser maior que o estudado, as temperaturas utilizadas não representam as temperaturas utilizadas no processamento de alimentos.

Resultados para a correlação entre os parâmetros que foram obtidos para a bacteriocina do estudo estão ilustrados na Figura 8, em cuja se observa o comportamento dos parâmetros avaliados quando gerada uma superfície de resposta.

Figura 8 - Superfície de resposta gerada através da DCCRR 2<sup>2</sup> frente a *E. coli*



Fonte: Autora, 2017.

Através da superfície de resposta, ressalta-se a ação da bacteriocina nos tratamentos com valores mais elevados de temperatura e pH, sendo que o segundo parâmetro interfere mais significativamente na porcentagem de inibição para esse micro-organismo, pois quando se percorre o eixo x (pH) da superfície, observa-se uma variação maior de colorações que quando varia a temperatura para um valor de pH fixo. Observa-se ainda que para o micro-organismo gram positivo (*S. aureus*) o fator que mais influencia na ação da bacteriocina é a temperatura, fato que não é observado nessa análise e assim como para o outro micro-organismo.

Os resultados de Rosa (2001) contribuem com os resultados encontrados no experimento, pois quando analisada a estabilidade térmica da bacteriocina produzida por “*Lactobacillus sake* 2a,” o autor observou uma estabilidade térmica para os tratamentos a 60°C por um intervalo de tempo de 5 a 60min., tratamento a 100°C em um intervalo de 5 a 20 min. e a 121°C por 15 min. obtendo um halo de inibição de 3-4 mm, pelo método de difusão em poços contra uma cepa de *Listeria monocytogenes*.

A estabilidade térmica das bacteriocinas é bastante variável e depende muito de sua estrutura. Lewus (1991) observou que dentre as bacteriocinas analisadas em seus

estudos todas foram mais sensíveis ao aquecimento a 100°C que a 60°C, como a “plantaricina BN”, produzida por *L. plantarum* que reduziu seu potencial de formação de halo de inibição em 50% quando aquecida a 60°C por 15 min e a 100°C por 10 min, a “bavaricina MN”, produzida por *L. bavaricus*, teve o tamanho dos halos de inibição reduzidos em 66% quando aquecidas a 60°C por 10 min e em 50% quando aquecidas a 100°C por 5 min. A “pediocina A” produzida por *P. pentosaceus* sofre uma redução de tamanho de halo de 33% devido ao aquecimento a 60°C por 10 min. Porém, a “leuconocina S” não foi afetada pelo aquecimento a 60°C, mantendo sua atividade mesmo após aquecimento a 100°C por 5 min.

As análises de Rosa (2001) quando utilizada uma bacteriocina produzida por “*Lactobacillus sake 2a*” isolada de linguiça frescal e purificada, apresentou ação de inibição contra diferentes espécies de *Listeria*, incluindo a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Para avaliação da sensibilidade dos micro-organismos patogênicos frente à bacteriocina, foram comparados dois métodos de inibição a *Spot-on-the-lawn* e a difusão em poços, a autora constatou em ambos os testes a ação eficiente da bacteriocina sobre os micro-organismo.

#### **4.2 Análises preliminares *in vitro***

Antes da aplicação da bacteriocina no produto alimentício foi avaliada a sua ação inibitória frente aos micro-organismos exigidos pela Legislação brasileira de controle em queijos do tipo Minas Frescal. Essas análises foram feitas em microplacas contra os micro-organismos *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* em cujas os extratos obtidos foram resultado da fermentação do caldo MRS por 24 h em erlenmeyer com agitação de 150rpm. Contudo, como os extratos apresentaram porcentagem de inibição bem baixa foram feitas novas análises contra o *S. aureus* e *E. coli*, com 72 horas de fermentação da BAL no caldo os resultados da ação da bacteriocina estão ilustrados na Tabela 6. Os “ELC” nas condições obtidas de fermentação apresentaram atividade antimicrobiana contra todos os micro-organismos testados. Quando utilizado o extrato com tempo de fermentação menor obteve-se uma menor porcentagem de inibição o que ilustra que o tempo de fermentação influencia na produção da bacteriocina no extrato, mas tais parâmetros devem ser mais estudados em trabalhos futuros.

Tabela 7 - Porcentagens de inibição contra os micro-organismos

Tempo de fermentação	G+		G-	
	<i>S. aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>
24h	23,13±3,91	46,20±1,44	21,53±3,68	21,23±4,45
72h	86,90±3,85	-	100,0±5,96	-

Fonte: Autores, 2017

Desse modo, através dos resultados obtidos foi possível observar que a bacteriocina estudada tem ação antimicrobiana contra os micro-organismos testados podendo ser aplicada na fabricação de alimentos caso tenha seu status *Grass* reconhecido pela FDA.

Esses resultados ilustram a eficácia da bacteriocina após 24 horas de fermentação e produção desse composto. Quando utilizado o extrato com 72 horas de fermentação contra os micro-organismos *E. coli* e *S. aureus* foram obtidos resultados mais satisfatórios quanto à porcentagem de inibição. Observa-se a necessidade de um maior tempo de fermentação da BAL para a produção da bacteriocina.

Barbosa (2013) quando avaliou a atividade antimicrobiana de uma bacteriocina produzido por “*Lactobacillus sakei* MBSa1” não observou ação inibitória contra *S. aureus* e contra *E. coli*, o autor observou a atividade contra diversas cepas de *Listeria monocytogenes* testadas. Ilustrando que, possivelmente, a bacteriocina isolada no presente estudo seja diferente da estuda por Barbosa (2013).

Durante a fermentação ocorre o abaixamento do pH, através da concentração de ácido no meio, com isso são necessários ajustes de pH antes das análises microbiológicas para que não interfira no desenvolvimento do micro-organismo patogênico utilizado nos testes.

Os resultados de inibição de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* com o extrato sob fermentação por 72 h não foi realizado por falta de tempo hábil para as análises, pois todas foram feitas separadamente.

Os resultados encontrados por Bucholdz (2014) corroboram com os encontrados no experimento em relação à ação de bacteriocinas frente ao desenvolvimento de colônias de *Salmonella*, o autor observou uma diminuição da contagem de colônias de *Salmonella choleraesuis* em 57,15% das cepas de

*Lactobacillus* isoladas, e 28,60% das cepas inibiram o desenvolvimento de *Salmonella bandaka*.

Barros et al. (2009) encontraram zonas de inibição por método direto em placas em 100% das suas amostras contaminadas por *Salmonella enteritidis* com diâmetros médios de 16 e 24 mm quando utilizado cepas de *L. salivarius* para fermentação e 86,7% das amostras quando utilizado *L. reuteri* na fermentação com halos de inibição de 14-22 mm.

Liserre (2002) quando analisou a formação de halos de inibição utilizando bacteriocina produzido por “*Lactobacillus sakei*,” testando cepas de *Listeria monocytogenes*, como micro-organismos patógeno, observou halos de inibição de 2 a 3 mm.

Assim como no presente estudo, Costa (2016) ao avaliar a atividade inibitória de bacteriocinas produzidas por diferentes cepas de bactérias ácido láctica, isoladas de queijos Minas Frescal, utilizando uma cepa de “*Lactobacillus sakei* 1” como controle positivo da atividade antimicrobiana do composto gerado por ela. O autor verificou resultados que variaram de 26 a 14 mm de halo para *Listeria monocytogenes* e de 9 a 5 mm de contra *Staphylococcus aureus*, os valores encontrados pelo autor para ação inibitória contra o *S. aureus* foram mais eficientes que o controle positivo que teve halo de inibição de 5 mm, já para a *Listeria*, o controle apresentou halo de 30 mm, mostrando o grande potencial de produção de bacteriocinas com essa característica.

### 4.3 Produção de Queijos

Para testes preliminares foi produzido um queijo com leite pasteurizado e um com leite cru. Como já era esperado, o tratamento térmico eliminou todos os micro-organismos viáveis do queijo. De modo que se decidiu utilizar o leite ainda cru para elaboração dos queijos, pois, após análises observou-se que já apresentava uma contaminação inicial bem elevada, eliminando a necessidade de uma contaminação posterior dos queijos produzidos com leite pasteurizado, para análise de ação antimicrobiana da bacteriocina sobre os patógenos presentes na matriz do alimento.

Após esses testes, foram então produzidos 3 queijos para análise iniciais, um queijo um com leite cru sem adição da bacteriocina, um com leite cru com adição da bacteriocina e por último um queijo com leite cru e adição de nisina. Os 3 queijos foram embalados a vácuo e mantidos sob mesmo processo de armazenamento, 4°C por

30 dias, com análises nos dias 1º, 14º e 30º dia. A Figura 9 mostra os queijos produzidos na etapa inicial do processo.

