

1 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
2 FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

3
4
5
6
7
8
9
10 CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL) ISOLADAS DE
11 QUEIJOS FRESCOS NÃO INSPECIONADOS COMERCIALIZADOS EM
12 BOTUCATU, SÃO PAULO
13
14
15
16
17
18

19 MARISE SANTIAGO VELAME
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 Botucatu – SP

35 2021

1 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
2 FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

3
4
5
6
7
8 CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL) ISOLADAS DE
9 QUEIJOS FRESCOS NÃO INSPECIONADOS COMERCIALIZADOS EM
10 BOTUCATU, SÃO PAULO

11
12
13
14
15 MARISE SANTIAGO VELAME

16
17
18
19
20 Dissertação apresentada junto ao
21 Programa de Pós Graduação em Medicina
22 Veterinária para obtenção do título de
23 Mestre

24
25
26
27 Orientador: Prof. Dr. Juliano Gonçalves
28 Pereira

29
30
31
32
33
34 Botucatu – SP

35 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Velame, Marise Santiago.

Caracterização de bactérias ácido lácticas (BAL)
isoladas de queijos frescos não inspecionados
comercializados em Botucatu, São Paulo / Marise Santiago
Velame. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Juliano Gonçalves Pereira
Capes: 50505009

1. Queijo - Contaminação. 2. Segurança alimentar.
3. Bacteriocinas. 4. Comercialização.

Palavras-chave: Bactérias ácido lácticas; Bacteriocina;
Bioconservante; Queijo; Segurança de alimentos.

Nome do autor: Marise Santiago Velame

Título: CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL) ISOLADAS DE QUEIJOS FRESCOS NÃO INSPECIONADOS COMERCIALIZADOS EM BOTUCATU, SÃO PAULO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Juliano Gonçalves Pereira

Presidente e Orientador

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Membro

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Kassandra Sussi Mustafé Oliveira

Membro

Departamento de Engenharia Rural e Socioeconomia

FCA – UNESP – Botucatu

Data da Defesa: 5 de maio de 2021

DEDICATÓRIA

1

2

3 Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas àqueles que têm
4 sido fundamentais na minha vida:

5 A Deus e a minha família, que com muito amor não mediram esforços para que
6 eu chegasse até esta etapa da minha vida, sempre me incentivando, acreditando e
7 investindo em mim.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida. Por me abençoar dia após dia, com muito mais do que eu mereço, sempre me dando saúde, coragem, força e sabedoria para superar os desafios, e por estar sempre iluminando o meu caminho.

Agradeço a minha mãe Ilma, a minhas tias Vera e Neuza e ao meu Tio José (Beto), por todo amor, carinho, incentivo, dedicação, cuidado, paciência, ensinamentos, conselhos, apoio... Não só nesta, mas em todas as minhas caminhadas pela vida.

A toda a Equipe de colaboradores do Serviço de Orientação a Alimentação Pública (SOAP), em especial, ao Sérgio por todo apoio, amizade e momentos de muitas risadas.

Aos Professores Otávio Augusto Martins e ao meu orientador Juliano Gonçalves Pereira, por contribuírem na minha caminhada rumo ao conhecimento.

Aos colegas Fernando, Marcos (Residentes) e Gustavo (Estagiário), por me ajudarem principalmente na reta final deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma direta ou indiretamente estiveram próximos, ajudando-me nesta jornada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

1

EPÍGRAFE

2

3

*“As suas orações **Deus escuta**, o teu coração **Deus conhece**, o seu futuro **Deus***

4

está cuidando.”

LISTA DE ABREVIACÕES

- 1
- 2
- 3 ATCC - *American Type Culture Collection*
- 4 AVC - Acidente vascular cerebral
- 5 BAL - Bactérias ácido lácticas
- 6 BHI - Caldo infusão cérebro coração
- 7 BPF - Boas práticas de fabricação
- 8 CCS - Contagem de células somáticas
- 9 DVA - Doenças veiculadas por alimentos
- 10 EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Ácético
- 11 FMVZ - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
- 12 FDA - *Food and Drug Administration*
- 13 GRAS - *Generally Recognized as Safe*
- 14 Hab - Habitantes
- 15 HPK - Proteína Histidina Quinase
- 16 IB - Instituto de Biociências
- 17 IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- 18 MALDI-TOF-MS - *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass*
- 19 *espectrometry*
- 20 MRS - *de Man Rogosa e Sharpe*
- 21 OMS - Organização Mundial da Saúde
- 22 PBS - *Phosphate Buffered Saline*
- 23 PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
- 24 RTIQ - Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade
- 25 SIE - Serviço de Inspeção Estadual
- 26 SIF - Serviço de Inspeção Federal

- 1 SIM - Serviço de Inspeção Municipal
- 2 SISBI - Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal
- 3 SOAP - Serviço de Orientação a Alimentação Pública
- 4 TSA - *Trypticase Soy Agar*
- 5 UA/mL - Unidades arbitrárias por mililitro
- 6 UFC - Unidades formadoras de colônias
- 7 UFPR - Universidade Federal do Paraná
- 8 UNESP - Universidade Estadual Paulista
- 9 USDA - *United States Department of Agriculture*

LISTA DE QUADROS

1

2

3	Quadro 1	Hábitos de consumo de leite e derivados no Brasil.....	74
4	Figura 1	Fluxograma das etapas analíticas.....	80

LISTAS DE TABELAS

1		
2		
3	Tabela 1	Zonas de inibição (em mm) da avaliação preliminar da atividade antagonista
4		de bactérias ácido lácticas (BAL) frente à patógenos.....45
5	Tabela 2	Temperatura ótima de produção de substâncias inibidoras (em unidades
6		arbitrárias/mL) por bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de queijos frescos não
7		inspecionados comercializados em Botucatu-
8		SP.....48
9	Tabela 3	Efeito do pH na produção de bacteriocinas (em unidades arbitrárias/mL)
10		produzidas por bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de queijos frescos não
11		inspecionados comercializados em Botucatu-
12		SP.....49
13	Tabela 4	Efeito da temperatura na produção de bacteriocinas (em unidades
14		arbitrárias/mL) produzidas por bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de queijos
15		frescos não inspecionados comercializados em Botucatu-SP.....50
16	Tabela 5	Determinação das espécies com potencial bacteriocinogênico.....51

SUMÁRIO

1		
2		
3	RESUMO.....	XIII
4	ABSTRACT	XIV
5	CAPÍTULO I.....	1
6	1 INTRODUÇÃO.....	1
7	2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
8	2.1 Queijos: Importância, estimativa de consumo e produção.....	4
9	2.2 Aspectos da segurança de alimentos na produção e comercialização de	
10	queijos inspecionados e clandestinos.....	6
11	2.3 Produção de queijos frescos.....	11
12	2.4 Bactérias ácido lácticas (BAL).....	14
13	2.5 Preservação de alimentos.....	16
14	2.6 Biopreservação na indústria de alimentos.....	18
15	2.6.1 Antimicrobianos de origem vegetal.....	18
16	2.6.2 Antimicrobianos de origem animal	20
17	2.6.3 Antimicrobianos de origem microbiana – bacteriocinas.....	21
18	2.6.4 Nisina.....	22
19	2.6.5 Pediocina.....	23
20	2.6.6 Colicinas.....	24
21	2.7 Bacteriocinas: histórico, definição, classificação, biossíntese e transporte e	
22	forma de ação.....	24
23	2.7.1 Histórico.....	24
24	2.7.2 Definição.....	25
25	2.7.3 Classificação.....	25
26	2.7.4 Biossíntese e transporte.....	27
27	2.7.5 Forma de ação das bacteriocinas.....	28
28	2.7.6 Mecanismos de resistência desenvolvidos.....	29
29	2.7.7 Critérios de seleção e segurança de bacteriocinas.....	30
30	CAPÍTULO 2.....	31
31	3 TRABALHO CIENTÍFICO.....	31
32	ABSTRACT.....	32
33	RESUMO.....	32
34	INTRODUÇÃO.....	33

1	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
2	Coleta de amostras e isolamento de BAL com potencial antimicrobiano.....	34
3	Confirmação de BAL.....	34
4	Avaliação da atividade antagônica de BAL pelo método “ <i>spot on the lawn</i> ”	34
5	Avaliação da atividade bacteriocinogênica de BAL - efeito antagônico do	
6	sobrenadante livre de células (SLC) de BAL.....	35
7	Confirmação da natureza proteica do SLC de BAL.....	35
8	Temperatura ótima de produção de bacteriocinas e diluição crítica.....	35
9	Efeito do pH sobre a produção de bacteriocinas por BAL.....	36
10	Efeito da temperatura sobre a produção de bacteriocinas por BAL.....	36
11	Avaliação do espectro de inibição do SLC de BAL.....	36
12	Determinação das espécies bacterianas confirmadas como produtoras de	
13	bacteriocinas.....	36
14	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
15	CONCLUSÃO.....	40
16	REFERÊNCIAS.....	40
17	TABELAS.....	45
18	4 CONCLUSÕES GERAIS.....	52
19	5 BIBLIOGRAFIA.....	53
20	6 ANEXOS.....	65
21	Normas de publicação.....	65
22	Quadro 1.....	74
23	Figura 1	80
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		
31		
32		
33		
34		

VELAME, M.S. **Caracterização de bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de queijos frescos não inspecionados comercializados em Botucatu, São Paulo.** Botucatu, 2021. 100 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Na produção de alimentos fermentados, as bactérias ácido lácticas (BAL) podem ser utilizadas como culturas *starters* na obtenção de efeitos tecnológicos, sensoriais e funcionais desejáveis. Além disso, algumas BAL possuem a capacidade de produzir metabólitos antimicrobianos denominados bacteriocinas. A utilização de BAL e seus metabólitos como bioconservantes são alternativas promissoras frente à utilização de aditivos químicos na indústria de alimentos. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial biotecnológico de BAL isoladas de 43 queijos frescos comercializados em Botucatu – SP. As amostras foram submetidas ao isolamento de BAL, avaliação da capacidade antagonista e a testes confirmatórios para determinar as melhores condições de multiplicação e produção de bacteriocinas à 25°C, 30°C e 37°C/24h; estabilidade das bacteriocinas em diferentes faixas de pH (2, 4, 6, 8 e 10 por 2h) e temperatura (60°C/2h; 80°C/2h; 121°C/15min). Sua atividade contra diferentes microrganismos também foi avaliada, além da especificação das espécies com potencial bacteriocinogênico. Os resultados encontrados na avaliação do potencial antagonico das BAL frente a cepas de referência, mostraram que todas as cepas testadas foram inibidas em algum grau pelas BAL. Na avaliação da atividade bacteriocinogênica, dos 108 isolados testados, 17 possuíam a capacidade de produzir bacteriocinas. Foi observada uma atividade maior das bacteriocinas quando submetidas a temperaturas de 37°C e 30°C e faixa de pH 2 e 6. 88,24% dos isolados foram capazes de inibir *Listeria monocytogenes* após exposição a diferentes temperaturas. Foram isoladas BAL com capacidade bacteriocinogênica frente a microrganismos patogênicos.

Palavras chave: bactérias ácido lácticas; bacteriocina; bioconservante; queijo; segurança de alimentos

VELAME, M.S. **Characterization of lactic acid bacteria (LAB) isolated from fresh non-inspected cheeses marketed in Botucatu, São Paulo**. Botucatu, 2021. 100 p. Dissertation (MSc Degree) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

In the production of fermented foods, lactic acid bacteria (BAL) can be used as starter cultures to obtain technological, sensory and desirable effects. In addition, some BALs have the capacity to produce antimicrobial metabolites called bacteriocins. The use of BAL and its metabolites as bioconservatives are promising alternatives to the use of chemical additives in the food industry. Thus, the objective of this study was to evaluate the biotechnological potential of BAL corrected for 43 fresh cheeses marketed in Botucatu - SP. As they were subjected to BAL isolation, evaluation of antagonist capacity and confirmatory tests to determine the best conditions for multiplication and production of bacteriocins at 25°C, 30°C and 37°C/24h; The stability of bacteriocins in different pH ranges (2, 4, 6, 8 and 10 for 2h) and temperature (60°C/2h; 80°C/2h; 121°C/15min). Its activity against different microorganisms was also evaluated, in addition to specifying species with bacteriocinogenic potential. The results found in the evaluation of the antagonistic potential of BAL against reference strains, essential that all strains tested were inhibited to some degree by BAL. In the evaluation of bacteriocinogenic activity, of the 108 chosen tested, 17 had the ability to produce bacteriocins. Higher bacteriocin activity was observed when subjected to a temperature of 37°C and 30°C and a pH range of 2 and 6. 88.24% of the possible ones were able to inhibit *Listeria monocytogenes* after exposure to different temperatures. BAL were reinforced with bacteriocinogenic capacity against pathogenic microorganisms.

Keywords: lactic acid bacteria; bacteriocin; bioconservative; cheese; food safety

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A demanda de consumidores por alimentos seguros tem impulsionado a indústria alimentícia para a busca e aplicação de bioconservantes na formulação de seus produtos. A bioconservação de alimentos consiste na utilização de microrganismos benéficos ou seus metabólitos na tecnologia da produção, tendo como resultado o aumento do tempo de prateleira e a segurança microbiológica. Consequentemente, a utilização de bioconservantes possibilita a redução da utilização de aditivos químicos durante a industrialização de alimentos, fato que coloca os aditivos naturais como opção interessante na busca por alimentos mais saudáveis (MARQUES *et al.*, 2017).

Dentre os microrganismos que podem ser utilizados como bioconservantes, destacam-se as bactérias ácido lácticas (BAL). As BAL podem estar associadas a um grande número de gêneros bacterianos, sendo os mais importantes os *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Weissella* e *Bifidobacterium* (ZHANG & CAI, 2014). Estes microrganismos são Gram-positivos, catalase negativa, microaerófilos, tolerantes a ácidos, não formadores de esporos e possuem uma diversidade de habitats, tais como produtos lácteos, grãos, carnes e produtos cárneos, frutas, vegetais, água e solo. Podem ainda ser encontrados nos tratos oral, respiratório, gastrointestinal e reprodutivo de humanos e animais (KLEEREBEZEM & HUGENHOLTZ, 2003; HORVATH *et al.*, 2009).

A capacidade de estarem presentes em vários locais, decorre da adaptação a diferentes condições de umidade, pressão, concentração de oxigênio e disponibilidade de nutrientes. Esta habilidade faz com que algumas cepas de BAL

adquiram capacidades metabólicas específicas relacionadas ao ambiente em que se encontram, convertendo-se em estirpes geneticamente diferenciadas. Esta característica possibilita estudos de isolamento e identificação de cepas selvagens de BAL em regiões geográficas ainda não exploradas, o que pode levar a obtenção de culturas com potencial bioconservante e biotecnológico e com identidades genéticas e metabólicas ainda não exploradas. Espécies de BAL isoladas diretamente destes nichos são as mais promissoras para uso na indústria de alimentos, pois tendem a ter significativa capacidade metabólica devido à adaptação, o que afeta positivamente a qualidade do produto adicionado de cultivos (CRUXEN *et al.*, 2017).

Na indústria de alimentos as BAL são utilizadas usualmente como fermentos que auxiliam no processo de transformação dos alimentos. Pela sua capacidade de fermentação de carboidratos (sobretudo da lactose), são amplamente utilizadas na produção de derivados lácteos, como iogurtes e queijos. Além disso, algumas BAL possuem a capacidade de produção de metabólitos antimicrobianos denominados bacteriocinas. As bacteriocinas são peptídeos sintetizados pelas bactérias que possuem ação contra microrganismos patogênicos, como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (TODOROV, 2009). O mecanismo de ação que reflete na capacidade antagônica frente à *L. monocytogenes* e *S. aureus* das bacteriocinas, está relacionado com a interação do peptídeo produzido pelas BAL na parede celular do patógeno, levando à formação de poros e consequentemente a morte celular (HOOVER & STEENSON, 1993).

Como as bacteriocinas são peptídeos naturalmente produzidos pelas BAL durante o metabolismo fermentativo, existe um grande interesse em seu uso como uma alternativa para garantir a segurança de alimentos. Com base em estudos bioquímicos e genéticos, várias bacteriocinas já foram caracterizadas, como por exemplo, as lactocinas, lactococinas, plantaricinas, pediocinas, enterocinas, entre

1 outras (OGAKI *et al.*, 2015). Porém, apenas a nisina é aprovada pela Organização
2 Mundial de Saúde sendo, portanto, a única bacteriocina comercializada e utilizada
3 como conservante de alimentos no Brasil (CLEVELAND *et al.*, 2001; AND & HOOVER,
4 2003).

5 Quando combinadas com outras substâncias antimicrobianas ou tratamentos
6 físicos, as bacteriocinas podem ser aplicadas como parte de uma tecnologia de
7 barreira, com impacto positivo na preservação da qualidade e inocuidade do produto
8 (DE VUYST & LEROY, 2007; BALCIUNAS *et al.*, 2013).

9 Na produção de alimentos fermentados, sobretudo nos lácteos, os cultivos
10 bacterianos utilizados na obtenção dos efeitos tecnológicos, sensoriais e funcionais
11 desejáveis são adicionados como cultivo *starter*, que pode ser definido com uma
12 preparação de microrganismos adicionada à matéria-prima para produzir um produto
13 alimentício fermentado. Na transformação tecnológica do leite, além da produção de
14 ácido láctico resultando na coagulação da caseína, os microrganismos *starters*
15 produzem compostos aromáticos (acetaldeídos), e polissacarídeos extracelulares,
16 conferindo alterações sensoriais desejadas no produto final, como sabor, aroma e
17 textura (SPERANZA *et al.*, 2017).

18 Portanto, a identificação de microrganismos com capacidade tecnológica e que
19 também possuam características bioconservantes (bacteriocinogênicos) e funcionais
20 (probióticos) pode trazer inúmeros benefícios tanto para indústria, pela possibilidade
21 de obter aditivos naturais aliados na transformação das matérias-primas, quanto para
22 os consumidores, que terão disponíveis em sua mesa, produtos alimentícios seguros
23 sob o ponto de vista microbiológico e que ainda auxiliam na melhoria de sua saúde
24 (ORTU *et al.*, 2007).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Queijos: Importância, estimativa de consumo e produção

A ingestão de alimentos ricos em macro e micronutrientes é de fundamental importância para manutenção da saúde do indivíduo. Ao longo dos anos, os padrões alimentares vêm passando por diferentes modificações. Antigamente, existia uma procura maior pelo consumo de alimentos *in natura* e minimamente processados, no entanto, com o decorrer do tempo, avanços na tecnologia e modificações no estilo de vida das pessoas, outras categorias de alimentos foram ganhando espaço no mercado e na mesa do consumidor, pela sua praticidade e diversidade, como os alimentos processados e ultra processados. Entretanto, sabe-se que o consumo excessivo de alimentos pertencentes a essas duas últimas categorias, está associado a problemas de saúde, tais como: doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes, hipertensão, dentre outras enfermidades crônicas (BRASIL, 2014).

Tendo em vista esses problemas, a Organização Mundial da Saúde (OMS), elaborou uma nota informativa, contendo recomendações a respeito do consumo de determinados alimentos e aditivos para a população. O órgão sugere uma maior ingestão diária de frutas e vegetais e redução de sódio, açúcares, e potássio da dieta, além do menor consumo de gorduras, especialmente de gorduras saturadas e gorduras trans produzidas industrialmente (OPAS/OMS, 2019). Também como forma de auxiliar na promoção da saúde, prevenindo e orientando à população, o Ministério da Saúde publicou o “Guia Alimentar para a População Brasileira”, onde aborda os princípios, diretrizes e atributos da alimentação saudável. Um dos pontos a se destacar é a recomendação do consumo regular de leite e seus derivados. Esses alimentos são fontes de proteínas de alto valor biológico, vitaminas, carboidratos,

lipídeos, minerais, com destaque para o cálcio que é fundamental para a formação e manutenção da massa óssea, sendo importante a ingestão em todas as fases da vida do indivíduo (BRASIL, 2006; MUNIZ *et al.*, 2012; SBAN, 2015).

Estima-se que são produzidas cerca de 816 milhões de toneladas de leite por ano no mundo, sendo em média 116,5 equivalentes kg de leite consumidos por habitante. Os níveis de consumo variam consideravelmente entre os países, estando relacionados principalmente ao crescimento econômico e à renda da população (SIQUEIRA, 2019). Países como Nova Zelândia, Austrália, Ucrânia e União Europeia, consomem cerca de 300 equivalentes kg de leite por ano. Em contra partida, a Indonésia e na maioria dos países africanos, este consumo é inferior a 30 kg/hab/ano (BRASIL, 2018). Apesar do Brasil estar entre os maiores produtores mundiais, o consumo de produtos lácteos tem decaído ao longo dos anos, chegando a 170 kg/hab/ano, valor este muito aquém do recomendado (200 kg/hab/ano) (BRASIL, 2019).

De acordo com uma pesquisa anual realizada em 2016 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), dentre os produtos lácteos produzidos no país, o leite UHT foi o mais vendido no setor, seguido pelos queijos. Apesar de estar no 2º lugar, os queijos são os produtos que apresentaram maior crescimento nos últimos anos, passando de 12,8 % para 23,7 %. Isso se deve não só a variedade de tipos, sabores e tamanhos, mas também, por serem alimentos nutritivos, práticos no consumo e por acompanharem uma nova tendência de aquisição (EMBRAPA, 2019).

