



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Iris da Silva Ferrari Paixão

**Caracterização de Bactérias Ácido Láticas autóctones  
de leite de cabra e sua funcionalidade no queijo coalho  
caprino artesanal**

Petrolina - PE  
Setembro - 2016

Iris da Silva Ferrari Paixão

**Caracterização de Bactérias Ácido Láticas autóctones  
de leite de cabra e sua funcionalidade no queijo coalho  
caprino artesanal**

Trabalho apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito da obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Francesca Silva Dias Nobre.

Co-orientadora: Rosane Freitas Schwan.

Petrolina - PE

Setembro – 2016

P142c Paixão, Iris da Silva Ferrari  
Caracterização de Bactérias Ácido Lácticas autóctones de leite de cabra e sua funcionalidade no queijo coalho caprino artesanal / íris da Silva Ferrari Paixão. – Petrolina, 2016.  
87 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina, 2016.  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Francesca Silva Dias Nobre.

Referências.

1. Caprinos. 2. Leite Caprino - Bactérias. 3. Queijo de Cabra. 4. Segurança Alimentar. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco

CDD579.3

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Iris da Silva Ferrari Paixão

Caracterização de Bactérias Ácido Láticas autóctones de leite de cabra e sua  
funcionalidade no queijo coalho caprino artesanal

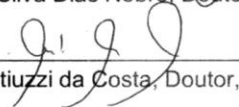
Dissertação apresentada como  
requisito parcial para obtenção de título  
de Mestre em Ciência Animal, pela  
Universidade Federal do Vale do São  
Francisco.

Aprovado em: 15 de setembro de 2016.

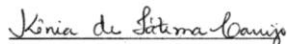
**Banca Examinadora**



Francesca Silva Dias Nobre, Doutora, UNIVASF



Mateus MatiuZZi da Costa, Doutor, UNIVASF



Kênia de Fátima Carrijo, Doutora, UFU

Dedico primeiramente a DEUS, porque sem ele não tinha alcançado meus objetivos e sonhos. Aos meus pais Wilson Ferrari e Gildete Ferrari, aos meus irmãos Italo Ferrari e Wilson Ferrari Júnior, a minha sobrinha linda Maria Eduarda, ao meu marido Gilbervânio Paixão e aos meus amigos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos. Obrigada Deus por escutar sempre minhas orações e nunca me desamparar.

Aos meus familiares, principalmente aos meus pais Wilson Ferrari e Gildete Ferrari e aos meus irmãos Ítalo Ferrari e Wilson Júnior, pelo apoio, atenção, compreensão e confiança. A minha sobrinha linda Maria Eduarda. O amor de vocês será responsável por todas minhas vitórias.

Ao meu grande amor, Gilbervânio Paixão, pela generosidade, carinho, dedicação, sempre fazendo de tudo para que eu seja uma grande profissional.

Ao grupo NEPOA, em especial Carla, Jane, Washington, Anay e Tayla, pela amizade verdadeira, companheirismo, amor e dedicação.

A minha orientadora, ou seja, minha mãe científica, Dr<sup>a</sup>. Francesca Silva Dias Nobre pelos ensinamentos, paciência e orientação para minha formação profissional e pessoal. Agradeço profundamente a senhora por todo conhecimento adquirido em todos esses anos no laboratório. Muito obrigada por tudo. Tenho um enorme carinho pela senhora. Obrigada pela sua amizade.

Ao Professor, Mateus Matiuzzi da Costa, por todo apoio para a realização de técnicas moleculares no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF, meu muito obrigado.

A Professora Rosane Freitas Schwan, por todo apoio para a realização da técnica cromatografia líquida de alta eficiência no laboratório de Fisiologia e genética de micro-organismos, meu muito obrigado.

A todos os professores da pós-graduação em Ciência Animal pelo conhecimento adquirido.

À CAPES pela concessão da bolsa de pós-graduação.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para essa conquista.

## RESUMO

A utilização de Bactérias Ácido Láticas (BAL) selecionadas a partir do leite caprino oferece características probióticas ao alimento. A aplicação desses micro-organismos em queijo caprino é uma estratégia interessante para incrementar os benefícios à saúde, oferecendo um produto inócuo e proporcionando características tecnológicas, aumento no valor nutricional e inibição ao micro-organismo patogênico, além disso aumentando o seu valor agregado, beneficiando os pequenos produtores da região semiárida do Vale do São Francisco. Este estudo teve como objetivo selecionar Bactérias Ácido Láticas (BAL) autóctones de leite de cabra com propriedades probióticas e funcionais, e testar sua adição ao queijo artesanal para inibição de *Salmonella* Typhi. Sessenta isolados (UNIVASF CAP) pré selecionados foram submetidos a testes *in vitro*, como DNase, hemólise, susceptibilidade a antimicrobianos, simulação ao Trato Gastrointestinal (TGI), teste de autoagregação e coagregação bacteriana, antagonismo as bactérias patogênicas, produção de diacetil, produção de gás, Exopolissacarídeos (EPS) e tolerância ao NaCl. Posteriormente, com base nesses testes foram selecionados quatro isolados de BAL (UNIVASF CAP 16, 45, 84 e 279) por meio da Análise de Componentes Principais (ACP) e identificados genotipicamente. Testes adicionais foram realizados para os isolados UNIVASF CAP 16, 45, 84 e 279, como a produção de ácido láctico e cítrico, além dos ensaios de Hidrolase de Sais Biliares (BSH),  $\beta$ -galactosidase e de atividade de descarboxilase. Após esta seleção, três queijos de cabra (1 – queijo com *Salmonella* Typhi), (2 – queijo com mix de *Salmonella* Typhi e BAL) e (3 – queijo controle) foram elaborados para avaliar a ação inibidora do cultivo selecionado de BAL frente a *Salmonella* Typhi, nos tempos 0, 5, 10, 15 e 20, através das análises microbiológicas e físico-químicas. No estudo, apenas o isolado UNIVASF CAP 97 mostrou uma lise completa das células vermelhas do sangue, sendo classificado como  $\beta$ -hemolítica. Os 60 Isolados UNIVASF CAP não mostraram atividade da enzima DNase em testes fenotípicos. Em testes de susceptibilidade antimicrobiana, o isolado UNIVASF CAP 90 apresentou resistência a todos os antimicrobianos testados. Portanto, na caracterização de fatores de virulência, dois isolados, UNIVASF CAP 90 e 97 foram excluídos como candidatos para adição em alimento. Assim, 58 isolados BAL UNIVASF CAP permaneceram para os demais testes. Estes demonstraram uma taxa de sobrevivência ao suco intestinal e pancreático superior a 90%. Em resposta à bile, a taxa de sobrevivência foi > 95% para todos os isolados testados. Os isolados UNIVASF CAP 58, 29 e 27 apresentaram atividade antibacteriana com *S. Typhi*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, respectivamente. A capacidade de autoagregação dos isolados variou de 3,58 a 36,55% ( $P < 0,05$ ). Em geral, isolados de BAL UNIVASF CAP apresentaram uma média baixa de coagregação (<4,0%) com *S. Typhi* e *L. monocytogenes*, exceto o isolado UNIVASF CAP 45 (27,87%). A produção de EPS entre isolados de BAL UNIVASF CAP variou de 0 a 44 mg/L,

com uma produção média de 12,50 mg/L. A produção de diacetil pelos isolados de BAL UNIVASF CAP variou de acordo com o isolado. Dos isolados testados, UNIVASF CAP 41, 11 e 3 foram negativos, fracos, médios e forte produtores de diacetil, respectivamente. Nove isolados produziram gás a partir de glicose e todos os isolados foram tolerantes a concentrações de NaCl de 4,0% para 6,5%. Os quatros isolados UNIVASF CAP 16, 45, 84 e 279 selecionados foram classificados como positivos quanto a atividade das enzimas BSH e  $\beta$ -galactosidase e negativos quanto a atividade de descarboxilase. O queijo inoculado com BAL (queijo 2) diminuiu a população de *S. Typhi* para 0,38 log<sub>10</sub> UFC/g, no queijo sem o inóculo de BAL (queijo 1) aumentou a população do patógeno em 0,29 unidades logarítmicas. Além disso, o valor de pH aumentou linearmente ao longo do tempo, em 0,004 unidades por dia, no queijo 1. No queijo 2, o valor de pH diminui linearmente ao longo do tempo, em 0,066 unidades por dia. O coquetel contendo estirpes selecionadas de *Lactobacillus*, com potenciais propriedades probióticas e tecnológicas, apresentou atividade antibacteriana *in vitro* contra *S. Typhi* no queijo de cabra artesanal. Assim, o leite de cabra é importante fonte de BAL com potencial probiótico que pode ser utilizada para inibir o crescimento populacional de *Salmonella* em queijo de cabra, contribuindo para a segurança e valor funcional do produto.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana. Probióticos. Queijo de cabra. Segurança alimentar.



## ABSTRAT

The use of lactic acid bacteria (LAB) selected from goat milk has probiotic characteristics to the food. The application of these micro-organisms in goat cheese is an interesting strategy to increase the health benefits by offering an innocuous product and providing technological characteristics, increased nutritional value and inhibiting the pathogenic micro-organism also increasing its value, benefiting small producers of semi-arid region of the São Francisco Valley. This study aimed to select autochthonous lactic acid bacteria (LAB) with probiotic and functional properties from goat dairies and test their addition on artisanal cheese for the inhibition of *Salmonella* Typhi. The 60 pre selected isolates were subjected to in vitro assays such as DNase, hemolysis, antimicrobial susceptibility, simulating the gastrointestinal tract (GIT), autoaggregation test and bacterial coaggregation, antagonism pathogenic bacteria, producing diacetyl, gas production, exopolysaccharides (EPS), and tolerance to NaCl. Subsequently, based on these tests were selected four strains LAB (UNIVASF CAP 16, 45, 84 and 279) through the Principal Component Analysis (PCA) and identified genotypically. Additional tests were performed for the isolated CAP UNIVASF 16, 45, 84 and 279, producing lactic and citric acid, in addition to Hydrolase testing of bile salts (BSH),  $\beta$ -galactosidase and decarboxylase activity. After this selection, three goat cheeses (1 - cheese *Salmonella* Typhi), (2 - mix cheese *Salmonella* Typhi and BAL) and (3 - cheese control) were designed to assess the inhibitory action of the crop selected BAL *Salmonella* Typhi in at 0, 5, 10, 15 and 20, through microbiological and physico-chemical analysis. In the study, only the isolated UNIVASF CAP 97 showed complete lysis of red blood cells being classified as  $\beta$ -hemolytic. The 60 UNIVASF CAP isolates did not show activity of the enzymes DNase and coagulase in phenotypic tests. In antimicrobial susceptibility testing, the isolate UNIVASF CAP 90 showed resistance to all the antibiotics tested. Therefore, in the characterization of virulence factors, two isolates, UNIVASF CAP 90 and 97 were excluded as candidates for addition to food. Thus, 58 LAB isolates remained for the other tests. Fifty-eight LAB isolates UNIVASF CAP demonstrated a survival rate in intestinal and pancreatic juice exceeding 90%. In response to bile, the survival rate was > 95% for all the isolates tested. In this study, 58, 29 and 27 UNIVASF CAP isolates presented antibacterial activity with *S. Typhi*, *L. monocytogenes* and *S. aureus*, respectively. The autoaggregation capability of the isolates ranged from 3.58 to 36.65% ( $P < 0.05$ ) In general, LAB isolates UNIVASF CAP showed a low average for coaggregation (< 4.0%) with *S. Typhi* and *L. monocytogenes* except the isolate UNIVASF CAP 45 (27.87%) with the pathogen *S. Typhi*. The production of EPS among the LAB isolates UNIVASF CAP ranged from 0 to 44 mg/L, with an average production of 12.50 mg/L. The isolate UNIVASF CAP 46 showed the highest EPS production: 44 mg/L. The production of diacetyl by LAB isolates UNIVASF CAP differ depending on the isolate. Of the isolates tested,

41, 11 and 3 were negative, weak, medium and strong producers of diacetyl, respectively. Nine isolates produced gas from glucose and all isolates were tolerant to NaCl concentrations of 4.0% and 6.5%. The four isolates selected UNIVASF CAP 16, 45, 84 and 279 were classified as positive for the activity of  $\beta$ -galactosidase, and BSH and negative enzymes and the activity decarboxylase. The cheese inoculated with LAB (cheese 2) decreased the population of *S.Typhi* to 0.38 log<sub>10</sub> CFU / g, cheese without inoculum BAL (cheese 1) increased pathogen population 0.29 log units. Moreover, the pH value increases linearly over time at 0,004 units per day in the cheese 1. In the cheese 2, the pH value decreases linearly over time at 0,066 units per day. In conclusion, goat milk presents as a potential source for isolating LAB with probiotic and technological properties. The four isolates, UNIVASF CAP 16, 45, 84 and 279, showed antibacterial activity against *Salmonella Typhi* in vitro and in artisanal goat cheese. Thus, these cultures could be used to inhibit the growth of *Salmonella* population in dairy goat products, contributing to an increase in the functional value of the product.

Keywords: Antibacterial activity. Food safety. Goat cheese. Probiotics.