Após todas as análises dos queijos teste, foram produzidas uma triplicata de queijos controle, com leite cru e sem a adição da bacteriocina e uma triplicata de queijos com a adição desta para confirmação dos resultados obtidos.

Figura 9 - Queijos produzidos para análise no 1º, 14º e 30º dias de armazenamento.



Fonte: Autora, 2017

Observou-se que, visualmente, a adição do ELC não interferiu na coloração e aroma dos queijos, apesar disso não foram feitas análises físico-químicas desses parâmetros.

Após a produção dos queijos e das análises microbiológicas ao longo da sua vida de prateleira observou-se uma alta contaminação por *Estafilococos coagulase*

positiva, coliformes totais e termotolerantes nos queijos produzidos. Não foi observada a presença de colônias típicas de *Salmonella*, apenas no décimo quarto (14º) dia de armazenamento sob refrigeração foi observada a presença de *Listeria monocytogenes*.

#### **4.3.1 Contaminação por *Estafilococos coagulase positiva* em queijo minas frescal**

Dentro dos 30 dias de armazenamento foram realizadas análises no 1º, 14º e 30º dia de armazenamento. Os dados das análises microbiológicas para estafilococos coagulase positiva estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8 - Dados da análise microbiológica para estafilococos coagulase positiva

<b>Dias de análises</b>	<b>Queijo controle</b>	<b>Queijo com bacteriocina</b>	<b>Queijo com Nisina</b>
<b>1º Dia</b>	2,6x10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>	5,5x10 <sup>3</sup> <sup>b</sup>	6,0x10 <sup>2</sup> <sup>c</sup>
<b>14º Dia</b>	2,6x10 <sup>4</sup> <sup>a</sup>	8,3x10 <sup>2</sup> <sup>b</sup>	5,4x10 <sup>2</sup> <sup>b</sup>
<b>30º Dia</b>	1,4x10 <sup>3</sup> <sup>a</sup>	6,0x10 <sup>2</sup> <sup>b</sup>	0,0 <sup>c</sup>

**Nota:** Letras iguais na linha representam valores de contagem de colônias, sem diferenças significativas com  $p < 0,05$ , em teste Tukey.

Fonte: Autora, 2017.

Na Tabela 8 são apresentados os valores de contaminação dos queijos em UFC/g e através dela é possível observar a diminuição significativa da contagem de colônias de estafilococcus coagulase positiva do queijo controle para o queijo com adição da bacteriocina com uma redução de 78,85% da contaminação inicial para o 1º dia de análises. Nesse mesmo dia, a contagem de colônias para o queijo com adição da nisina foi menor que o queijo com a bacteriocina, no entanto, esse resultado já era esperado visto que a nisina foi utilizada como controle positivo de inibição contra esse grupo de patógenos.

A partir das análises do 14º dia de conservação, observa-se conservação da elevada contaminação do queijo controle (sem adição de conservantes), mas observa-se que a bacteriocina avaliada no estudo não apresenta diferença significativa em relação ao conservante comercial, ilustrando o seu grande potencial como conservante natural em alimentos. E assim ressalta-se que a bacteriocina tem ação semelhante à nisina, conservante natural já permitido pela legislação para utilização em queijos. Por ser uma bacteriocina produzida por uma bactéria ácido láctea apresenta grandes chances de receber o *Status Grass*, que permite sua utilização em alimentos.

O mesmo comportamento é observado no 30º dia de conservação dos queijos mantidos a vácuo e 4°C. Porém, nesse dia já é observado o efeito da temperatura sobre a sobrevivência dos micro-organismos, sendo observada uma diminuição da contagem de colônias viáveis de estafilococos coagulase positiva mesmo nos queijos controle. Não obstante, há diferença significativa entre esse e os queijos com adição dos conservantes naturais. Observando uma diminuição da contagem de colônias nas análises do 30º dia entre o queijo controle e o com adição da bacteriocina, de 57,15% de redução das UFC de estafilococos coagulase positiva.

Apesar da diminuição significativa com o uso da bacteriocina na formulação dos queijos, eles ainda não estavam dentro dos padrões exigidos pela Resolução RDC 12/2001 da ANVISA, que estabelece valor máximo de  $5 \times 10^2$  UFC/g como máximo de contagem de estafilococos coagulase positiva em queijos de alta umidade, como o Minas Frescal. Contudo, observa-se que a contaminação inicial da matéria-prima é muito elevada dificultando a ação da bacteriocina.

Como observado por Loguerci e Aleixo (2001), a presença de *Staphylococcus aureus* é frequentemente pesquisada em alimentos, sendo que o queijo é um dos principais veículos de intoxicações alimentares, e sua presença está associada às práticas de higiene e manipulação inadequadas e insuficientes. Em função de não ser apenas o *Staphylococcus aureus* a única espécie do gênero *Staphylococcus* capaz de produzir enterotoxinas, a legislação da ANVISA, resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, definiu que o padrão microbiológico passou a ser para estafilococos coagulase positiva com contagem máxima  $5 \times 10^2$  UFC/g (ANVISA, 2001). As altas contaminações desses micro-organismos estão relacionadas principalmente a problemas de processamento, como falhas de pasteurização ou utilização de leite cru, higienização inadequada de equipamentos e manipulação, porém pode ser ainda resultado de infecções estafilocócicas nas glândulas mamárias bovinas (FLOWER et al., 2005; FORSYTHE, 2002).

A toxicidade das cepas de *Staphylococcus* pode ser observada através da capacidade do micro-organismo de coagular o plasma sanguíneo, essa coagulação é realizada através da presença de coagulase, que são enzimas produzidas pelo micro-organismo e excretadas para fora da célula e está presente apenas nas cepas de estafilococos que apresentam patogenicidade (LANCETTE; BENNET, 2001). Assim, no presente estudo todo o micro-organismo que apresentou a coagulase foi analisado para confirmação das cepas de estafilococos coagulase positiva.

Os resultados encontrados na análise são menores que os encontrados por Ferreira et al. (2011) ao analisar queijos Minas Frescal artesanais produzidos na cidade de Uberlândia, o autor conclui que uma contaminação para o tipo de queijo D, de  $1,1 \times 10^4$  até um máximo de contaminação de  $2,6 \times 10^5$ , do total dos queijos analisados, 90% apresentavam uma contaminação fora dos padrões exigidos pela legislação.

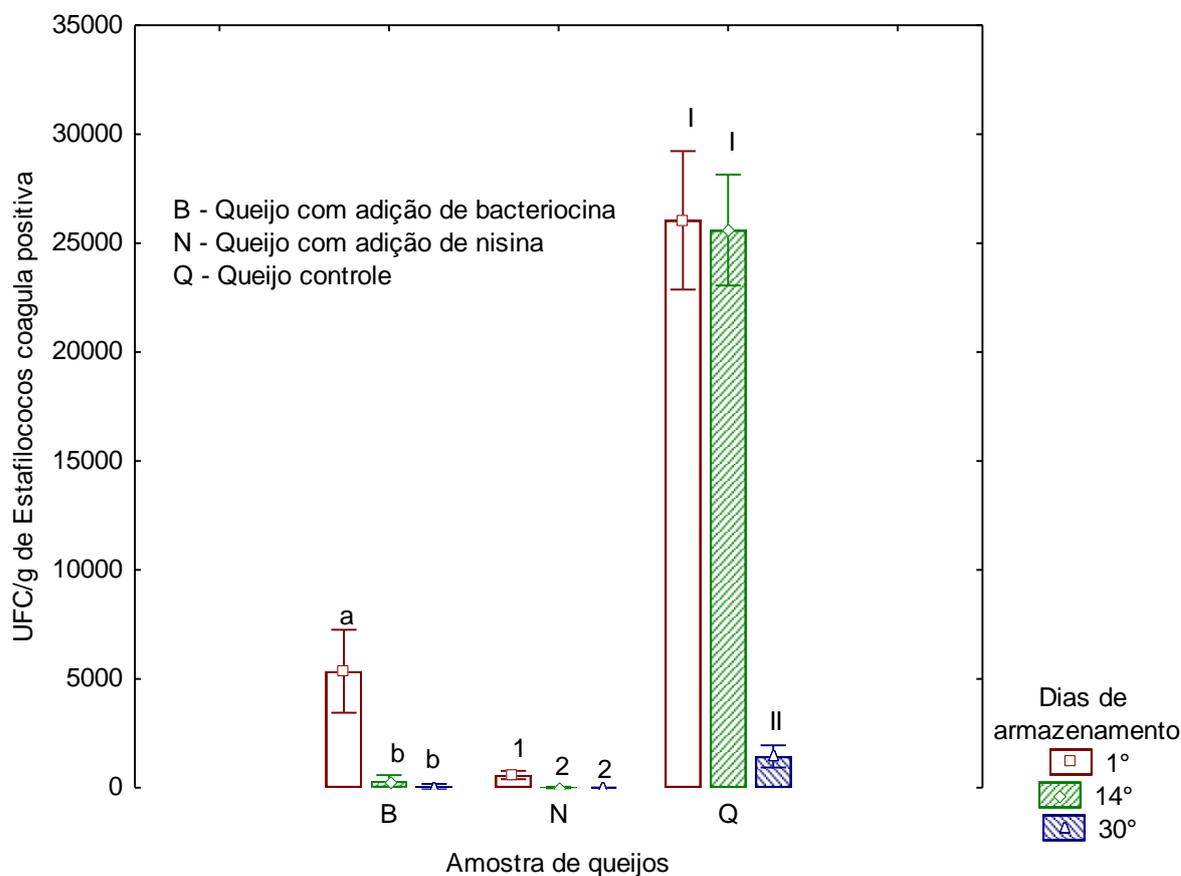
Almeida Filho et al. (2000) em seus estudos analisaram 80 amostras de queijo Minas Frescal que apresentaram contagem acima de  $10^3$  UFC/g, valores acima do permitido. Salotti et al. (2006) analisaram 30 amostras de queijo Minas Frescal artesanais produzidas na cidade de Jaboticabal – SP, 20% das amostras apresentaram contagem acima dos padrões variando entre  $5 \times 10^3$  UFC/g a valores maiores que  $5 \times 10^4$  UFC/g. Assim, observa-se a necessidade de um controle mais rigoroso com a qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas Frescal, pois há uma grande ocorrência de contaminações. Ressalta-se a necessidade da utilização de conservantes na produção de queijos principalmente do tipo Minas Frescal com base láctea de lei cru ou a utilização de leite pasteurizado para a produção queijos.