Os consumidores estão cada vez mais preocupados com o que estão levando para as suas casas, se interessando não só pelos ingredientes inseridos e seus benefícios, mas também, se foi produzido de forma sustentável, se houve preocupação com o bem estar animal, qual a sua origem (rastreabilidade), se é um produto inspecionado ou não e buscam compreender melhor o que está descrito nos

rótulos, dando uma atenção maior para aqueles que contém ingredientes mais naturais possíveis (AUNG & CHANG, 2014; MORAES & FILHO, 2017; EMBRAPA, 2019; PIVARO, 2019; SIQUEIRA, 2019).

2.2 Aspectos da segurança de alimentos na produção e comercialização de queijos inspecionados e clandestinos

Para assegurar a qualidade e a inocuidade dos produtos, é imprescindível que estes passem por uma inspeção durante a cadeia produtiva. Esse controle, consiste na adoção de normas e procedimentos baseados em decretos, instruções normativas, portarias, resoluções e Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade (RTIQ), com a finalidade de se obter um produto de alta qualidade comercial e tecnológica e ao mesmo tempo, estar isento de qualquer risco ou perigo que possa vir a causar qualquer dano para o consumidor e ao meio ambiente (SANTOS *et al.*, 2007; COSTA, *et al.*, 2015).

Conforme a lei nº 1.283 de 18 de dezembro de 1950, que dispõe sobre a Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos De Origem Animal, é obrigatória a fiscalização industrial e sanitária de todos os produtos de origem animal, sejam eles comestíveis ou não, com ou sem adição de produtos vegetais, preparados, transformados, manipulados, recebidos, acondicionados, depositados e em trânsito. Sendo assim, os estabelecimentos industriais ou entrepostos de produtos de origem animal devem ser registrados no órgão competente para que haja a fiscalização da sua atividade.

No Brasil, são adotados alguns tipos de serviços de fiscalização: Serviço de Inspeção Municipal (SIM), Serviço de Inspeção Estadual (SIE), Sistema de Inspeção Federal (SIF) e Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI-

POA). Cada um atua de acordo com a sua esfera e está ligado a como este alimento poderá ser comercializado no território nacional ou internacional. Ao final do processo de elaboração e após passar pela inspeção realizada pelo profissional Médico Veterinário, os produtos recebem em seu rótulo um selo de certificação da inspeção ao qual foi submetido (SIM, SIE ou SIF), que indica que este alimento foi produzido em um estabelecimento devidamente registrado e fiscalizado por um serviço de inspeção oficial (BRASIL, 1968; MIRANDA, 2002; BRASIL, 2017; MINISTÉRIO PÚBLICO DE SANTA CATARINA, 2020).

Em 2019, foi sancionado o Decreto nº 9.918, permitindo a comercialização interestadual de produtos alimentícios artesanais, como queijos, mel e embutidos, elaborados por meio de métodos tradicionais, com características regionais próprias, desde que sejam submetidos as boas práticas agropecuárias de fabricação, fiscalização estadual e federal e que tenham a indicação do selo “ARTE”. Sendo assim, além de garantir a inocuidade, o selo é uma ferramenta importante para agregar valor ao produto com características organolépticas únicas, ao passo que reconhece e incentiva a produção e comercialização dos pequenos produtores e da agricultura familiar (BRASIL, 2020).

O termo “Artesanal” segundo o Dicionário Brasileiro da Língua Portuguesa Michaelis (2015), está relacionado a algo que é “feito de forma rudimentar, rústico, grosseiro”, que é “elaborado pelos processos tradicionais, individuais e manuais, em oposição à produção industrial”. Esse conceito, quando levado para a produção de alimentos, muitas vezes acaba gerando divergências quanto a sua definição, principalmente quando se fala em produção de queijos artesanais. Para alguns, está ligada à forma tradicional com que o queijo é elaborado, de forma rudimentar, sem uma padronização muito bem definida (empírica), ausência do controle de qualidade e fiscalização, além de serem na maioria das vezes disponibilizados no comércio

informal, também conhecido como ilegal ou clandestino. Já para outros, os queijos artesanais são produzidos de acordo com métodos ou processos tradicionais, porém seguindo a legislação vigente (SEBRAE, 2008).

O comércio informal de leite e derivados ainda é uma realidade em muitas regiões brasileiras. Muitas vezes, os produtores não se atentam para as condições higiênico sanitárias das instalações onde estes queijos são produzidos, sendo na maioria das vezes estruturas improvisadas, sem controle de qualidade da matéria prima e ingredientes que serão utilizados, inexistência de padronização e cuidados com as boas práticas de manipulação de alimentos, acondicionamento e transporte, ausência de refrigeração, além do desconhecimento sobre os riscos que estes produtos podem vir a causar aos consumidores (CHALITA, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2013; FAO, 2013). No Quadro 1 (em Anexo), podem ser visualizados os perfis de consumo de leite e derivados dos brasileiros, com base em pesquisas científicas.

A qualidade e os cuidados com o leite que será utilizado na produção de queijos é um ponto fundamental, uma vez que, a matéria-prima deve apresentar qualidade microbiológica adequada para que sejam obtidos derivados de qualidade (JUNIOR *et al.*, 2014). O produtor deve se preocupar com a saúde do rebanho (alimentação, vacinação), cuidados pré e pós-ordenha e estar atento ao período de carência dos antibióticos e demais medicações utilizadas. O controle da contagem de células somáticas (CCS) além de determinar a saúde do úbere, pode indicar alterações importantes com relação às proteínas (SACCO, 2013). Outras modificações de ordem físico-químicas também podem ocorrer em decorrência do aumento da CCS, como diminuição do teor de gordura, cálcio, fósforo, lactose e aumento dos ácidos graxos livres de cadeia curta e das atividades proteolíticas e lipolíticas. O aumento de enzimas antimicrobianas (lactoferrina, lactoperoxidase e plasmina), podem interferir

1 na formação do coalho pois inibem a multiplicação dos microrganismos da cultura
2 láctea (SOBRAL *et al.*, 2017).

3 O não cumprimento do período de carência da medicação, pode interferir na
4 qualidade dos queijos. Os resíduos de antibióticos presentes no leite que será utilizado
5 na sua produção, podem inibir ação das bactérias ácido lácticas - BAL (que estão
6 presente no leite cru e no pingo, também conhecido como fermento láctico natural),
7 alterando todo processo fermentativo. A inibição das bactérias ácido lácticas, pode
8 provocar uma série de defeitos, como por exemplo, dificuldade de dar o ponto na
9 massa devido a não acidez necessária, falta de porosidade e retenção de soro,
10 aumentando o teor de umidade e interferindo no sabor. Além disso, se houver
11 presença de coliformes e/ou leveduras na massa, estes encontrarão alta
12 concentração de lactose, utilizando-a como fonte de nutrientes, aumentando assim a
13 formação de gás e de outros compostos (ácido láctico, ácido acético, etanol, CO₂, H₂),
14 provocando o aparecimento de defeitos como o aparecimento de olhaduras
15 indesejáveis, que comprometem a aparência e o sabor do queijo. Tendo em vista que
16 na produção dos queijos artesanais não ocorre a etapa de pasteurização do leite, este
17 defeito pode ocorrer com uma maior frequência (SOBRAL *et al.*, 2017).

18 O leite e seus derivados constituem um excelente meio de cultura para diversos
19 patógenos, devido a sua riqueza de nutrientes, tornando-os sensíveis a ação
20 microbiana, o que pode vir a interferir na qualidade, no potencial tecnológico e valor
21 nutricional do produto. Segundo uma pesquisa realizada por JUNIOR *et al.* (2020),
22 verificou-se que o perfil do brasileiro ainda consiste em consumir produtos de origem
23 clandestina e que este hábito pode contribuir para o aumento do número de casos de
24 doenças de origem alimentar. Entre 2009 e 2018, foram notificados 2.403 casos de
25 surtos de DVA no Brasil. Com 7,9 %, os produtos lácteos aparecem em 4º lugar na
26 lista dos produtos envolvidos em surtos, atrás dos alimentos mistos (25,5 %), água

(21,2 %) e múltiplos alimentos (10,7 %). Quanto aos lugares de maior ocorrência, as residências continuam sendo os principais locais com 36,9 %, seguido dos restaurantes/padarias (15,8 %) e outras instituições (11,6 %) (BRASIL, 2019).

Os custos e impactos que as doenças de origem alimentar causam na sociedade são altos, pois envolvem desde despesas com as vítimas, com internações, exames laboratoriais, medicamentos, diminuição da produtividade devido ao afastamento de suas funções laborais e procedimentos de investigações do surto. Para a empresa, os prejuízos vão desde a interdição do estabelecimento, perda de colaboradores, comprometimento da sua imagem, enfrentamento de processos, podendo culminar com o fechamento do estabelecimento (OLIVEIRA, 2020).

Dentre os principais microrganismos patogênicos relacionados a surtos de toxinfecções alimentares envolvendo o consumo de queijos produzido com leite cru, destacam-se *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Brucella* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter* sp. Os queijos preparados e comercializados de forma ilegal, normalmente são inseridos em embalagens impróprias, com sujidades, sem rotulagem, não indicando data de fabricação e validade, nem o selo de serviço de inspeção (MARTINS, 2018).

A ocorrência de *Listeria monocytogenes* em produtos lácteos é preocupante uma vez que a população ainda tem o hábito de consumir o leite cru e seus derivados sem submetê-los a um tratamento térmico adequado. Dentre os produtos lácteos, os queijos de alta e média umidade são os mais envolvidos em contaminação por este patógeno pois são armazenados por longos períodos sob refrigeração, o que permite o seu desenvolvimento (BARANCELLI *et al.*, 2011)

MENEZES *et al.* (2009) ao investigarem a qualidade de queijos do tipo coalho produzidos com leite cru e comercializados em três municípios da macrorregião do Agreste Paraibano, verificaram que 100% das amostras (total de 10 amostras)

estavam fora dos padrões estabelecidos pela legislação para *Staphylococcus* coagulase positiva, resultado decorrente, provavelmente, de uma manipulação inadequada em sua cadeia produtiva e/ou da utilização de leite cru contaminado na fabricação do produto, sendo considerado impróprio para consumo.

2.3 Produção de queijos frescos

Segundo a Portaria nº 146, de 07 de Março de 1996, que aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos, é denominado queijo, “*o produto fresco ou maturado, obtido a partir da separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído, ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas de bactéria específica, de ácido orgânicos, isolados ou combinados, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes*” (BRASIL,1996).

O queijo fresco, bastante consumido pelos brasileiros, é aquele que está pronto para o consumo logo após sua fabricação. A maior parte do volume de leite que é utilizado na produção dos queijos, resulta em soro, que é rico em proteínas, sais minerais, vitaminas e principalmente a lactose. No Brasil, o leite utilizado na produção de queijos deve ser submetido a pasteurização ou tratamento térmico equivalente previamente, a fim de garantir a inocuidade do produto. Só é permitida a utilização de leite cru na fabricação de queijos, quando o produto passa pelo processo de maturação a uma temperatura superior a 5°C por pelo menos 60 dias, como é o caso do queijo Minas artesanal, fabricado nas regiões das Serras da Canastra, Serro e Salitre, em Minas Gerais (PERRY, 2004; PAULA, 2009).

1 Para que ocorra a transformação do leite em queijo, é necessário que ele passe
2 por várias etapas, sendo elas: coagulação, acidificação, dessoramento do grão
3 (sinérese), enformagem e salga (PERRY, 2004; PAULA, 2009; IFPR, 2012).

4 A primeira etapa é a de coagulação enzimática. Nesta fase, o coalho ou
5 coagulante é adicionado ao leite a uma temperatura entre 32 a 35°C para que haja a
6 coagulação em 30 a 40 minutos. Esse coalho utilizado pode ser adquirido na forma
7 em pó ou líquida e deve ser administrado conforme recomendação do fabricante,
8 sendo composto por duas proteinases: a quimosina e a pepsina. Ao final deste
9 processo é obtido um gel (PERRY, 2004; PAULA, 2009; IFPR, 2012).

10 Na segunda etapa, é verificado o ponto da massa e são efetuados cortes
11 lentamente para estimular a saída do soro (sinérese). Desta forma, o queijeiro pode
12 controlar o teor de umidade e a estabilidade do queijo (PERRY, 2004; PAULA, 2009;
13 IFPR, 2012).

14 A terceira etapa é a acidificação. São adicionadas à massa, culturas *starter*
15 (iniciadoras) liofilizadas, que vão atuar sobre a lactose presente, fermentando-a e
16 transformando em ácido lático, proporcionando a acidificação do meio. Esses
17 fermentos, são compostos por três tipos de bactérias mesofílicas: homofermentativas,
18 heterofermentativas e termofílicas. Podem ser utilizadas culturas definidas, onde é
19 previamente determinado o número de cepas inseridas, ou culturas mistas, onde são
20 adicionados diferentes tipos. Nos queijos produzidos com leite cru, a cultura presente
21 também realiza esse processo, no entanto, como essa microbiota é variável, pode
22 interferir no grau de acidificação e na qualidade do queijo. A produção de ácido quando
23 realizada de forma correta, controla e previne o crescimento de bactérias deteriorantes
24 e patogênicas (através da produção de substâncias antimicrobianas), atua na
25 retenção e na atividade do coagulante durante a coagulação, solubiliza fosfato de
26 cálcio (o que influencia na textura do queijo), promove sinérese e intervém na atividade

enzimática. Também podem ser adicionadas, culturas ou fermentos secundários, quando se deseja obter características específicas para um determinado tipo de queijo (estimular o aparecimento de olhaduras, mudança na coloração, espessura da casca e aroma) (PERRY, 2004; PAULA, 2009).

A quarta etapa é a de enformagem e prensagem. Após atingir o pH e teor de umidade desejado, a massa é colocada em formas e prensada para que o soro seja separado e os grãos compactados, formando assim uma massa lisa e homogênea. Por fim, é efetuada a salga que possui várias funções, dentre elas: realça o sabor do queijo, controle microbiano, ajuda a prorrogar a duração do produto, além de regular atividade enzimática e mudanças físicas das proteínas do queijo (influencia na textura, solubilidade e conformação). Ao final do processo, o produto é embalado (PERRY, 2004; PAULA, 2009).

Apesar de hoje em dia existirem cursos para auxiliar na produção e capacitação dos produtores, o conhecimento das técnicas de fabricação dos queijos, na maioria das vezes, continua sendo transferido verbalmente de geração em geração. Habitualmente, os queijos são fabricados a partir do leite cru e sem a inserção de um inóculo inicial, o que proporciona a instalação e crescimento de uma microbiota diversificada e indesejável, oriundo do próprio leite e das condições higiênico sanitárias as quais são submetidos. Levando em conta este aspecto, este alimento pode se tornar um perigo aos consumidores, uma vez que pode atuar como um veículo de microrganismos deteriorantes e patogênicos. Por outro lado, no leite cru utilizado na fabricação destes queijos, estão presentes um grupo bacteriano denominado bactérias ácido lácticas (BAL), que são consideradas essenciais, não só para o processo de fermentação, como também, há muitos anos, são utilizadas como método de preservação. Em decorrência da utilização de carboidratos como fonte de nutrientes, presentes no alimento, são gerados como produto dessa fermentação,

1 ácidos orgânicos (com destaque para o ácido láctico), que provocam uma redução no
2 pH do queijo, proporcionando um efeito antagonista contra estes microrganismos
3 indesejáveis. Além disso, a competição por nutrientes e produção de outras
4 substâncias antimicrobianas, que veremos mais à frente, são outras estratégias
5 utilizadas pelas bactérias ácido lácticas (HERMANNNS, 2013; PAIXÃO, 2016).

6 A identificação de isolados microbianos com características funcionais e
7 tecnológicas de interesse, provenientes de queijos “artesanais” produzidos a partir do
8 leite cru, pode auxiliar na prevenção da perda da biodiversidade microbiana em
9 alimentos típicos e a conservar a variedade de novas estirpes para criação de novos
10 produtos (HERMANNNS, 2013).

12 **2.4 Bactérias ácido lácticas (BAL)**

14 As bactérias ácido lácticas (BAL) são caracterizadas como bactérias Gram-
15 positivas, em formato de cocos ou bacilos, não esporuladas, catalase negativas,
16 anaeróbias facultativas, produtoras de ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico.
17 A utilização dos carboidratos pode ser homofermentativa, resultando na produção de
18 ácido láctico, ou heterofermentativa, gerando ácido láctico e acético, álcool etílico e CO₂
19 como resultados da fermentação. Possuem pH ótimo de crescimento entre 4,0 e 4,5
20 e temperaturas ótimas de crescimento entre 30°C e 42°C (BELOTI, *et al*, 2015;
21 MOTTA & GOMES, 2015; BRUNO & MACHADO, 2017; SILVA, *et al.*, 2017).

22 O grupo das BAL é composto principalmente por 13 gêneros, sendo eles:
23 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*,
24 *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Oenococcus*,
25 *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (POFFO & SILVA, 2011; BELOTI *et al*,
26 2015)

As BAL possuem a capacidade de produzir substâncias inibidoras do crescimento microbiano. Esse potencial, há alguns anos vem sendo explorado pelas indústrias de alimentos, como um método de conservação natural. Além desses metabólitos, elas também produzem outros ácidos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil e as bacteriocinas, que são os compostos mais utilizados na biopreservação de alimentos. Paralelamente, a grande produção de ácidos orgânicos, principalmente de ácidos láctico e acético, levam a redução do pH do alimento (abaixo de 4,5) o que proporciona um ambiente desfavorável para o crescimento de bactérias, bolores e leveduras. (BELOTI *et al*, 2015; BRUNO & MACHADO, 2017).

- *Ácidos orgânicos*: podem ser produzidos tanto pela homofermentação, quanto pela heterofermentação. Dentre os ácidos gerados com a fermentação, o acético apresenta maior poder inibitório sobre as bactérias, bolores e leveduras, do que o ácido láctico. Já o propiônico, atua melhor sobre leveduras e bolores. Devido ao aumento da permeabilidade da membrana celular bacteriana, ocorre um acúmulo de ânions no citoplasma, o que afeta as atividades celulares. Para compensar essa situação, as BAL e outras bactérias reduzem o pH, e assim conseguem tolerar a presença de ácidos (BELOTI *et al*, 2015).

- *Peróxido de hidrogênio*: esse composto apresenta efeito bactericida devido ao seu poder oxidante oriundo das sulfidrilas das proteínas e lipídeos de membrana celular bacteriano. Durante a produção de peróxidos pode ocorrer o sequestro de oxigênio, deixando o ambiente anaeróbico, inibindo alguns microrganismos (BELOTI *et al*, 2015).

- *Dióxido de carbono*: a sua produção gera um ambiente anaeróbio, desfavorável para muitos microrganismos. É um metabólito muito utilizado na indústria em embalagens com atmosfera modificada (BELOTI *et al*, 2015).

1 - *Diacetil*: Possui potencial de ação maior em bactérias Gram-negativas,
2 leveduras e bolores, do que em bactérias Gram-positivas (BELOTI *et al*, 2015).

3 - *Bacteriocinas*: são as substâncias mais importantes produzidas pelas BAL e
4 utilizadas pelas indústrias de alimentos (BELOTI *et al*, 2015).

5 Além do efeito bioprotetor, as BAL são importantes no desenvolvimento das
6 características sensoriais dos produtos fermentados, especialmente dos derivados
7 lácteos. As enzimas sacarolíticas, proteolíticas e lipolíticas atuam sobre os nutrientes
8 originais do alimento, modificando-os, formando compostos aromáticos e de sabor.
9 Daí, a importância de selecionar e melhorar cada vez mais as culturas que serão
10 utilizadas, a fim de garantir que o produto final obtenha características únicas e
11 especiais (BELOTI *et al*, 2015; BRUNO & MACHADO, 2017).

12

13 **2.5 Preservação de alimentos**

14

15 Os alimentos de origem animal e vegetal possuem uma capacidade de
16 deterioração muito rápida. Isso pode ser influenciado por diversos fatores como a
17 quantidade de nutrientes, pH, formulação, modelo de embalagem, temperatura e
18 forma de armazenamento e produção, dentre outros fatores. As fontes de deterioração
19 podem ser físicas, químicas ou biológicas, sendo que a de origem biológica constitui-
20 se a principal delas. As falhas de BPF e a falta de um controle de qualidade podem
21 favorecer a contaminação destes alimentos por bactérias deteriorantes e ou
22 patogênicas, o que influencia não só na qualidade, reduzindo o tempo de prateleira,
23 como também, na possibilidade de causarem danos à saúde do consumidor (MELO
24 *et al.*, 2005).

25 Com o intuito de aumentar o tempo de prateleira dos produtos alimentícios,
26 retardando ao máximo o crescimento dos microrganismos, as indústrias lançam mão

de métodos tradicionais de conservação como: tratamentos térmicos (pasteurização e esterilização), desidratação, congelamento, refrigeração, irradiação, utilização de embalagens com atmosfera modificada e adição de agentes antimicrobianos (aditivos sintéticos). Além destas, novas técnicas têm sido utilizadas, como: tratamento sob alta pressão hidrostática, pulsos elétricos, embalagens ativas e aditivos antimicrobianos naturais. Um dos fatores que impulsionaram a busca por novas tecnologias de conservação relaciona-se ao fato de que as técnicas tradicionalmente utilizadas possuem a desvantagem de poderem alterar o estado do alimento, com algumas perdas nutricionais e organolépticas (MELO *et al.*, 2005; LUCERA *et al.*, 2012; SINGH, 2018).