## LISTA DE FIGURAS

### Artigo Científico:

**Figura 1.** Análise de Componentes Principais (ACP) com base nas características probióticas e tecnológicas de 58 isolados de BAL para aplicação em queijo de cabra. Os seis primeiros componentes explicaram 72,42% da variância total; entre eles, CP1 e CP2 explicou 17,47% e 15,25% da variância total, respectivamente.....p.69

**Figura 2.** Contagens viáveis ( $\log_{10}$  UFC/g) de *S. Typhi* em queijo sem (queijo 1) e com (queijo 2) uma mistura de BAL durante o armazenamento por até 20 dias a 4°C. (\*)  $P < 0,05$ , indicando diferenças estatisticamente significativas, segundo o teste de Scott-Knott. EP = 0,032.....p.73

**Figura 3.** Contagens viáveis ( $\log_{10}$  UFC/g) de BAL inoculadas no queijo (queijo 2) durante o armazenamento por até 20 dias a 4°C.....p.74

**Figura 4.** Valores de pH nos queijos sem (queijo 1) e com (queijo 2) uma mistura de BAL durante armazenamento de até 20 dias a 4°C. EP = 0,030.....p.74

**Figura 5.** Teor de lactose em queijos com uma mistura de BAL (queijo 2) durante o armazenamento por até a 20 dias a 4°C. EP = 0,020.....p.75

## LISTA DE TABELAS

### Artigo Científico:

**Tabela 1:** Porcentagem média da atividade de autoagregação de 58 isolados UNIVASF CAP ao longo de 1 a 4 horas.....p.65

**Tabela 2:** Porcentagem média de atividade de coagregação de 58 isolados UNIVASF CAP ao longo 1 a 5 horas..... p.66

**Tabela 3:** Identificação de quatro isolados UNIVASF CAP selecionados autóctones de leite de cabra.....p.70

**Tabela 4:** Resumo das características fenotípicas *in vitro* mais promissoras das estirpes de BAL discriminados através ACP.....p.71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP.....	Análise de Componente Principal
ATCC.....	American Type Culture Collection
ANOVA.....	Análise de variância
BAL.....	Bacterias Ácido Láticas
BSH.....	Hidrolase de Sais Biliares
CAP.....	Caprino
CCMA.....	Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola
DNase.....	Dexoribonuclease
EDTA.....	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPS.....	Exopolissacarídeo
FAO.....	Food and Agriculture Organization
g.....	Grama
GRAS.....	Generally Regarded as Safe
IBGE.....	Instituto Brasileiro Geográfico e Estatístico
KOH.....	Hidróxido de potássio
mL.....	Mililitro
mg.....	Miligrama
min.....	Minuto
MRS.....	Man, Rogosa and Sharpe
NaCl.....	Cloreto de sódio
NaHCO <sub>3</sub> .....	Bicarbonato de sódio
PBS.....	Solução salina tamponada
pH.....	Potencial hidrogênioônico
UFC.....	Unidades Formadoras de Colônias

## SUMÁRIO

RESUMO.....	07
ABSTRACT.....	09
LISTA DE FIGURAS .....	11
LISTA DE TABELAS .....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
1.0 INTRODUÇÃO.....	16
2.0 DESENVOLVIMENTO.....	18
2.1 PRIMEIRA PARTE: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA - Embasamento bibliográfico abordando os principais temas envolvidos no trabalho: Caracterização de Bactérias Ácido Láticas autóctones de leite de cabra e sua funcionalidade no Queijo Coalho Caprino Artesanal.....	18
2.1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1.1.1 Bactérias Ácido Láticas .....	18
2.1.1.2 Potencial probiótico das Bactérias Ácido Láticas.....	20
2.1.1.3 Potencial tecnológico das Bactérias Ácido Láticas.....	25
2.1.1.4 Queijo de coalho caprino artesanal: definição e caracterização	28
2.1.1.5 <i>Salmonella</i> : Definição, aspectos gerais e o risco em queijos.....	30
2.1.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
2.1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
2.2 SEGUNDA PARTE: ARTIGO CIENTÍFICO - Seleção de Bactérias Ácido Láticas autóctones de leite de cabra e sua adição em queijo artesanal para avaliar a inibição de <i>Salmonella Typhi</i> .....	49
RESUMO.....	49
ABSTRACT.....	51
2.2.1 INTRODUÇÃO.....	52
2.2.2 MATERIAS E MÉTODOS.....	54

2.2.2.1 Local de execução, pré seleção e identificação dos isolados..	54
2.2.2.2 Caracterização de fatores de virulência dos isolados de BAL.....	55
2.2.2.3 Simulação à tolerância ao Trato Gastrointestinal (TGI) dos isolados de BAL selecionados.....	56
2.2.2.4 Agar difusão em disco - Atividade antibacteriana.....	57
2.2.2.5 Atividade de agregação.....	57
2.2.2.5.1 Ensaio de autoagregação.....	57
2.2.2.5.2 Ensaio de coagregação: patogénos e isolados de BAL.....	58
2.2.2.6 Propriedades tecnológicas das BAL.....	58
2.2.2.7 Produção de ácido láctico e ácido cítrico.....	59
2.2.2.8 BSH, $\beta$ -galactosidase e atividade de descarboxilase.....	60
2.2.2.9 Inibição da <i>Salmonella Typhi</i> em queijo de cabra artesanal....	61
2.2.2.9.1 Enumeração bacteriana.....	61
2.2.2.9.2 Análises físico-químicas.....	62
2.2.2.10 Análises estatísticas.....	62
2.2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
2.2.3.1Caracterização de fatores de virulência dos isolados de BAL.	63
2.2.3.2Simulação á tolerância ao trato gastrointestinal, agregação e a atividade antibacteriana dos isolados selecionados de BAL.....	64
2.2.3.3 Propriedades tecnológicas dos isolados UNIVASF CAP.....	66
2.2.3.4 Identificação e produção de ácidos orgânicos dos isolados UNIVASF CAP.....	68
2.2.3.5 BHS, $\beta$ -galactosidase e atividade de descarboxilase.....	70
2.2.3.6 A inibição da <i>S. Typhi</i> e acompanhamento físico-químicas em queijo de cabra artesanal.....	72
2.2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
3.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	86
4.0 ANEXO .....	87

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem o sétimo maior rebanho caprino do mundo, concentrado no nordeste, na região semiárida, especialmente nos estados da Bahia e de Pernambuco (IBGE, 2011; FAO, 2014). O consumo de derivados lácteos caprinos tem aumentado em todo o mundo, com o conseqüente aumento da demanda por leite de cabra (QUEIROGA et al., 2013). O valor funcional deste leite pode ser mais bem explorado por meio das Bactérias Ácido Lácticas (BAL), as quais estão naturalmente presentes neste produto, e quando selecionadas, podem apresentar propriedades promissoras (ALMEIDA JUNIOR et al., 2015). Uma característica importante destas estirpes é a atividade antagonista contra bactérias patogênicas (DARILMAZ; BEYATLI, 2012).

O derivado de leite de cabra mais comum na região semiárida nordestina é o queijo caprino artesanal, sendo um meio de subsistência para os pequenos produtores rurais. Porém, a cadeia produtiva leiteira da região está associada à baixa qualidade microbiológica (SILVA et al., 2013). O queijo é considerado um veículo para micro-organismos patogênicos alimentares, em particular, queijos frescos artesanais produzidos principalmente a partir de leite cru (CARVALHO et al., 2015).

O gênero *Salmonella* é um importante patógeno de origem alimentar, sendo conhecido por apresentar respostas adaptativas a várias condições de estresse, incluindo o ácido, sal e a temperatura, o que pode aumentar a sua sobrevivência em ambientes adversos (TAMAGNINI; SOUSA, 2008). Uma das abordagens utilizadas para prevenir o crescimento de micro-organismos patogênicos na alimentação é o uso de BAL, produtoras de substâncias antimicrobianas (COELHO et al., 2014). BAL também fortalecem o sistema imunológico e contribuem para o sabor e a textura do produto (DAL BELLO et al., 2010; SOCCOL et al., 2010; FAVARO; PENNA; TODOROV, 2015).

Para a caprinocultura, a seleção de micro-organismos autóctones de leite caprino com propriedades probióticas é essencial para ampliar e expandir o mercado, uma inovação tecnológica, garantindo o fornecimento de novos derivados lácteos com segurança microbiológica e de caráter funcional. Nesta primeira parte deste trabalho revisa-se a literatura atual referente as BAL



com potencial probiótico e tecnológico e sua funcionalidade no queijo coalho caprino artesanal para controle de *Salmonella* Typhi. Portanto, este estudo foi realizado com os objetivos de selecionar Bactérias Ácido Láticas (BAL) autóctones de leite de cabra com propriedades probióticas e funcionais, e testar a sua adição ao queijo artesanal para inibição de *Salmonella* Typhi.

## 2. DESENVOLVIMENTO

### 2.1 PRIMEIRA PARTE: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### EMBASAMENTO BIBLIOGRÁFICO ABORDANDO OS PRINCIPAIS TEMAS ENVOLVIDOS NO TRABALHO: CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS AUTÓCTONES DE LEITE DE CABRA E SUA FUNCIONALIDADE NO QUEIJO COALHO CAPRINO ARTESANAL

##### 2.1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

###### 2.1.1.1 Bactérias Ácido Láticas:

Bactérias Ácido Láticas (BAL) abrangem um grupo heterogêneo de micro-organismos (CARR; CHILL; MAIDA, 2002), os quais são utilizadas em uma variedade de formas, incluindo a produção de alimentos e a melhoria da saúde e da produção de enzimas e metabólitos. Desde o nascimento, estamos expostos a estas espécies através do nosso alimento e do ambiente. Espécies de BAL são habitantes em uma série de matrizes, incluindo leite, plantas, carnes, grãos e do Trato Gastrointestinal (TGI) de vertebrados (PFEILER; KLAENHAMMER, 2007). Este grupo engloba várias espécies, como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Oenococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc* (AXELSSON, 2004; MAYO; VAN SINDER, 2008).

BAL são classificadas como células procarióticas, Gram positivas, não esporuladas e que têm como característica comum a produção de ácido lático como produto da fermentação principal ou único, durante o metabolismo homofermentativo ou heterofermentativo. A temperatura ideal para o crescimento das bactérias ácido láticas varia de 10°C a 45°C, de acordo com a determinada espécie da BAL (AXELSSON, 2004). O papel principal da BAL é utilizar a lactose como substrato e convertê-la em ácido lático, durante a fermentação do leite (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001; AOUZIA et al., 2016).

As BAL, especialmente *Lactobacillus* e *Enterococcus*, são comumente utilizadas como probióticos (BARBOSA; GIBBS; TEIXEIRA, 2010;

TULUMOGLU; KAYA; ŞİMŞEK, 2014). Embora sejam Geralmente Reconhecidas como Seguras (GRAS), a sua capacidade de produção de compostos tóxicos também deve ser levada em consideração. O gênero *Enterococcus* é membro da comunidade de BAL e o seu emprego ainda é controverso, devido á presença de genes virulência em algumas espécies. Por estas razões, há a necessidade de avaliação de toxicidade e determinantes patogênicos para os potenciais micro-organismos empregados como probióticos (LANDETA et al., 2013).

De modo geral, as BAL são um grande grupo de bactérias benéficas que têm um grande potencial para a utilização em biopreservação (MALDONADO et al., 2012; O'BRYAN; CRANDALL; RICKE, 2015). Dessa forma, além do efeito de preservação das BAL, acredita-se que sua presença nos alimentos possa ter efeito probiótico, pela produção de ácidos orgânicos, bacteriocinas e outros compostos (MARTINIS; SANTAROSA; FREITAS, 2003).

As BAL são consideradas os maiores grupos de bactérias com ação probiótica e, dentre os gêneros existentes, destaca-se o dos *Lactobacillus*, o mais abundante desse grupo de bactérias. Os *Lactobacillus* são comumente encontrados no trato gastrointestinal de humanos e animais (COLLINS; THORNTON; SULLIVAN, 1998; MESSAOUDI et al., 2012, 2013).

O gênero *Lactobacillus* é definido como células alongadas, em forma de bastonete, não produtores de esporos, termófilos, microaerófilos, Gram positivo e produtoras de ácidos, em grande parte láctico, a partir de carboidratos (FAIRBROTHER; CPRM, 2014). Microscopicamente, essas bactérias são imóveis e apresentam hastes finas que variam em comprimento de longo para curto. Também podem aparecer como corineformes, uma morfologia dobrada ou tendem a crescer em cadeias. A maioria das espécies de lactobacilos é anaeróbia facultativa (SLOVER; DANZIGER, 2008).

O gênero *Lactobacillus* reúne cerca de 140 espécies que podem ser encontradas no leite cru, em produtos fermentados, na carne, em frutas, etc (SINGHT et al., 2009). Desempenha importante papel na produção e na preservação dos alimentos e é componente de vários tipos de fermentos, como, por exemplo, na produção de leites fermentados e na maturação de diversos tipos de queijos. Também contribui para a manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal, constituindo componentes importantes na produção de

probióticos para a alimentação humana e animal (FERREIRA, 2012). Muitas estirpes de *Lactobacillus* foram caracterizadas como probióticos e foram notificados para exercer benefícios para saúde do consumidor (UROIC et al., 2016).