Felício et al. (2015) observaram uma redução de cerca de 1 log UFC/mL na multiplicação de *S. aureus* na presença de nisina em queijos Minas Frescal após 30 dias a 4°C. No presente estudo, após os 30 dias de armazenamento dos queijos também foi possível observar uma redução da contagem de colônias de estafilococos coagulase positiva.

A concentração da nisina purificada e liofilizada, adicionada no queijo é de 12,5 mg/ L de leite, dissolvida em 10 mL de leite fresco. Porém, a concentração adicionada da bacteriocina produzida pelo *Lactobacillus sakei* não é conhecida, sendo adicionada 10 mL de ELC com concentração desconhecida de bacteriocinas no meio. Como essa concentração não é conhecida e o composto não foi purificado, sabe-se que mesmo adicionando o mesmo volume de inóculo a concentração final da nisina é bem maior que a concentração da bacteriocina estudada. Observando seu grande potencial mesmo em concentrações menores apresenta ação semelhante ao conservante comercial.

Na Figura 10 é ilustrado o comportamento da contaminação microbiana ao longo do tempo de armazenamento dos queijos sob refrigeração a 4°C, para os 3 queijos produzidos.

Figura 10 - Qualidade microbiológica dos queijos em função dos dias de armazenamento sob refrigeração



**Notas:** Letras e números iguais representam valores sem diferença significativa com  $p < 0,05$  em teste Tukey.

Fonte: Autora, 2017

Através da análise dos resultados expostos na Figura 10, observa-se que há uma diferença significativa na contaminação microbiana ao longo da vida de prateleira dos queijos, a queda da contaminação ao longo do tempo mostra a ação da bacteriocina e da nisina com o tempo.

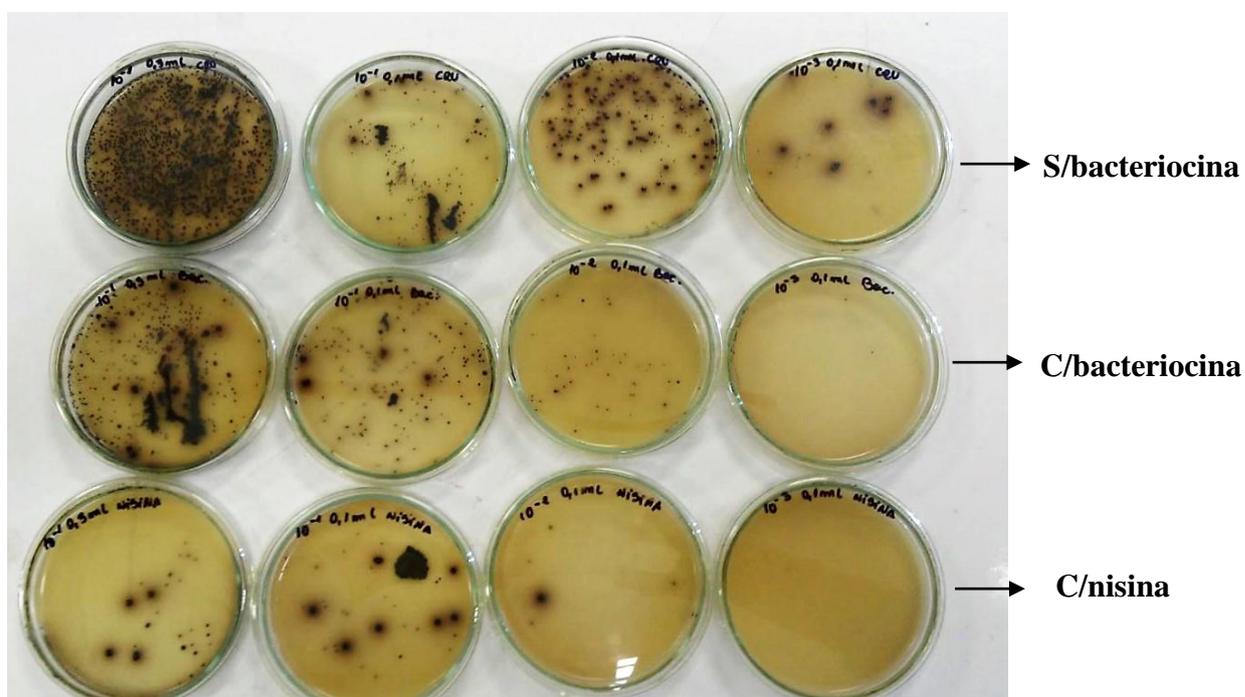
Apesar de ocorrer uma diminuição da contagem de colônias de patógenos também no queijo controle ocasionada pela ação do frio sobre os micro-organismos, há uma constante redução da carga microbiana causada pelos conservantes naturais. Pois, quando avaliados os dias separadamente observa-se que em relação ao queijo controle, com contagem média de  $1,4 \times 10^3$  UFC/g e os queijos com bacteriocina com contagem média de  $6,0 \times 10^2$  UFC/g, existe uma redução de 57,15% da contaminação. Ilustrando a ação da bacteriocina mesmo após os 30 dias de armazenamento.

Os estudos de Carvalho (2010) confirmam os resultados obtidos neste estudo para a diminuição da contagem do patógeno nos queijos controle, visto que sofre uma redução consideravelmente significativa em relação ao 1 e 14º dia de armazenamento ocasionada por injúrias pelo frio, pois a refrigeração altera o crescimento dos micro-organismos, assim o autor observa que a temperatura mínima de crescimento para a maioria dos micro-organismos está em torno de 10°C, ainda observa que os mesófilos não representam problemas, pois não se desenvolvem bem nessa temperatura. Entretanto, mesmo para os psicrófilos, quanto mais baixa for a temperatura, menor será a sua velocidade de crescimento. Assim, os alimentos sofrerão deterioração 10 vezes mais rápido a 10°C que a 5°C e 0°C.

Segundo Lancette e Bennet (2001), a concentração bacteriana de cepas toxigênicas de estafilococos coagulase positiva, necessária mínima para produção de enterotoxinas capazes de produzir intoxicações alimentares estafilocócica é de no mínimo  $10^5$  UFC/g. Por fim, observa-se que nenhum dos queijos produzidos tem essa capacidade, segundo a contaminação apresentada nos experimentos.

Da mesma forma que no presente estudo, nos experimentos de Felício (2013), Pinto (2008) e Teodoro (2012) a maior contagem de estafilococos coagulase positiva ocorreu no tratamento sem adição de bacteriocinas como conservante. Felício (2013) obteve, após 24 horas de inoculação, uma contagem de 8,12 log UFC/mL, já Pinto (2008) e Teodoro (2012), após 48 horas, a contagem foi de 8,75 log UFC/mL e 7,24log UFC/mL, respectivamente. O mesmo comportamento foi observado no estudo no qual o número de colônias diferiu consideravelmente em relação aos queijos com e sem adição da bacteriocina, como pode ser observado na Figura 11.