Nos últimos anos, tem crescido a preocupação dos consumidores e a busca por alimentos mais frescos e ou minimamente processados. Muitos acabam optando por consumirem alimentos com poucos ou nenhum aditivo, sendo que os mais comumente utilizados pelas indústrias são os sintéticos. São vários os tipos e funções, como: antioxidantes, umectantes, corantes e conservantes. Normalmente são adicionadas aos alimentos com o intuito de aumentar o tempo de prateleira, intensificar ou modificar as suas propriedades sensoriais, desde que não tenham fins nutricionais. (FIB, 2010; ROMEIRO & DELGADO, 2013). No entanto, apesar de terem os seus benefícios, os estudos realizados ao longo dos anos têm mostrado que o uso indiscriminado de aditivos sintéticos (como por exemplo, nitratos, benzoato, sulfitos, sorbato, formaldeído, glutamato, etc.), podem causar danos à saúde humana, desde quadros alérgicos que podem se agravar a depender da hipersensibilidade da vítima, à hipertensão, AVC, insuficiência renal, dores de cabeça, predispor ao câncer, demência, Alzheimer, dentre outros (PISOCHI *et al.*, 2018).

Com a preocupação frente aos danos causados pelo uso de aditivos sintéticos, há também um outro problema que tem chamado bastante a atenção dos

pesquisadores, que é o desenvolvimento de microrganismos multirresistentes, devido ao uso indiscriminado de antibióticos. Em decorrência dessa preocupação com a saúde e busca por alimentos mais naturais, tem-se observado um aumento e interesse por novos métodos de preservação, tais como a biopreservação e bioproteção (BEMENA *et al.*, 2014; PISOCHI. *et al.*, 2018).

2.6 Biopreservação na indústria de alimentos

A biopreservação consiste na utilização de conservantes naturais, também denominados de aditivos naturais, com capacidade de oferecer produtos mais saudáveis e seguros para a população. Os antimicrobianos naturais são metabólitos que podem ser produzidos a partir de três tipos de fontes: animal, vegetal e microbiana (fungos e bactérias) (SINGH, 2018). Esses compostos, possuem um amplo potencial de atuação contra patógenos de origem alimentar; no entanto, estes não devem influenciar negativamente o microbioma do consumidor, devendo, portanto, o seu uso ser assegurado por agências regulamentares (GANGULY, 2013; PISOCHI *et al.*, 2018; HAMMAMI *et al.*, 2019).

2.6.1 Antimicrobianos de origem vegetal

São antimicrobianos provenientes de plantas comestíveis, medicinais e seus derivados (óleos essenciais), que conseguem retardar ou inibir a ação de bactérias, leveduras e bolores. Esses compostos podem ser extraídos a partir dos óleos essenciais, sementes (cominho, erva-doce, salsa, etc), flores ou botões (cravo), bulbos (alho e cebola), folhas (alecrim, sálvia, manjerição, orégano, tomilho e manjerona), cascas, frutos (pimenta e cardamomo), madeira e raízes de plantas. Na

maioria das vezes são utilizados com a função aromatizante e para incrementar o sabor dos alimentos (TIWARI *et al.*, 2009; FIB, 2010).

Os principais componentes dos óleos essenciais com ação antimicrobiana são os compostos fenólicos, terpenos, álcoois alifáticos, aldeídos, cetonas, ácidos e isoflavonóides. Os óleos com altos níveis de eugenol, aldeído cinamático e citral são considerados como antimicrobianos fortes (TIWARI *et al.*, 2009; FIB, 2010).

Uma das desvantagens do uso do óleo essencial como conservante e de especiarias, é que eles não são tão potentes quando aplicados sozinhos e podem causar efeitos negativos quanto às características sensoriais (principalmente do sabor), quando adicionados em quantidades consideradas suficientes para que se obtenha o efeito antimicrobiano esperado.

A ação dos agentes antimicrobianos acontece principalmente ao nível da membrana celular da bactéria, provocando danos estruturais e funcionais. Os compostos atuam alterando a estrutura fosfolipídica da membrana celular, interrompendo o sistema enzimático o que compromete o material genético da bactéria, formando compostos tóxicos, como o peróxido de hidrogênio. Para que a ação desses compostos seja eficaz, alguns cuidados devem ser tomados. Deve-se atentar ao método utilizado para extração dos óleos essenciais, fase de crescimento e propriedades extrínsecas e intrínsecas do alimento, tais como: pH, teor em gordura, proteína, água, antioxidantes, conservantes, tempo e temperatura de incubação, processo de embalagem e estrutura física dos alimentos (TIWARI *et al.*, 2009; FIB, 2010; HYLDGAARD *et al.*, 2012).

2.6.2 Antimicrobianos de origem animal

A maioria destes antimicrobianos surgiu em decorrência da resposta dos mecanismos de defesa do próprio hospedeiro. Os mais conhecidos são: pleurocidina, lactoferrina, defensinas e protamina. Além de atuarem sobre as bactérias Gram-positivas e negativas, eles também possuem atividades antifúngicas e antivirais (PISOCHI *et al.*, 2018).

A pleurocidina é um composto presente na membrana mucosa da pele de peixes da espécie *Pleuronectes americanus* (linguado). Esse agente consegue atuar efetivamente contra Gram-positivos e Gram-negativos, como *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Saccharomyces cerevisiae* e *Penicillium expansum*. Já as defensinas, são produzidas por vertebrados. Podem ser encontradas em fagócitos de mamíferos e células epiteliais de galinhas e conseguem atuar sobre bactérias, fungos e vírus (PISOCHI *et al.*, 2018).

O leite constitui outra fonte de peptídeos antimicrobianos. A casocidina, presente no coalho, possui atividade antibacteriana, agindo contra *Staphylococcus* spp., *Sarcina* spp., *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*. A lactoferrina é outro peptídeo antimicrobiano que age sobre bactérias Gram-positivas e negativas, fungos, parasitas e vírus. É usada como antimicrobiano em uma variedade de produtos cárneos, podendo atuar só ou em associação com a nisina. Outro componente que está presente no leite é a lactoperoxidase, que atua preservando a qualidade microbiológica dos produtos lácteos (PISOCHI *et al.*, 2018).

A lisozima é outra enzima antimicrobiana, encontrada na clara do ovo, no leite e no sangue. Atua inibindo principalmente bactérias Gram-positivas, visto que as Gram-negativas são mais resistentes devido à camada de lipopolissacarídeo de sua membrana externa. No entanto, a utilização de agentes surfactantes e quelantes,

como EDTA, podem sensibilizar a membrana deste grupo bacteriano (PISOCHI *et al.*, 2018).

A quitosana, obtida a partir de exoesqueletos de crustáceos e artrópodes, possui ação antifúngica e antibacteriana. Contudo, a sua utilização na preservação de alimentos tem sido restrita devido à sua baixa solubilidade em pH neutro e alcalino (PISOCHI *et al.*, 2018).

2.6.3 Antimicrobianos de origem microbiana – bacteriocinas

As bacteriocinas podem ser utilizadas de diferentes formas em alimentos. Dentre elas, destacam-se: a inoculação da BAL (como cultura *starter*), ou protetora, com potencial bacteriocinogênico no alimento (com produção *in situ*), adição da bacteriocina no alimento (purificada ou semi-purificada) com função conservante e uso como ingrediente na formulação de alimentos (BEMENA *et al.*, 2014).

Além de serem utilizadas com funções probióticas e bioconservantes em alimentos, as bacteriocinas também apresentam grande interesse clínico e farmacêutico, pois podem auxiliar no tratamento de determinadas doenças causadas pela *E. coli* enterotoxigênica e *Campylobacter jejuni*, possuem propriedades antivirais, espermicidas e anticancerígenas (OGAKI *et al.*, 2015; LOPETUSO *et al.*, 2019).

Para que uma bacteriocina possa ser utilizada em alimentos, ela precisa atender a alguns critérios. A cepa produtora deve ser reconhecida como *Generally Recognized as Safe* (GRAS), possuir um amplo espectro de inibição de patógenos, ser estável ao calor, possuir atividade específica, não deve oferecer riscos à saúde do consumidor e a sua inclusão nos produtos, deve promover efeitos benéficos como maior segurança, qualidade e proporcionar características próprias ao produto. De acordo com o alimento que se pretende trabalhar, é feita a escolha da bacteriocina

mais indicada. Apesar do amplo espectro de ação ser um dos benefícios mais procurados, outros fatores também devem ser levados em consideração como: faixa ótima de atuação do pH, solubilidade e estabilidade (COTTER *et al.*, 2005; GÁLVEZ *et al.*, 2007; RAMU *et al.*, 2015).

Atualmente, as culturas protetoras e as bacteriocinas têm sido consideradas como grandes promessas para garantir a qualidade e segurança de alimentos (HAMMAMI *et al.*, 2019). Muitas bacteriocinas oriundas de BAL têm sido estudadas e caracterizadas não só para serem utilizados em alimentos, como também na pecuária, sendo que as mais conhecidas são: nisina, lacticina, enterocina, pediocina e plantaricina. Dentre essas, a nisina é a que possui um maior destaque (ANANOU, *et al.*, 2008; OGAKI, *et al.*, 2015).

2.6.4 Nisina

A nisina é amplamente utilizada em uma grande variedade de alimentos sejam eles líquidos ou sólidos, enlatados ou embalados, armazenados em ambiente frio ou quente. A sua aplicação pode ter diferentes objetivos, como: prevenir a deterioração por formadores de endosporos Gram-positivos (especialmente em alimentos processados termicamente), inibir ou eliminar patógenos. A utilização na indústria se dá através da incorporação em filmes plásticos impregnados com a bacteriocina (utilizados na embalagem de determinados alimentos) e também pode ser usada em altas concentrações na forma de spray ou banho para descontaminar uma superfície. Além disso, ela pode ser utilizada na fabricação de queijo semi-duro e duro para aumentar a fermentação, promovendo uma aceleração da maturação e melhora no sabor. O nível de adição de Nisina depende do tipo de alimento, do tratamento térmico

a que o mesmo será submetido, do pH, das condições de armazenamento e do seu grau de viabilidade (COTTER *et al.*, 2005; BEMENA *et al.*, 2014).

O seu uso foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos para aplicações em alimentos, recebendo o *status* de GRAS em 1988. Essa denominação indica que o produto químico ou substância adicionada ao alimento é considerada segura pelos especialistas, pois foi submetida a testes comprobatórios (BEMENA, 2014; FDA, 2019). Em 1969, a nisina foi aprovada pela OMS e, em 1995, também foi autorizada a sua utilização para preservação de alimentos na União Europeia (BEMENA, 2014; OGAKI *et al.*, 2015). Das 40 espécies conhecidas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 35 sintetizam essa bacteriocina (CLEVELAND *et al.*, 2001).

O mecanismo de ação da nisina ocorre a nível da membrana celular, onde há um aumento da permeabilidade e formação de poros, ocasionando a saída do material intracelular. Em decorrência desse extravasamento, a célula bacteriana afetada vai perdendo energia, ocorrem distúrbios funcionais que acabam culminando com a sua morte (FANI, 2016).

2.6.5 Pediocina

Depois da nisina, a pediocina é a bacteriocina mais pesquisada. É sintetizada por *Pediococcus acidilactici* e possui um potencial antimicrobiano importante frente a linhagens de *Listeria* spp., em produtos cárneos, sorvete e leite (VITOLA *et al.*, 2018). É estável em soluções aquosas, consegue atuar em uma ampla faixa de pH e possui alta resistência ao aquecimento e ao congelamento (SILVA *et al.*, 2018). É sensível a enzimas proteases gerais, como pepsina, papaína e tripsina (NIAMAH, 2018).

2.6.6 Colicinas

São proteínas antimicrobianas produzidas endogenamente por bactérias entéricas comensais no intestino humano. São instáveis ao calor, ácido e digestão proteolítica. Em 2015, foram reconhecidas pelo FDA como antimicrobianos GRAS de primeira classe. Essa decisão permitiu que ela passasse a ser utilizada no controle de *E. coli* patogênica em frutas e vegetais e em 2017 também foram aceitas no controle de produtos cárneos pela FDA e *United States Department of Agriculture* (USDA). Também não há relatos de hipersensibilidades ou reações alérgicas devido ao uso desta bacteriocina (LÖBMANN *et al.*, 2019).

2.7 Bacteriocinas: histórico, definição, classificação, biossíntese e transporte e forma de ação

2.7.1 Histórico

O primeiro registro sobre bacteriocinas se deu em 1925, com a descoberta das colicinas, através de um estudo realizado por André Gratia onde foi testado o efeito antagônico frente a diferentes linhagens de *E. coli*. Já em 1953, outros pesquisadores ao perceberem que esta ação inibitória não se limitava somente as substâncias produzidas por este grupo bacteriano, propuseram a denominação “bacteriocina” para as proteínas antimicrobianas produzidas por microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos (NASCIMENTO *et al.*, 2008; OGAKI *et al.*, 2015).

Em 1947, a nisina foi descoberta pelos pesquisadores Mattick e Hirsch. Ela foi inicialmente purificada e comercializada na Inglaterra em 1953, sendo considerada segura para uso em alimentos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1969.

Na Europa, a nisina foi adicionada à lista de aditivos alimentares em 1983 e, em 1988, nos EUA, o FDA autorizou seu uso em queijos processados. No Brasil, seu uso foi autorizado na fabricação de queijos na concentração de até 12,5 mg/kg, em 1996 (NASCIMENTO *et al.*, 2008).

2.7.2 Definição

Bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos, produzidos nos ribossomos, que possuem a capacidade de atuar contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os organismos produtores são imunes a sua própria bacteriocina, uma vez que possuem mecanismos de imunidade específicos (CLEVELAND *et al.*, 2001; OGAKI *et al.*, 2015). As bacteriocinas são produzidas por bactérias Gram-positivas e negativas e por algumas arqueas. Além disso, sofrem influência de fatores ambientais como temperatura, pH e composição do meio de cultura (CHIKINDAS *et al.*, 2018; LOPETUSO *et al.*, 2019).

A maior parte das bacteriocinas são produzidas pelo filo Firmicutes, e em menor escala, pelos filos Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria. Dentro do filo Firmicutes, os metabólitos produzidos pelas bactérias ácido lácticas são os de maior interesse pela indústria de alimentos (LOPETUSO *et al.*, 2019).

2.7.3 Classificação

As bacteriocinas são caracterizadas de acordo com as suas propriedades físicas, de estabilidade, estrutura química, tamanho molecular, modo de ação e o tipo de microrganismo que a produz.

Ao longo dos anos, a classificação das bacteriocinas vem sofrendo algumas modificações e reclassificações. A classificação proposta neste trabalho foi a descrita em JOHNSON *et al.* (2018). As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas são classificadas em 4 classes:

Classe I – Lantibióticos: São formados por peptídeos pequenos (< 5 kDa de baixo peso molecular) que sofrem modificações pós traducionais. São assim denominados por conterem em sua composição o aminoácido Lantionina. Os Lantibióticos são classificados em três subgrupos: Classe Ia, que inclui os lantibióticos lineares com destaque para a nisina, a Classe Ib, que possui uma estrutura globular, como a mersacidina, e a Classe Ic, que apresenta uma peculiaridade, pois requerem dois ou mais peptídeos para serem funcionais (Ex: lacticina).

Classe II: São bacteriocinas que não contêm em sua composição a lantionina. São compostos por pequenos peptídeos não modificados (< 10 kDa) e subdivididos também em três subgrupos:

Classe IIa: São peptídeos (leucocina A, pediocina PA-1, enterocina A e sakacin G) termoestáveis e não contêm a lantionina e seus derivados. Este subgrupo chama a atenção por causa de sua atividade contra *L. monocytogenes*. São formadas por pontes de dissulfeto, com presença de cisteína em sua porção terminal N. Essas pontes de dissulfeto dão estabilidade à molécula e também aumentam a atividade antimicrobiana.

Classe IIb: São formadas por dois ou mais peptídeos não modificados para induzir as atividades antimicrobianas. Agem sobre as membranas celulares das cepas alvo. Fazem parte desse grupo, a enterocina 1071 (A e B) de *E. faecalis* BFE1071.

Classe IIc: São formadas por um grupo heterogêneo de bacteriocinas (Ex: enterocina EJ97 de *E. faecalis* EJ97) compostas por um único peptídeo não-pediocina, que possui várias formas de ação para matar as células-alvo.

1 Classe III (proteínas grandes): São formadas por proteínas grandes (30 kDa) e
2 termolábeis. São denominadas de bacteriolisinas (endopeptidases). Através de sua
3 ação enzimática, causam lise das paredes celulares de cepas suscetíveis. Elas foram
4 subdivididos em dois subgrupos:

5 Classe IIIa: São consideradas como bacteriocinas líticas (25-35 kDa – Ex:
6 enterolisina A de *E. faecalis*) que atuam como uma enzima, atacando a camada de
7 peptidoglicano da parede celular em alvos bacterianos Gram-positivos suscetíveis,
8 causando morte celular.

9 Classe IIIb: São bacteriocinas produzidas por bactérias não líticas, termolábeis,
10 que possuem modo de ação peculiar contra as células bacterianas suscetíveis. Estão
11 neste grupo: helveticina J, estreptococcina A-M57 e disgalacticina.

12 Classe IV (peptídeos circulares - 5,5-7,5 kDa): são bacteriocinas circulares. A
13 enterocina AS-48 isolada de *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens* S-48 foi a
14 primeira bacteriocina isolada deste grupo. Também fazem parte deste grupo, a
15 saposina, gassericina A.

16 Entre todas essas classes de bacteriocinas, aquelas pertencentes a classe I, II
17 e IV como nisina (disponível no mercado como Nisaplin™ e Novasin™), Pediocina
18 (Alta™ 2341) e Enterocina AS-48, são amplamente utilizadas na preservação de
19 alimentos.

21 **2.7.4 Biossíntese e transporte**

22
23 O produto inicial na biossíntese da bacteriocina é uma forma biologicamente
24 inativa que consiste em um pré-peptídeo (peptídeo líder N-terminal e um pró-peptídeo
25 (C-terminal). O peptídeo líder mantém as bacteriocinas inativas antes de serem
26 exportadas da célula produtora (JOHNSON *et al.*, 2018).

Nos lantibióticos, o pró peptídeo possui resíduos de serina, treonina e cisteína, que sofrem modificação pós-tradução em Lan/MeLan. Os pré-peptídeos são constituídos por uma sequência-líder de aminoácidos na região N-terminal, a qual é removida durante a maturação da proteína (OGAKI *et al.*; 2015; JOHNSON, *et al.*, 2018).

As etapas que envolvem a maturação são: síntese do pré-peptídeo; clivagem subsequente em local específico (onde há a remoção da sequência N-terminal) e a exportação para o exterior da célula.

2.7.5 Forma de ação das bacteriocinas

O modo de ação varia conforme o tipo de bacteriocina. Os receptores primários das bacteriocinas são as moléculas lipídicas aniônicas, presentes na membrana citoplasmática. A ligação das moléculas da bacteriocina causa a formação de poros na membrana levando ao efluxo de íons e outras moléculas das células, causando danos irreversíveis e morte celular (JOHNSON *et al.*, 2018).

Nos lantibióticos, a estabilidade da formação de poros é aumentada pelo lipídeo II e o precursor de peptidoglicano que atua como molécula de docking (JOHNSON *et al.*, 2018).

Nas bacteriocinas de classe II, a especificidade é determinada por moléculas receptoras presentes na membrana celular. A formação de poros pela bacteriocina classe I segue o modelo de cunha, enquanto a bacteriocina classe II segue como “modelo de tapete”, onde as bacteriocinas se orientam paralelamente à superfície da membrana e promovem a sua ruptura. (JOHNSON *et al.*, 2018).

2.7.6 Mecanismos de resistência desenvolvidos

Como uma forma de adaptação a situações adversas, frente a ação do agente antimicrobiano, as bactérias alvo também desenvolvem componentes para resistir a essas bacteriocinas em exposição persistente, levando a resistência. A bactéria alvo pode escapar das bacteriocinas por neutralização da carga negativa líquida da parede celular, devido a ação enzimática produzida por ela (KUMARIYA *et al.*, 2019).

O uso combinado de mais de uma bacteriocina, pode ser vantajoso em relação a aplicação de apenas uma (especialmente para uso médico), reduzindo significativamente a concentração inibitória mínima e consequentemente a dose utilizada do composto. Apesar de serem largamente utilizadas pela indústria, isso não quer dizer que elas são totalmente inofensivas. Algumas bacteriocinas e micotoxinas têm sido associadas à hepatotoxicidade. Além disso, como são agentes antibacterianos, também podem induzir, a exemplo dos antibióticos, processos de resistência por parte dos microrganismos alvos (KUMARIYA *et al.*, 2019).

Levando em consideração a propriedade antibacteriana das bacteriocinas, alguns pesquisadores têm especulado considerá-las como da mesma classe dos antibióticos. No entanto, apesar de atuarem como agente bactericidas, as bacteriocinas são peptídeos produzidos a partir de bactérias, enquanto os antibióticos são produzidos a partir de complexos multi-enzimáticos. Em comparação aos antibióticos tradicionais, as bacteriocinas possuem um espectro de ação estreito sobre as bactérias (RAMU *et al.*, 2015; KUMARIYA *et al.*, 2019).