Com base nas sequências do gene 16S rRNA, os lactobacilos são filogeneticamente distribuídos em sete grupos que são: *Lactobacillus buchneri* (bu), *Lactobacillus casei* (ca), *Lactobacillus delbrueckii* (de), *Lactobacillus plantarum* (pl), *Lactobacillus reuteri* (re), *Lactobacillus sakei* (sa) e *Lactobacillus salivarius* (sl). Tradicionalmente, o gênero é dividido em três grupos, com base nas vias de fermentação de hidratos de carbono, que são: (1) Homofermentativa, (2) Heterofermentativas facultativas e (3) Heterofermentativa. Os dois papéis benéficos de lactobacilos são como culturas iniciadoras (para produzir ácido rapidamente) e culturas probióticas (DE ANGELIS et al., 2011).

### **2.1.1.2 Potencial probiótico das Bactérias Ácido Lácticas**

Os probióticos são definidos, pela FAO/WHO, como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro, melhorando o equilíbrio microbiano intestinal (FAO/WHO, 2002). O valor do consumo de BAL surgiu no início do século XX, quando Metchnikoff sugeriu que a ingestão desses micro-organismos vivos, presentes no iogurte, aumentou a longevidade do consumidor. Metchnikoff atribuiu os efeitos positivos observados sobre a saúde do hospedeiro a uma redução da população de bactérias deteriorantes e/ou produtoras de toxinas no trato digestivo (BURGAIN et al., 2014).

Atualmente, o interesse é crescente no desenvolvimento de novos alimentos que contenham micro-organismos probióticos (SIDIRA et al., 2015). Recentes estudos relacionados com inclusão de cultivo probiótico de bactéria ácido lácticas, em alimentos, pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Enterococcus* (COMAN et al., 2012; JENSEN et al., 2012; GREGORET et al., 2013; BABOT et al., 2014; SHORI, 2016).

Como critério funcional, estirpes probióticas devem sobreviver à passagem ao TGI e, portanto, ser capazes de tolerar as condições ácidas do

estômago, resistir às enzimas digestivas e aos ácidos biliares no início do intestino delgado, aderir à superfície da mucosa intestinal e, assim, assegurar benefícios clinicamente validados para a saúde dos consumidores (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000; COTTER; HILL, 2003; JENSEN et al., 2012).

Algumas BAL têm propriedades probióticas benéficas para a saúde humana. Estas são resistentes á acidez gástrica e sais biliares e, por conseguinte, ao passarem através do trato gastrointestinal, podem influenciar o metabolismo e o equilíbrio microbiano. O controle das alterações no metabolismo (atividade enzimática, etc.) e sobre a composição de espécie microbiana exercida por probióticos é uma característica importante de saúde, porque os micro-organismos intestinais podem exercer efeitos benéficos no hospedeiro (MINELLI et al., 2004). Estirpes probióticas devem ser capazes de sobreviver a altas concentrações de lisozima na saliva humana, às condições de estresse ácido e enzimas digestivas (pepsina), ou seja, do estômago, e á bile no intestino delgado (CORZO; GILLIAND, 1999; MARCO; PAVAN; KLEEREBEZEM, 2006; LIU et al., 2013).

Segundo Almeida Júnior et al. (2015), isolados de BAL que apresentam taxa de sobrevivência superior a 90% em pH 2 são considerados como tendo boa resistência a ácidos. Sabe-se que, para sobreviver à passagem através do trato gastrointestinal humano e exercer a sua atividade fisiológica, probióticos devem ser capazes de suportar o ambiente hostil do suco gástrico e os sais biliares. A resistência a ácidos e a tolerância á bile são consideradas critérios básicos para verificar potenciais cepas probióticas (REN et al., 2014).

Os probióticos comerciais são bem conhecidos por resistirem ao baixo pH. Prasad et al. (1998) relataram que duas estirpes comerciais de probióticos, *Lactobacillus acidophilus* LA-1 e *Lactobacillus rhamnosus* GG, ao serem testadas em pH 3,0, durante 3 horas de incubação, obtiveram um crescimento de 7,6 log UFC/mL<sup>-1</sup>. Dados relatados por Messaoudi et al. (2013) demonstraram que uma elevada taxa de sobrevivência das estirpes testadas foi obtida após exposição as condições simuladas no Trato Gastrointestinal (TGI). De acordo com Rönkä et al. (2003), ambas estirpes *Lactobacillus brevis* apresentaram bom desempenho nos testes *in vitro* e sobrevivência a tensões gástricas. Dados semelhantes também foram descritos por Minelli et al. (2004), os quais constataram que todas as estirpes testadas sobreviveram a valores de

pH tão baixos como pH 2,0, durante, pelo menos, 120 minutos. De forma similar, Pennacchia et al. (2004) relataram que a sobrevivência das bactérias no suco gástrico depende da sua capacidade de sobreviver a um pH baixo.

As BAL que apresentam sobrevivência ao estômago também devem demonstrar essa característica quando submetidas ao contato com o ambiente intestinal, quando são expostas à pancreatina, sais biliares e pH 8,0. Assim como acontece com a tolerância gástrica, as condições de tolerância ao intestino pelas bactérias lácticas também podem ser influenciadas pelo alimento que está sendo ingerido (RANADHEERA et al., 2012). A adesão às células epiteliais do intestino é um critério confiável para a seleção de probióticos (MESSAOUDI et al., 2012). As BAL apresentam efeitos benéficos no intestino humano devido à sua presença natural no trato intestinal e aos seus efeitos de promoção de saúde e bem-estar (VAUGHAN et al., 2002). Segundo Dunne et al. (2001), as estirpes de bactérias ácido lácticas têm a capacidade de aderir e colonizar o trato intestinal. Dados semelhantes também são descritos por Messaoudi et al. (2012), os quais afirmam que as estirpes probióticas apresentaram adesão às células intestinais. A resistência a simulação dos sucos gástrico e intestinal estão entre os ensaios *in vitro* que são frequentemente sugeridos para a avaliação da estirpe com potencial probiótico (BURITI; CASTRO; SAAD, 2010; GBASSI et al., 2011). Kaewnopparat et al. (2013) relataram que os *Lactobacillus fermentum* SK5 apresentaram adesão às células epiteliais intestinais e inibição contra patógenos.

A auto e a coagregação de probióticos são processos necessários para a ocorrência de adesão ao epitélio intestinal e a formação de barreiras que impedem a colonização por micro-organismos patogênicos (DEL RE et al., 2000). A agregação é um fenótipo relacionado às propriedades de aderência da célula (PELLETIER et al., 1997; KOS et al., 2003).

Sabe-se que um dos critérios mais importantes para a seleção de probióticos é a sua capacidade de adesão ao epitélio intestinal do hospedeiro. Além disso a formação de agregados multicelulares é uma propriedade essencial para a colonização no intestino humano (WASKO<sup>a</sup> et al., 2014; AODIA et al., 2016). Acredita-se que as propriedades de superfície da membrana, bem como alterações no pH, podem modificar a interação das células bacterianas com a mucosa gastrointestinal, e, portanto, podem

influenciar a sua localização no intestino e funcionalidade (WASKO<sup>b</sup> et al., 2014; HADDAJI et al., 2015). Ainda, estudos apontam que a camada-S associada com algumas proteínas, podem agir como fatores de aderência, influenciando diretamente a alta capacidade de aderir, autoagregar e, até mesmo, coagregar (DEEPIKA; CHARALAMPOPOULOS, 2010).

A adesão de bactérias probióticas a mucosa intestinal, como já descrito, é crucial para um efeito benéfico a saúde. Porém, a adesão também é conhecida por ser um pré-requisito para a colonização e a infecção do trato gastrointestinal por muitos agentes patogênicos (GARCÍA-CAYUELA et al., 2014). Para uma exclusão competitiva de micro-organismos patogênicos no epitélio intestinal, além de propriedades antimicrobianas, esta capacidade de formar aglomeração entre as células geneticamente distintas (coagregação) com agentes patogênicos é altamente desejável. Isolados coagregantes poderiam controlar um microambiente em torno dos agentes patogênicos e aumentar a concentração de substâncias inibidoras excretadas (COLLADO; MERILUOTO; SALMINEN, 2007; KAEWNOPPARAT et al., 2013; GARCÍA-CAYUELA et al., 2014). A capacidade de coagregação das espécies de *Lactobacillus* com potenciais agentes patogênicos pode prevenir a colonização do intestino por estes patógenos (BAO et al., 2010). Assim, as estirpes probióticas devem mostrar a capacidade de coagregar com as estirpes patogênicas testadas, mas a capacidade de coagregação é estirpe específica. Cepas probióticas comerciais apresentaram habilidades para agregar com agentes patogênicos depois de 20 horas de incubação, uma vez que estas características são específicas e dependentes das condições de incubação (COLLADO et al., 2007).

As propriedades antimicrobianas mediada por bacteriocinas produzidas por BAL têm sido amplamente estudadas, o que conduz à utilização desses micro-organismos na indústria alimentar como agentes conservantes contra bactérias patogênicas (DUBOURG; ELSAWI; RAOULT, 2015). Diversas estirpes de BAL, como, por exemplo, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* vêm demonstrado comportamento antagônico a outros micro-organismos, podendo também manifestar antagonismo aos de igual gênero e/ou patógenos (MCMULLEN; STILLES, 1996; WANG et al., 2015). Assim, uma propriedade importante das estirpes

probióticas é a atividade antagonista contra bactérias patogênicas (DARILMAZ; BEYATLI, 2012). De acordo com Martinis, Santarosa e Freitas (2003), acredita-se que a presença de BAL nos alimentos possa ter efeito probiótico, pela produção de ácidos orgânicos, bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e diacetil (DAESCHEL, 1989), que são eficazes em inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos (YOON; LEE; CHOI, 2016). Por exemplo, *L. plantarum* tem ação de inibir o crescimento de *Salmonella typhimurium*, devido à produção de ácido durante o amadurecimento do queijo obtido de leite cru (STECCHINI; SARAIS; BERTOLDI, 1991).

Sabe-se que algumas BAL agem para diminuir a intolerância da lactose nos humanos devido à presença da enzima  $\beta$ -galactosidase (DE VRESE et al., 2014). As  $\beta$ -galactosidases são conhecidas por catalisar duas reações básicas, hidrólise da lactose e estruturas relacionadas com glicosídeos e reações de transgalactosilação (SILLA SANTOS, 1996; IQBAL et al., 2010). Esta enzima apresenta várias aplicações na indústria alimentar (NIE et al., 2013). As BAL como *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* são consideradas como boas fontes de  $\beta$ -galactosidade, principalmente para utilização em alimentos funcionais (USTOK; TARI; HARSA, 2010; OLIVEIRA<sup>a</sup>; GUIMARÃES; DOMINGUES, 2011). O uso de  $\beta$ -galactosidase na indústria permite que pessoas intolerantes à lactose consumam derivados lácteos (KLEIN et al., 2016).

As bactérias probióticas não devem produzir substâncias nocivas durante as atividades metabólicas. Sabe-se que a capacidade dos micro-organismos de descarboxilar aminoácidos é altamente variável, sendo na maioria dos casos, um processo estirpe-específico (POVEDA; CHICON; CABEZAS, 2015). Relatos na literatura de BAL produtoras de aminas biogênicas já foram reportados, apesar de terem *status* de Geralmente Reconhecidas como Seguras (GRAS). Alguns micro-organismos podem descarboxilar alguns aminoácidos, levando à formação de aminas biogênicas, cuja acumulação no alimento é indesejável, causando efeitos tóxicos aos consumidores (LADERO et al., 2012; ALVAREZ; MORENO-ARRIBAS, 2014). As aminas biogênicas são compostos de baixo peso molecular que são formados em produtos alimentares por descarboxilação microbiana dos ácidos aminados precursores (POVEDA; CHICON; CABEZAS, 2015). A ingestão



excessiva dessas aminas biogênicas pode ter efeitos toxicológicos sobre a saúde humana, como hipotensão ou hipertensão, dor de cabeça, náuseas, reações alérgicas, palpitação cardíaca e hemorragia intracerebral e, até mesmo, a morte, em casos muito graves (SHALABY, 1996). No entanto, as estirpes de BAL, quando selecionadas podem agir como removedores de aminas. Por exemplo, segundo Herrero-Fresno et al. (2012), as linhagens de *L. casei* foram capazes de degradar as aminas biogênicas tóxicas.

BAL desempenham um papel na redução da absorção de gordura pelo corpo, reduzindo o colesterol no soro por meio da atividade da enzima Hidrolase de Sais Biliares (BSH), responsável pela desconjugação de sais biliares na circulação entero-hepática (ANANDHARAJ; SIVASANKARI, 2014). Contudo, o metabolismo excessivo de sais biliares no intestino delgado humano pode ser prejudicial, pois, como os sais biliares secundários (desidroxilado) são citotóxicos e pró-carcinogênicos, podem induzir lesões celulares no intestino delgado (MARTEAU et al., 1995). A desconjugação de sais biliares pode ser um mecanismo de desintoxicação e a enzima BSH pode desempenhar um papel na tolerância biliar e, conseqüentemente, sobrevivência no trato gastrointestinal (BEGLEY; GAHAN; HILL, 2005).

### **2.1.1.3 Potencial tecnológico das Bactérias Ácido Lácticas**

As BAL contribuem no desenvolvimento de “flavor”, da textura, do aumento de vida útil e da preservação nos alimentos. São conhecidas para conceder propriedades tecnológicas desejadas e bioproteção em várias matrizes de alimentos diferentes, melhorando, simultaneamente, as qualidades sensoriais e de textura do produto final (OLIVEIRA; ZANNINI; ARENDT, 2014).