Figura 11 - Placas de Agar Baird Parker para o crescimento de estafilococos nos queijos nas diluições  $10^{-1}$  (0,3 mL e 0,1mL),  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , respectivamente.

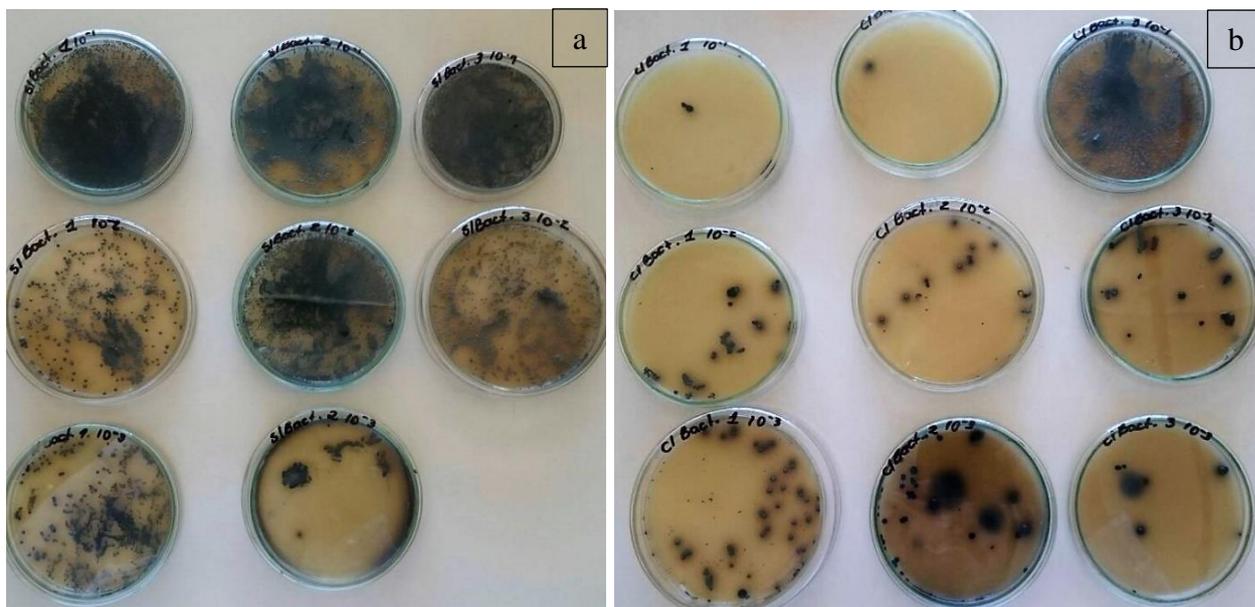


Fonte: Autora, 2017

Através da Figura 11, observa-se visualmente a diminuição das colônias formadas no Ágar Baird Parker, para os queijos com adição da bacteriocina estudada e adição da nisina, em relação ao queijo sem adição dos conservantes.

Para a confirmação dos resultados foi realizada a triplicata de queijos e as análises foram realizadas em duplicata. Para os queijos com adição da bacteriocina após 30 dias de armazenamento, observou-se uma diminuição significativamente menor em relação à contagem de colônias típicas e atípicas da triplicata de queijos controle. Figura 5 ilustra os resultados obtidos.

Figura 12 - Placas de Agar Baird Parker para o crescimento de estafilococos nos queijos nas diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , respectivamente para confirmação dos resultados



Nota: a – Placas da análise do queijo controle; b – placas das análises dos queijos com bacteriocina.

Fonte: Autora, 2017

Nas placas da confirmação dos resultados, na Figura 12, assim como na análise dos queijos teste, foi possível observar que a contagem de colônias dos queijos foi bem menor, sendo que a contaminação dos queijos controle por presença de estafilococos coagulase positiva passou de  $2 \times 10^5$  UFC/g no 30º dia de análise e para a triplicata de queijos e a contaminação das placas das análises com o queijos adicionados de bacteriocina tiveram média de  $7,1 \times 10^3$  UFC/g. Confirmando os resultados já encontrados nas queijos testes da ação conservadores da bacteriocina estudada em queijos conservados sob refrigeração a  $4^\circ\text{C}$ .

Felício et al. (2015) observaram uma redução de cerca de 1 log UFC/g na multiplicação de *S. aureus* na presença de nisina como conservador natural em queijos Minas Frescal após 30 dias a  $4^\circ\text{C}$ .

Como ilustrado por Alegria et al. (2010), a neutralização dos extratos dos sobrenadantes para a caracterização da atividade inibitória das culturas antagonistas, permite descartar um possível efeito inibidor dos ácidos orgânicos produzidos pelas culturas frente aos micro-organismos indicadores utilizados. Assim, foi feito o ajuste de todos os extratos para pH 7,0, para inibir a ação do pH.

Jay (2005) descreve que a razão para a inibição do crescimento microbiano a baixas temperaturas é devido às reações metabólicas dos micro-organismos que são

catalisadas por enzimas e a taxa de reação catalisada enzimaticamente diminui, dependendo da temperatura. Nessa perspectiva, a redução da temperatura causa uma diminuição das taxas de reação.

Lino e Lino (2014) observaram que o grupo dos estafilococos tem uma temperatura mínima de crescimento de 7°C, ilustrando assim o motivo do decréscimo da contagem de bactérias desse grupo no queijo controle após 30 dias de armazenamento. Mesmo assim, ainda com a diminuição causada pelo frio na contagem desse grupo de bactérias foi possível observar a ação da bacteriocina após os 30 dias de armazenamento.

#### 4.3.2 Contaminação por Coliformes termotolerantes em queijo minas frescal

As análises de coliformes exigidas pela legislação brasileira é a de Coliformes termotolerantes, para queijo Minas frescal. Os termotolerantes crescem a 44,5±0,2°C e dentro desse grupo de micro-organismos, o maior representante é a *Escherichia coli* (VALSECHI, 2006).

A Tabela 9, ilustra os valores de contagem de coliformes termotolerantes através da análise de número mais provável, os queijos com nisina foram produzidos para comparação dos resultados.

Tabela 9 - Contaminação por coliformes termotolerantes

Dias de análises	Queijo controle	Queijo com bacteriocina	Queijo com Nisina
	Colif. Termot. (NMP/g)	Colif. Termot. (NMP/g)	Colif. Termot. (NMP/g)
1º Dia	460 <sup>a</sup>	<3,0 <sup>b</sup>	23 <sup>b</sup>
14º Dia	<3,0 <sup>a</sup>	<3,0 <sup>a</sup>	<3,0 <sup>a</sup>
30º Dia	3,6 <sup>a</sup>	<3,0 <sup>b</sup>	3,6 <sup>a</sup>

**Notas:** letras iguais na linha representam valores sem diferença significativa com p< 0,05 em teste Tukey.

Fonte: Autora, 2017.

Através dos resultados expostos observa-se uma semelhança significativa entre a ação da bacteriocina estudada e a nisina, apresentando uma ação bastante positiva em relação à contagem de coliformes no queijo sem a adição da bacteriocina. Apesar de todos os queijos apresentarem contagem menor que a estabelecida pela legislação brasileira (5x10<sup>2</sup> NMP/g), é possível observar ainda assim, uma ação inibitória da bacteriocina estudada. Com diferença significativa entre as análises do queijo com

bacteriocina no 30º dia em comparação aos demais queijos, sendo possível observar que a bacteriocina manteve sua ação estável ao longo do tempo de armazenamento.

Nas análises de confirmação dos resultados os queijos produzidos não apresentaram nenhum tubo positivo na análise com caldo EC, contudo a tabela dos resultados de NMP/g apresentada por Silva et al. (2010) descreve esse valor como <3,0 NMP/g. Sendo o mesmo valor para as duas triplicatas de queijos elaboradas.

A contaminação por coliformes pode ser proveniente de sanitizações impróprias das superfícies e equipamentos da planta de processo, contaminações no momento da ordenha e por meio de águas contaminadas, assim sua presença em alimentos reflete a qualidade (CARVALHO, 2003). Esse micro-organismo é responsável por estufamentos precoces em queijos, que são caracterizados pela produção de gás H<sub>2</sub> em 1 a 2 dias após a sua fabricação (FOX et al., 2000).