2.7.7 Critérios de seleção e segurança de bacteriocinas

Para ser utilizada na preservação de alimentos, a bacteriocina deve obedecer a vários critérios e pré-requisitos tais como: não causar danos a microflora intestinal do consumidor, possuir um amplo espectro antibacteriano, resistir às enzimas presentes nas matrizes alimentares e ser estável ao tratamento térmico, além de atuar em ampla faixa de pH e concentração de sal (JOHNSON *et al.*, 2018).

Apesar de ter sido encontrado na maioria das bacteriocinas um certo grau de citotoxicidade, percebeu-se que a concentração para que isto ocorra, é muito maior que a quantidade inibitória mínima necessária para atuar sobre os microrganismos alvos (JOHNSON *et al.*, 2018).

Para que as bacteriocinas sejam usadas como conservantes de alimentos, precisam ser aceitas e aprovadas pelas agências regulatórias como aditivos alimentares ou como substâncias GRAS. Para isso, é necessário analisar o seu histórico de uso como aditivos alimentares antes de 1958, ou se não, a liberação deve ser pelo do FDA descrevendo o uso proposto e sua segurança, detalhes sobre as formulações e explicar em que condições serão utilizadas (JOHNSON *et al.*, 2018).

CAPÍTULO 2

3 Trabalho científico

Título do artigo: Caracterização de bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de queijos frescos não inspecionados comercializados em Botucatu, São Paulo.

[Artigo](#) submetido em 06/02/2023, à revista *Veterinária e Zootecnia*, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu e publicado em 14/12/2023.

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL) ISOLADAS DE QUEIJOS FRESCOS NÃO INSPECIONADOS COMERCIALIZADOS EM BOTUCATU, SÃO PAULO

Marise Santiago Velame¹
Otávio Augusto Martins²
Juliano Gonçalves Pereira³

RESUMO

A utilização de BAL para obtenção de efeitos tecnológicos e seus metabólitos como bioconservantes são alternativas promissoras frente à utilização de aditivos químicos na indústria de alimentos. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial biotecnológico de BAL isoladas de 43 queijos frescos comercializados em Botucatu – SP. As amostras foram submetidas ao isolamento de BAL, à avaliação da capacidade antagonista e a testes confirmatórios para determinação das melhores condições de multiplicação e produção de bacteriocinas à 25 °C, 30 °C e 37 °C/24 h, estabilidade das bacteriocinas em diferentes pH (2, 4, 6, 8 e 10 por 2 h) e temperaturas (60 °C/2 h; 80 °C/2 h; 121 °C/15 min). A atividade contra diferentes microrganismos também foi avaliada, além da especificação das espécies com potencial bacteriocinogênico. Os resultados do potencial antagonístico, mostraram que todas as cepas testadas foram inibidas em algum grau pelas BAL. Dos 108 isolados testados, 17 possuíam a capacidade de produzir bacteriocinas. Houve maior atividade bacteriocinogênica em temperaturas de 37 °C e 30 °C e em pH 2 e 6. 88,24% dos isolados, foram capazes de inibir *Listeria monocytogenes* após exposição a diferentes temperaturas.

Palavras-chave: ácido láctico; bacteriocina; bioconservante; capacidade antagonística; segurança de alimentos

CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA (LAB) ISOLATED FROM FRESH NON-INSPECTED CHEESES MARKETING IN BOTUCATU, SÃO PAULO

ABSTRACT

The use of LAB to obtain technological effects and its metabolites as biopreservatives are promising alternatives to the use of chemical additives in the food industry. In this context, the aim of this study was to evaluate the biotechnological potential of LAB isolated from 43 fresh cheeses sold in Botucatu - SP. The samples were submitted to BAL isolation, evaluation of antagonist capacity and confirmatory tests to determine the best conditions for multiplication and production of bacteriocins at 25 °C, 30 °C and 37 °C/24 h, stability of bacteriocins in different pH (2, 4, 6, 8 and 10 for 2 h) and temperatures (60 °C/2 h; 80 °C/2 h; 121 °C/15 min). The activity against different microorganisms was also evaluated, in addition to specifying the species with bacteriocinogenic potential. The results of the antagonistic potential showed that all strains tested were inhibited to some degree by BAL. Of the 108 isolates tested, 17 had the

¹ Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP/FMVZ *Correspondência: isavelame@hotmail.com

² Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP/FMVZ. otavio.a.martins@unesp.br

³ Docente da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP/FMVZ. juliano.pereira@unesp.br

Velame MS, Martins AO, Pereira JG. Caracterização de Bactérias Ácido Lácticas (BAL) isoladas de queijos frescos não inspecionados comercializados em Botucatu, São Paulo. Vet. e Zootec. 2023; v30: 1-13.

ability to produce bacteriocins. There was greater bacteriocinogenic activity at temperatures of 37 °C and 30 °C and at pH 2 and 6. 88.24% of the isolates were able to inhibit *Listeria monocytogenes* after exposure to different temperatures.

Keywords: lactic acid; bacteriocin; bioconservative; antagonistic capacity; food safety

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL) AISLADAS DE QUESOS FRESCOS NO INSPECIONADOS VENDIDOS EM BOTUCATU, SÃO PAULO

RESUMEN

El uso de BAL para obtener efectos tecnológicos y sus metabolitos como bioconservadores son alternativas prometedoras al uso de aditivos químicos en la industria alimentaria. En ese contexto, el objetivo de este estudio fue evaluar el potencial biotecnológico de BAL aisladas de 43 quesos frescos vendidos en Botucatu - SP. Las muestras se sometieron a aislamiento de BAL, evaluación de capacidad antagonista y pruebas confirmatorias para determinar las mejores condiciones de multiplicación y producción de bacteriocinas a 25 °C, 30 °C y 37 °C/24 h, estabilidad de bacteriocinas a diferentes pH (2, 4, 6, 8 y 10 durante 2 h) y temperaturas (60 °C/2 h; 80 °C/2 h; 121 °C/15 min). También se evaluó la actividad frente a diferentes microorganismos, además de especificar las especies con potencial bacteriocinogénico. Los resultados del potencial antagonístico mostraron que todas las cepas probadas fueron inhibidas en algún grado por BAL. De los 108 aislamientos probados, 17 tenían la capacidad de producir bacteriocinas. Hubo mayor actividad bacteriocinogénica a temperaturas de 37 °C y 30 °C y a pH 2 y 6. 88,24% de los aislados fueron capaces de inhibir *Listeria monocytogenes* tras la exposición a diferentes temperaturas.

Palabras clave: ácido láctico; bacteriocina; bioconservante; capacidad antagonista; Seguridad alimenticia

INTRODUÇÃO

O queijo fresco é bastante apreciado pelos brasileiros por ser de baixo custo, saboroso e prático de ser produzido. No Brasil, o leite utilizado na sua produção deve ser submetido a pasteurização ou tratamento térmico equivalente previamente, a fim de garantir a inocuidade do produto só sendo permitida a utilização de leite cru quando o queijo passa pelo processo de maturação por pelo menos 60 dias, como é o caso do queijo Minas artesanal, fabricado nas regiões das Serras da Canastra, Serro e Salitre, em Minas Gerais (1-2). No entanto, o comércio informal de leite e derivados ainda é uma realidade em muitas regiões brasileiras (3,4,5).

Na maioria das vezes, os queijos elaborados de forma "caseira", são a base de leite cru, que apesar do risco existente quanto a patógenos de importância para a saúde pública como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium spp.* e *Brucella spp.*, também são compostos por uma microbiota autóctone rica em bactérias ácido lácticas (BAL). A maior parte das BAL, são seguras para o consumo humano e desempenham funções importantes para a produção de queijos, pois contribuem para a sua maturação, influenciam na textura, sabor e aroma do produto final, podendo ainda serem usadas na indústria de alimentos como culturas iniciais ou *starters*, probióticos e como biopreservantes (6,7,8,9,10,11).

A bioconservação de alimentos consiste na utilização de microrganismos benéficos ou de seus metabólitos na tecnologia da produção, tendo como resultado o aumento do tempo de

Velame MS, Martins AO, Pereira JG. Caracterização de Bactérias Ácido Lácticas (BAL) isoladas de queijos frescos não inspecionados comercializados em Botucatu, São Paulo. Vet. e Zootec. 2023; v30: 1-13.

prateleira e a segurança microbiológica (12). Entre os microrganismos que podem ser utilizados como bioconservantes, sobressaem-se as BAL que possuem a capacidade de produzir substâncias inibidoras do crescimento microbiano (7-8). Dentre as substâncias produzidas pelas BAL, destacam-se as bacteriocinas (peptídeos antimicrobianos) que possuem a capacidade de atuar contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (13-14). Quando combinadas com outras substâncias antimicrobianas ou tratamentos físicos, as bacteriocinas podem ser aplicadas como parte de uma tecnologia de barreira, com impacto positivo na preservação da qualidade e inocuidade do produto (15-16).

Tendo em vista essa notoriedade das BAL e busca por novas alternativas bioconservantes, o objetivo do presente trabalho foi isolar BAL com potencial antimicrobiano, determinar a capacidade antagonista frente a cepas de microrganismos patogênicos de interesse para a saúde pública, avaliar a atividade bacteriocinogênica e determinar as espécies com potencial bacteriocinogênico de queijos frescos comercializados em Botucatu - SP.

MATERIAL E MÉTODOS

O período de coleta das amostras ocorreu entre 6 de Maio de 2019 a 14 de Fevereiro de 2020, somando um total de 43 amostras de queijos frescos comercializados informalmente. Após a aquisição, os queijos foram identificados e acondicionados em caixas isotérmicas à 4 °C até o momento da análise, realizada no Laboratório de Análises Microbiológicas do Serviço de Orientação a Alimentação Pública (SOAP) - UNESP.

O isolamento de BAL com potencial bacteriocinogênico foi realizado pela técnica descrita por Todorov e Dicks (17) com algumas modificações. Foram pesadas assepticamente 25 g da amostra de queijo fresco em um saco plástico estéril e adicionados 225 mL de solução salina a 0,85% para efetuar a diluição da amostra. Homogeneizou-se no *stomacher* por 2 min, sendo essa diluição considerada a 10^{-1} . A partir da diluição de 10^{-1} , foram realizadas diluições seriadas até a diluição de 10^{-9} em tubos contendo 9 mL de solução salina a 0,85%.

Em placas previamente preparadas e identificadas, contendo ágar De Man Rogosa e Sharpe (Ágar MRS), foram inoculados 0,1 mL de cada diluição e com auxílio da alça de Drigalski, o inóculo foi espalhado por toda a placa de Petri até a sua total absorção. Após a secagem, foi distribuída uma sobrecamada de ágar MRS fundido em cada placa. Após a solidificação da sobrecamada, as placas foram colocadas em jaras de anaerobiose contendo gerador de atmosfera anaeróbica e incubadas em estufa a 30 °C por 72 h. Placas contendo até 50 colônias foram selecionadas para testes posteriores.

Confirmação de BAL

Foram realizadas a coloração de Gram seguindo as recomendações do fabricante (kit de coloração de Gram) e a prova de catalase. Foram consideradas como características de BAL (e passaram para as próximas etapas), as colônias que apresentavam padrões de cocos ou bacilos Gram-positivos e resultado negativo para a prova de catalase (18).

Avaliação da atividade antagonista de BAL pelo método "spot on the lawn"

Os isolados foram submetidos à avaliação do potencial de inibição de patógenos e deteriorantes, segundo Lewus e Montville (19), com algumas modificações. Em placas de Petri contendo ágar MRS, foram pipetados 10 µL do caldo MRS contendo as BAL isoladas, sendo o volume transferido para quatro pontos equidistantes. Após absorção, as placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. Após este período, foi realizada a sobrecamada com 10 mL de ágar BHI semi-sólido a 1% contendo 6 log UFC de *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella* Typhimurium

ATCC 14028; *Escherichia coli* ATCC 8739, *Lactobacillus sakei* ATCC 15521, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610. Cada espécie inoculada foi testada separadamente em placas contendo ágar MRS. Após a solidificação, as placas foram novamente incubadas na estufa a 35 °C por mais 24 h. Foi realizada a leitura das placas com a medição dos halos de inibição formados, com a utilização de uma régua. As BAL que produziram halos de inibição de no mínimo 2 mm de diâmetro foram consideradas como potencialmente produtoras de bacteriocinas, sendo então submetidas aos testes de avaliação da capacidade de produção de bacteriocinas como descrito por Todorov e Dicks (20) e Pegoraro et al. (11).

Avaliação da atividade bacteriocinogênica de BAL - efeito antagônico do sobrenadante livre de células (SLC) de BAL

Os isolados foram cultivados em caldo MRS e incubados a 30 °C por 24 h. Após a incubação, o caldo foi centrifugado a 14.000 x g por 15 minutos, obtendo-se assim o SLC. Após a obtenção, o SLC teve seu pH ajustado para 6,5 com NaOH 1M, para prevenir o efeito inibitório em decorrência da produção de ácido lático. Em seguida, os tubos contendo os SLC, foram tratados a 80 °C em um bloco aquecedor por 10 min, para inativar a ação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Após este procedimento foi realizada a técnica "spot on the lawn" transferindo-se 10 µL de cada sobrenadante para placas contendo ágar BHI e após absorção, foi realizada a sobrecamada com ágar BHI contendo 6 log UFC de *L. monocytogenes* ATCC 422 e 7644 (microrganismos indicadores de produção de bacteriocina). As placas foram incubadas a 35 °C por 24 h e após este período foi realizada a leitura do tamanho dos halos de inibição, sendo considerados positivos os SLC que produziram halos de inibição de no mínimo 2 mm de diâmetro frente aos microrganismos indicadores.

Confirmação da natureza proteica do SLC de BAL

Os sobrenadantes dos isolados confirmados na etapa anterior foram tratados com 0,1 mg/mL de proteinase K e incubados a 30 °C por 2 h. Em seguida, foram submetidos à temperatura de 98 °C por 2 min, para inativação da enzima. Após este procedimento, foi realizada a técnica "spot on the lawn" como descrito anteriormente. A perda da atividade antimicrobiana foi registrada como resultado positivo para produção de bacteriocina, confirmando a natureza proteica. Os isolados confirmados nesta etapa, foram submetidos a novos testes para a avaliação da temperatura ótima de produção de bacteriocinas e efeito do pH e da temperatura na sua produção.

Temperatura ótima de produção de bacteriocinas e diluição crítica

Os isolados selecionados foram incubados a 25 °C, 30 °C e 37 °C por 24 h em caldo MRS. Após este período, o SLC foi preparado como descrito anteriormente. Em seguida, foram submetidos ao método de diluição crítica em 10 mM Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS) em pH 6.5 (11-21). A atividade da bacteriocina contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* 422 foi testada usando o teste local de ágar (20) e expressa em unidades arbitrárias (UA/mL), sendo calculada como segue: $ab \times 100$; onde "a" correspondeu ao fator de diluição e "b" a última diluição que produziu halo de inibição de no mínimo 2 mm. Nos testes seguintes, foram utilizados os SLC a partir de isolados incubados na temperatura ótima de produção de bacteriocinas.

Efeito do pH sobre a produção de bacteriocinas por BAL

Foram produzidos SLC com ajuste de pH em diferentes valores (2, 4, 6, 8 e 10) utilizando HCl 1N ou NaOH 1N. Após 1 h de incubação a 30 °C, os sobrenadantes foram neutralizados a pH 6, tratados a 80 °C por 10 min, e a atividade bacteriocinogênica determinada pelo método de diluição crítica como indicado anteriormente frente aos microrganismos indicadores (*L. monocytogenes* ATCC 422 e 7644). As placas foram incubadas por 24 h a 35 °C e avaliaram-se as diluições que produziram halos de inibição. O resultado foi expresso em UA/mL.

Efeito da temperatura sobre a produção de bacteriocinas por BAL

Os SLC foram incubados a 7 °C, 42 °C, 60 °C e 80 °C por 2 h, e a 121 °C/15 min. Após este período, o pH foi ajustado para 6, tratados a 80 °C por 10 min, e a atividade bacteriocinogênica determinada pelo método de diluição crítica. O resultado foi expresso em UA/mL.

Avaliação do espectro de inibição do SLC de BAL

Cada SLC foi obtido e tratado como descrito anteriormente e testado contra os seguintes alvos: *Bacillus cereus* NVH 0173/05 e 1600075-95, *Escherichia coli* ATCC 25922 e 8739, *Lactobacillus sakei* ATCC 15521, *Listeria monocytogenes* ATCC 506, 422 e 7644, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, *Salmonella* *Thiophymurium* ATCC 14028, *Salmonella* Heidelberg, *Serratia* 16GB, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610.

Placas com cerca de 6 log UFC/mL de cada microrganismo foram preparadas e o "spot on the lawn" do SLC foi realizado. As placas foram incubadas nas melhores condições de crescimento de cada microrganismo alvo. Zonas de inibição maiores que 2 mm foram consideradas como positivas.

A identificação das espécies de BAL classificadas como produtoras de bacteriocinas, foi realizada pelo laboratório especializado, Qualileite da FMVZ/USP utilizando a técnica de *Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF-MS).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A diversidade de microrganismos presentes nos queijos, pode ser procedente de vários fatores, dentre eles da própria matéria prima (leite), das etapas de produção, armazenamento, processamento e das condições higiênico sanitárias a que são submetidos. As BAL, desempenham funções importantes que contribuem tanto com o processo de maturação do queijo, como também, proporcionam uma ação bioprotetora através da competição por nutrientes com microrganismos indesejáveis (9-22).

Das 43 amostras de queijos frescos não inspecionados comercializados em Botucatu-SP, foram isoladas 303 cepas suspeitas de BAL. Destas, 294 foram confirmadas pelas técnicas de Gram e catalase. Das 294 BAL, foram selecionadas 108 para o teste de antagonismo. Todos os 108 isolados apresentaram algum efeito antagônico frente aos microrganismos testados, produzindo halos de inibição de no mínimo 2 mm de diâmetro. O fato de haver atividade antagonista da BAL contra patógenos é muito relevante e tendo em vista que nem todas as cepas são produtoras de bacteriocina, e que seu efeito inibitório pode estar ocorrendo em decorrência da produção de diferentes substâncias, o SLC foi analisado para comprovar a natureza proteica uma vez que as bacteriocinas são peptídeos de baixo peso molecular e permanecem no

1
2

sobrenadante após a centrifugação. Deste modo, dos 108 isolados, 17 foram classificados como produtores de bacteriocinas (Tabela 1).

A temperatura de armazenamento do queijo durante e após a sua produção, é um importante fator que pode interferir na qualidade do produto, podendo influenciar diretamente tanto no crescimento das BAL, como no metabolismo e produção de bacteriocinas (11). Foi observado que nas temperaturas de 37 °C (exceto em 2 isolados - 22F e 37H) e 30 °C (exceto em 4 isolados - 22G, 26E, 37H e 43A) a atividade bacteriocinogênica foi maior quando comparada a 25 °C (Tabela 1).

Tabela 1. Temperatura ótima de produção de substâncias inibidoras (em unidades arbitrárias/mL) por bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de queijos frescos não inspecionados comercializados em Botucatu-SP.

Cepa testada	Unidades Arbitrárias/mL		
	25 °C	30 °C	37 °C
20B	800	1600	1600
20C	800	800	1600
22A	400	1600	3200
22E	800	800	3200
22F	800	800	<100
22G	1600	800	3200
26C	800	1600	1600
26D	800	800	1600
26E	1600	800	3200
35F	800	800	1600
36A	800	800	1600
36C	400	800	1600
37H	6400	800	3200
43A	6400	800	6400
43C	800	800	1600
43D	800	1600	3200
43E	800	1600	6400

Esse resultado foi semelhante ao encontrado por Bromberg et al. (23), que avaliaram características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *L. monocytogenes* na carne bovina, tendo verificado que a produção foi maior a 37 °C comparativamente às demais temperaturas testadas (25 °C, 4 °C e -20 °C). Em seu estudo, Todorov (24) também registrou produção ótima da bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum* AMA-K apenas quando incubada a 30 °C ou 37 °C. Pegoraro et al. (11) e Todorov e Dicks (25) obtiveram melhores resultados em 25 °C e 30 °C.

O pH também pode exercer uma influência importante na atividade da bacteriocina, variando de acordo com a espécie produtora e o microrganismo alvo. No presente trabalho, foram observados que os pH que apresentaram maior atividade contra *L. monocytogenes* ATCC

3
4

1
2
3

422 e 7644 na temperatura considerada ideal para a produção da bacteriocina foram 2 e 6. No entanto, o pH 4 em 11 isolados, manteve a produção de bacteriocina constante ou aumentou um pouco a sua atividade, quando comparada com os pH 2 e 6 aqui considerados como melhores efeitos (Tabela 2). Segundo Paixão (35), os isolados de BAL que apresentam taxa de sobrevivência em pH 2 são considerados como tendo boa resistência a ácidos. Isso é importante pois para sobreviver à passagem através do trato gastrointestinal humano e exercer a sua atividade probiótica as BAL, devem ser capazes de suportar o ambiente hostil do suco gástrico e dos sais biliares.