Defeitos em queijo, resultantes da produção de gás indesejado, são um problema esporádico que resulta em perdas financeiras significativas na indústria láctea (PORCELLATO et al., 2015). A produção de gás pode aumentar o número e/ou o tamanho das olhaduras em queijos semi-duros. Formação de olhaduras no queijo é um processo complexo influenciada por uma série de fatores, destacando-se a formação de gás, a difusão do gás, a presença de núcleos de formação de olhaduras, o pH e a elasticidade da massa do queijo (FRÖHLICH-WYDER et al., 2013). A produção de gás por

BAL pode ser necessária em alguns produtos, como no kefir e em alguns queijos, como, por exemplo, gouda, edam e danbo (LEITE et al., 2013; PEDERSEN et al., 2013). De acordo com Gómez-torres et al. (2014), quando o ácido láctico é metabolizado, outros ácidos orgânicos, principalmente o ácido butírico e gases, tais como dióxido de carbono e hidrogênio são produzidos. A pressão dos gases evoluídos provoca fissuras e fendas, que são geralmente acompanhadas de aroma desagradável e sabor a ranço, causado pelos ácidos. Além disso, a produção de ácido láctico contribui para a formação da textura e do sabor ácido (LANDETA et al., 2013).

Na fabricação de queijo há a necessidade contínua para melhoria do sabor e adição de novas estirpes selecionadas com potencial aromático. Segundo Pogačić et al. (2015), as abordagens eficazes de aroma são necessárias, a fim de avaliar diversas espécies de micro-organismos que proporcionem “flavor”. O diacetil é um metabólito principal de sabor produzido por BAL (BARTOWSKY; HENSCHKE, 2004). Segundo Passerini et al. (2013), a produção de aroma está associada com a capacidade intrínseca de algumas BAL em metabolizar o citrato. O diacetil pode inibir micro-organismos patogênicos ao difundir-se pelas membranas bacterianas e interferir com as funções metabólicas essenciais (HOR; LIONG, 2014). Altos níveis de diacetil estão associados com um desequilíbrio de sabor, sabor amargo e aroma desagradável (CLARK; POTTER, 2007), mas é utilizado como ingredientes na formulação de muitos produtos alimentares, tais como queijo cottage, margarina, essências de óleo vegetal, queijo processado, creme de leite e para aumentar os níveis de aroma amanteigado que ocorre associado naturalmente à fermentação (RINCON-DELGADILLO et al., 2012).

Algumas culturas iniciadoras têm a capacidade metabólica para fermentar o ácido cítrico e de produzir diacetilo, um composto que tem grande impacto no sabor de produtos lácteos (HUTKINS, 2006). Durante o crescimento de bactérias no leite, a principal fonte de energia é a lactose, que é convertido em ácido láctico e outros produtos através de duas vias metabólicas diferentes. Outra característica metabólica de certas bactérias produtoras de ácido láctico é a capacidade de metabolizar o ácido cítrico, o qual é um componente menor no leite. Pode ser convertido em diacetilo, que é um composto de sabor importante nos produtos lácteos fermentados (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A biossíntese de diacetilo é dependente do metabolismo do ácido cítrico (BARTOWSKY; HENSCHKE, 2004). A conversão bioquímica dos componentes do leite por bactérias ácido lácticas, naturalmente, faz com que ocorra alterações nos produtos fermentados. Estas alterações atuam intimamente sobre as propriedades das bactérias envolvidas e do tipo de produto. Um dos principais aspectos é o ácido (especialmente ácido láctico) a partir de lactose, que afeta a preservação, textura e sabor do produto. Além disso, outros compostos são formados durante a fermentação de ácido cítrico e de lactose, tais como diacetilo, CO<sub>2</sub> e exopolissacáridos, que afetam o sabor, a textura e a consistência do produto, respectivamente (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Os ácidos orgânicos são amplamente utilizado na indústria de alimentos (MAHMOUD; 2014).

Em muitos produtos lácteos, um número significativo de enterococos estão presentes. Por exemplo, em muitos queijos, tais como Condado, Cebreiro, Mozzarella Kefalotyri, Serra, Manchego, feta, e Teleme, enterococos compreendem grande parte da microbiota do queijo fresco. Há relatos de que os enterococos podem ter um papel importante na produção de queijo e que contribuem para a maturação e a qualidade dos produtos maduros. Além disso, alguns investigadores têm sugerido que os enterococos podem desempenhar um papel no desenvolvimento do aroma e sabor de muitos queijos, provavelmente devido ao catabolismo citrato (QUINTANS et al., 2008). A utilização de citrato parece ser generalizada entre os lactobacilos na presença de um hidrato de carbono fermentável: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus brevis* (DRINAN; ROBIN; COGAN, 1976). Christensen e Pederson (1958) relataram que o ácido cítrico é essencial para a produção de diacetilo por algumas estirpes, como *Lactobacillus brevis* L155. Budinich et al. (2011) demonstraram o consumo de ácido cítrico durante o crescimento de *Lb. paracasei* ATCC 334, em extrato de queijo cheddar e diacetil, produzida pela cepa.

Durante o crescimento, BAL secretam os Exopolissacarídeos (EPS) em seus ambientes circundantes e micro-organismos candidatos a probióticos tem como critérios de seleção importantes a síntese de EPS. Este, quando produzido pelo micro-organismo no ecossistema intestinal, poderia conferir uma vantagem seletiva para a sobrevivência e a colonização pelas bactérias

produtoras (PATTEN et al., 2014; HAMET; PIERMARIA; ABRAHAM, 2015). Os EPS são polímeros com elevado peso molecular, sendo produzidas *in situ* por micro-organismos em produtos lácteos fermentados e são considerados como aditivo de alimentos alternativos. Os EPS sintetizados por certas bactérias ácido lácticas, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* são considerados micro-organismos reconhecidos como seguros (BOELS et al., 2001). Os EPS podem ser utilizados como aditivos alimentares para melhorar a textura, o que favorece o desenvolvimento de novos produtos alimentares com uma melhor aparência, estabilidade e propriedades reológicas (DE VUYST; VIN; DEGEEST, 2001). Os lactobacilos, pertencentes à BAL, tem a capacidade para produzir diferentes tipos de EPS que apresenta uma grande diversidade de estruturas. Os EPS são classificadas, de acordo com a sua composição em homopolissacáridos e heteropolissacarídeos, onde uma das suas aplicações mais descritas é a sua utilização como agente de texturização sintetizada naturalmente os alimentos fermentados (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011).

BAL desenvolveram mecanismos para suportar várias concentrações de NaCl que, geralmente, envolvem a absorção ou a síntese de um número limitado de solutos (BREMER; KRAEMER, 2000). Reale et al. (2015) relataram que osmotolerância é um critério importante para a seleção de estirpes para aplicações tecnológicas a partir de estudo com *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*. Ammor, Florez e Mayo (2007) afirmam que a capacidade da estirpe probiótica de sobreviver a elevadas concentrações de sal variam de 2% a 15% no produto final.

#### **2.1.1.4 Queijo de Coalho Caprino Artesanal: Definição e aspectos gerais**

O queijo coalho é uma comida típica brasileira que tem sido produzido, a partir de leite cru ou pasteurizado, na região nordeste, há mais de 150 anos (QUEIROGA et al., 2013). É um produto muito apreciado por causa de suas propriedades sensoriais, incluindo um sabor levemente salgado e ácido, aroma suave e textura compacta e macia (BEZERRA et al., 2016).

De acordo com a Instrução Normativa N° 30, de 26 de junho de 2001, do

Ministério da Agricultura e Abastecimento, que institui o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho, entende-se por queijo coalho o produto obtido após a coagulação do leite com coalho ou enzimas coagulantes apropriadas que são, por vezes, complementadas com bactérias lácticas selecionadas (cultura iniciadora). Este queijo é comercializado, normalmente, com até 10 (dez) dias de fabricação. É um queijo de média a alta umidade, de massa semi-cozida ou cozida e apresentando um teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35,0% e 60,0% (BRASIL, 2001).

Dentre os produtos lácteos, o queijo caprino artesanal é o mais comum na região semiárida nordestina. A produção de queijo de leite de cabra no nordeste brasileiro é uma forma rentável de utilização do leite caprino, sendo o queijo de coalho um alimento típico produzido em vários estados daquela região. Este queijo ainda é fabricado utilizando-se processos não padronizados. É um produto de grande valor comercial, devido, principalmente à simplicidade da tecnologia de fabricação e ao elevado rendimento do processo (BARBARA et al., 2011; SILVA et al., 2012; QUEIROGA et al., 2013).

É um produto lácteo que tem um bom potencial para a carrear micro-organismos probióticos ao intestino humano, devido às suas características físicas e químicas, em comparação com leites fermentados (maior valor de pH e menor acidez titulável, maior teor de gordura, maior disponibilidade de nutrientes, menor teor de oxigênio e textura da matriz mais densa) (BOYLSTON et al., 2004; KARIMI; MORTAZAVIAN; CRUZ, 2011).

A preferência do consumidor para o queijo de leite cru está crescendo continuamente, devido ao seu sabor mais intenso e variado do que o queijo de leite pasteurizado (YOON; LEE; CHOI, 2016). O queijo caprino é consumido em todo o mundo e a procura de produtos lácteos de cabra no Brasil está crescendo (SILVA et al., 2012). O perfil aromático dos queijos afeta diretamente a sua aceitação ou rejeição (BEZERRA et al., 2016). O desenvolvimento de aroma em queijos de leite cru é regida, principalmente, por sua comunidade microbiana naturalmente existente, o que também contribui para a inibição do crescimento bacteriano patogênico de origem alimentar. As BAL são os micro-organismos indígenas dominantes de queijo de leite cru. Elas produzem substâncias inibidoras de micro-organismos patogênicos, tais como, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, e é possível a fabricação do queijo

com qualidades desejáveis microbiológicas, contribuindo para o sabor e textura do produto. No entanto, os surtos de doenças transmitidas por alimentos têm sido associados ao consumo de queijo de leite cru, e as preocupações têm sido levantadas sobre a segurança microbiológica dos queijos fabricados a partir de leite cru (DAL BELLO et al., 2010; FAVARO; PENNA; TODOROV, 2015; YOON; LEE; CHOI, 2016). Por exemplo, *L. plantarum* tem ação de inibir o crescimento de *Salmonella typhimurium*, devido a produção de ácido durante o amadurecimento de queijo de leite cru Montasio (STECCHINI; SARAI; BERTOLDI, 1991).

#### **2.1.1.5 *Salmonella*: definição, características gerais e o risco em queijos**

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*. São bastonetes Gram negativos, anaeróbias facultativas, a maioria das espécies é móvel, com flagelos peritríquos, oxidase negativa, catalase positiva, indole e Voges-Proskauer negativo, vermelho de metilo e citrato de Simmons positivo. Apresenta a capacidade de descarboxilação da lisina e ornitina. A temperatura ótima de crescimento é de, aproximadamente, 37°C (LE MINOR, 1984; HOLT; KRIEG; SNEATH, 1994).

O gênero tem morfologia de bastonete medindo 0,7–1,5 X 2–5 µm. As salmonelas fermentam a glicose, produzindo ácido e gás, porém, são incapazes de metabolizar a lactose e a sacarose. Os carboidratos usualmente fermentados incluem L-arabinose, maltose, D-manitol, D-manose, L-rhamnose, D-sorbitol, trehalose, D-xylose. Elas são amplamente distribuídas na natureza e têm o homem e os animais como seus principais reservatórios. O hábitat primário da *Salmonella* spp. é o trato intestinal de animais, como pássaros, répteis, animais de granja, além do homem e, ocasionalmente, insetos (LE MINOR, 1984; HOLT; KRIEG; SNEATH, 1994; JAY, 2005).

As salmonelas podem ser divididas em três grupos que são: Primeiro (salmonelas altamente adaptadas ao homem, incluindo os sorovares *S. Typhi* e *S. Paratyphi* A, B e C, agentes da febre entérica (febres tifóide e paratifóide). Segunda (salmonelas altamente adaptada aos animais, representadas por *S. Dublin* (bovinos), *S. Choleraesuis* e *S. Typhi suis* (suínos), *S. Pullorum* e *S.*

Gallinarum (aves), responsáveis pelo paratifo dos animais). Terceiro, inclui a maioria dos sorovares que atingem indiferentemente o homem e os animais, salmonelas zoonóticas, responsáveis por quadro de gastroenterites (enterocolites) ou doenças de transmissão alimentar (LE MINOR, 1984; HOLT; KRIEG; SNEATH, 1994).

É um agente patogênico de origem alimentar zoonótica significativa em todo o mundo (PATCHANEE et al., 2016). Doenças alimentares causadas por *Salmonella* resultam da ingestão de alimentos contendo um número significativo de determinadas linhagens do gênero (JAY, 2005). É frequentemente associada à doença diarreica aguda. A bactéria é transmitida, principalmente, por meio da ingestão de alimentos contaminados ou água, ou manipuladores de alimentos infectados (DURANGO; ARRIETA; MATTAR, 2004).

Quando os produtos alimentares são contaminados com quantidades suficientes de *Salmonella* ou são tratadas de forma a permitir o crescimento do micro-organismo no alimento, a presença de salmonelose em seres humanos é possível (JARVIS et al., 2016).