No meio seletivo para coliformes termotolerantes incubados à temperatura de 45°C, observou-se a presença desse grupo de micro-organismos pela produção de gás, resultado da fermentação da lactose, aprisionado no interior dos tubos de Durham no meio Caldo EC, com sais biliares na sua composição, o que faz com que iniba o crescimento de micro-organismos Gram-positivos.

Salloti et al. (2006), após analisarem queijos minas frescal industrializados e artesanais, verificaram a presença de coliformes a 45°C em 100% das amostras, do total 83,3% dos artesanais e 66,7% dos industrializados foram condenados como impróprios ao consumo.

Rocha et al. (2006) encontraram um aumento da contaminação por *E. coli* em linhas de processamento de queijos minas frescal quando utilizaram derivados produzidos com leite fluído pasteurizado constataram um aumento de 2 log UFC/g e quando utilizaram leite cru no processamento dos queijos houve um aumento de 4 log UFC/g. Confirmando assim a influência da pasteurização na concentração final dos micro-organismos no produto. Segundo Langoni et al. (2006), o leite cru pode apresentar-se contaminado pela bactéria *E. coli* assim como por outros agentes patogênicos em decorrência de ordenha de animais não sadios.

Segundo os estudos de Siqueira et al., (2010) indicam que queijos minas frescal comercializados no Brasil são amplamente contaminados, confirmando a ausência de boas práticas e utilização de matéria prima de baixa qualidade na fabricação dos derivados seja na indústria ou em produções artesanais.

No estado do Rio Grande do Sul, Zaffari et al. (2007) constataram a presença de coliformes termotolerantes acima dos padrões preconizados pela legislação em 84% dos produtos analisados produzidos no estado.

A utilização de leite cru ou que recebe um tratamento inadequado na produção de queijos é uma via de transmissão importante do patógeno *E. coli*, esse micro-organismo não apresenta resistência a temperaturas elevadas e assim é sensível a faixa acima de 60°C em poucos segundos, porém algumas cepas podem resistir por longos períodos quando expostos em temperatura de refrigeração (SILVA et al., 2010).

#### **4.3.3 Presença de *Salmonella* em queijo minas frescal**

Nos queijos produzidos para o estudo, não foram observadas colônias típicas ou atípicas de *Salmonella* no ágar XLD, HE e BS, assim a análise foi interrompida com a decisão da ausência de *Salmonella* nas amostras.

De acordo com a RDC 12, de 2001 (ANVISA), qualquer alimento deve estar livre de *Salmonella* em porções de 25g. Apesar disso, esse micro-organismo é comumente encontrado em derivados lácteos e tem sido relatado em diferentes estados do país, principalmente em alimentos de produção artesanal, nos quais o agente patogênico é associado à precariedade de higiene durante a fabricação do produto (PEREIRA et al. 1999).

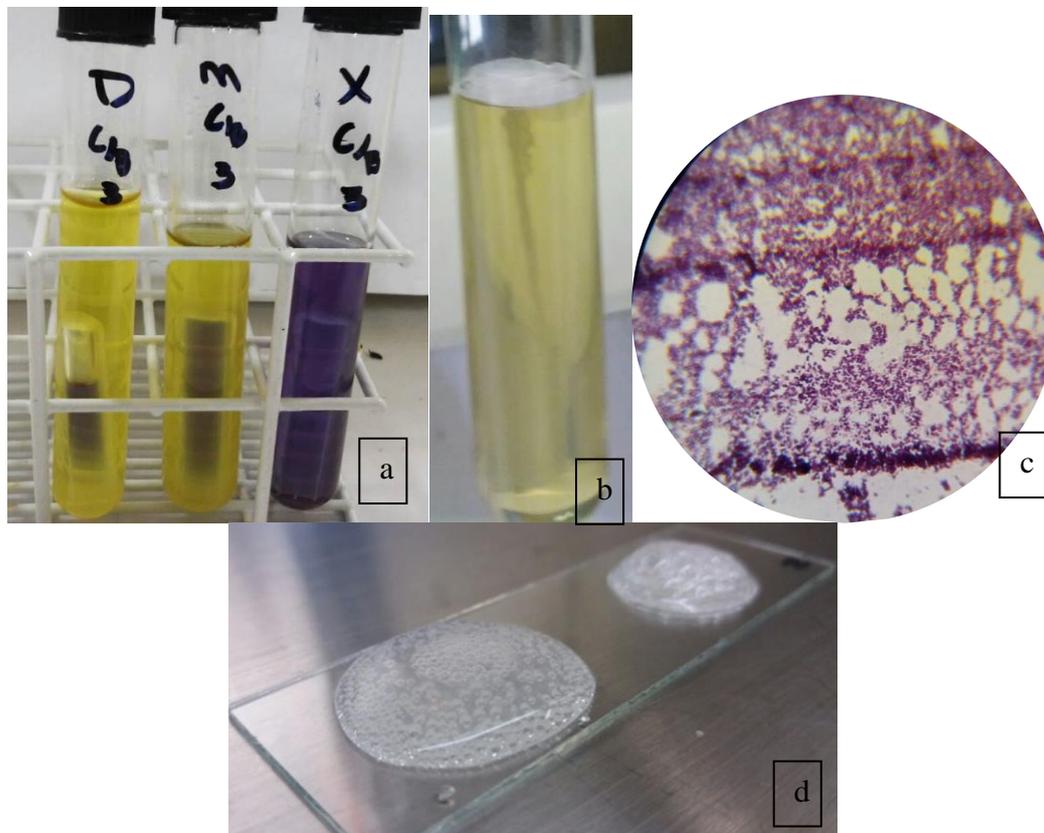
#### **4.3.4 Presença de *Listeria* em queijo minas frescal**

Para as amostras de queijo em que foram realizadas as análises não foram observadas cepas de *Listeria* no 1º dia de conservação nem no 30º dia, contudo as análises do dia 14º, mostraram resultados positivos para essa análise. Mostrando a presença dos micro-organismos nos queijos, tornando o alimento impróprio ao consumo, pois conforma a resolução RDC 12 de 2001 da ANVISA que exige ausência desse micro-organismo em 25 g de alimento.

Através da análise da triplicata para confirmação dos resultados foram encontradas colônias de *Listeria* em todos os queijos produzidos, não obstante, para os queijos com adição da bacteriocina a presença foi confirmada apenas nas análises do 30º dia de armazenamento, nas análises do 1º dia a presença não foi confirmada. Esse fato pode ter ocorrido por presença muito baixa de colônias do micro-organismo nos alimentos, assim quando retirada a amostra por vezes é possível que a parte que é

utilizada na análise não contenha o micro-organismo. A Figura 13 mostra os testes bioquímicos realizados para confirmação da presença de *Listeria* nos queijos.

Figura 13 - Testes bioquímicos para confirmação de *Listeria*



Nota: (a-teste de fermentação de carboidratos; b-motilidade; c-coloração de Gram; d-teste de catalase)

Fonte: Autora, 2017

Os resultados encontrados condizem com os estabelecidos por Jay (2005) e Gasanov (2005) que estabelecem que esse micro-organismo é representado por bastonetes Gram-positivos como observado pelo teste de coloração de Gram, podem ser considerados psicrotróficos, devido a sua capacidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração de 2 a 7°C. Em temperaturas de 25°C apresenta motilidade e capacidade de fermentação da glicose e outros carboidratos com a produção de ácido, contudo sem a produção de gás.

Apesar da capacidade de se desenvolver em baixas temperaturas é termosensível, sendo assim, facilmente destruído na pasteurização. Esse micro-organismo tem a capacidade de produzir enzimas extracelulares (lipases e proteases) que são termoresistentes. É um micro-organismo muito importante em produtos que são conservados sob refrigeração por período entre 1 a 4 semanas (PERRY, 2004).

Hemanns (2013) encontrou halos de inibição contra *S. aureus* de 15,83 mm até um máximo de 30,62 mm quando utilizadas BAL nativas isoladas de leite e queijos artesanais da fronteira Noroeste do RS. Outros autores como Nero et al. (2008) também observaram o potencial antagônico de 360 colônias de BAL isoladas de leite cru e observaram que 25,3% mostraram atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* e apenas 9,2% demonstraram antagonismo contra *Salmonella*.

## 5 CONCLUSÃO

Através da análise de estabilidade da atividade antimicrobiana da bacteriocina foi possível concluir que a bacteriocina permanece estável mesmo com as variações elevadas de temperatura e pH mais próximos da neutralidade, no processo de armazenamento da bacteriocina por 24 horas. Assim, observa-se que a atividade inibitória da bacteriocina frente ao micro-organismo *S aureus* foi observada para os tratamentos 3, 4, 6, 8 e 11, com nível aproximado de 100% de inibição sem diferença significativa entre os tratamentos com  $p > 0,05$ .