O isolado 22F registrou uma perda de atividade contra os microrganismos alvos durante o experimento. A perda de atividade também foi contabilizada em 14,7% (5 dos 34 isolados) por Pegoraro et al. (11). Noonpakdee et al. (26) verificaram que apesar da bacteriocina WNC 20 ser ativa em amplos valores de pH (entre 2 e 10), a sua atividade foi reduzida significativamente em pH básico. Neste estudo, também observamos uma queda em 58,82% (10 isolados) dos casos no pH 8 e 41,18% (7 isolados) no pH 10. Bromberg et al. (23) analisaram os efeitos da atividade da bacteriocina CTC 484 em diferentes pH em amostras de carne bovina e registraram nível máximo de atividade correspondendo a 1.600 UA/mL em valores de pH entre 2 e 4. Notaram que houve perda de 50% de sua atividade entre os valores de pH 6 a 9 e de 75% no pH 10. Em pH 12 houve uma completa inativação da atividade da bacteriocina.

Tabela 2. Efeito do pH na produção de bacteriocinas (em unidades arbitrárias/mL) produzidas por bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de queijos frescos não inspecionados comercializados em Botucatu-SP.

Cepa testada	Unidades arbitrárias/mL				
	pH 2	pH 4	pH 6	pH 8	pH 10
20B	3200	800	1600	400	400
20C	3200	1600	1600	400	800
22A	1600	1600	1600	800	1600
22E	3200	1600	1600	1600	1600
22F	<100	<100	<100	<100	<100
22G	1600	1600	800	400	1600
26C	1600	1600	1600	800	800
26D	800	800	1600	800	800
26E	800	1600	1600	1600	1600
35F	800	800	1600	800	1600
36A	1600	1600	800	800	1600
36C	800	1600	800	1600	1600
37H	800	1600	800	800	800
43A	3200	800	1600	1600	800
43C	1600	1600	1600	800	1600
43D	1600	1600	800	1600	1600
43E	1600	400	1600	1600	800

4

Além de inibirem o crescimento de microrganismos indesejáveis, as bacteriocinas podem ser utilizadas associadas ao tratamento térmico, uma vez que muitas permanecem estáveis quando submetidas ao aquecimento (27). Quando analisados os efeitos da temperatura sobre a atividade bacteriocinogênica do SLC, observamos que na maior parte dos casos, salvo algumas exceções, houve um decréscimo em relação a atividade bacteriocinogênica na medida em que foram submetidas a temperaturas mais altas (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito da temperatura na produção de bacteriocinas (em unidades arbitrárias/mL) produzidas por bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de queijos frescos não inspecionados comercializados em Botucatu-SP.

Cepa testada	Unidades arbitrárias/mL				
	7 °C	42 °C	60 °C	80 °C	121 °C
20B	3200	1600	1600	800	400
20C	1600	1600	1600	1600	1600
22A	3200	3200	1600	800	800
22E	6400	3200	3200	800	1600
22F	<100	<100	<100	<100	<100
22G	<100	<100	<100	<100	<100
26C	1600	3200	3200	1600	1600
26D	1600	1600	1600	1600	800
26E	3200	6400	6400	3200	6400
35F	3200	3200	3200	1600	800
36A	1600	1600	1600	800	1600
36C	1600	1600	1600	800	400
37H	1600	3200	3200	800	1600
43A	3200	3200	3200	1600	1600
43C	3200	1600	1600	800	800
43D	3200	6400	6400	800	1600
43E	3200	1600	1600	800	800

No caso dos SLC dos isolados 22F e 22G verificamos que não houve efeito considerável da atividade independente da temperatura a que foi submetido (7 °C, 42 °C, 60 °C, 80 °C ou 121 °C) (Tabela 3). Isso pode ser em decorrência da perda progressiva do poder de ação das bacteriocinas sobre as cepas alvo. No entanto, apesar do decréscimo observado, os SLC produzidos a partir de 15 cepas de BAL (88,24%) foram capazes de inibir *L. monocytogenes* após exposição a 7 °C, 42 °C, 60 °C, 80 °C e 121 °C. Resultados semelhantes foram encontrados por Pegoraro et al. (11) onde as bacteriocinas se mostraram ativas em 88,2% dos casos quando expostas a temperaturas entre 7 °C e 80 °C e 11,8% mantendo seus efeitos mesmo após serem submetidas a temperaturas de esterilização. A atividade inibitória da cepa WNC 20 de *Lactococcus lactis* produtora de nisina estudada por Noonpakdee et al. (26), também não foi destruída pela exposição a temperatura elevada (121 °C) em pH 3, só sendo destruída com o aumento do pH.

Quanto ao teste de espectro de ação inibitório do SLC, ocorreu inibição frente às cepas de *L. monocytogenes* ATCC 506 (15 isolados – Exceto: 22F e 22G), *L. monocytogenes* ATCC 422 (11 isolados – Exceto: 22A, 36A, 36C, 37H, 43A e 43E) e *L. monocytogenes* ATCC 7644 (15 isolados – Exceto: 22F e 22G). Os SLC de BAL foram capazes de inibir ambas as cepas

de *L. monocytogenes* testadas. Já para as demais cepas testadas, os SLC não demonstraram resultados satisfatórios (sem formação de halo).

Resultados diferentes foram encontrados por Pegoraro et al. (11-28) que também analisaram amostras de queijos artesanais (do tipo colonial) e obtiveram resultados satisfatórios contra cepas Gram-positivas e negativas em 5 dos 34 isolados analisados. Apesar de ter um efeito maior sobre as bactérias Gram-positivas, principalmente sobre *L. monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, as bacteriocinas também conseguem atuar sobre bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (23, 28, 29,30).

O grupo das BAL do gênero *Enterococcus* possui uma importância considerável no processo de maturação dos queijos e produtos cárneos fermentados, uma vez que através das suas ações glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas proporcionam características desejáveis a estes produtos. Além disso, algumas cepas são produtoras de enterocinas, responsáveis por inibir bactérias deteriorantes e patogênicas. Através da técnica MALDI-TOF, foram detectadas as seguintes espécies pertencentes a este grupo: *Enterococcus faecalis* (isolados 36A e 36C), *Enterococcus faecium* (isolados 20B, 20C, 22A, 22E, 22F, 26C, 26D, 26E, 35F, 37H, 43A, 43C, 43D e 43E) e *Enterococcus durans* (isolado 22G). As espécies encontradas no presente estudo, também foram detectadas em outras pesquisas de Bulut et al. (31), Ouadghiri et al. (32), Lima et al. (33) e Castro (34). Apesar das BAL proporcionarem características sensoriais desejáveis e únicas aos produtos, um aumento em grande proporção de *E. faecalis* não é desejável, pois pode indicar práticas inadequadas de higiene durante o processamento do produto (34).

Segundo Paixão (35) e Azhar, Akbar e Sadiq (36) os *Enterococcus spp.* isolados de fontes alimentares não estão associados a infecções clínicas, no entanto, o consumo de alimentos portadores de bactérias resistentes a antibióticos é uma possível causa da transferência dessa característica para a microbiota presente no hospedeiro. Dentre as variadas espécies pertencentes a este grupo, o *Enterococcus faecium* tem sido utilizado como probiótico ou cultura iniciadora em produtos alimentícios, e tem demonstrado efeitos benéficos quando utilizados no tratamento da síndrome do intestino irritável, diarreia associada a antibióticos, regulação imunológica e controle do nível de colesterol sérico em humanos. A União Europeia já autorizou o uso de várias cepas de *Enterococcus faecium* para uso como aditivos em alimentos e o Advisory Committee on Novel Foods and Processes (ACNFP) também aprovou o uso da cepa *E. faecium* K77D em vários produtos lácteos fermentados como cultura inicial.

O conhecimento da microbiota láctica presente nos queijos, assim como do seu papel no desenvolvimento das características tecnológicas do produto são essenciais para que haja a melhoria e auxílio no desenvolvimento de novos fermentos lácteos, promovendo assim uma maior diversidade de queijos artesanais (8).

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados encontrados, foram detectadas espécies produtoras de bacteriocinas que se mantiveram estáveis mesmo após serem submetidas a diferentes temperaturas e pH. As bacteriocinas produzidas foram capazes de inibir o desenvolvimento de bactérias patogênicas como *L. monocytogenes*.

REFERÊNCIAS

1. Perry KSP. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. Qim Nova [Internet]. 2004 [citado 10 Jul 2020];27(2):293-300. Disponível em:

- <https://www.scielo.br/j/qn/a/nrmhRjf7kXfPXszfrXmRh9m/> doi: 10.1590/S0100-40422004000200020.
2. Paula JCJ, Carvalho AF, Furtado MM. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. Rev Inst Laticínios Cândido Tostes [Internet]. 2009 [citado 11 Jul 2020];64(367-8):19-25. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/ilct/article/view/76/82>
 3. Chalita MAN. O Consumo de queijo como referência para a análise do mercado de qualidade do produto. Rev Econ Sociol Rural [Internet]. 2012 [citado 6 Jul 2020];50(3):545-62. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/restr/a/9nKg8jK3hTybHVJkps7schs/?format=pdf&lang=pt>
 4. Almeida SL, Paiva FG Jr, Guerra JRF. Representação da produção e consumo do queijo coalho artesanal. RIGS [Internet]. 2013 [citado 1 Ago 2020];2(2):37-58. Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/rigs/article/view/9870> doi: 10.9771/23172428rigs.v2i2.9870.
 5. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Milk and dairy products in human nutrition [Internet]. Rome: FAO; 2013 [citado 3 Jul 2020]. Disponível em: <https://www.fao.org/3/i3396e/i3396e.pdf>
 6. Barancelli GV, Silva-Cruz JV, Porto E, Oliveira CAF. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. Arq Inst Biol [Internet]. 2011 [citado 1 Jan 2021];78(1):155-68. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/aib/a/bnRYSSXNWzxQ7fvWdvz3qqn/?lang=pt> doi: 10.1590/1808-1657v78p1552011.
 7. Beloti V. Leite: obtenção, inspeção e qualidade. Londrina: Editora Planta; 2015.
 8. Bruno LM, Machado TF. Caracterização tecnológica de bactérias lácticas visando à sua aplicação na produção de fermentos lácteos [Internet]. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical; 2017 [citado 16 Abr 2021]. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1069267/1/DOC17002.pdf>
 9. Giazzi A. Caracterização e estudo do perfil tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos tipo minas artesanais e leite cru [dissertação] [Internet]. Londrina (PR): Universidade Tecnológica Federal do Paraná; 2017 [citado 21 Mar 2021]. Disponível em: http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/3049/1/LD_PPGTAL_M_Giazzi%2c%20Amanda_2017.pdf
 10. Martins MGG. Patógenos em queijos artesanais e os fatores de risco para sua ocorrência [trabalho de conclusão de curso] [Internet]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2018 [citado 11 Jan 2021]. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/ICBB-BD9TZR/1/corre_o_monog_cd.pdf
 11. Pegoraro K, Sereno MJ, Cavicchioli VQ, Viana C, Nero LA, Bersot LS. Bacteriocinogenic potential of lactic acid bacteria isolated from artisanal colonial type-cheese. Arch Vet Sci [Internet]. 2020 [citado 16 Fev 2021];25(1):35-44. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/340566579_BACTERIOCINOGENIC_POTEN

TIAL OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM ARTISANAL COLONIAL TYPE - CHEESE

12. Marques JL, Funck GD, Dannenberg GS, Cruzen CES, El Halal SLM, Dias ARG, et al. Bacteriocin-like substances of *Lactobacillus curvatus* P99: characterization and application in biodegradable films for control of *Listeria monocytogenes* in cheese. Food Microbiol [Internet]. 2017 [citado 20 Mar 2020];63:159-63. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28040164/> doi: 10.1016/j.fm.2016.11.008.
13. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. Int J Food Microbiol [Internet]. 2001 [citado 23 Abr 2020];71(1):1-20. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160501005608?via%3Dihub> doi: 10.1016/S0168-1605(01)00560-8.
14. Ogaki MB, Furlaneto MC, Maia LF. Revisão: aspectos gerais das bacteriocinas. Braz J Food Technol [Internet]. 2015 [citado 5 Maio 2020];18(4):267-76. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjft/a/RWbydrVtbsPYBCcvphKrvS/?lang=pt#> doi: 10.1590/1981-6723.2215.
15. De Vuyst L, Leroy F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. J Mol Microbiol Biotechnol [Internet]. 2007 [citado 5 Set 2020];13(4):194-9. Disponível em: <https://karger.com/mmb/article-pdf/13/4/194/3097557/000104752.pdf> doi: 10.1159/000104752.
16. Balciunas EM, Castillo Martinez FA, Todorov SD, Franco BDGM, Converti A, Oliveira RPS. Novel biotechnological applications of bacteriocins: a review. Food Control [Internet]. 2013 [citado 9 Ago 2020];32(1):134-42. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512006275?via%3Dihub> doi: 10.1016/j.foodcont.2012.11.025.
17. Todorov SD, Dicks LMT. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. Enzyme Microb Technol [Internet]. 2005 [citado 4 Abr 2021];36(2-3):318-26. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014102290400287X?via%3Dihub> doi: 10.1016/j.enzymictec.2004.09.009.
18. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Gomes RAR, Okazaki MM. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 5a ed. São Paulo: Blucher; 2017.
19. Lewus CB, Montville TJ. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. J Microbiol Methods [Internet]. 1991 [citado 6 Maio 2020];13(2):145-50. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016770129190014H?via%3Dihub> doi: 10.1016/0167-7012(91)90014-H.
20. Todorov SD, Dicks LMT. Screening of lactic-acid bacteria from south african barley beer for the production of bacteriocin-like compounds. Folia Microbiol (Praha) [Internet]. 2004 [citado 22 Ago 2020];49(4):406-10. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15530005/> doi: 10.1007/BF02931601.

21. Harting AM, Hedges AJ, Berkeley RCW. Methods for studying bacteriocins. In: Norris JR, Ribbons DW. Methods in microbiology. Cambridge: Academic Press; 1972. Chap. VII, p. 315-422. doi: 10.1016/S0580-9517(08)70618-4.
22. Bruno LM, Carvalho JDG. Microbiota láctica de queijos artesanais [Internet]. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical; 2009 [citado 15 Abr 2021]. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/748514/1/Doc124.pdf>
23. Bromberg R, Moreno I, Delboni RR, Cintra H. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* ctc 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. Cienc Tecnol Aliment [Internet]. 2006 [citado 8 Jan 2021];26(1):135-44. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/PtZ54qyVQLv7pnfvg9pfTR/citation/?format=pdf&lang=pt>
24. Todorov SD. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* sp. Braz J Microbiol [Internet]. 2008 [citado 9 Jan 2021];39(1):178-87. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/DZR4s5JXp9FvfQLFbBXnDv/?lang=en> doi: 10.1590/S1517-83822008000100035.
25. Todorov SD, Dicks LMT. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. Microbiol Res [Internet]. 2006 [citado 9 Jan 2021];161(2):102-8. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501305000698?via%3Dihub> doi: 10.1016/j.micres.2005.06.006.
26. Noonpakdee W, Santivarangkna C, Jumriangrit P, Sonomoto K, Panvim S. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. Int J Food Microbiol [Internet]. 2003 [citado 4 Abr 2021];81(2):137-45. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160502002192?via%3Dihub> doi: 10.1016/S0168-1605(02)00219-2.
27. Carvalho JDG. Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas [tese] [Internet]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2007 [citado 19 Abr 2021]. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/426721/1/CarvalhoJulianeDoeringGasparinD.pdf>
28. Pegoraro K, Sereno MJ, Belle TH, Barcellos VC, Bersot LS. Espectro de ação das bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas isoladas de queijos coloniais. In: Anais do 25o Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos: Alimentação: A Árvore Que Sustenta a Vida [Internet]; 2016; Gramado (RS). Gramado: FAURGS; 2016 [citado 3 Feb 2021]. p. 1-6. Disponível em: <https://docplayer.com.br/84123657-Espectro-de-acao-das-bacteriocinas-produzidas-por-bacterias-acido-laticas-isoladas-de-queijos-coloniais.html>
29. Tulini FL, Gomes BC, Martinis ECP. Purificação parcial e caracterização de uma bacteriocina produzida por *Enterococcus faecium* 130 isolada de queijo muçarela. Cienc

- Tecnol Aliment [Internet]. 2011 [citado 8 Jan 2021];31(1):155-9. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/L3k5ZpCsVfHcDHDtwLjzFKx/?lang=en> doi: 10.1590/S0101-20612011000100022.
30. Contessa CR, Souza NB, Gonçalo GB, Almeida LS, Manera AP, Moraes CC. Estudo de resistência a cloreto de sódio de bacteriocina de *Lactobacillus sakei*. Rev CSBEA [Internet]. 2018 [citado 8 Jan 2021];4(1):82-8. Disponível em: <https://www.periodicos.udesc.br/index.php/revistacsbea/article/view/13547/9494>
 31. Bulut C, Gunes H, Okuklu B, Harsa S, Kilic S, Coban HS, et al. Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, Comlek peyniri from Cappadocia region. J Dairy Res [Internet]. 2005 [citado 6 Maio 2020];72:19-24. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-dairy-research/article/homofermentative-lactic-acid-bacteria-of-a-traditional-cheese-comlek-peyniri-from-cappadocia-region/FCBDBA593460FDFA3123A98BEACC7C3#> doi: 10.1017/S0022029904000536.
 32. Ouadghiri M, Amar M, Vancanneyt M, Swings J. Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). FEMS Microbiol Lett [Internet]. 2005 [citado 2 Mar 2021];251(2):267-71. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16168579/> doi: 10.1016/j.femsle.2005.08.012.
 33. Lima CDLC, Lima LA, Cerqueira MMOP, Ferreira EG, Rosa CA. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. Arq Bras Med Vet Zootec [Internet]. 2009 [citado 20 Mar 2021];61(1):266-72. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abmvz/a/5GMTXs8mKQxwzBJF5Pffx6y/?lang=pt#> doi: 10.1590/S0102-09352009000100037.
 34. Castro RD. Queijo Minas artesanal fresco de produtores não cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes - MG: qualidade microbiológica e físico-química em diferentes épocas do ano [dissertação] [Internet]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2015 [citado 21 Mar 2021]. Disponível em: https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/SMOC-9VUJ9C/1/disserta_o_final_renata_dias_de_castro_corrigida.pdf
 35. Paixão ISF. Caracterização de Bactérias Ácido Lácticas autóctones de leite de cabra e sua funcionalidade no queijo coalho caprino artesanal [dissertação] [Internet]. Petrolina (PE): Universidade Federal do Vale do São Francisco; 2016 [citado 21 Abr 2023]. Disponível em: <http://www.univasf.edu.br/~tcc/000007/000007b8.pdf>
 36. Azhar F-U-A, Mehnaz S, Akbar A, Sadiq MB. Probiotic characterization of *Enterococcus* spp. isolated from raw goat milk. Braz Arch Biol Technol [Internet]. 2022 [citado 21 Abr 2023];65:e22210091. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/babt/a/krKh3DFp5r5vdz74DwGZ9bJ/?lang=en#> doi: 10.1590/1678-4324-202210091.

Recebido em: 06/02/2023

Aceito em: 12/12/2023

Velame MS, Martins AO, Pereira JG. Caracterização de Bactérias Ácido Lácticas (BAL) isoladas de queijos frescos não inspecionados comercializados em Botucatu, São Paulo. Vet. e Zootec. 2023; v30: 1-13.

1.

TABELAS

Tabela 1. Zonas de inibição (em mm) da avaliação preliminar da atividade antagonista de bactérias ácido láticas (BAL) frente a patógenos (halos maiores que 2 mm foram consideradas positivas).