A salmonelose é uma doença causada por espécies de *Salmonella*. É um importante problema de saúde pública em todo o mundo, devido à alta taxa de morbidade e também tem um grande impacto econômico negativo na produção de alimentos (HU; KOPECKO, 2002; CHAMBERS; GONG, 2011; MOHAMED et al., 2014; ABDELHASEIB et al., 2016).

Os sintomas característicos de doenças de origem alimentar ocasionadas por *Salmonella* incluem: diarreia, náusea, dor abdominal, febre branda e calafrios e, algumas vezes, vômitos, dor de cabeça e fraqueza. O período de incubação antes da doença é de cerca de 16 a 72 horas. A enfermidade é, normalmente, autolimitante e persiste durante 2 a 7 dias. A pessoa infectada excretará grandes quantidades de *Salmonella* pelas fezes durante o período da doença (FORSYTHE, 2002; BOLTON et al., 2013).

A salmonelose representou cerca 131,468 casos de humanos confirmados na União Europeia (UE), em 2008, representando a segunda doença zoonótica mais frequentemente relatados em seres humanos, após campilobacteriose. Casos de salmonelose humana relatados em 2008 mostram uma diminuição de 13,5%, a partir de 2007, na UE. No entanto, vários países

européus continuam a mostrar uma tendência de aumento significativo, provando que esforços contínuos para prevenção e controle ainda são necessários. Na UE, os sorotipos de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium são relatados como os dois principais agentes etiológicos de salmonelose que se adaptaram aos seres humanos (CARRASCO; MORALES-RUELLA; GARCÍA-GIMENO, 2012).

O queijo é considerado um veículo para agentes patogênicos alimentares, em particular queijos frescos artesanais produzidos, principalmente, a partir de leite cru (CARVALHO et al., 2015). Normalmente, a contaminação por *Salmonella* pode ocorrer em leite e em queijo de cabra (TAMAGNINI; SOUSA, 2008; OLIVEIRA<sup>b</sup> et al., 2011), porque as cabras são reservatórios de *Salmonella* e uma grande porcentagem de animais apresentam este micro-organismo no rúmen ou nas fezes (WOLDEMARIAM et al., 2005; POINTON; KIERMEIER; FEGAN, 2012). Uma vez que este agente patogênico pode sobreviver a baixo pH e temperatura, que permanece por um longo tempo em queijos armazenados. Assim, *Salmonella* spp. continuam a ser uma preocupação para a indústria de laticínios (TAMAGNINI; SOUSA, 2008; YANG et al., 2014; LYNNE, FOLEY; HAN, 2016). A contaminação do alimento ocorre devido ao controle inadequado de temperatura, de práticas de manipulação ou por contaminação cruzada de alimentos crus com alimentos processados. O micro-organismo se multiplica no alimento até atingir a dose infecciosa (FORSYTHE, 2002).



### **2.1.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Bactérias ácido lácticas com ação probiótica e tecnológicas podem ser selecionadas a partir de diferentes ambientes e matrizes alimentares para incorporação em vários produtos alimentares, aumentando, assim, a funcionalidade dos alimentos e os efeitos benéficos sobre a saúde do consumidor. No entanto, para exercer estes efeitos, um rigoroso critério é necessário para selecionar estirpes probióticas seguras, funcionais e com características tecnológicas e fisiológicas desejáveis.

## 2.1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELHASEIB, M.U.; SINGH, A.K.; BAILEY, M.; SINGH, M.; EL-KHATEIB, T.; BHUNIA, A. Fiber optic and light scattering sensors: Complimentary approaches to rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples. **Food Control**, v.61, p.135-145, 2016.

ALMEIDA JUNIOR, W.L.; FERRARI, I.S.; SOUZA, J.V.; SILVA, C.D.A.; COSTA, M.M.; DIAS, F.S. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. **Food Control**, v.53, p.96-103, 2015.

ALVAREZ, M.A.; MORENO-ARRIBAS, M.V. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. **Trends in Food Science & Technology**, v.39, p.146-155, 2014.

AMMOR, M.S.; FLOREZ, A.B.; MAYO, B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, v.24, p.559-570, 2007.

ANANDHARAJ, M.; SILVASANKARI, B. Isolation of potential probiotic *Lactobacillus oris* HMI68 from mother's milk with cholesterol-reducing property. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.118, p.153-159, 2014.

AOUDIA, N.; RIEU, A.; BRIANDET, R.; DESCHAMPS, J.; CHLUBA, J.; JEGO, G.; GARRIDO, C. Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*: Effect stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. **Food Microbiology**, v.53, p.51-59, 2016.

AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: **Salminen S, von Wright A, Ouwehand A, editors. Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects**, 3rd Edition. Marcel Dekker Inc; New York, p.1-6, 2004.

BABOT, J.D.; ARGANÁRAZ-MARTÍNEZ, E.; SAAVEDRA, L.; APELLA, M.C.; PEREZ CHAIA, A. Selection of indigenous lactic acid bacteria to reinforce the intestinal microbiota of newly hatched chicken - relevance of *in vitro* and *ex vivo* methods for strains characterization. **Research in Veterinary Science**, v. 97, p. 8-17, 2014.

BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for lactobacilli exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v.29, p.54-66, 2011.

BAO, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; WANG, S.; DONG, X.; WANG, Y.; ZHANG, H. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. **Food Control**, v.21, p.695-701, 2010.

BARBARA, M.S.; OLIVEIRA, M.E.G.; SOUSA, Y.R.F.; MADUREIRA, A.R.M.F.M.; PINTADO, M.M.E.; GOMES, A.M.P.; SOUZA, E.L.; QUEIROGA, R.C.R.E. Caracterização físico-química e sensorial de queijo de coalho produzido com mistura de leite de cabra e de leite de vaca. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.70, p.302-10, 2011.

BARBOSA, J.; GIBBS, P.A.; TEIXEIRA, P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. **Food Control**, v.21, p.651-656, 2010.

BARTOWSKY, E.J.; HENSCHKE, P.A. The 'buttery' attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v.96, p.235-252, 2004.

BEGLEY, M.; GAHAN, C.G.M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.625-651, 2005.

BEZERRA, T.K.A.; ARAUJO, A.R.R.; NASCIMENTO, E.S.; PAZ, J.E.M.; GADELHA, C.A.; GADELHA, T.S.; PACHECO, M.T.B.; QUEIROGA, R.C.R.E.; OLIVEIRA, M.E.G.; MADRUGA, M.S. Proteolysis in goat "coalho" cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. **Food Chemistry**, v.196, p.359-366, 2016.

BOELS, I. C.; VAN KRANENBURG, R.; HUGENHOLTZ, J.; KLEEREBEZEM, M.; VOS, W. M. Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, p.723-732, 2001.

BOYLSTON, T.D.; VINDEROLA, C.G.; GHODDUSI, H.B.; REINHEIMER, J.A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v.14, p.375-387, 2004.

BOLTON, D.; IVORY, C.; DOWELL, D.; BOLTON, D.J. A study of *Salmonella* in pigs from birth to carcass: Serotypes, genotypes, antibiotic resistance and virulence profiles. **International Journal of Food Microbiology**, v.160, p.29303, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de Junho de 2001. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e

Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Seção 1, p.10, 2001.

BREMER, E.; KRAMER, R. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In G. Storz and R. Hengge-Areolis (ed.). **Bacterial stress response**, p.79-97, 2000.

BUDINICH, M.F.; PEREZ-DÍAZ, I.; CAI, H.; RANKIN, S.A.; BROADBENT, J.R.; STEELE, J.L. Growth of *Lactobacillus paracasei* ATCC 334 in a cheese model system: A biochemical approach. **Journal of Dairy Science**, v.94, p.5263-5277, 2011.

BURGAIN, J.; SCHER, J.; FRANCIUS, G.; BORGES, F.; CORGNEAU, M.; REVOL-JUNELLES, A.M.; CAILLIEZ-GRIMAL, C.; GAIANI, C. Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.213, p.21-35, 2014.

BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.137, p.12-129, 2010.

CARRASCO, E.; MORALES-RUELLA, A.; GARCÍA-GIMENO, R.M. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. **Food Research International**, v.45 p.545-556, 2012.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v.28, p.281-370, 2002.

CARVALHO, R.J.; SOUZA, G.T.; HONORIO, V.G.; SOUSA, J.P.; CONCEIÇÃO, M.L.; MAGANANI, E.L.S. Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. **Food Microbiology**, v.52, p.59-65, 2015.

CHAMBERS, J.R.; GONG, J. The intestinal microbiota and its modulation for *Salmonella* control in chickens. **Food Research International**, v.44, p.3149-3159, 2011.

CHRISTENSEN, M.D.; PEDERSON, C.S. Factors Affecting Diacetyl Production by Lactic Acid Bacteria. **Applied Microbiology**. v.6, p.319-322, 1958.

CLARK, S.; POTTER, E.D. Cottage Cheese. In: Hui, YH. **Handbook of food products manufacturing: health, meat, milk, poultry, seafood and vegetables**, v.2, p.618-633, 2007.

COELHO, M.C.; SILVA, C.C.G.; RIBEIRO, S.C; DAPKEVICIUS, M.L.N.E.; ROSA, H.J.D. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.191, p.53-59, 2014.

COLLADO, M.C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: In vitro evaluation of different method. **Journal of Microbiological Methods**, v,71, p.71-74, 2007.

COLLINS, J.K.; THORNTON, J.; SULLIVAN, G.O. Selection of Probiotic Strains for Human Applications. **International Dairy Journal**, v.8, p.487-490, 1998.

COMAN, M.M.; CECCHINI, C.; VERDENELLI, M.C.; SILVI, S.; ORPIANESI, C.; CRESCI, A. Functional foods as carriers for SYN BIO®, a probiotic bacteria combination. **The International Journal of Food Microbiology**, v.157, p.346-352, 2012.

CORZO, G.; GILLILAND, S.E. Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, v.82, p.472-480, 1999.

COTTER, P.D.; HILL, C. Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, p.429-453, 2003.

DAESCHEL, M.A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Technology**, v.43, p.164-166, 1989.

DAL BELLO, B.; RANTSIOU, K.; BELLIO, A.; ZEPPA, G.; AMBROSOLI, R.; CIVERA, T.; COCOLIN, L. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p.1151-1159, 2010.

DARILMAZ, D.O.; BEYATLI, Y. Acid-bile, antibiotic resistance and inhibitory properties of propionibacteria isolated from Turkish traditional home-made cheeses. **Anaerobe**, v.18, p.122-127, 2012.

DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Lactic acid bacteria | *Lactobacillus* spp:General features. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, p.78-90, 2011.

DEEPIKA, G.; CHARALAMPOPOULOS, D. Surface Adhesion Properties Of Lactobacilli. **Advances in applied microbiology**, v.70, p.127-152, 2010.

DEL RE, B.; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M.; PALENZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Letters in Applied Microbiology**, v.31, p.438-442, 2000.

DE VRESE, M.; LAUE, C.; OFFICK, B.; SOETH, E. Combination of acid lactase from *Aspergillus oryzae* and yogurt bacteria improves lactose digestion in lactose maldigesters synergistically: A randomized, controlled, double-blind cross-over trial. **Clinical Nutrition**, v.14, p.1-6, 2014.

DE VUYST, L.; VIN, F.D.; DEGEEST, F.V.B. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v.11, p.687-707, 2001.

DRINAN, D.F.; ROBIN, S.; COGAN, T.M. Citric Acid Metabolism in Hetero- and Homofermentative Lactic Acid Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, p.481-486, 1976.

DUBOURG, G.; ELSAWI, Z.; RAOULT, D. Assessment of the in vitro antimicrobial activity of *Lactobacillus* species for identifying new potential antibiotics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.46, p.590-593, 2015.

DUNNE, C.; O'MAHONY, L.; MURPHY, L.; THORNTON, G.; MORRISSEY, D.; O'HALLORAN,.; FEENEY, M.; FLYNN, S.; FITZGERALD, G.; DALY, C.; O'SULLIVAN, G. C.; SHANAHAN, F.; COLLINS, J.K. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.386-392, 2001.

DURANGO, J.; ARRIETA, G.; MATTAR, S. Presencia de *Salmonella* spp. em un área del Caribe colombiano: un riesgo para la salud pública. **Biomédica**, v.24, p.89-96, 2004.

ERKKILÄ, S.; PETÄJÄ, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Science**, v. 55, p.297-300, 2000.

FAIRBROTHER, R.W.; CPRM, M. M. Chapter XXIX – Miscellaneous Genera: *Pseudomonas*, *Lactobacillus* And Fusiformis. **A Text-Book of Medical Bacteriology**, p.333-335, 2014.

FAO / WHO. **Orientações para a avaliação de probióticos na alimentação**. London, 2002. p.11

FAO (Food Agriculture Organization of the United Nations). (2014). FAOSTAT agriculture data. Available at: <http://faostat.fao.org/site/573/default.aspx#ancor>  
Acesso 05.08.16

FAVARO, L.; PENNA, A.L.B.; TODOROV, S. D. Bacteriocinogenic LAB from cheeses - Application in biopreservation. **Trends in Food Science & Technology**, v.41, p.37-48, 2015.

FERREIRA, C. L. L. F. Prebióticos e Probióticos: atualização e prospecção. Fortes Ferreira (editora), Rio de Janeiro, **Editora Rubio**, 2012.

FORSYTHE, S, J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto alegre: artmed, 2002.