Observa-se que a bacteriocina mesmo em condições desfavoráveis (pH 4,5 e T 18°C; pH 4,0 T 52°C) não foi desestabilizada completamente apresentando valores de 46,4% de inibição frente a esses micro-organismos. A ação inibitória da bacteriocina frente a *E. coli* foi observada para os tratamentos 3 (pH 4,5 T 86°C), 4 (pH 7,0 T 86°C), 6 (pH 7,5 T 52°C), 8 (pH 5,9 T 100°C) e os pontos centrais 9, 10 e 11 (pH 5,9 T 52°C) com aproximadamente 100% de inibição sem diferença significativa com  $p < 0,05$  para os tratamentos. Assim como para os micro-organismos Gram positivos, a ação da bacteriocina frente a *E. coli* não foi inativada completamente, porém foram observados valores de inibição menores que 50% para o tratamento 5 (pH 4,0 e T 52°C)

Os testes preliminares *in vitro* realizados com a bacteriocina demonstraram a ação inibitória do composto frente aos micro-organismos *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* em teste de microplacas. Conclui-se que a produção da bacteriocina pela BAL se dá ao longo do tempo de fermentação e interfere diretamente na concentração do composto no extrato, observando-se que os melhores resultados de inibição do *S. aureus* e da *E. coli* foram para um tempo de fermentação de 72 horas, representados por 86,90% e 100% de inibição, respectivamente. Apesar de resultados mais baixos de inibição, a bacteriocina apresentou ação contra o desenvolvimento de todos os micro-organismos testados com o extrato fermentado por 24 horas.

Através dos dados obtidos com as análises realizadas foi possível observar a eficiência da bacteriocina quando administrada na formulação de queijos Minas Frescal, diminuindo aproximadamente 78,5% da contagem de bactérias do grupo estafilococos coagulase positiva, no produto em comparação aos queijos controle para o 1º dia de análise. Verificou-se ainda a semelhança entre a bacteriocina estudada e a

nisina, apresentados valores significativamente iguais para um  $p > 0,05$  nas análises do 14º dia. Para o teste contra o grupo de coliformes termotolerantes foi observada uma diminuição significativamente menor para os queijos com a presença da bacteriocina estudada nos queijos.

Conclui-se ainda que mesmo com ação inibitória da bacteriocina nos queijos eles não estavam aptos ao consumo conforme a RDC 12/2001, porém observa-se uma elevada contaminação inicial dos queijos produzidos com leite cru e sem a adição dos conservantes, o que dificulta a ação da bacteriocina na inibição de uma elevada contaminação.

Assim, através dos resultados de inibição encontrados com a utilização desse composto é possível observar que a bacteriocina produzida pelo *Lactobacillus sakei* estudado, tem grande potencial para aplicação em alimentos como o queijo Minas Frescal e em alimentos com pH variando de 4,5 a 7,5 que recebam tratamento térmico.

## TRABALHOS FUTUROS

Como trabalhos futuros, observa-se a necessidade de uma avaliação maior da forma de produção da bacteriocina com um acompanhamento da cinética de crescimento da bactéria ácido láctea correlacionado às fases de seu crescimento com a produção da bacteriocina.

Observa-se ainda a necessidade da identificação da bacteriocina produzida pelo *Lactobacillus sakei* isolado de salame italiano, para que mais estudos possam ser voltados diretamente às características próprias do composto.

A estabilidade da bacteriocina a variações de concentrações de sais dissolvidos no meio também é um parâmetro importante para a avaliação da sensibilidade da bacteriocina, observando assim em quais alimentos essa pode ser utilizada.

## REFERÊNCIAS

- AGENTES ANTIMICROBIANOS QUÍMICOS E NATURAIS. **Food Ingredients Brasil**. n. 15, 2010. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/155.pdf>>. Acesso em: 19 mai. 2017.
- ALEGRIA, A. et al. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 143, p. 61-66, 2010.
- ALMEIDA FILHO, E. S. de; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “Frescal”. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 6, p. 578-580, 2000.
- ANDREWS W. H; HAMMACK, T. S. *Salmonella*. In: Food and Drug Administration, **Bacteriological Analytical Manual Online**. Cap. 5, 2007. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>>. Acesso em: 16 jun. 2017.
- ANVISA. Resolução - RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. 2001.
- APOLINÁRIO, T. C. C; SANTOS, S. S; LAVORATO, J. A. A. Evaluation of the microbiological quality of Minas Cheese produced by dairies in the state of Minas Gerais. **Revista Instituto de Laticínicos Cândido Tostes**, v. 69, n.6, p.433-442, 2014.
- ARQUÉS, J. L. et al. Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in Milk. **Food Control**, v. 22, p. 457-461, 2011.
- ASAO, T. et al. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology and Infection**, v. 130, p. 33-40, 2003.
- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S; VON WRIGHT, A; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects**, New York: Marcel Dekker, 2004, p. 1-66.
- AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: SALMINEN, S; VON WRIGHT, A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects**. New York: Marcel Dekker, 1998, pp. 1-72.

BALBANI, A. P. S; BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. **Revista Pediatria**. v. 4, n. 23, p. 320-328, 2001.

BALCIUNAS, E. M. et al. Novel biotechnological application of bacteriocins: A review. **Reviews Food Control**. v. 32, p.134-142, 2013.

BARBOSA, M. S. **Avaliação da ação de ingredientes da matriz alimentar na atividade antilisteria das bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a**. 2009, p. 117. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BARBOSA, M. S. Bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas em salame: isolamento, caracterização, encapsulação e aplicação no controle de *Listeria monocytogenes* em salame experimentalmente contaminado. 2013, 205p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

BARRANCELLI, G.V. et al. *Listeria monocytogenes*: Ocorrência em Produtos Lácteos e suas Implicações em Saúde Pública. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.78, n.1, p.155-168, 2011.

BARROS, M.R.; ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E.T. and CROCCI, J.A. 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**, v.61, n.4, p.863-868, 2009.

BASTOS, M. 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**. v. 57, p.130-136, 2001.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 3, p.1-20, 2004.

BORGES, M. F. et al. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. **Boletim do CEPPA**, v. 26, n. 1, p. 71-86, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. Portaria n. 352, de 4 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação e Qualidade de Queijo Minas Frescal. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 8 set. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria n. 146 de 07 de março de 1996. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 11 mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa n. 4 de 1 de março de 2004. Inclusão do termo “Muito” na definição do queijo Minas frescal no Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal, **Diário Oficial [da] União**, Brasília, 5 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Seção 1. p. 45-53. 2001.

BORGES, M. F; BRANDÃO, S. C. C; PINHEIRO, A. J. R. Sobrevivência de *Salmonella* em queijo Minas padronizado durante a maturação. **Revista de Microbiologia**, v. 20, n. 3, p. 276-281, 1990.

BRUNO, L. M; CARVALHO, J. D. G. **Microbiota Láctica de Queijos Artesanais**, Embrapa Agroindústria Tropical, v. 124, n. 1, 2009.

BULCHOLDZ, K. Q. Desenvolvimento de bioconservante natural para aplicação em alimentos. 2014. XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Anais.... Florianópolis SC. 2014.

CÂMARA, S. A. V. **Fatores de risco para câncer de estômago: Avaliação dos teores de nitrato e nitrito em linguças**. 2006, p. 106. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2006.

CAMARGO, R. G. Ação de bacteriocinas de bactérias lácticas no controle de *Listeria monocytogenes* e no aumento de vida de prateleira de mortadela fatiada. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Paulo, 2011.

CARRIQUEMAS, J. J. M.et al. Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese – an outbreak listeriosis? **Epidemiology and Infection**, v. 130, n.1, p. 79-86, Londres, Inglaterra, 2003.

CARR, F. J; CHILL, D; MAIDA, N. The acid lactic bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, 2002.

CARVALHO, J. D. G. **Avaliação da qualidade de queijos tipo Minas Frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas -SP.** 2003, p. 107. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CARVALHO, I. T. Microbiologia dos Alimentos. Programa escola aberta do Brasil (ETEC-Brasil). Ministério da Educação, 84 p., 2010.

CDC – Center for Disease Control and Prevention. **Food Safety – Foodborne germs and Illness.** 2016. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>>. Acesso em: 11 abr. 2017.

CDC – Center for Disease Control and Prevention. **Out break of Listeria monocytogenes infections associated with pasteurized milk from a local dairy – Massachusetts, 2007.** Morbidity and Mortality Weekly Reports, v. 57, n. 40, p.1097-1100, Atlanta, EUA, 2008.