Isolado de BAL	SALM	LM	EC	LB	PF	SA	YE
2B	0	22,75	22,5	27,25	36,67	31,25	*
5F	24,75	21	0	23,5	20	0	*
5H	29	26	0	0	0	0	0
6A	0	21,5	20,75	24,75	29	21,25	*
6B	0	19	22	13,25	*	20	*
6E	27,75	18,75	22,5	14,25	22,75	31,75	*
6F	0	19,5	21,5	14,5	26	*	*
6H	17	19	21,5	14,25	17	*	*
9B	8,25	13,75	17,75	12,5	30	19,75	*
11A	13	0	15,75	18	0	23,5	*
13H	0	0	0	0	0	0	*
17B	22,25	17	23	9,25	19,25	32,75	*
17C	25,25	20,75	19	0	0	24	*
17E	22,5	21,5	20,25	15,75	25	24	*
17F	21,75	22	19	16,5	0	26	*
17H	24	22,75	20,75	16,25	28	22,5	*
17J	20,75	24	20,75	15,5	15	25,5	*
17K	20,5	24	21,25	15,75	12,5	24	*
18A	19	20,25	22	14,5	18,25	30,5	*
18B	19	22	21	10,5	*	30,5	*
18E	20,5	21,75	21	4,25	20,5	*	*
18F	22,75	22	24,75	0	20,75	*	*
18G	21,75	21	21	0	15	32,5	*
19B	20	18,75	21,25	23,5	0	*	*
19E	22	26,75	0	24,75	0	0	*
19F	20,25	25	0,5	0	0	0	*
20B	15,5	19,25	18	13,75	11,75	23	*
20C	20,25	18,25	17	13,5	12,25	22,75	*
22A	21,75	22,25	13,75	17	5	24	*
22D	17,25	25	22,25	21,75	0	21,5	*
22E	30	39,25	18	17,75	11,25	25	*

22F	28,5	31,5	27,5	22,75	0	32,75	*
22G	30,5	27	33	*	0	30,25	*
23C	21,75	19,5	19,75	11,5	15,75	26,75	*
23D	22,5	21,25	19,5	0	16	24,75	*
23E	17,75	23,25	20,5	0	13,75	33,75	*
23H	21	19,75	18	0	24,5	28,75	*
23I	19	21,5	17	21,5	24,75	21,25	*
24C	28	3	1,25	18,5	0	21,5	*
24D	25,5	9	0,5	21	6	20	*
24E	22	4,25	0	19,25	0	0	*
24F	26,75	28	0	20,5	8	32	*
24G	19,25	0	0	4,25	0	9,75	*
24H	21	0	27,5	23,5	18,5	*	*
26A	0	13,75	15,25	0	0	0	*
26C	18,5	21	19	0	0	*	*
26D	22,25	22,5	23,75	18,75	19,75	*	*
26E	20	21,5	19,75	15	0	23	*
26F	14,5	20	12,5	17,75	0	0	*
26G	15,75	23,25	0	17,75	12	20,5	15,5
28B	19,5	23	20,25	14,25	5	23,75	*
28C	21,75	22,75	21,25	15	27	24,25	*
28E	0	0	0	22,25	0	25,5	*
29A	16	16,25	18,5	12,25	14	28,75	*
29B	19,5	17,75	18,75	13,75	*	19,75	*
29C	13,75	15	16,5	9	0	32	*
29D	14,75	15	18,25	10,5	0	21	*
29E	14,75	16	17	11,25	0	18,75	*
29F	11,75	15,75	19	11,5	*	33	*
30A	19,75	21	22,75	14,25	0	42,25	*
30C	22,5	20,25	20,5	13,5	25,75	*	*
30E	16,25	17,75	13,75	11,5	22,5	*	*
30G	19	20,5	20,75	12,25	*	*	*
31J	21,5	20,75	19,5	0	15	*	*
33G	18	22	18,25	23,25	12,5	29	*
33H	29	0	0	22,5	15,25	*	*
34I	24	19,5	17,75	0	34	29,25	*
34M	22,5	35	29,5	0	0	0	*
34O	23,75	21,5	23,25	12	*	33,5	*
35A	18,5	21	23,75	12,5	10	38,5	*
35B	13,75	20,5	22	11,75	10	30,25	*

35C	21,75	23	20,75	16	12	31,25	*
35D	21	25,5	23,5	11,5	*	33,25	*
35E	20,25	21,75	19,25	11,5	0	40	*
35F	17	21,25	18,25	11,75	0	*	*
36A	19	22	17,75	12	10,25	*	*
36C	18	17,5	18,5	0	21,5	*	*
36D	0	19,75	19,5	21,75	28,5	33	*
36F	0	21,5	18,75	12,75	6	32,75	*
36G	22,25	23,75	20	0	22,5	31,75	*
37C	0	0	0	20,5	0	*	*
37G	18,75	18,75	18,25	13	22	27,5	*
37H	14	20,75	19,5	12,75	22	28,5	*
38B	21,25	0	0	16,75	13,5	20,75	28,75
39F	31,25	8,5	11,75	0	7,75	0	12
39M	33	0	0	0	0	0	*
40A	32,25	28	20	22	15	*	19,5
40B	29,75	27	23,5	14	30	30	*
40C	33,25	29,75	20,5	10	30,5	36	*
40D	32,75	26,75	22	25,75	17,5	32	*
40E	37	28	22,5	11,5	31	34	*
40G	0	26	31	28,25	0	34,25	*
41B	0	0	0	0	0	0	*
41D	0	0	0	19,25	19,75	*	*
41E	0	0	0	16,75	13,75	*	*
41F	17	0	0	18,75	0	0	10,25
42A	27,5	23,75	19	22	29,33	27	*
42B	21	21,5	22,75	11	25,5	31,5	*
42C	24,5	18,5	20,75	8,5	28,5	28,25	*
42D	0	22,75	21,5	15	25	25,5	*
42E	0	22,5	20,25	15,5	*	33	*
42F	0	21	22,75	14	31	19	*
43A	21,25	21,25	18	0	0	*	*
43B	22,5	20,25	22,25	11,25	29,33	27,75	*
43C	20,75	20,5	18,75	11	30	27,25	*
43D	17,5	20,5	20	11,25	22	28,25	*
43E	19,75	21,5	19	14,25	0	32	*
43F	24,5	20,25	20,5	11,5	0	27,5	*

1 *Inibição total de crescimento.

2 Legendas: SALM - *Salmonella* Typhimurium; LM - *Listeria monocytogenes*; EC - *Escherichia coli*; LB
3 - *Lactobacillus sakei*; PF - *Pseudomonas fluorescens*; SA - *Staphylococcus aureus*; YE - *Yersinia*
4 *enterocolitica*

- 1 **Tabela 2.** Temperatura ótima de produção de substâncias inibidoras (em unidades
 2 arbitrárias/mL) por bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de queijos frescos não
 3 inspecionados comercializados em Botucatu-SP.

Cepa testada	Unidades Arbitrárias/mL		
	25°C	30°C	37°C
20B	800	1600	1600
20C	800	800	1600
22A	400	1600	3200
22E	800	800	3200
22F	800	800	<100
22G	1600	800	3200
26C	800	1600	1600
26D	800	800	1600
26E	1600	800	3200
35F	800	800	1600
36A	800	800	1600
36C	400	800	1600
37H	6400	800	3200
43A	6400	800	6400
43C	800	800	1600
43D	800	1600	3200
43E	800	1600	6400

- 1 **Tabela 3.** Efeito do pH na produção de bacteriocinas (em unidades arbitrárias/mL)
 2 produzidas por bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de queijos frescos não
 3 inspecionados comercializados em Botucatu-SP.

Cepa testada	Unidades arbitrárias/mL				
	pH 2	pH 4	pH 6	pH 8	pH 10
20B	3200	800	1600	400	400
20C	3200	1600	1600	400	800
22A	1600	1600	1600	800	1600
22E	3200	1600	1600	1600	1600
22F	<100	<100	<100	<100	<100
22G	1600	1600	800	400	1600
26C	1600	1600	1600	800	800
26D	800	800	1600	800	800
26E	800	1600	1600	1600	1600
35F	800	800	1600	800	1600
36A	1600	1600	800	800	1600
36C	800	1600	800	1600	1600
37H	800	1600	800	800	800
43A	3200	800	1600	1600	800
43C	1600	1600	1600	800	1600
43D	1600	1600	800	1600	1600
43E	1600	400	1600	1600	800

4

5

- 1 **Tabela 4.** Efeito da temperatura na produção de bacteriocinas (em unidades
 2 arbitrárias/mL) produzidas por bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de queijos frescos
 3 não inspecionados comercializados em Botucatu-SP.

Cepa testada	Unidades arbitrárias/mL				
	7°C	42°C	60°C	80°C	121°C
20B	3200	1600	1600	800	400
20C	1600	1600	1600	1600	1600
22A	3200	3200	1600	800	800
22E	6400	3200	3200	800	1600
22F	<100	<100	<100	<100	<100
22G	<100	<100	<100	<100	<100
26C	1600	3200	3200	1600	1600
26D	1600	1600	1600	1600	800
26E	3200	6400	6400	3200	6400
35F	3200	3200	3200	1600	800
36A	1600	1600	1600	800	1600
36C	1600	1600	1600	800	400
37H	1600	3200	3200	800	1600
43A	3200	3200	3200	1600	1600
43C	3200	1600	1600	800	800
43D	3200	6400	6400	800	1600
43E	3200	1600	1600	800	800

1 **Tabela 5.** Determinação das espécies com potencial bacteriocinogênico

Número da amostra	Espécie identificada
20B	<i>Enterococcus faecium</i>
20C	<i>Enterococcus faecium</i>
22A	<i>Enterococcus faecium</i>
22E	<i>Enterococcus faecium</i>
22F	<i>Enterococcus faecium</i>
22G	<i>Enterococcus durans</i>
26C	<i>Enterococcus faecium</i>
26D	<i>Enterococcus faecium</i>
26E	<i>Enterococcus faecium</i>
35F	<i>Enterococcus faecium</i>
36A	<i>Enterococcus faecalis</i>
36C	<i>Enterococcus faecalis</i>
37H	<i>Enterococcus faecium</i>
43A	<i>Enterococcus faecium</i>
43C	<i>Enterococcus faecium</i>
43D	<i>Enterococcus faecium</i>
43E	<i>Enterococcus faecium</i>

4 CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, verificou-se que alguns dos queijos frescos comercializados em Botucatu, apresentaram em sua microbiota BAL com importante capacidade de produção bacteriocinogênica, que por sua vez são capazes de atuar inibindo o desenvolvimento de bactérias patogênicas como *L. monocytogenes*.

É relevante ressaltar a importância de serem realizados estudos adicionais a fim de identificar e caracterizar as substâncias antimicrobianas produzidas com capacidade biotecnológica. Essa caracterização detalhada é importante ao se considerar a aplicabilidade dessas substâncias como uma fonte alternativa para biopreservação dos alimentos.

5 BIBLIOGRAFIA

1. ALMEIDA, S.L.; JÚNIOR, F.G.P.; GUERRA, J.R.F. Representação da Produção e Consumo do Queijo Coalho Artesanal. **Revista Interdisciplinar de Gestão Social (RIGS)**. v.2 n.2, 2013 Acesso em: 01/07/2020 <https://portalseer.ufba.br/index.php/rigs/article/view/9870>
2. ANANOU, S.A.; MUNÓZ, A.; GÁLVEZ, A.C.; MARTÍNEZ, M.B.; MAQUEDA, M.; VALDIVIA, E. Optimization of enterocin AS-48 production on a whey-based substrate. **International Dairy Journal**.v.18, p. 923-927, 2008. Acesso em: <https://sci-hub.do/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.02.001>
3. AND, H. C.; HOOVER, D. G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety**, v. 2, n.3, p. 82-100, 2003.
4. AUNG, M.M.; CHANG, Y,S. Traceability in a food supply chain: Safety and quality perspectives. **Food Control**. n. 39, p. 172e184, 2014. Acesso em: 03/07/2020 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713513005811?via%3Dihub>
5. BALCIUNAS, E. M.; CASTILLO, M. F. A.; TODOROV, S.D.; FRANCO, B.D.G.M.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R.P.S.O. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, v. 32, p. 134-142, 2013.
6. BARANCELLI, G. V.; CRUZ, S.J.V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C.A.F. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivo do Instituto Biológico**. v.78, n.1, p.155-168, 2011. Acesso em 11/01/2021. <https://www.scielo.br/pdf/aib/v78n1/1808-1657-aib-78-1-0155.pdf>
7. BARCELOS, M.M.; MARTINS. L.; GRENFELL, R. C.; JULIANO, L.; ANDERSON, K.L.; SANTOS, M.V.; GONÇALVES, J.L. Comparison of standard and on-plate extraction protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF MS. **Brazilian Journal of Microbiology**. n.50, p. 849 – 857, 2019.
8. BELOTI, V.; TAMANINI, L.A.; NERO, A.; MOREIRA, M.A.S.; SILVA, L.C.C.; FAGNANI, R.; REIS, K.T.M.G. **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Londrina: Ed.Planta, 2015
9. BEMENA, L.D.; MOHAMED, L.A.; FERNANDES, A.M.; LEE, B.H. Applications of bacteriocins in food, livestock health and medicine. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**. v. 3, n. 12, p. 924-949, 2014.
10. BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro

de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Acesso em: 16/05/2020 [https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/2017/decreto-9013-29-marco-2017-784536-norma-atualizada-pe.pdf](https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/2017/decreto-9013-29-marco-2017-784536-norma-2017-784536-norma-atualizada-pe.pdf)

11. BRASIL. Decreto nº 9.918, de 18 de Julho de 2019. Regulamenta o art. 10-A da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, que dispõe sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. Acesso em: 17/05/2020 <http://www.in.gov.br/web/dou/-/decreto-n-9918-de-18-de-julho-de-2019-198615217>
12. BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária **Anuário de leite 2019**. Edição digital, 140p. 2019 Acesso em: 21/03/2020 www.embrapa.br/gado-de-leite
13. BRASIL. Lei nº 1.283 de 18 de Dezembro de 1950. Dispõe sobre a inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal. Acesso em: 27/04/2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L1283.htm
14. BRASIL. Lei nº 5.517 de 23 de Outubro de 1968. Dispõe sobre o exercício da profissão de médico-veterinário e cria os Conselhos Federal e Regionais de Medicina Veterinária. Acesso em: 27/04/2020 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L5517.htm
15. BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Cartilha. Selo ARTE: Tradição, Cultura e Regionalismo, Brasília, DF, 2020. Acesso em: 30/06/2020 <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/selo-arte/publicacoes/SELOARTEv2.pdf/view>
16. BRASIL. Ministério da Indústria, Comércio exterior e Serviços - MDIC. **Cadeia Agroindustrial do Leite no Brasil: Diagnóstico dos Fatores Limitantes à Competitividade**. Brasília, DF, 2018.
17. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Guia alimentar para a população brasileira : promovendo a alimentação saudável / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Acesso em: 20/03/2020 http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_alimentar_populacao_brasileira_2008.pdf
18. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed., 1. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. Acesso em: 20/03/2020 https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_alimentar_populacao_brasileira_2ed.pdf

- 1 19. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.
2 Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis Coordenação
3 Geral de Doenças Transmissíveis. Surtos de doenças transmitidas por
4 alimentos: Informe de 2018. Brasília, DF, 2019 Acesso em: 13/07/2020
5 [https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/maio/17/Apresentacao-Surtos-
7 DTA-Maio-2019.pdf](https://www.saude.gov.br/images/pdf/2019/maio/17/Apresentacao-Surtos-
6 DTA-Maio-2019.pdf)
- 8 20. BRASIL. Portaria nº 146, de 07 de Março de 1996. Aprova o Regulamento
9 Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Publicado no Diário Oficial
10 da União de 11/03/1996, Seção, Página 3977, Brasília, DF, 1996. Acesso
11 em: 20/04/2020. [http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-
13 consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=4344](http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-
12 consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=4344)
- 14 21. BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R.R., CINTRA, H.C.
15 Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp.
16 *hordniae* ctc 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne
17 bovina. **Ciência e Tecnologia Alimentar**. v. 26 , n. 1 p. 135-144, 2006.
18 Acesso em: 08/01/2021. <https://www.scielo.br/pdf/cta/v26n1/28862.pdf>
- 19 22. BRUNO, L.M.; MACHADO, T.F. Empresa Brasileira de Pesquisa
20 Agropecuária.
- 21 23. BULUT, C.; GUNES, H.; OKUKLU, B.; HARSA, S.; KILIC, S.; KOBAN, H.
22 S.; YENIDUNYA, A.F. Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional
23 cheese, Comlek peyniri from Cappadocia region. **Journal of Dairy**
24 **Research**. v. 72, p. 19–24, 2005.
- 25 24. CASTRO, R. D. **Queijo Minas artesanal fresco de produtores não**
26 **cadastrados da mesorregião de campo das vertentes – mg: qualidade**
27 **microbiológica e físico-química em diferentes épocas do ano**. 2015.
28 89-90 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Escola de Veterinária,
29 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. Acesso em
30 21/03/21: [https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/SMOC-
32 9VUJ9C/1/disserta_o_final_renata_dias_de_castro_corrigida.pdf](https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/SMOC-
31 9VUJ9C/1/disserta_o_final_renata_dias_de_castro_corrigida.pdf)
- 33 25. CONTESSA, C.R.; SOUZA, N. B.; GONÇALO, G.B.; ALMEIDA, L. S.;
34 MANERA, A.P.; MORAES, C. C. Estudo de resistência a cloreto de sódio
35 de bacteriocina de *Lactobacillus sakei*. **Revista do Congresso Sul**
36 **Brasileiro de Engenharia de Alimentos**. v. 4, n. 1, p.82, 2018. Acesso em
37 08/01/2021. <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/1567>.
- 38 26. COSTA, B.S.; CIRÍACO, N. M.; SANTOS, W.L.M.; SANTOS, T. M.;
39 ORNELLAS, C. B. D. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**,
40 n.77, p. 9-31, 2015. Acesso em: 25/04/2020
41 [https://vet.ufmg.br/ARQUIVOS/FCK/file/editora/caderno%20tecnico%2077
43 %20inspecao%20produtos%20origem%20animal.pdf](https://vet.ufmg.br/ARQUIVOS/FCK/file/editora/caderno%20tecnico%2077
42 %20inspecao%20produtos%20origem%20animal.pdf)
- 44 27. CHALITA, M. A.N. O Consumo de queijo como referência para a análise
45 do mercado de qualidade do produto. **RESR**, Piracicaba-SP, v. 50, n. 3, p.
46 545-562, 2012 Acesso em: 06/07/2020

https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-20032012000300009

28. CHIKINDAS, M.L; WEEKS, R.; DRIDER, D.; CHISTYAKOV, V.A.; DICKS, L.M.T. Functions and emerging applications of bacteriocins. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 49, p. 23–28, 2018. Acesso em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0958166917300988?via%3Dihub>
29. CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.1-20, 2001.
30. COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**. v. 3, p 777-788,2005
31. CRUXEN, C. E. S.; FUNCK, G. D.; DANNENBERG, G. S.; HAUBERT, L.; MARQUES, J. L.; KRONING, I. S.; CHAVES, F. C.; SILVA, W.P.; FIORENTINI, A. M. Characterization of *Staphylococcus xylosus* LQ3 and its application in dried cured sausage. **LWT – Food Science and Technology**, v. 86, p. 538-543, 2017.
32. DE VUYST, L.; LEROY, F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 194-199, 2007.
33. Embrapa Agroindústria Tropical. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Caracterização Tecnológica de Bactérias Lácticas Visando à sua Aplicação na Produção de Fermentos Lácticos**. Embrapa Agroindústria Tropical, 2017.
34. FANI, M. Nisina: Um conservante alimentício natural. **Aditivos & Ingredientes**. n. 133, p, 26-32, 2016. Acesso em: https://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201611/2016110914991001478189165.pdf
35. FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Milk and dairy products in human nutrition**. Rome, p. 266-267, 2013. Acesso em; 03/07/2020 <http://www.fao.org/3/i3396e/i3396e.pdf>
36. FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization – FAO/ WHO, **Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. FAO Food and Nutrition Paper 85. FAO, Rome, Italy. 2006
37. FDA. US Food and Drug Administration. Direct food substances affirmed as generally recognized as safe. **Federal Register** 42 FR 14653, Mar 15, 1977, Revised as of Sept 19, 2019 . Acesso em: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=184>

38. FIB. Agentes antimicrobianos químicos e naturais. **Food Ingredients Brasil**. n.15, p.36-42, 2010.
39. GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; OMAR, N.B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**. v. 120, p. 51–70, 2007.
40. GANGULY, S. Basic Principles for Effective Food Preservation: A Review. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**. v.1, n. 6, p. 84-85, 2013.
41. GIAZZI, A. **Caracterização e estudo do perfil tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos tipo minas artesanais e leite cru**. 2017. 75 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, campus Londrina. Acesso em: 21/03/2021 http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/3049/1/LD_PPGTAL_M_Giazzzi%2c%20Amanda_2017.pdf
42. GOKTEPE, I.; JUNEVA, V. K.; AHMEDNA, M. **Probiotics in food safety and human health**. Taylor & Francis Group, LLC: Boca Raton, FL, 2006.
43. HAMMAMI, R.; FLISS, I.; CORSETTI, A. Editorial: Application of Protective Cultures and Bacteriocins for Food Biopreservation. **Protective Cultures and Bacteriocins for Food Biopreservation**. v.10, n. 1561, p. 1-2, 2019
44. HERMANN, G. **Potencial bacteriocinogênico e probiótico de bactérias ácido lácticas isoladas de leite e queijos artesanais**. 2013. 101 f. Tese (Doutorado em Ciência e tecnologia dos alimentos). Universidade Federal de Santa Maria. Centro de Ciências Rurais, Santa Maria, RS. Acesso em: 13/04/2021: https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/3391/HERMANN_S%2c%20GISLAINE.pdf?sequence=1&isAllowed=y
45. HOOVER, D. G.; STEENSON, L. R. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. Academic Press, Inc.: San Diego, California, 1993.
46. HORVATH, P.; COUTE-MONVOISIN, A. C.; ROMERO, D. A.; BOYAVAL, P.; FREMAUX, C.; BARRANGOU, R. Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 62-70, 2009.
47. HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers Microbiology**. v.25, 2012 Acesso em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00012/full>
48. IFPR. INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ (IFPR). **Apostila do curso Pronatec: Preparador de derivados de leite**. Editora IFPR, Paraná, p.27

(112), 2012. Acesso em: 10/07/2020 <http://pronatec.ifpr.edu.br/wp-content/uploads/2012/07/pdl1.pdf>