FRÖHLICH-WYDER, M.T.; GUGGISBERG, D.; BADERTSCHER, R.; WECHSLER, D.; WITWER, A.; IRMLER, S. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus parabuchneri* on the eye formation of semi-hard cheese. **International Dairy Journal**, v.33, p.120-128., 2013.

GARCÍA-CAYUELA, T.; KORANY, A.; BUSTOS, I.; CADIÑANOS, L.P.G.; REQUENA, T.; PELÁEZ, C.; MARTÍNEZ-CUESTA, M.C. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. **Food Research International**, v.57, p.44-50, 2014.

GBASSI, G.K.; VANDAMME, T.; YOLOU, F.S.; MARCHIONI, E. In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal model. **International Dairy Journal**, v.21, p.97-102, 2011.

GÓMEZ-TORRES, N.; ÁVILA, M.; GAYA, P.; GARDE, S. Prevention of late blowing defect by reuterin produced in cheese by a *Lactobacillus reuteri* adjunct. **Food Microbiology**, v.42, p.82-88, 2014.

GREGORET, V.; PEREZLINDO, M.J.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J.; BINETTI, A. A comprehensive approach to determine the probiotic potential of human-derived *Lactobacillus* for industrial use. **Food Microbiology**, v.34, p.19-28, 2013.

HADDAJI, N.; KHOUADJA, S.; FDHILA, K.; KRIFI, B.; ISMAIL, M.B.; LAGHA, R.; BAKIR, K.; BAKHROUF, A. Acid stress suggests different determinants for

polystyrene and HeLa cell adhesion in *Lactobacillus casei*. **Journal of Dairy Science**, v.98, p.4302-4309, 2015.

HAMET, M.F.; PIERMARIA, J.A.; ABRAHAM, A.G. Selection of EPS-producing *Lactobacillus* strains isolated from kefir grains and rheological characterization of the fermented milks. **LWT - Food Science and Technology**, v.63, p.129-135, 2015.

HERRERO-FRESNO, M.N.; SANCHEZ-LIANA, E.; DIAZ, M.; FERNANDEZ, M.; MARTIN, M.C. *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. **International Journal of Food Microbiology**, v.2, p.297-304, 2012.

HU, L.; KOPECKO, D.J. *Salmonella* Typhi e paratyphi. **Molecular Medical Microbiology**, v.2 p.1365-1391, 2002.

HUTKINS. **Microbiology and Technology of Fermented Foods**/ Robert W. Hutkins —1 ed. Blackwell Publishing. 2006. Chapter 4. Cultured Dairy Products p. 137, 2006.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative bacteriology**. Williams & Wilkins, v. 9, 1994.

HOR, Y.Y.; LIONG, M.T. Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen *Staphylococcus aureus*. **Dermatologica Sinica**, v.32, p.141-147, 2014.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). (2011). **Produção da Pecuária Municipal - 2011**. Available at: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Producao\\_da\\_Pecuaria\\_Municipal/2011/ppm2011.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/ppm2011.pdf) Acesso 05.08.16

IQBAL, S.; NGUYEN, T.H.; NGUYEN, T.T.; MAISCHBERGER, T.; HALTRICH, D. Beta-Galactosidase from *Lactobacillus plantarum* WCFS1: biochemical characterization and formation of prebiotic galacto-oligosaccharides. **Carbohydrate Research**, v.345, p.1408-1416, 2010.

JARVIS, N.A.; O'BRYAN, C.A.; DAWOUD, T.M.; PARK, S.H.; KWON, Y.M.; CRANDALL, P.G.; RICKE, S.C. An overview of *Salmonella* thermal destruction during food processing and preparation. **Food Control**, v.68, p.280-290, 2016

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, p.711, 2005.



JENSEN, H.; GRIMMER, S.; NATERSTAD, K.; AXELSSON, L. *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.153, p.216-222, 2012.

KAEWNOPPARAT, S.; DANGMANEE, N.; KAEWNOPPARAT, N.; SRICHANA, T.; CHULASIRI, M.; SETTHARAKSA, S. In vitro probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. **Anaerobe**, v.22, p.6-13, 2013.

KARIMI, R.; MORTAZAVIAN, A.M.; DA CRUZ, A.G. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. **Dairy Science and Technology**, v.91, p.283-308, 2011.

KLEIN, M.P.; HACKENHAAR, C.R.; LORENZONI, A.S.G.; RODRIGUES, R.C.; COSTAC, T.M.H. Chitosan crosslinked with genipin as support matrix for application in food process: Support characterization and -d-galactosidase immobilization. **Carbohydrate Polymers**, v.137, p.184-190, 2016.

KOS, B.; KOVIC, J.S.; VUKOVIC, S.; SIMPRAGA, M.; FRECE, J.; MATOSIC, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.981-987, 2003.

LADERO, V.; FERNANDEZ, M.; CALLES-ERÍQUEZ, M.; SÁNCHEZ-LLANA, E.; CAÑEDO, E.; MARTÍN, M.C.; ALVAREZ, M.A. Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci. **Food Microbiology**, v.30, p.132-138, 2012.

LANDETA, G.; CURIEL, J.A.; CARRASCOSA, A.V.; MUÑOZ, R.; DE LAS RIVAS, V. Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. **Meat Science**, v.95, p.272-280, 2013.

LEITE, M.O.; LEITE, D.C.; DEL AGUILA, E.M.; ALVARES, T.S.; PEIXOTO, R.S.; MIGUEL, M.L.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M.F. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.4149-4159, 2013.

LE MINOR, L. Genus *Salmonella*. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J. G. **Bergey's: Manual of Sistematic Bacteriology**. Williams; Wilkins, 8 th, Baltimore M.D, v.1, p.964, 1984.

- LIU, X.; LIU, W.; ZHANG, Q.; TIAN, F.; WANG, G.; ZHANG, H.; CHEN, W. Screening of lactobacilli with antagonistic activity against enteroinvasive *Escherichia coli*. **Food Control**, v.30, p.563-568, 2013.
- LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v.11, p.1-17, 2001.
- LYNNE, A.M.; FOLEY, S.L.; HAN, J. *Salmonella*: properties and occurrence. Mod. **Food Science from Encyclopedia of Food Health**, p.695-700, 2016..
- MAHMOUD, B.S.M. The efficacy of grape seed extract, citric acid and lactic acid on the inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* in shucked oysters. **Food Control**, v.41, p.13-16, 2014.
- MALDONADO, N.C.; DE RUIZ, C.S.; OTERO, M.C.; SESMA, F.; NADER-M. Lactic acid bacteria isolated from young calves-characterization and potential as probiotics. **Research in Veterinary Science**, v.92, p.342-349, 2012.
- MARCO, M.L.; PAVAN, S.; KLEEREBEZEM, M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. **Current Opinion in Biotechnology**, v.17, p.204-210, 2006.
- MARTINIS, E.C.P.; SANTAROSA, P.R.; FREITAS, F.Z. Caracterização preliminar de bacteriocinas produzidas por seis cepas de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos embalados a vácuo. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v.23, p.195-199, 2003.
- MARTEAU, P.; GERHARDTS, M.F.; MYARAS, A.; BOUVIERI, E.; TRIVINS, F.; RAMBAUD, J.C. Metabolism of Bile Salts by Alimentary Bacteria During Transit in the Human Small Intestine. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.8, p.151-157, 1995.
- MAYO, B.; VAN SINDER. Genoma analysis of food grade lactic acid-producing bacteria: From basics to application. **Current Genomics**, v.9, p.169-183, 2008.
- MCMULLEN, L.M.; STILLES, M.E. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. **Journal of Food Protein**, v. 59, p.64-71, 1996.
- MESSAOUDI, S.; MADI, A.; PREVOST, H.; FEUILLOLEY, M.; MANAI, M.; DOUSSET, X.; CONNIL, N. In vitro evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus salivarius* SMXD51. **Anaerobe**, v.18, p.584-589, 2012.

MESSAOUDI, S.; MANAI, M.; KERGOURLAY, G.; PRÉVOST, H.; CONNIL, N.; CHOBERT, J. M.; DOUSSET, X. *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity. **Food Microbiology**, v.36, p.296-304, 2013.

MINELLI, E.B.; BENINIA, A.; MARZOTTOB, M.; SBARBATIC, A.; RUZZENENTE, O.; FERRAIO, R.; HENDRIKS, H.; DELLAGLIO, F. Assessment of novel probiotic *Lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. **International Dairy Journal**, v.14, p.723-736, 2004.

MOHAMED, T.; ZHAO, S.; WHITE, D.G.; PARVEEN, S. Molecular characterization of antibiotic resistant *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella* Kentucky isolated from pre- and post-chill whole broilers carcasses. **Food Microbiology**, v.38, p.6-15, 2014.

NIE, C.; LIUA, B.; ZHANGA, Y.; ZHAO, G.; FANA, X.; NINGA, X.; ZHANGA, W. Production and secretion of *Lactobacillus crispatus*  $\beta$ -galactosidase in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v.92, p.88-93, 2013.

O'BRYAN, C.A.; CRANDALL, P.G.; RICKE, S. Lactic acid bacteria (LAB) as antimicrobials in food products: Types and mechanisms of action. **Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality**, p.117-136, 2015.

OLIVEIRA<sup>a</sup>, C.O.; GUIMARÃES, P.M.R.; DOMINGUES, L. Recombinant microbial systems for improved  $\beta$ -galactosidase production and biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v.29, p.600-609, 2011.

OLIVEIRA<sup>b</sup>, C.J.B.; HISRICH, E.R.; MOURA, J.F.P.; GIVISIEZ, P.E.N.; COSTA, R. G.; GEBREYES, W. A. On farm risk factors associated with goat milk quality in Northeast Brazil. **Small Ruminant Research**, v.98, p.64-69, 2011.

OLIVEIRA, P.M.; ZANNINI, E.; ARENDT, E.K. Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: From crop farming to cereal products. **Food Microbiology**, v.37, p.78-95, 2014.

PASSERINI, D.; LAROUTE, V.; CODDEVILLE, M.; LE BOURGEOIS, P.; LOUBIÈRE, P.; RITZENTHALER, P.; COCAIGN-BOUSQUET, M.; DAVERAN-MINGOT, M. L. New insights into *Lactococcus lactis* diacetyl- and acetoin-producing strains isolated from diverse origins. **Food Microbiology**, v.160, p.329-336, 2013.

PATCHANEE, P.; TANSIRICHAROENKUL, K.; BUAWIRATLER, T.; WIRATSUDAKUL, A.; ANGCHOKCHATWAL, K.; YAMSAKUL, P., YANO, T.; BOONKHOT, P.; ROJANASATIEN, S.; TADE, P. *Salmonella* in pork retail outlets and dissemination of its pulsotype through pig production chain in

Chiang Mai and surrounding areas, Thailand. **Preventive Veterinary Medicine**, v.130, p.99-105, 2016.

PATTEN, D.A.; LEIVERS, S.; CHADHA, M. J.; MAQSOOD, M.; HUMPHREYS, P. N.; LAWS, A. P.; COLLETT, A. The structure and immunomodulatory activity on intestinal epithelial cells of the EPSs isolated from *Lactobacillus helveticus* sp. Rosyjski and *Lactobacillus acidophilus* sp. **Carbohydrate Research**, v.384, p.119-127, 2014.

PEDERSEN, T.B.; RISTAGN, D.; MCSWEENEY, P.L.H.; VOGENSE, F.K.Y.; ARD, Y. Potential impact on cheese flavour of heterofermentative bacteria from starter cultures. **International Dairy Journal**, v.33, p.112-119, 2013.

PENNACCHIA, C.; ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; PEPE, O.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. **Meat Science**, v.67, p.309-317, 2004.

PFEILER, E. A.; KLAENHAMMER, T. R. The genomics of lactic acid bacteria. **TRENDS in Microbiology**, v.15, 2007.

PELLETIER, C.; BOULEY, C.C.; BOUTTIER, S.; BOURLIOUX, P.; BELLON-FONTAINE, M.N. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.1725-1731, 1997.

POGACIC, T.; MAILLARD, M.B.; LECLERC, A.; HERVE, C.; CHUAT, V.; YEE, A.; VALENCE, F.; THIERRY, A. A methodological approach to screen diverse cheese-related bacteria for their ability to produce aroma compounds. **Food Microbiology**, v.46, p.145-153, 2015.

POINTON, A.; KIERMEIER, A.; FEGAN, N. Review of the impact of pre-slaughter feed curfews of cattle, sheep and goats on food safety and carcass hygiene in Australia. **Food Control**, v.26, p.313-321, 2012.

PORCELLATO, D.; JOHNSON, M.E.; HOUCK, K.; SKEIE, S. B.; MILLS, D.A.; KALANETRA, K.M.; STEELE, J.L. Potential of *Lactobacillus curvatus* LFC1 to produce slits in Cheddar cheese. **Food Microbiology**, v.49, p.65-73, 2015.

POVEDA, J.M.; CHICON, R.; CABEZAS, L. Biogenic amine content and proteolysis in Manchego cheese manufactured with *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* as adjunct and other autochthonous strains as starters. **International Dairy Journal**, v.47, p.94-101, 2015.

PRASAD, J.; GILL, H.; SMART, J.; GOPAL, P. K. Selection and

characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. **International Dairy Journal**, v.12, p.993-1002, 1998.