CHAPAVAL, L. et al. An alternative method for *Staphylococcus aureus* DNA isolation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 299-306, 2008.

CHARLIER, C. et al. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story new perspectives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, p. 30-39, 2009.

CHEN, H; HOOVER, D.G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, p. 82-100, 2003.

CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.1-20, 2001.

COSTA, A. C. C. C. **Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e avaliação de sua atividade frente a patógenos alimentares em sistema de bioconservação de produto lácteo.** 2016. 65p. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Goiás. Goiania, 2016.

COTTER, P. D; HILL, C; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p.777-788, 2005.

DAESCHEL, M. Applications and interactions bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. In: DAESCHEL, M. **Bacteriocins of lactic acid bacteria.** New York: Academic Press, 1992, p. 17-43.

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

DELGADO, A. et al. Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of 4% de NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. **Journal of Biotechnology**, v. 130, p. 193-201, 2007.

DIMITRIEVA-MOATS, G. Y.; ÜNLÜ, G. Development of Freeze-Dried Bacteriocin-Containing Preparations from Lactic Acid Bacteria to Inhibit *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. **Probiotics & Antimicrobial Proteins**, [S. l.] v. 4, p. 27-38, 2012.

ECKNER, K. F. Bacteriocins and food applications. **Dairy, Food and Environmental sanitation**, v. 12, n. 4, p. 204-209, 1992.

FELÍCIO, B. A. **Efeito inibitório de diferentes concentrações de nisina sobre *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Frescal**. 2013, p. 57. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Universidade Federal de Minas Gerais. Montes Claros, 2013.

FELICIO, B. A.; PINTO, M. S.; OLIVEIRA, F. S.; LEMPK, M. W.; PIRES, A. C. S.; LELIS, C. A. Effects of nisin on *Staphylococcus aureus* count and physicochemical properties of minas frescal cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, p. 4364-4369, 2015.

FEITOSA, T; BORGES, M. F; NASSU, R. T. Pesquisa de *Salmonella sp.*, *Listeria sp.* e microrganismos indicadores higiênico sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 162-165, 2003.

FERREIRA, R. M. et al. Quantificação de coliformes totais e termotolerantes em queijos Minas Frescal artesanal. **PUBVET**, v. 5, n. 5, art 1022, 2011.

FERREIRA, M. A. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Staphylococcus aureus* isolados de queijo minas frescal industrial e artesanal**. 2015, p. 110. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Saúde). Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2015.

FILHO, N. J. P. **Atividade de bacteriocinas bovina HC5 e nisina sobre *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Frescal**. 2010. 71p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2010.

FONSECA, B. C. P; REIS, J. N; SANTOS, M. S. Avaliação microbiológica de produtos lácteos comercializados na cidade de vitória da conquista-Bahia. **Revista Saúde.Com.** v. 12, n.2, p. 575-583, 2016.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar.** In: GUIMARÃES, M. C. M; LEONHARDT, V. (Traduzido). Porto Alegre: Artmed, 2002.

FOX, P. F, et al. **Fundamentals of cheese science.** Massachusetts: Kluwer Academic, 587 p., 2000.

FLOWERS, R. S. et al. Pathogens in milk and milk products. In: MARSHALL, R. T. **Standard methods for the examination of dairy products.** Washington: American Public Health Association, 2005. p. 103-212.

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

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos:** causas e prevenção. São Paulo: Fonte, 1999.

GÁLVEZ, A. et al. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology,** v.120, p. 51-70, 2007.

GÁLVEZ, A. et al. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology,** v.28, p.125-152, 2008.

GASANOV, U. Methods for the isolation and identification of listeria monocytogenes: a review. *Fems Microbiology Review,* Amsterdam, v. 29, p.851-875, 2005.

GAVA, A. J; SILVA, C. A. B; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de Alimentos:** Princípios e Aplicações. Sexta edição. São Paulo: Nobel, 2008.

GONSALVES, S. M. L. Identificação e caracterização de bactérias do ácido láctico isoladas de um produto cárneo fermentado tradicional e do ambiente fabril. 94 p. 2009. Dissertação (Mestrado em Segurança alimentar). Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2009.

GRANDE, M. J. et al. Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice based foods by enterocin AS-48. **International Journal of Food Microbiology.** v. 106, p. 185-194, 2006.

HASSAN, M. et al. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. Review article. **Journal of Applied Microbiology**, n.113, p. 723-736, 2012.

HERMANN, G. **Potencial bacteriocinogênico e probiótico de bactérias ácido lácticas isoladas de leite e queijos artesanais**. 2013, p. 101. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

LINO, G. C. L.; LINO, T. H. L. Congelamento e Descongelamento. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 25 p., 2014.

HITCHINS, A. D. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. In.: US Food and Drug Administration (FDA), **Bacteriological Analytical Manual Online**. Cap. 10, 2003. Disponível em:  
<<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm>>.  
Acesso em: 16 de jun. 2017.

HOLZAPFEL, W. H.; GEINSEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, p. 343-362, 1995.

HURST, A. Nisin. **Advanced Applied Microbiology**, n. 27, p. 85-123, 1981.

JACXSSENS, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Temperature dependence of shelf life as affected by microbial proliferation and sensory quality of equilibrium modified atmosphere package fresh produce. **Postharvest Biology and Technology**, v. 26, n. 1, p. 59-73, 2002.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Sexta edição. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern Food Microbiology**. 7 ed. New York: Springer, 2005.

JOZALA, A. F. et al. Nisin production utilizing skimmed milk aiming to reduce process cost. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 136, p. 515-528, 2007.

KABUKI, D. Y. **Rastreamento de *Listeria monocytogenes* em indústrias processadoras de queijo fresco tipo hispânico dos Estados Unidos, utilizando subtipagem molecular**. 2004, p. 145. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

KAWAI, Y. et al. Structural and Functional Differences in Two Cyclic Bacteriocins with the Same Sequences Produced by Lactobacilli. **Applied and Environmental Microbiology**, n.70, p. 2906-2911, 2004.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Review**, n. 12, p. 39–85, 1993.

KLEIN, G. et al. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, n. 2, p. 103-125, 1998.

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.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON J. L. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. IN: DOWNES, F. P; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4 ed. American Public Health Association, Washington, 2001. Cap. 8, p. 69-82.

KURBANOGLU, E. B.; ALGUR, O. F. Utilization of ram horn hydrolysate as a supplement for recovery of heat- and freeze-injured bacteria. *Food Control*, v.17, p. 238-242, 2006.

LANCETTE, G. A; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES F. P; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4 ed. American Public. Health Association, Washington, 2001. Cap. 39, p. 387-403.

LANGONI, H. DOMINGUES, P.F. BALDINI, S. Mastite caprina: seus agentes e sensibilidade frente a antimicrobianos. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, v 13, n. 1, p. 51-54, 2006.

LEROY, F; VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends Food in Science and Technology**, v. 15, p. 67-78, 2004.

LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, n. 13, p. 145-150, 1991.

LIU, W; HANSEN, J. N. Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 2551-2558, 1990.

- LISERRE, A. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* strain in modified atmosphere-packaged brazilian sausage. **Meat Science**, v. 61, n° 4, p. 449 – 455, 2002.
- LOGUERCIO, A. P; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijos tipo Minas Frescal produzidos artesanalmente. **Ciência Hoje**, v. 31, n. 6, p. 1063-1067, 2001.
- LOUREIRO, D. S. P. M. Estudos da bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum* B391 para potencial utilização na Indústria. Defesa de Mestrado, Instituto politécnico de Viana do Castelo, 2015.
- LÓPEZ, M. M. et al. Are bacteriocins underexploited? Novel applications for old antimicrobials. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, n.12, p. 1205-1220, 2011.
- MACHADO, T. F; BORGES, M. F; BRUNO, L. M. **Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos**: Documentos 145. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. 2011. 32p.
- MAPA. PORTARIA Nº 359, de 04 de setembro de 1997. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão ou Requesõn**. 4 set. 1997.
- MAROTI, G. et al. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 4. p. 363-374, 2011.
- MARTINS, E. **Associação de bacteriocinas e bactérias lácticas para inibição de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Frescal**. 2012. 49p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2012.
- MARTINS, E; MOURA, C. **Manual técnico na arte e princípios da fabricação de queijos**. 2. ed. Alto Piquiri: Campana, 2010. p. 14-16, 65.
- MELO, N. R; SOARES, N.F. F; GONÇALVES, M.P.J.C. Nisina: um conservante natural para alimentos. **Revista Ceres**, v. 52, n. 303, p. 921-938, 2005.
- MENEZES, L. D. M; PENA, E. C; SOUZA, V. F; Avaliação microbiológica do queijo Minas artesanal produzido em Minas Gerais em 2008. In: XVI Encontro Nacional e II Congresso latino-americano de analistas de alimentos, 2009, Belo Horizonte. **Anais...**, Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 2009.