49. JOHNSON, E.M.; JUNG, Y.G.; JIN, Y.Y.; JAYABALAN, R.; YANG, S.H.; SUH, J.W. Bacteriocins as food preservatives: Challenges and emerging horizons. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 58, n. 16, p. 2743-2767, 2018. Acesso em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2017.1340870>
50. JUNIOR, J.C.R.; SANTOS, I.G.C.; DIAS, B.P.; MENDES, L.P.; BARBON, A.P.A.C. Perfil do consumidor brasileiro e hábitos de consumo de leite e derivados. **Archives of Veterinary Science**. v.25, n.2, p.21-30, 2020. Acesso em: 07/07/2020 <https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/72429/41006>
51. JUNIOR, J.C.R.; SHECAIRA, C.L.; SILVA, F.F.; PARREN, G.E.; BELOTI, V. Influência de boas práticas de higiene de ordenha na qualidade microbiológica do leite cru refrigerado. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 6, p. 395-404, 2014. Acesso em: 01/07/2020 <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/343>
52. KLEEREBEZEM, M.; HUGENHOLTZ, J. Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 232-237, 2003.
53. KUMARIYA, R.; GARSAB,A.K.; RAJPUTC, Y.S.; SOODC, S.K.; AKHTARD, N.; PATELE, S. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. **Microbial Pathogenesis**. v.128, p. 171–177, 2019
54. LEWUS, C. B.; MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactis acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 13, n. 2, p. 145-150, 1991.
55. LIMA, C. D. L. C.; LIMA, L. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; FERREIRA, E.G.; ROSA, C.A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 61, n. 1, p. 266-272. 2009. 20 de Março 2021 Acesso em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352009000100037
56. LÖBMANN, S.H.; STEPHAN, A.; SCHULZ, S.; SCHNEIDER, T.; SHAVERSKIY, A.; TUSÉ, D.; GIRITCH, A.; GLEBA, Y. Colicins and Salmocins – New Classes of Plant-Made Non-antibiotic Food Antibacterials. **Frontiers in Plant Science**. v.10, n. 437, p.1-16, 2019. Acesso em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00437/full>
57. LOPETUSO, L.R.; GIORGIO, M.E.; SAVIANO,A.; SCALDAFERRI, F.; GASBARRINI, A.; CAMMAROTA, G. Bacteriocins and Bacteriophages:

Therapeutic Weapons for Gastrointestinal Diseases?. **International Molecular Sciences**. v.20, n. 183, p.1-12, 2019

58. LUCERA, A.; COSTA, C.; CONTE, A.; NOBILE, M.A.D. Food applications of natural antimicrobial compounds. **Frontiers in microbiology**. v. 3, n. 287, 2012
59. MARQUES, J. L.; FUNCK, G. D.; DANNENBERG, G. D. S.; CRUXEN, C. E. D. S.; HALAL, S. L. M. E.; DIAS, A. R. G.; FIORENTINI, A. M.; SILVA, W. P. Bacteriocin-like substances of *Lactobacillus curvatus* P99: characterization and application in biodegradable films for control of *Listeria monocytogenes* in cheese. **Food Microbiology**, v. 63, p. 159-163, 2017.
60. MARTINS, M.G.G. **Patógenos em queijos artesanais e os fatores de risco para sua ocorrência**. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018. Acesso em 11/01/2021. https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/ICBB-BD9TZR/1/corre_o_monog_cd.pdf
61. MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A.J.; BERKELEY, R.C.W. Methods for studying bacteriocins. In: NORRIS, J. R.; RIBBONS, D. W. (Eds.) **Methods in Microbiology**. New York: Academic Press, 1972. v. 7a, p. 313-342.
62. 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.
63. MENEZES, L.D.M. et al. **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. 16. 2009, Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Analistas de Alimentos, 2009. Acesso em 11/01/2021. <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/1949/1/FJTMSJ28072017.pdf>
64. MICHAELIS. **Michaelis Dicionário Brasileiro da Língua Portuguesa**. São Paulo: Editora Melhoramentos Ltda, 2015. Acesso em: 01/07/2020 <https://michaelis.uol.com.br/moderno-portugues>
65. MIRANDA, Z. B. Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Revista CFMV**. n 26, p. 21 –26, 2002. Acesso em: 01/05/2020 <http://certidao.cfmv.gov.br/revistas/edicao26.pdf>
66. MINISTÉRIO PÚBLICO DO ESTADO DE SANTA CATARINA (MPSC). Centro de Apoio Operacional do Consumidor. Cartilha sobre segurança alimentar de produtos de origem animal - Programa de Proteção Jurídico-Sanitária dos Consumidores de Produtos de Origem Animal Acesso em: 27/04/2020

https://documentos.mpssc.mp.br/portal/conteudo/cao/cco/programas/cartilha_poa_web.pdf

67. MORAES, M. M. B.; FILHO, B. R. Mercado Brasileiro de Lácteos: análise dos impacto de políticas de estímulo à produção. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, Piracicaba-SP, v. 55, N. 4, p. 783-800, Out/Dez, 2017. Acesso em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-20032017000400783&lng=pt&tlng=pt
68. MOTTA, A.S. ; GOMES, M. S.M. Technological and functional properties of Lactic acid bacteria: the importance of these Microorganisms for food. **Revista Institucional Laticínios Cândido Tostes**. V. 70, n. 3, p. 172-184, 2015.
69. MUNIZ, CORREIA. L.; MADRUGADA, WINCK. S.; ARAÚJO, LUIZA. C. Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no Sul do Brasil: um estudo de base populacional. **Ciência & Saúde Coletiva**, 18(12):3515-3522, 2013.
70. NASCIMENTO, M.S; MORENO,I.; KUAYE,A.Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão.**Brazilian Journal of Food Technology**. v. 11, n. 2, p. 120-127, abr./jun, 2008
71. NIAMAH, A.K. Structure, mode of action and application of pediocin natural antimicrobial food preservative: A review. **Basrah Journal of Agricultural Sciences**. v. 31, n. 1, p. 59-69, 2018. Acesso em: https://www.researchgate.net/publication/326877201_Structure_mode_of_action_and_application_of_pediocin_natural_antimicrobial_food_preservative_A_review
72. NOONPAKDEE, W.; SANTIVARANGKNA, C.; JUMRIANGRIT, P. et al. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81,p. 137-145, 2003. Acesso em 11/01/2021. [https://scihub.do/10.1016/s0168-1605\(02\)00219-2](https://scihub.do/10.1016/s0168-1605(02)00219-2)
73. OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F. Review: General aspects of bacteriocins. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 267-276, 2015.
74. OLIVEIRA, M.S. **Qualidade higiênico-sanitária e perigos microbiológicos dos queijos minas frescal clandestinos comercializados no norte do Tocantins**.2020. Dissertação (Mestrado acadêmico em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos) - Universidade Federal do Tocantins Câmpus de Araguaína, Araguaína - TO, 2020. Acesso em: <http://repositorio.uft.edu.br/bitstream/11612/2009/1/Monike%20da%20Silva%20Oliveira%20-%20Disserta%20c3%a7%20c3%a3o.pdf>

- 1 75. OPAS/OMS. Organização Pan-americana de Saúde/ Organização Mundial
2 da Saúde. Folha informativa: Alimentação saudável. Julho de 2019. Acesso
3 em: 20/03/2020
4 [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5964:folha-informativa-alimentacao-saudavel&Itemid=839)
5 [5964:folha-informativa-alimentacao-saudavel&Itemid=839](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5964:folha-informativa-alimentacao-saudavel&Itemid=839)
6
- 7 76. ORTU, S.; FELIS, G. E.; MARZOTTO, M.; DERIU, A.; MOLICOTTI, P.
8 SECHI, L. A.; DELLAGLIO, F.; ZANETTI, S. Identification and functional
9 characterization of *Lactobacillus strains* isolated from milk and Gioddu, a
10 traditional Sardinian fermented milk. **International Dairy Journal**, v. 17, p.
11 1312-1320, 2007.
12
- 13 77. OUADGHIRI, M.; AMAR, M.; VANCANNEYT, M. SWINGS, J. Biodiversity
14 of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). **FEMS**
15 **Microbiology Letters**. v. 251, p. 267–271, 2005.
16
- 17 78. PAIXÃO, I.S.F. **Caracterização de Bactérias Ácido Láticas autóctones**
18 **de leite de cabra e sua funcionalidade no queijo coalho caprino**
19 **artesanal**.2016. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal).
20 Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF. Acesso em
21 14/04/2021 <http://www.univasf.edu.br/~tcc/000007/000007b8.pdf>
22
- 23 79. PAULA, J.C.J.; CARVALHO, A.F.; FURTADO, M.M.Princípios básicos de
24 fabricação de queijo: do histórico à salga. **Rev. Inst. Latic. “Cândido**
25 **Tostes”**. nº 367/368, p.19-25, 2009. Acesso: 11/07/2020
26 <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/76/82>
27
- 28 80. PEGORARO, K.; SERENO, M.J.; CAVICCHIOLI, V.Q.; VIANA, C.; NERO,
29 L.A.; BERSOT, L.S. Bacteriocinogenic potential of lactic acid bacteria
30 isolated From artisanal colonial type-cheese. **Archives of Veterinary**
31 **Science**, v.25, n.1, p.35-44, 2020.
32
- 33 81. PEGORARO, K.; et al. **Espectro de ação das bacteriocinas produzidas**
34 **por bactérias ácido láticas isoladas de queijos coloniais**. XXV
35 Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos: Alimentação:
36 a árvore que sustenta a vida, 2016. Acesso em 09/01/2021.
37 <http://www.ufrgs.br/sbctars-eventos/xxvcbcta/anais/files/439.pdf>
38
- 39 82. PERRY, K.S.P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos.
40 **Química Nova**, v. 27, n. 2, 293-300, 2004. Acesso em: 10/07/2020
41 [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000200020)
42 [40422004000200020](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000200020)
43
- 44 83. PIVARO, J. No caminho da evolução. **Revista Indústria Laticínios**. Ano
45 XXIII - Jan/Fev 2019 – n. 136, p. 18-19, 2019.
46
- 47 84. PISOSCHI, A.M.; POP, A.; GEORGESCU, C.; TURCUS, V.; OLAH, N.K.;
48 MATHE, E. An overview of natural antimicrobials role in food.European
49 Journal of Medicinal Chemistry. v.143, p. 922-935, 2018. Acesso em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0223523417309984?via%3Dihub>

85. POFFO, F.; SILVA, M.A.C. Caracterização taxonômica e fisiológica de bactérias ácido-láticas isoladas de pescado marinho. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v.31, n. 2, p.303-307, 2011.
86. RAMU, A.; SHIRAHATTI, P.S.; DEVI, A.T.; PRASAD, A.; KUMUDA, J.; LOCHANA, M. S.; ZAMEER F.; DHANANJAYA, B. L.; NAGENDRA, P. M. N. Bacteriocins and Their Applications in Food Preservation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 60, n. 18, p. 2, 2015.
87. ROMEIRO, S.; DELGADO, M. Aditivos Alimentares: Conceitos Básicos, Legislação e Controvérsias. **Revista nutrícias**. n.18, p. 22-26, 2013
88. Acesso em: http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2182-72302013000300006&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
89. SACCO. Sacco Comércio, Importação e Exportação de Alimentos Ltda. Qualidade do leite para a produção de derivados: alguns pontos para reflexão. **Boletim tecnológico de laticínios**. Ano X, Ed. 40, 2013. Acesso em: 01/07/2020
http://saccobrasil.com.br/admin/PASTA/VIA_LACTEA_40.pdf
90. SBAN. SOCIEDADE BRASILEIRA DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO. **A importância do consumo de leite no atual cenário nutricional brasileiro**. 2015. Acesso em: 21/03/2020.
http://sban.cloudpainel.com.br/source/SBAN_Importancia-do-consumo-de-leite.pdf
91. SANTOS, L.M.; ROCHA, J. R.; CASALE, D. S.; PINHEIRO Júnior, O. Á. Importância do médico veterinário na produção de alimento de origem animal, para a sociedade: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano. IV, n. 8, 2007. Acesso em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/UonPfZv2wSNgGye_2013-5-22-17-10-17.pdf 01/05/2020
92. SEBRAE. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE). **Estudos de mercado SEBRAE/ESPM 2008 sobre queijos nacionais**. 2008. Acesso em: 01/07/2020
http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/4416AA3881FA433B832574DC00471EF1/%24File/NT0003909A.pdf
93. SILVA, C.C.G.; SILVA, S.P.M.; RIBEIRO, S.C. Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, n. 594, 2018. Acesso em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5900009/>

- 1 94. SILVA, N.; J.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. Manual de Métodos de Análise
2 Microbiológica de Alimentos e Água. 5. Ed, Editora: Blucher, Cap14. 535p,
3 2017.
- 4
- 5 95. SINGH, V.P. Recent approaches in food bio-preservation - a review. **Open**
6 **Veterinary Journal**. v.8, n.1, p104-111,2018.
- 7
- 8 96. SIQUEIRA, B. K. O mercado consumidor de leite e derivados. **Circular**
9 **técnica da Embrapa**, n.120, Juiz de Fora, MG, Jul, 2019. Acesso em:
10 22/03/2020
11 [https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/199791/1/CT-120-](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/199791/1/CT-120-MercadoConsumidorKennya.pdf)
12 [MercadoConsumidorKennya.pdf](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/199791/1/CT-120-MercadoConsumidorKennya.pdf)
- 13
- 14 97. SOBRAL, D.; COSTA, R.B.C.; PAULA, J.C.J.; TEODORO, V.A.M.;
15 MOREIRA, G.M.M.; PINTO, M.S.P. Principais defeitos em queijo Minas
16 artesanal: uma revisão. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de
17 Fora, v. 72, n. 2, p. 108-120, 2017. Acesso em: 02/07/2020
18 <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/600>
- 19
- 20 98. SPERANZA, B.; BEVILACQUA, A.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M.
21 **Starter cultures in food production**. John Wiley & Sons: Garsington
22 Road, Oxford, 2017.
- 23
- 24 99. TIWARI, B.K.; VALDRAMIDIS, V.P.; DONNELL, C.P.O.;
25 MUTHUKUMARAPPAN, K.; BOURKE, P.; CULLEN, P.J. **Journal**
26 **Agriculture and Food Chemistry**. v. 57, n.14, p. 5987-6000, 2009.
- 27
- 28 100. TODOROV, S. D. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* production,
29 genetic organization and mode of action. **Brazilian Journal of**
30 **Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 209-222, 2009.
- 31
- 32 101. TODOROV, S.D. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K
33 isolated from Amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of
34 the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* sp. **Brazilian Journal of**
35 **Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 178-187, 2008. Acesso em 09/01/2021.
36 [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822008000100035)
37 [83822008000100035](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822008000100035)
- 38
- 39 102. TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Effect of medium components on
40 bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and
41 ST341LD, isolated from spoiled olive brine. **Microbiological Research**, v.
42 161, p. 102-108, 2006. Acesso em 09/01/2021.
43 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501305000698>
- 44
- 45 103. TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. *Lactobacillus plantarum* isolated from
46 molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria.
47 **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 318-326, 2005
- 48

- 1 104. TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Screening of Lactic-Acid Bacteria from
2 South African Barley Beer for the Production of Bacteriocin-like compounds.
3 **Folia Microbiologica**, v.49, n. 4, p. 406-410, 2004.
4
- 5 105. TULINI, F. L.; GOMES, B. C.; MARTINIS, E.C.P. Purificação parcial e
6 caracterização de uma bacteriocina produzida por *Enterococcus faecium*
7 130 isolada de queijo muçarela. **Ciência e Tecnologia Alimentar**. v.31 n.1,
8 2011. Acesso em: 08/01/2021.
9 [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612011000100022)
10 [20612011000100022](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612011000100022)
11
- 12 106. VITOLA, H.R.S.; GANDRA, E.A.G.; FRAZZON, A.P.G.; DANNENBERG,
13 G.S.; MOTTA, A.S. Efeito de nisina e pediocina sobre culturas de
14 *Staphylococcus aureus* isoladas de carcaças de frango. **Revista Brasileira**
15 **de Biociências de Porto Alegre**. v. 16, n.1, p. 21-27, 2018. Acesso em:
16 <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3990>
17
- 18 107. WATSON, R. R.; PREEDY, V. R. **Bioactive Foods in Promoting Health:**
19 **Probiotics and Prebiotics**. Elsevier Inc: Jamestown Road, London, 2010.
20
- 21 108. ZHANG, H.; CAI, Y. **Lactic Acid Bacteria – Fundamentals and Practice**.
22 Springer: Dordrecht, 2014.

6 ANEXOS

Normas de publicação

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

LER ATENTAMENTE TODAS AS RECOMENDAÇÕES!!!

- É obrigatório no momento da submissão, o preenchimento de TODOS os dados referentes à autoria (nome, e-mail, ORCID, Afiliação) na submissão do artigo.
- A norma utilizada para referências e citações é a VANCOUVER, NÃO ABNT. As citações numéricas no texto devem ser em ordem crescente (1, 2, 3, 4, etc).
- É necessário o encaminhamento em documentos separados, da contribuição de cada autor na produção do artigo, bem como uma declaração confirmando não haver conflito de interesses.
- Caso envie um trabalho corrigido a pedido da assessoria, NÃO inicie nova submissão. Anexe o trabalho corrigido na publicação já existente !!!
- Responda todos os itens questionados pela assessoria, em ofício resposta, além de anotar no novo texto, as alterações realizadas.
- A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por qualquer outro periódico científico; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao editor", no ato da submissão.
- A contribuição será aceita como original se já estiver disponibilizada em repositório de preprints, desde que esteja indicada a respectiva URL, ou DOI, do preprint.
- O arquivo da submissão deve estar em arquivo editável, formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF. Não serão aceitos arquivos em PDF.
- O arquivo a ser submetido deverá conter Título, Resumo, e Palavras-chave, nos idiomas português, inglês e espanhol.
- Título, Resumo e Palavras-chave deverão ser digitados no formulário de submissão em português, inglês e espanhol, independentemente do idioma do texto.
- No campo designado no formulário de submissão, indicar o idioma do texto, utilizando abreviatura de pt para português, en para inglês e sp para espanhol.
- O título deverá ser digitado no formulário em letras maiúsculas. No texto, usar fonte Times New Roman, tamanho 12, em negrito, centralizado, em letras maiúsculas e siglas em maiúsculas.
- No perfil de cada autor o campo URL deverá ser preenchido com link para seu Currículo Lattes, caso tenha. Campo ORCID deverá ser preenchido para todos os autores. A filiação e titulação de cada um dos autores é obrigatória e deve ser adicionada somente no formulário de submissão, e não no texto.
- O texto deve estar com espaçamento simples, fonte Times New Roman, tamanho 12 e alinhamento justificado.

- 1• Todas as citações no texto, bem como a lista de referências, devem estar em
2 ordem numérica crescente (1, 2 ,3, (...)) conforme exigido pela Norma
3 Vancouver.
- 4• Todas as Referências indicam, como último elemento, os respectivos DOIs, ou
5 URLs dos textos completos onde foram disponibilizados. DOIs e URLs devem
6 ser links ativos para que leitor acesse texto completo a um clique. Exceção feita
7 apenas para referências não disponíveis em texto completo na web.
- 8• Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação,
9 postar no OJS, como documento suplementar, o parecer da Comissão de Ética
10 ou equivalente, onde deverá constar a data de aprovação.
- 11• Deletar nas propriedades do documento a ser submetido todas as informações
12 de autoria, deixando como anônimo, para que autoria não seja identificada pelos
13 avaliadores.
- 14• O texto segue todos os padrões de estilo e requisitos descritos nas Diretrizes
15 para Autores >
16 <https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/about/submissions#authorGuidelines>
- 17• Não serão aceitos os artigos que não constem os metadados completos dos
18 autores, assim como alterações posteriores na revisão estão vetadas, salvo
19 exceções com a permissão formal do Editor-Chefe do periódico.

21 Diretrizes para Autores

22 Desde 2019 aceitamos somente contribuições submetidas via sistema OJS

23 ARTIGOS ORIGINAIS

- 241. Título do trabalho em português, em inglês e em espanhol, fonte Times New
25 Roman, tamanho 12, com espaçamento simples, em negrito e centralizado, em
26 letras maiúsculas;
- 272. Quando necessário, indicar a entidade financiadora da pesquisa, como primeira
28 chamada de rodapé. Indicar também no formulário de submissão, no campo
29 específico para indicar financiamento da pesquisa
- 303. Em caso de envolvimento de seres humanos ou animais de experimentação,
31 postar no OJS, como documento suplementar, o parecer da Comissão de Ética
32 ou equivalente, onde deverá constar a data de aprovação
- 334. Resumo, Abstract e Resumen deverão ser copiados/colados nas caixas de texto
34 específicas de cada idioma, no ato da submissão. Deverão conter, no respectivo
35 idioma, no máximo 400 palavras cada um, com informações referentes à
36 introdução, metodologia, resultados e conclusões. O Abstract e o Resumen
37 deverão ser tradução fiel do Resumo. Independente do idioma em que o artigo
38 for apresentado, deverá conter o Resumo em português, inglês e espanhol.
39 Deverão conter, no máximo, cinco palavras-chave, keywords, e palabras clave
40 que identifiquem o conteúdo do texto
- 415. A estrutura do artigo deverá conter: **Introdução:** deve ser clara, objetiva e
42 relacionada ao problema investigado e à literatura pertinente, bem como aos
43 objetivos da pesquisa. A introdução estabelece os objetivos do
44 trabalho. **Material e Métodos:** deve oferecer informações de reprodutibilidade
45 da pesquisa, de forma clara e concisa, como variáveis, população, amostra,
46 equipamentos e métodos utilizados, inclusive os
47 estatísticos. **Resultados:** apresentação dos resultados obtidos, que devem ser
48 descritos sem interpretações e comparações. Poderá ser sob a forma de tabelas,
49 em folha à parte, no máximo de cinco, ordenadas em algarismos arábicos e
50 encabeçadas pelo título, identificadas no texto como Tabela; sob a forma de

1 figuras, nos casos de gráficos, fotografias, desenhos, mapas, etc., ordenadas em
 2 algarismos arábicos, até no máximo de seis, e citadas no texto como Figuras
 3 inseridas no texto. Fotografias podem ser em preto e branco ou coloridas, e
 4 também inseridas no texto. No caso de desenhos originais, o arquivo deve estar
 5 em resolução adequada, de qualidade. **Discussão:** deve ser entendida como a
 6 interpretação dos resultados, confrontando com a literatura pertinente,
 7 apresentada na introdução. Se julgar conveniente, os resultados e a discussão
 8 poderão ser apresentados conjuntamente. **Conclusões:** é a síntese final,
 9 fundamentada nos resultados e nos objetivos. **Referências:** devem ser
 10 apresentadas de acordo com as normas Vancouver ([http://www.icmje.org./](http://www.icmje.org/))

116. Deverão ser editorados em Microsoft Word for Windows, para edição de textos,
 12 Excel (qualquer versão) para gráficos, formato JPEG ou GIF (imagem) para
 13 fotografias, desenhos e mapas. Formato A4 (21,0 x 29,7 cm), em espaço
 14 simples, mantendo margens de 2,5 cm, nas laterais, no topo e pé de cada
 15 página. Fonte Times New Roman, tamanho 12, e numeração consecutiva das
 16 páginas em algarismos arábicos, a partir da Identificação.