QUEIROGA, R.C.R.E.; SANTOS, B.M.; GOMES, A.M.P.; MONTEIRO M.J.; TEIXIERA, S.M.; SOUZA, E.L.; PEREIRA, C.J.D.; PINTADO, M.M.E. Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. **LWT - Food Science and Technology**, v.50, p.538-544, 2013.

QUINTANS, N.G.; BLANCATO, V.; REPIZO, G.; MAGNI, C.; LÓPEZ, P. **Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria**. In: Molecular aspects of lactic acid bacteria for traditional and new applications / Editors: Baltasar Mayo, Paloma López and Gaspar Pérez-Martínez, pp.344, 2008.

RANADHEERA, C.S.; EVANS, C.A.; ADAMS, M.C.; BAINES, S.K. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt C. **Food Research International**, v.49, p.619-625, 2012.

REALE, A.; DI RENZO, T.; ROSSI, F.; ZOTTA, T.; LACUMIN, L.; PREZIUSO, M.; PARENTE, E.; SORRENTINO, E.; COPPOLA, R. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. **LWT - Food Science and Technology**, v.60, p.721-728, 2015.

REN, D.; LI, C.; QIN, Y.; YIN, R.; DU, S.; YE, F.; LIU, C.; LIU, H.; WANG, M.; LI, Y.; SUN, Y.; LI, X.; TIAN, M.; JIN, N. *In vitro* evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. **Anaerobe**, v.30, p.1-10, 2014.

RINCON-DELGADILLO, M.I.; LOPEZ-HERNANDEZ, A.; WIJAYA, I.; RANKIN, S.A. Diacetyl levels and volatile profiles of commercial starter distillates and selected dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.1128-1139, 2012.

RÖNKÄ, E.; MALINEN, E.; SAARELA, M.; RINTA-KOSKI, M.; AARNIKUNNAS, J.; PALVA, A. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. **International Journal of Food Microbiology**, v.83, p.63-74, 2003.

SOCCOL, C. R.; SOUZA, V. L. P.; SPIER, L. P.; MEDEIROS, A. B. P.; YAMAGUISHI, C. T.; LINDNER, J. D. D. The potential of probiotics: a review. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, p.34-413, 2010.

SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v.29, p.675-690, 1996.

SHORI, A. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. **Food Bioscience**, v.13, p.1-8, 2016.

SIDIRA, M.; KANDYLIS, P.; KANELLAKI, M.; KOURKOUTAS, Y. Effect of immobilized *Lactobacillus casei* on the evolution of flavor compounds in probiotic dry-fermented sausages during ripening. **Meat Science**, v.100, p.41-51, 2015.

SILLA SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.29, p.213-231, 1996.

SILVA, G. S.; FERRARI, I. S.; SILVA, C. D. A.; ALMEIDA JÚNIOR, W.L.G.; CARRIJO, K.F.; COSTA, M.M.; SILVA, A.E.V.N. ; DIAS, F.S. Microbiological and physical-chemical profile of goat milk in the semiarid region of the San Francisco Valley. **Veterinary Notification**, v.19, p.14-22, 2013.

SILVA, R.A.; LIMA, M.S.F.; VIANA, J.B.M.; BEZESSA, V.S.; PIMENTEL, M.C.B.; PORTO, A.L.F.; CAVALCANTI, M.T.H.; LIMA, J.L. Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? **Food Chemistry**, v.135, p.1533-1538, 2012.

SINGHT, S.; GOSWAMI, P.; SINGHT, R.; HELLER, K. J. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, p.448-457, 2009.

SLOVER, C. M.; DANZIGER, L. *Lactobacillus*: a Review. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.30, p.23-27, 2008.

STECCHINI, M.L.; SARAIS, I.; DE BERTOLDI, M. The influence of *Lactobacillus plantarum* culture inoculation on the fate of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* in Montasio cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.14, p.99-109, 1991.

TAMAGNINI, L.M.; SOUSA, G.B. Behavior of *Enterobacter amnigenus* and *Salmonella typhimurium* in Crottin goat's cheese: Influence of fluctuating storage temperature. **Small Ruminant Research**, v.76, p.177-182, 2008.

TULUMOĞLU, S.; KAYA, H.I.; ŞİMŞEK, Ö. Probiotic characteristics of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from tulum cheese. **Anaerobe**, v.30, p. 120-125, 2014.

UROIC, K.; NOVAK, J.; HYNENONEN, U.; PIETILEA, T.E.; PAVUNC, A.L.; KANT, R.; KOS, B.Z.; PALVA, A.; SUCKOVIC, J. The role of S-layer in adhesive and immunomodulating properties of probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* D6 isolated from artisanal smoked fresh cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v.69, p.623-632, 2016.

USTOK, F.I.; TARI, C.; HARSA, S. Biochemical and thermal properties of b galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. **Food Chemistry**, v.119, p.1114-1120, 2010.

VAUGHAN, E.E.; DE VRIES, M.C.; ZOETENDAI, E.G.; BEN-AMOR, K.; AKKERMANS, A.D.; DE VOS, V.M. The intestinal LABs. Antonie Van Leeuwenhoek. **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v.82, p.341-352, 2002.

WALSTRA, P.; WOUTERS, T.M.; GEURTS, T.J. **Dairy science and technology** / Pieter Walstra, Jan T.M. Wouters, T.J. Geurts.—2 ed. CRC Press Taylor & Francis Group. 2006. Chapter 13 - Lactic Fermentations. Total pp.768, 2006.

WANG, Y.; SUN, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, Z.; SONG, J.; GUI, M.; LI, P. Bacteriocin-producing probiotics enhance the safety and functionality of sturgeon sausage. **Food Control**, v.50, p.729-735, 2015

WASKO<sup>A</sup>, A.; POLAK-BERECKA, M.; PADUCH, R.; JOZWIAK, K. The effect of moonlighting proteins on the adhesion and aggregation ability of *Lactobacillus helveticus*. **Anaerobe**, v.30, p.161-168, 2014.

WAŚKO<sup>B</sup>, A.; POLAK-BERECKA, M.; KUZDRALIŃSKI, A.; SKRZYPEK, T. Variability of S-layer proteins in *Lactobacillus helveticus* strains. **Anaerobe**, v.25, p.53-60, 2014.

WOLDEMARIAM, E.; MOLLA, B.; ALEMAYEHU.D.; MUCKLE, A. Prevalence and distribution of *Salmonella* apparently healthy slaughtered sheep and goats in DebreZeit, Ethiopia. **Small Ruminant Research**, v.58, p.19-24, 2005.

YANG, B.; ZHAO, H.; CUI, S.; WANG, Y.; XIA, X.; XI, M.; WANG, X.; MENG, J.; GEW. Prevalence and characterization of *Salmonella enterica* in dried milk-related infant foods in Shaanxi, China. **Journal of Dairy Science**, v.11, p.6754-6760, 2014.

YOON. Y.; LEE, S.; CHOI, K.H. Microbial benefits and risks of raw milk cheese.  
**Food Control**, v.63, p.201-215, 2016.



## 2.2 SEGUNDA PARTE: ARTIGO CIENTÍFICO

Publicado no Periódico *Food Microbiology*, v.60, p.29-38, 2016.

### **Seleção de Bactérias Ácido Láticas autóctones de leite de cabra e sua adição em queijo artesanal para avaliar a inibição de *Salmonella Typhi***

#### **RESUMO**

Este estudo objetivou selecionar Bactérias Ácido Láticas (BAL) autóctones de leite de cabra com propriedades probióticas e funcionais, e testar a sua adição ao queijo artesanal para inibição de *Salmonella Typhi*. Testes *in vitro* para sessenta isolados foram conduzidos, incluindo a sobrevivência no Trato Gastrointestinal (TGI), testes de autoagregação e coagregação, ensaio hemolítico, atividade de DNase, susceptibilidade antimicrobiana, atividade antibacteriana, tolerância a NaCl, Exopolissacarídeo (EPS), produção de gás e de diacetil. Com base nesses testes, foram selecionados e identificados quatro isolados de BAL (UNIVASF CAP 16, 45, 84 e 279). Testes adicionais, como a produção de ácido lático e cítrico, foram realizados para os isolados UNIVASF CAP, além dos ensaios de Hidrolase de Sais Biliares (BSH),  $\beta$ -galactosidase e de atividade de descarboxilase. As quatro BAL selecionadas produziram ácido lático em elevada concentração ( $>17$  g / L) e ácido cítrico em baixa concentração (0,2 g / L). Todas as estirpes selecionadas apresentaram BSH e atividade  $\beta$ -galactosidase, e nenhuma apresentou atividade de descarboxilase. Três queijos de cabra (1, 2 e controle) foram produzidos e avaliados pela ação inibitória das BAL selecionadas sobre a *Salmonella Typhi*. O queijo inoculado com BAL (queijo 2) diminuiu a população de *S.Typhi* para 0,38 log<sub>10</sub> UFC/g, no queijo sem o inóculo de BAL (queijo 1) aumentou a população do patógeno em 0,29 unidades logarítmicas. Além disso, o valor de pH aumentou linearmente ao longo do tempo, em 0,004 unidades por dia, no queijo 1. No queijo 2, o valor de pH diminuiu linearmente ao longo do tempo, em 0,066 unidades por dia. O coquetel contendo estirpes selecionadas de *Lactobacillus*, com potenciais propriedades probióticas e tecnológicas, apresentou atividade antibacteriana *in vitro* contra *S. Typhi* no queijo de cabra artesanal. Assim, o

leite de cabra é importante fonte de BAL com potencial probiótico que pode ser utilizada para inibir o crescimento populacional de *Salmonella* em queijo de cabra, contribuindo para a segurança e valor funcional do produto.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana. Probióticos. Queijo de cabra. Segurança alimentar.

## ABSTRACT

This study aimed to select autochthonous lactic acid bacteria (LAB) with probiotic and functional properties from goat dairies and test their addition to artisanal cheese for the inhibition of *Salmonella* Typhi. *In vitro* tests, including survival in the gastrointestinal tract (GIT), auto and co-aggregation, the hemolytic test, DNase activity, antimicrobial susceptibility, antibacterial activity, tolerance to NaCl and exopolysaccharide (EPS), gas and diacetyl production were conducted for sixty isolates. Based on these tests, four LAB isolates (UNIVASF CAP 16, 45, 84 and 279) were selected and identified. Additional tests, such as production of lactic and citric acids by UNIVASF CAP isolates were performed in addition to assays of bile salt hydrolase (BSH),  $\beta$ -galactosidase and decarboxylase activity. The four selected LAB produced high lactic acid (> 17 g/L) and low citric acid (0.2 g/L) concentrations. All selected strains showed BSH and  $\beta$ -galactosidase activity and none showed decarboxylase activity. Three goat cheeses (1, 2 and control) were produced and evaluated for the inhibitory action of selected LAB against *Salmonella* Typhi. The cheese inoculated with LAB (cheese 2) decreased 0.38 log<sub>10</sub> CFU/g of *S. Typhi* population while in the cheese without LAB inoculation (cheese 1) the pathogen population increased by 0.29 log units. Further, the pH value increased linearly over time, by 0.004 units per day in cheese 1. In the cheese 2, the pH value decreased linearly over time, by 0.066 units per day. The cocktail containing selected *Lactobacillus* strains with potential probiotic and technological properties showed antibacterial activity against *S. Typhi* *in vitro* and in artisanal goat cheese. Thus, goat milk is an important source of potential probiotic LAB which may be used to inhibit the growth of *Salmonella* population in cheese goat, contributing to safety and functional value of the product.

Keywords: Antibacterial activity. Food safety. Goat cheese. Probiotics.

### 2.2.1 INTRODUÇÃO

A primeira e a segunda unidade de Federação com os maiores rebanhos de caprinos, estão localizados nos estados brasileiros da Bahia (BA) e Pernambuco (PE). Dois municípios da região semiárida do Brasil, Juazeiro (BA) e Petrolina (PE), correspondem ao segundo e ao sétimo municípios, respectivamente, com os maiores rebanhos caprinos (IBGE, 2011). Naturalmente, os caprinos têm importância econômica e social para a população dessa região.

Entre os produtos lácteos provenientes da cadeia produtiva da cabra em regiões semiáridas, destaca-se o queijo artesanal. Este produto é preferido pelos consumidores locais e pode, ainda, complementar a renda dos pequenos produtores (ALMEIDA JUNIOR et al., 2015; BEZERRA et al., 2016), no entanto, a qualidade microbiológica deve ser aprimorada. A associação de leite e seus derivados com vários micro-organismos patogênicos enfatiza a necessidade de intensificar esforços para garantir a segurança desses produtos (EL-SHAROUD, 2015).

Normalmente, a contaminação por *Salmonella* pode ocorrer em leite e em queijo de cabra (TAMAGNINI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011) porque as cabras são reservatórios de *Salmonella* e uma grande porcentagem desses animais transporta estes micro-organismos em seu rúmen ou fezes (WOLDEMARIAM et al., 2005; POINTON; KIERMEIER; FEGAN, 2012). Uma vez que este agente patogênico pode sobreviver a baixas temperaturas e pH, consegue permanecer por um longo período em queijos armazenados. Assim, *Salmonella* spp. continua a ser uma preocupação para a indústria de laticínios (TAMAGNINI et al., 2008; YANG et al., 2014; LYNNE; FOLEY; HAN, 2016).