MERCOSUL. **Regulamento técnico do MERCOSUL de identidade e qualidade de queijo Minas frescal**. Fortaleza, 13 dez. 1996a.

MERCOSUL. **Regulamento técnico MERCOSUL de identidade e qualidade do requeijão**. Brasília, 11 out. 1996b.

MILLS, S. et al. New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. **Annual Review of Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 2, p. 299-329, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. **Doenças Transmitidas por Alimentos: VE/DTA 2000-2015**. 2016a. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/marco/10/Apresenta---o-dados-gerais-DTA-2016.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. 2016b. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/09/Apresentacao-Surtos DTA-2016.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. **Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 158 p.

MORENO, I. et al. Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis*. *Journal of Microbiology*, v. 31, p. 184-92, 2000.

MOREIRA, M. R. et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT- Food Science and Technology**, v. 38, n. 5, p. 565-570, 2005.

MORENO, I; LERAYER, A.L. S; LEITÃO, M.F.F. **Bacteriocinas de bactérias lácticas: Utilização em laticínios e fatores que afetam a sua eficiência**. 2008. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_3/bacteriocinas/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_3/bacteriocinas/index.htm)>. Acesso em: 21 abr. 2017.

MORTVEDT, C. I. A; et al. Production and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantiotic from *Lactobacillus sakei*L45. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 175-179, 1995.

NASCIMENTO, M. S. **Caracterização da atividade antimicrobiana e tecnológica de três culturas bacteriocinogênicas e avaliação de sua eficiência no controle de *Listeria***

*monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* em queijo Minas Frescal. 2007, 184 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

NASCIMENTO, M. S; MORENO, I; KUAYE, A.Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, p. 120-127, 2008.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard— Eighth Edition. NCCLS document M2-A8. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NERO, L. A. et al. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. In raw milk produced in Brazil: occurrence and interence of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, p. 229-305, 2008.

NES, I. F; YOON, S. S; DIEP, D. B. Ribosomally Synthesiszed Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria: A Review. **Food Science and Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 675 - 690, 2007.

NETTLES C.G; AREFOOT, S.F. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food associated lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**. v.56, n. 4, p. 339–356, 1993.

NETO, A. C; SILVA, C. G. M; STANFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 263-271, 2002.

NISINA UM CONSERVANTE ALIMENTÍCIO NATURAL. **Aditivos & Ingredientes**.

Disponível em:

<[http://aditivosingredientes.com.br/upload\\_arquivos/201610/2016100943561001477573436.pdf](http://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201610/2016100943561001477573436.pdf)>. Acesso em: 22 maio 2017.

NOGUEIRA, J. M. R; MIGUEL, L. F. S. Bacteriologia. In: MOLINARO, E. M; CAPUTO, L. FL. G; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2009. 496 p.

NOONPAKDEE, W. et al. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from ham, a traditional thai fermented sausage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 137-145, 2003.

O'SULLIVAN, L. et al. Bacteriocins: changes in cheese flora and flavour. In: WEIMER, B. C. **Improving the flavour of cheese**. Cambridge: Wood head Publishing. v. 15, p. 326-342, 2007.

OLIVEIRA, M. J; ARAÚJO, W. M. C; BORGIO, L. A. Quantificação de nitrato e nitrito em linguiças do tipo frescal. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n. 4, 2005.

ONDA, T. et al. Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus spp.* strain GM005, isolated from miso-paste. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, n. 15, p. 153-159, 2003.

ORTOLANI, M. B. T. **Bactérias ácido lácticas autóctones de leite cru e queijo Minas Frescal: isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular**. Viçosa: 2009. 123p. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

OS CONSERVANTES MAIS UTILIZADOS EM ALIMENTOS. **Aditivos & Ingredientes**.

Disponível em:

<[http://aditivosingredientes.com.br/upload\\_arquivos/201601/2016010485708001453470366.pdf](http://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201601/2016010485708001453470366.pdf)>. Acesso em: 22 mai. 2017.

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. 3, p. 521-542, 2007.

PEREIRA, M. L. et al. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte [on line], v. 51, n.5, 427-431., out., 1999. Disponível na World Wide Web: <<http://www.scielo.br>>.

PERRY, K. S. P. **Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos**. Química Nova, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PIN TO, M. S. **Efeito da microbiota endógena e da nisina sobre *Listeria spp* e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas artesanal do Serro**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 71 f. 2008.

PREZZI, L. E. **Efeito da adição de *Lactobacillus rhamnosus* em queijos Minas frescal sobre as contagens de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes***. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2014.

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

RIBEIRO, M. G. et al. Fatores de virulência em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de mastite bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p.724-731, 2006.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo minas frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.

RODRIGUES, M. I; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Campinas: Casa do Pão Editora, 1ª ed., 2005.

ROSA, C. M; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocinas de bactérias lácticas. **Con. Scientia e Saúde**, v. 1, p. 9-15, 2002b.

ROSA, C. M.et al. Purification and mechanistic action of a bacteriocin produced by a Brazillian sausage isolated, *Lactobacillus sakei*, 2a. **Journal of Food Safety**. v. 22, p. 39-54, 2002a.

ROSA, C. M. Purificação e mecanismo de ação de uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake* 2ª isolado de linguiça frescal. 2001. 98 p. Tese (Doutorado em Ciência Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

ROSS, R. P; MORGAN, S; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, p. 3-16, 2002.

ROSSI, L. M.et al. Research advances in the development of peptide antibiotics. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 97, p. 1060-1070, 2008.

SALOTTI, B. M. et al. Qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n. 2, p. 171-175, 2006.

SILVA, R.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; MOURA, M. M. L.; CARVALHO, L. M. J.; WATER, E. H. M.; SANT'ANA, A. Pasteurized milk: efficiency of pasteurization and its microbiological conditions in Brazil. *Foodborne Pathogenes and Disease*, v.7, n.2, 2010.

SCHLEIFER, K.H; LUDWIG, W. Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. In: WOOD, B.J.B., HOLZAPFEL, W.H. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**, Londres: Chapman & Hall, 1995. v. 2, p. 7-18.

SCHNEIDER, K. **Aplicação de bactérias lácticas com ação antimicrobiana em queijo Minas Frescal**. 2016. 91p. Dissertação (Mestre em Ciência e Biotecnologia) - Universidade do Oeste de Santa Catarina. Videira, 2016.

SHAH, N.P. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 4, p. 894-907, 2000.

SILVA, M. C. D; HOFER, E; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**. n. 61, v. 3, p. 354-356, 1998.

SILVA, F. T. **Queijo Minas Frescal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2005.

SIQUEIRA, K. B. et al. **O mercado lácteo brasileiro no contexto mundial**: Circular Técnica 104. Juiz de Fora: Embrapa, 2010.

SOUZA, A. D. F. **Caracterização da SAM 4244, um peptídeo bioativo com potencial aplicação como um biopreservativo em alimentos**. 2010. 134p. Dissertação (Mestre em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010.

SOUZA, N. B. et al. Purificação de baixa resolução de composto bioativo contra *Escherichia coli*. In: 8º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão. 2016. Uruguaiana, **Anais...**, – Universidade Federal do Pampa, 2016.

TEODORO, V. A. M. **Efeito da nisina na multiplicação de *Staphylococcus aureus* e nas características físico-químicas, reológicas e microbiológicas do queijo Minas artesanal da Serra da Canastra – MG**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 138 f. 2012.

TODOROV, S. D. Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolates from smoked salmon. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 971 – 986, 2011.

VALSECHI, O. A. **Microbiologia dos Alimentos**. 49 p. Universidade Federal de São Carlos. Araras, 2006. Disponível em:

<http://www.cca.ufscar.br/~vico/Microbiologia%20dos%20Alimentos.pdf>. Acesso em: 19 nov. 2017.

VIEIRA, A. P. **Aplicação de bacteriocinas de bactérias lácticas para controle de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal processado pelo método de acidificação direta.** 2011. 106p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2011.

VOULGARI, K. et al. Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. **Food Control**, v. 21, p. 136-142, 2010.

VUYST, L; CALLEWAERT, R; CRABBÉ, K. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocina production under unfavourable growth conditions. **Microbiology**, v. 142, n. 4, p. 817-827, 1996.

ZAFFARI, C. B; MELLO, J. F; COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 862-867, 2007.

ZAMFIR, M. et al. Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. **FEMS Microbiology Letters**, v. 190, n. 2, p. 305- 308, 2000.