177. Deverão também apresentar do lado esquerdo numeração nas linhas,
 18 reiniciando a contagem a cada nova página. Não devem exceder a 15 páginas.
 19 Abreviaturas não usuais devem ser empregadas após escritas por extenso na
 20 primeira utilização

218. O arquivo a ser submetido deverá conter apenas o Título, Resumo, Palavras-
 22 chave, nos idiomas português, inglês e espanhol. Na sequência deverão estar
 23 as partes do texto a partir da Introdução. Os demais dados, de autoria, filiação
 24 etc., que serão digitados em campos específicos do formulário de submissão,
 25 não estarão disponíveis para os avaliadores. Por isso não deverão constar do
 26 arquivo a ser submetido

279. Deletar nas propriedades do documento a ser submetido todas as informações
 28 de autoria, deixando como anônimo, para que autoria não seja identificada pelos
 29 avaliadores

31 **ARTIGOS DE REVISÃO SISTEMÁTICA**

32 Os artigos de revisão sistemática serão publicados nas línguas portuguesa,
 33 inglesa e espanhola, quando o autor apresentar contribuição científica, relevante
 34 na área específica do assunto abordado. Deverão conter: Título (português,
 35 inglês e espanhol), resumo com palavras-chave, abstract com keywords e
 36 resumen com palabras claves, introdução, desenvolvimento do assunto,
 37 conclusão e referências. Deverão conter no máximo 20 páginas, bem como
 38 devem ser revisões sistemáticas, informando na metodologia, quais os critérios
 39 e bases de dados utilizadas para a escolha dos artigos.

40 Os artigos de revisão devem ser convidados pelo Editor-Chefe, e os assuntos
 41 abordados devem ser atuais do ponto de vista científico, e estado atual da arte.

43 **RELATOS DE CASO**

44 Não devem ser estruturados como os artigos. Devem apresentar o título em
 45 português, em inglês e espanhol, resumo com palavras-chave, abstract com
 46 keywords, resumen com palabras claves e referências. Devem conter no máximo
 47 cinco páginas, três tabelas ou figuras e 15 referências.

49 **COMUNICAÇÕES CURTAS**

São relatos contendo dados inéditos e relevantes de estudos originais, como, por exemplo, resultados preliminares de uma pesquisa. Devem ser apresentadas com, no máximo, cinco páginas, uma tabela e 10 referências. A estrutura deve respeitar as normas para relatos de caso.

REFERÊNCIAS E CITAÇÕES

As referências devem ser numeradas consecutivamente e listadas na ordem em que são mencionadas no texto. As referências devem ser identificadas no texto, nas tabelas e legendas com números arábicos, entre parênteses, seguindo a mesma sequência. Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus disponível em: <http://www.nlm.nih.gov>

EXEMPLOS DE CITAÇÕES

O material deve ser mantido em compressas embebidas em solução fisiológica para evitar o ressecamento (1). Aulisa (2) administrou heparina, por via intramuscular, em cobaias. Udupa e Prasad (3) utilizaram osteoclasia manual do úmero sem imobilização. Herbsman et al. (4) realizaram osteoclasia manual no fêmur e não imobilizaram. O rato apresenta níveis mais elevados de heparina que o homem (35,42,51). O mesmo autor obteve resultados semelhantes, mesmo com metodologias diferentes (22-26).

EXEMPLOS DE REFERÊNCIAS

1 Artigo em Periódico
 Autor(es) do artigo. Título do artigo. Título do periódico abreviado. Ano de publicação;volume(número):página inicial-final do artigo.
 Silva JJ, Carvalho DMG, Gomes RAB, Rodrigues ABC. Produção de leite de animais criados em pastos no Brasil. Vet Zootec. 2010;17(1):26-36.
 Narasimhaiah M, Arunachalam A, Sellappan S, Mayasula VK, Guvvala PR, Ghosh SK, et al. Organic zinc and copper supplementation on antioxidante protective mechanism and their correlation with sperm functional characteristics in goats. Reprod Domest Anim. 2018;53(3):644-54.
 Hopper K, Epstein SE, Fletcher DJ, Boller M. RECOVER evidence and knowledge gap analysis on veterinary CPR. Part 3: Basic life support. J Vet Emerg Crit Care. 2012;22 Suppl 1:S26-43.

- Artigo de periódico com DOI (Digital Object Identifier)
 Hall MB, Mertens DR. A 100-year review: carbohydrates—characterization, digestion, and utilization. J Dairy Sci. 2017;100(12):10078-93. doi: 10.3168/jds.2017-13311.

- Artigo de periódico na Internet
 Autor(es) do artigo. Título do artigo. Título do periódico abreviado [tipo de mídia]. Ano de publicação [data de citação];volume(número do fascículo):página inicial-final do artigo. Disponibilidade.
 Kawase K, Ujiie H, Takaki M, Yamashita K. Clinical outcome of canine cardiopulmonary resuscitation following the RECOVER clinical guidelines at a Japanese nighttime animal hospital. J Vet Med Sci [Internet]. 2018 [cited 2020 Apr 13];80(3):518-25. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5880836/>

Sasahara THC, Rocha DW, Abdala FCM, Miglino MA, Rabello VC, Ruaro MA, et al. Morphoquantitative evaluation of the heart of cutia (*Dasyprocta agouti*) and capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Arq Bras Med Vet Zootec [Internet]. 2020 [citado 15 Set 2020];72(5):1737-41. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352020000501737

Nota: para trabalhos consultados na internet (artigos, livros, capítulo de livros, etc.) mencionar a data de acesso e o endereço eletrônico. As expressões “citado” e “Disponível em” devem seguir o idioma do artigo que está sendo submetido à revista, conforme exemplos:
 -Artigo redigido em Português: [citado 10 Abr 2021] e Disponível em:
 -Artigo redigido em Inglês: [cited 2021 Apr 10] e Available from:
 -Artigo redigido em Espanhol: [citado 10 Abr 2021] e Disponible en:

2 Livro
 Autor(es) do livro. Título do livro. Edição (número da edição). Cidade de publicação: Editora; ano de publicação.
 Modolo JR, Stachissini AVM, Castro RS, Ravazzolo AP. Planejamento de saúde para o controle da artrite-encefalite caprina. São Paulo: Cultura Acadêmica; 2003.
 Maxie MG, editor. Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals. 6th ed. St. Louis: Elsevier; 2016.

- **Livro com Séries**
 Ogbourne CP. Pathogenesis of cyathostome (*Trichonema*) infections of the horse: a review. Farnham Royal: Commonwealth Agricultural Bureaux; 1978. (Miscellaneous Publication; n. 5).

- **Livros na Internet**
 Autor(es) do livro. Título do livro [tipo de mídia]. Edição (número da edição). Cidade de publicação: Editora; ano de publicação [data de citação]. Disponibilidade.
 Paoletti MG, editor. Ecological implications of minilivestock: potential of insects, rodents, frogs and snails [Internet]. Enfield: Science Publishers; 2005 [cited 2020 Sept 15]. Available from: <https://woven-network.co.uk/wp-content/uploads/2015/08/Paoletti-2005-BOOK-Ecological-Implications-of-Minilivestock-Potential-of-Insects-Rodents-Frogs-and-Snails-1.pdf>

3 Capítulo de livro

- **Autor do capítulo é também o autor do livro no todo.**
 Autor(es) do livro. Título do livro. Edição (número da edição). Cidade de publicação: Editora; ano de publicação. Título do capítulo; página inicial-final do capítulo.
 Corrêa MC, Corrêa CNM. Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos. 2a ed. Rio de Janeiro: MEDSI; 1992. Estafilococias em geral; p. 91-103.
 Meier-Ruge WA, Bruder E, editors. Histopathology of chronic constipation. Basel: Karger; 2005. Chap B, Different colon diseases with chronic constipation; p. 3-32.

- Autor do capítulo é diferente do autor do livro
 Autor(es) do capítulo. Título do capítulo. In: Autor(es) do livro. Título do livro. Edição (número da edição). Cidade de publicação: Editora; ano de publicação. número do capítulo (se houver), página inicial-final do capítulo. Hochleithner C, Holland M. Ultrasonography. In: Mader DR, Divers SJ, editors. Current therapy in reptile medicine and surgery. St. Louis: Saunders; 2013. Chap. 10, p. 107-27. Larue SM, Gordon IK. Radiation therapy. In: Withrow SJ, Vail DM, Page R. Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2013. p. 194-7. Grego KF, Albuquerque LR, Kolesnikovas CKM. Squamata (Serpentes). In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL. Tratado de animais selvagens: medicina veterinária. 2a ed. São Paulo: Roca; 2014. v. 1, p. 186-218.

- Capítulo de livro na Internet
 Autores do capítulo. Título do capítulo. In: Autor(es) do livro. Título do livro [tipo de mídia]. Edição (número da edição). Cidade de publicação: Editora; ano de publicação [data de citação]. Número do capítulo (se houver), página inicial-final do capítulo. Disponibilidade. Taylor MA, Coop RL, Wall RL. Parasitologia veterinária [Internet]. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2017 [cited 2021 Mar 4]. Parasitas de bovino; p. 343-423. Available from: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#!/books/9788527732116/cfi/6/46!/4/2@0:0> Li RW, Gasbarre LC. Gene expression in the bovine gastro-intestinal tract during nematode infection. In: Lamann GV, editor. Veterinary parasitology [Internet]. New York: Nova Biomedical Press; 2010 [citado 4 Mar 2021]. Chap. 6, p. 157-78. Disponível em: <https://www.pdfdrive.com/veterinary-parasitology-d25328227.html>

4 Organização como autor
 Nome da organização, instituição. Título da publicação. Cidade de publicação: Editora; ano de publicação. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

- Em meio eletrônico
 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pecuária 2011 [Internet]. Rio de Janeiro: IBGE; 2011 [citado 15 Out 2016]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=am&tema=pecuaria2011> World Health Organization. Food safety [Internet]. Geneva: WHO; 2019 [cited 2021 Mar 3]. Available from: www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety American Veterinary Medical Association. Senior pets [Internet]. Schaumburg: AVMA; 2018 [citado 4 Abr 2019]. Disponível em: www.avma.org/public/PetCare/Pages/Senior-Pets.aspx

5 Teses, dissertações e outros trabalhos acadêmicos
 Autor. Título do trabalho [tipo de conteúdo]. Cidade (Estado): Instituição onde foi

apresentada; ano de defesa do trabalho.
 Vilella LDM. Produção de insetos para uso na alimentação animal [trabalho de conclusão de curso]. Porto Alegre: Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2018.
 Mortari AC. Avaliação da técnica de transposição do músculo semitendinoso para reparo do diafragma pélvico: estudo experimental em cães [dissertação]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2004.
 Martins NS. Epidemiologia e controle de nematódeos intestinais em equinos da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil [dissertação]. Pelotas (RS): Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas; 2018.

- Teses, dissertações e outros trabalhos acadêmicos na Internet
 Autor. Título do trabalho [tipo de conteúdo e mídia]. Cidade (Estado): Instituição onde foi apresentada; ano de defesa do trabalho [data de citação]. Disponibilidade.

Palumbo MIP. Potencial evocado visual por flash em cães, ovinos e quinos [tese] [Internet]. Botucatu (SP): Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista; 2014 [cited 2021 Mar 3]. Available from: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/123708/000831505.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Nota:

Não é necessário colocar o estado para as capitais.

6 Artigos apresentados em congressos, reuniões, seminários etc
 Autor(es) do trabalho. Título do trabalho apresentado. In: Anais ou Proceedings do número e título do evento; data do evento; cidade do evento. Cidade de publicação: Editora ou responsável pela publicação; ano de publicação. Página inicial-final.

Malhado CHM, Piccinin A, Gimenez JN, Ramos AA, Gonçalves HC. Modelos polinomiais para descrever a curva de postura de codornas. In: Anais do 3o Congresso Nordeste de Produção Animal; 2004; Campina Grande (PB). Campina Grande: Universidade Federal da Paraíba; 2004. p. 1-3.
 Nunes EAC, Patrício PFMM, Patrício LAMM, Andrade ARS, Brasil KQ. Análise estatística da qualidade de ovos vermelhos, comercializados nos municípios de Angelim, Garanhuns, Lagoa do Ouro e São João - PE. In: Anais da 9a Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão - JEPEX; 2009; Recife. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2009.

7 Publicações disponíveis na Internet

Autor(es) do artigo. Título do artigo [Internet]. Cidade: Nome do Site; ano [data de acesso]. Disponibilidade.
 Vasconcelos JLM, Santos RM. Endometrite subclínica em vacas leiteiras [Internet]. Piracicaba: Milkpoint; 2004 [cited 2004 Jan 16]. Available from: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/jose-luiz-moraes-vasconcelos-ricarda-santos/endometrite-subclinica-em-vacas-leiteiras-17646n.aspx>

8 Documento Legal

Jurisdição (País). Título da lei (ou projeto, decreto...), data de aprovação.

Ementa. Dados da publicação. (Local: Editora ou responsável pela publicação; ano)

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 26, de 9 de Julho de 2009. Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Brasília: MAPA; 2009.

Brasil. Lei nº 8.080, de 19 de Setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. Diário Oficial da União. 19 Set 1990.

Brasil. Decreto nº 56.585, de 20 de Julho de 1965. Aprova as novas especificações para a classificação e fiscalização do ovo. Diário Oficial da União. 22 Jul 1965; Sec. 1, p. 6954.

9 Artigo em Jornal

Autor do artigo. Título do artigo. Nome do jornal. Data; Seção:página (coluna).

Naves P. Lagos andinos dão banho de beleza. Folha de São Paulo. 28 Jun 1999; Folha Turismo:2 (Cad. 8).

Tynan T. Medical improvements lower homicide rate: study sees drop in assault rate. The Washington Post. 2002 Aug 12;Sect. A:2 (col. 4).

10 Material não publicado (a ser publicado)

A National Library of Medicine sugere usar o termo: Forthcoming (usa-se a expressão "Forthcoming" para todas as formas de publicação adiantada - artigos em fase de publicação, no prelo, in press, ahead of print, online first, entre outros).

Fraga MFP, Malheiros CA, Yokota ME, Stefano DV. Injeção endoscópica intragástrica da toxina botulínica com tratamento paliativo na obesidade mórbida. Modelo experimental em coelhos. Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa Sao Paulo. Forthcoming 2004.

Tian D, Araki H, Stahl E, Bergelson J, Kreitman M. Signature of balancing selection in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A. Forthcoming 2002.

Para outros exemplos recomendamos consultar as normas "Citing Medicine" da National Library of Medicine, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=citmed>

Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals/>

Artigos Originais

Devem ser elaborados de acordo com as normas da RVZ. A estrutura do artigo deverá conter introdução, material e métodos, resultados que pode ser apresentados de forma descritiva sob a forma de tabelas e figuras. Deve conter ainda sessão de discussão e as conclusões, bem como as referências que devem ser de acordo com as normas Vancouver.

Artigos de Revisão

Deve ser elaborado apresentando caráter descritivo discursivo. Poderão ser publicados na língua portuguesa, inglesa e espanhola. Deve ter formulação clara de um objetivo científico, com argumentação lógica, crítica teórico-metodológica

dos trabalhos consultados e síntese conclusiva. Deverão conter título em português, inglês e espanhol, resumo com palavras-chave, abstract com keywords e resumen com palabras claves, introdução, desenvolvimento do assunto, conclusão e referências. Deverão conter no máximo 20 páginas e 60 referências.

Relatos de Casos

Devem ser considerados casos interessantes e que se adéquem ao escopo da RVZ. Não devem ser estruturados como artigos. Devem conter título em português, inglês e espanhol, resumo com palavras-chave, abstract com keywords, resumen com palabras claves, o relato do caso e as referências, com no máximo cinco páginas, três tabelas ou figuras e 15 referências.

Comunicações Curtas

São considerados relatos contendo dados inéditos e relevantes de estudos originais, como por exemplo resultados preliminares de uma pesquisa. Devem conter no máximo cinco páginas.

1 **Quadro 1.** Hábitos de consumo de leite e derivados no Brasil.

Título	Metodologia	Tipos de alimentos envolvidos nas pesquisas	Regiões do país abrangidas no estudo	Localidade onde residem os entrevistados	Grau de escolaridade	Hábitos de consumo (Preferências)	Frequência de consumo	Conhecimento sobre produtos consumidos (clandestinos x legalizados)	Conhecimento sobre o significado dos símbolos de inspeção	Local de compra x relação de compra	Conhecimento sobre benefícios do consumo do leite na dieta e aos perigos inerentes	Autoria
Perfil do consumidor brasileiro e hábitos de consumo de leite e derivados	Questionário (ferramenta Google Formulários) Período: 23 de abril a 04 de maio de 2018. N = 2.052 respostas	Leite e/ou derivados	Sul (72,9 %) Sudeste: 13,6 % Centro Oeste: 6,7 % Nordeste: 5,3 % Norte: 1,5 %	Região urbana (96,2 %) Região rural: (3,8 %)	1º grau (4,4 %) 2º grau (19,2 %) Ensino Superior (53,3 %)	89 % - Consumo regular de leite fluido: - UHT (83,5%) - em pó (21,1%) - Pasteurizado (18%) - Leite cru (7,3%) Derivados: - Queijos (92,3 %) - Leite condensado (83,6 %) - Creme de	Leite (Nº de vezes/semana) 1x (18,8 %) 2x (11,7 %) 3x (14,5 %) 4x (6,8 %) 5x (10 %) > 5x semana (38,2%)	Não sabem diferenciar (25,5 % – leite cru x pasteurizado) 77 % Já consumiram, queijo clandestino	Não sabem identificar (34 %) Sabem (66 %)	Supermercado (72,7 % - confiabilidade) Padaria (6,3 % - fácil acesso) Feira (3,3 % valor do produto)	- Consideram um alimento saudável (85,4 %) - Acreditam que o leite pode transmitir alguma doença (70,8 %)	(JUNIOR <i>et al.</i> , 2020)

						leite (83,1 %) Manteiga (81,3 %)						
--	--	--	--	--	--	-------------------------------------	--	--	--	--	--	--

Perfil do consumidor de leite e derivados no Município de Maringá, PR	Formulários (<i>in loco</i> e Ferramenta Google Formulários) Período: maio a setembro de 2016 N = 328	Leite e derivados	Maringá - PR	Domicílios maringenses	1º grau (2,4 %) 2º grau (18,2 %) Ensino Superior (79,3 %)	Leite: - UHT (64,4 %) - Pasteurizado (11,2 %) - Em pó (2,1 %) Queijo:	Leite: Até 2x (17,6 %) 3 a 4x (17,6 %) 5 a 6x (14,6 %) Todos os dias (46,5 %) Queijo: Até 2x (35 %) 3 a 4x (31,6 %) 5 a 6x (16,7 %) Todos os dias (10,3 %)	Conceito não abordado no estudo	Conceito não abordado no estudo	UHT - Supermercado (praticidade e tempo de armazenamento) * Principais fatores determinantes de compra: preço (31,6 %), qualidade (24 %) e benefícios a saúde.	Conceito não abordado no estudo	(PEREIRA <i>et al.</i> , 2018)
Perfil do consumidor de leite no município de Juazeiro – Bahia – Brasil	Questionários Período: Setembro de 2009 à Janeiro de 2010 N = 534 residências	Leite	Juazeiro - BA	Residências Juazeirenses	Conceito não abordado no estudo	- Em pó (46,1 %) - UHT (19,5 %) - Leite cru (13,5 %) - Pasteurizado (1,5 %)	Consumo de leite no geral: - Todos os dias (71,23%) - Consumo esporádico	Desconhecimento de qualquer lei de proibição da venda de leite cru (86,11%) Desconhecimento sobre a origem do leite cru (83,33 %)	Conceito não abordado no estudo	Leite cru: recebem nas residências (51,38 %) Mercado, padaria, vizinhança e fazenda (48,62 %)	Sabem da existência de doenças transmitidas pelo leite (55,65 %) Não sabem (44,35 %)	(ZOCCHI <i>et al.</i> , 2013)

												***Produção de queijos (2,58 %)	
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---------------------------------------	--

1 **Figura 1.** Fluxograma das etapas analíticas.