Uma abordagem para a indústria de laticínios para inibir patógenos e agregar valor aos seus produtos é a utilização de Bactérias Ácido Lácticas (BAL). Culturas selecionadas de BAL são usadas pela indústria de laticínios em grande escala e oferecem os benefícios de segurança microbiológica, uniformidade e qualidade do produto final (ROSS; MORGAN; HILL, 2002). A produção de ácido láctico e bacteriocinas por BAL tem um efeito inibitório sobre as bactérias patogênicas (COELHO et al., 2014; FONTANA et al., 2015).

Além disso, a adição de BAL aos produtos lácteos pode contribuir para as propriedades tecnológicas (NIETO-ARRIBAS et al., 2009; FAVARO et al., 2014) e também as propriedades funcionais. De acordo com Giraffa (2012), para um probiótico ser benéfico á saúde humana, este deve sobreviver à passagem através do TGI (trato gastrointestinal) e ser capaz de sobreviver no ambiente do intestino. Os requisitos funcionais dos probióticos incluem a tolerância ao ácido e à bile, a aderência às superfícies epiteliais e a atividade antagonista com agentes patogênicos intestinais. Este estudo teve como objetivos avaliar e selecionar estirpes de BAL autóctones de leite caprino com potencial probiótico e tecnológico e testar a sua adição ao queijo artesanal para para inibição do crescimento de *Salmonella Typhi*.

## **2.2.2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.2.2.1 Local de execução, pré seleção e identificação dos isolados**

O estudo foi realizado no Laboratório de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF. Para a realização de técnicas moleculares tivemos o apoio do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal – UNIVASF, bem como o laboratório de Fisiologia e Genética de Micro-organismos da Universidade Federal de Lavras – UFLA para a realização da técnica cromatografia líquida de alta eficiência. Um total de 60 BAL pré-selecionadas entre 290 isolados foi utilizado neste estudo. Estas estirpes foram isoladas do leite de cabra obtido de explorações leiteiras extensivas em pequena escala com cabras de raça mista, em seis municípios da região semiárida, nordeste do Brasil (ALMEIDA JUNIOR et al., 2015). Foram escolhidos, aleatoriamente, dez fazendas em cada região, para um total de 60 amostras de leite. A caracterização básica dos isolados foi realizada através da reação de Gram, morfologia, motilidade, catalase ( $H_2O_2$ , 3% v / v) e a atividade do citocromo-oxidase. Na sequência, a pré-seleção de isolados BAL UNIVASF CAP foi baseada em sua capacidade de tolerar os efeitos do pH baixo. Assim, sessenta isolados com uma taxa de sobrevivência superior a 90% ao pH 2 (SOLIERI et al., 2014) foram selecionados para os testes descritos a seguir.

Foram identificadas as quatro estirpes selecionadas a partir dos testes descritos nas seções 2.2.2.2 a 2.2.2.6. O gênero e a espécie foram confirmadas por análise da sequência do gene de 16S rRNA. O DNA bacteriano foi extraído de cada uma das estirpes utilizando o kit Pure Link Genomic DNA Mini (Invitrogen). As reações de PCR foram realizadas num volume final de 50  $\mu$ L contendo 25  $\mu$ L de Top Taq Master Mix (Qiagen), 1  $\mu$ L de cada iniciador (27f / 1512r), 2  $\mu$ L de DNA e 21  $\mu$ L de RNase livre de água. Os produtos de PCR foram purificados com o kit de purificação de PCR Pure Link (Invitrogen). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados por Helixxa Pesquisa (Paulínia - SP, Brasil). As sequências foram, então, comparadas com

as do banco de dados GenBank, utilizando o BLAST (National Center for Biotechnology Information, Maryland, EUA).

Os quatro isolados de BAL UNIVASF CAP selecionados foram depositados na Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola (CCMA) (<https://sites.google.com/site/ccmaufla/home>) da Universidade Federal de Lavras, Brasil.

#### **2.2.2.2 Caracterização de fatores de virulência dos isolados de BAL**

A produção de DNase foi determinada através da adição de alíquotas de 1  $\mu$ L do isolado em gotas sobre a superfície de ágar teste DNase (Himedia) com azul de toluidina a 0,1%. As placas foram, então, incubadas a 37°C durante 48 horas. A formação de halo rosado em volta das colônias indicou um resultado positivo para a presença de DNase (PERIN et al., 2014).

Para o teste de coagulase, 0,3 mL de cada isolado foi transferido para tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho (Plasma Coagu-LaborClin®) incubadas a 36°C ( $\pm$  1°C) durante 6 horas. A formação de um coágulo grande ou a total coagulação foram consideradas um resultado positivo para o teste (PERIN et al., 2015).

Para o teste de hemólise, os isolados de BAL foram cultivados em caldo MRS (Himedia) a 37°C, durante 15 horas e transferidos para placas de ágar sangue (Himedia) suplementado com 5% de sangue de cavalo desfibrinado (Oxoid). Depois de 48 a 72 horas, a reação hemolítica foi avaliada através da observação tanto da hidrólise parcial das células vermelhas do sangue e a produção de uma zona verde ( $\alpha$ -hemólise), bem como a hidrólise total de células vermelhas do sangue produzindo uma zona clara em torno da colônia bacteriana ( $\beta$ -hemólise) ou nenhuma reação ( $\gamma$ -hemólise) (PERIN et al., 2014).

No teste de susceptibilidade antimicrobiana, utilizaram-se os antimicrobianos cloranfenicol (30  $\mu$ g/disco), oxacilina (1  $\mu$ g/disco), vancomicina (30  $\mu$ g/disco), tetraciclina (30  $\mu$ g/disco), ciprofloxacina (5  $\mu$ g/disco) e penicilina G (10 UI/disco), segundo as recomendações da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Os isolados de BAL foram cultivados em ágar MRS (Himedia), durante 24 horas, a 37°C. As estirpes foram inoculadas em 4 mL de água destilada estéril para obter o n° de 0,5 McFarland padrão de

turvação (Probac, Brasil). Um swab estéril foi utilizado para espalhar o inóculo através da superfície de ágar Muller Hinton (Himedia), e, em seguida, os discos antimicrobianos foram aplicados à placa. A susceptibilidade antimicrobiana foi avaliada através da mensuração da zona de inibição do crescimento bacteriano, após incubação, durante 24 horas, a 37°C. *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada no teste para controle positivo.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

### **2.2.2.3 Simulação à tolerância do Trato Gastrointestinal (TGI) dos isolados de BAL selecionados**

Depois do critério de pré-seleção, dos isolados com uma taxa de sobrevivência maior que 90% a pH 2, foram dadas sequência com outros testes para simular a sobrevivência no TGI. Os isolados de BAL pré-selecionados foram testados num modelo *in vitro* que simula quimicamente as condições fisiológicas. No teste de tolerância á bile, o meio MRS (Himedia) foi suplementado com bile de bovino 2,0% (Sigma-Aldrich). Para o teste da tolerância do fluído pancreático, foram utilizados NaHCO<sub>3</sub> 150 mM e 1,9 mg/ml de pancreatina (Sigma-Aldrich), e o pH foi ajustado para 8,0, conforme sugerido por Ronka et al. (2003). Para testar a tolerância ao suco intestinal, de acordo com Bao et al. (2010), 0,1 g de tripsina (Sigma, Aldrich) e 1,8 g de sais biliares foram adicionados a uma solução estéril de 1,1 g de bicarbonato de sódio e 0,2 g de cloreto de sódio em 100 mL de água destilada. O pH da solução foi ajustado para 8,0 com hidróxido de sódio 0,5 M e esterilizado por filtração através de uma membrana de 0,45 µm.

As estirpes para cada teste foram inicialmente cultivadas durante 24 horas em meio MRS a 37°C. Após este período, as estirpes foram centrifugadas durante 5 minutos e lavadas 3 vezes em tampão fosfato salino (PBS) a pH 7,0. Tubos individuais contendo cada estirpe e meio de teste foram incubados, durante 3 horas, a 37°C em banho-maria. A viabilidade foi avaliada em duplicata, em 0 e 3 horas, em Ágar MRS. O ensaio foi realizado em triplicata. As taxas de sobrevivência foram calculadas de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Taxa de sobrevivência(\%)} = \frac{\log \text{UFC N1} \times 100}{\log \text{UFC N0}}$$



Em que N1 representa a contagem total de isolados viáveis no tempo de 3 horas e N0 representa a contagem total de isolados viáveis no tempo 0 hora.

#### **2.2.2.4 Agar difusão em disco - Atividade antibacteriana**

O efeito inibidor de diferentes isolados de BAL frente a agentes patogênicos foi testado utilizando-se o método de difusão em ágar disco. *Salmonella* Typhi (ATCC 6539), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Staphylococcus aureus* (ATCC nº 25923) foram cultivadas em ágar Triptona de Soja (TSA, Himedia) suplementado com 0,6% de extrato de levedura, durante 24 horas, a 37°C. Cada patógeno foi suspenso em 4 mL de água estéril e padronizado para, aproximadamente,  $10^8$  UFC/mL, por comparação de turvação ao padrão nº 0,5 da escala de McFarland. Um swab estéril foi embebido na suspensão e aplicado sobre a superfície de uma placa com ágar TSA. Em seguida, discos de papel filtro estéril (Whatman nº 1) de 6 mm foram umedecidos com 20 µL do sobrenadante isento de células (obtido por centrifugação 2.500 x g/10min) de cada isolado de BAL em fase de crescimento exponencial. A susceptibilidade de micro-organismos patogênicos foi avaliada por meio da mensuração da zona de inibição do crescimento bacteriano em torno dos discos (raio - mm) após a incubação, durante 24 horas, a 37°C. Uma zona clara de inibição de pelo menos 1 mm de raio foi registrada como positiva (AHMADOVA et al., 2012). O experimento foi realizado em triplicata.

#### **2.2.2.5 Atividade de agregação**

##### **2.2.2.5.1 Ensaio de autoagregação**

Os ensaios de autoagregação foram realizados como descrito por Kos et al. (2003), com algumas modificações. Resumidamente, as células foram lavadas duas vezes com PBS (pH 7,2). As células foram, então, ressuspensas em 4 mL, a  $10^8$  UFC/ml, em vortex durante 10 segundos e incubados, durante 4 horas à temperatura ambiente. Nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 horas, 5 µL da suspensão superior foram cuidadosamente removidos, transferidos para microplaca contendo 195 µL de PBS e a absorbância (A) a 620 nm foi

mensurada. A porcentagem de autoagregação foi expressa como uma função de tempo, até que fosse constante, utilizando a fórmula:  $1 - (A_t/A_0) \times 100$ , onde A representa a absorbância no tempo  $t = 4$  horas e  $A_0$ , a absorbância a  $t = 0$ . O experimento foi realizado em triplicata.

#### **2.2.2.5.2 Ensaio de coagregação: patógenos e isolados de BAL**

O método para preparar as suspensões de células utilizadas para o teste de coagregação foi o mesmo que o de autoagregação, como sugerido por Kos et al. (2003). Para este teste, os agentes patogênicos utilizados foram: *S. Typhi* (ATCC 6539) e *L. monocytogenes* (ATCC 7644). Volumes iguais (2 mL) de *Lactobacillus* e estirpe patogênica foram misturados, por vórtex, durante 10 segundos. Os tubos de controle foram preparados, ao mesmo tempo, contendo 4 mL de cada suspensão bacteriana separada. Nas suspensões, "A" a 620 nm foi medido após a mistura e, em seguida, após 5 horas de incubação à temperatura ambiente. As amostras foram avaliadas do mesmo modo como no ensaio de autoagregação. O ensaio foi realizado em triplicata. A porcentagem de coagregação foi calculada usando a equação:

$$\text{Coagregação(\%)} = \frac{((A_{\text{Lactob}} + A_{\text{patóg}})/2) - A_{\text{mix}}}{A_{\text{Lactob}} + A_{\text{patog}}} \times 100,$$

Onde  $A_{\text{patog}}$  e  $A_{\text{Lactob}}$  representam as suspensões bacterianas separadas à 620 nm, e  $A_{\text{mix}}$  representa a absorbância da suspensão bacteriana misturada.

#### **2.2.2.6 Propriedades tecnológicas das BAL**

A produção de Exopolissacarídeo (EPS) a partir dos isolados de BAL foi testada de acordo com o método descrito por Van Geel-Schutte et al. (1998), com modificações. Resumidamente, as culturas de BAL foram cultivadas em frascos contendo 20 mL de caldo MRS suplementado com 2% (w/v) de glicose, a 37°C, durante 3 dias. As células bacterianas foram removidas por

centrifugação, a 6.000 x g por 20 minutos, e dois volumes de etanol frio 95% (Merck) foram adicionados a um volume do sobrenadante da cultura para precipitação do EPS. Os precipitados foram separados por filtração a vácuo e secos a 60°C. Seus pesos foram mensurados para determinar a quantidade de EPS produzido.

Para verificar a produção de gás a partir de glicose, caldo MRS com glicose a 5% foi utilizado e adicionados a tubos Durham, de acordo com o método de Cai et al. (1999).

Para verificar a produção de diacetil, após crescimento, as amostras foram centrifugadas, a 4000 rpm, durante 15 minutos. O sedimento foi ressuspenso em água peptonada e inoculado (1% (w / v)) em 10 mL de leite integral UHT e incubadas a 30°C, durante 24 horas. Em seguida, 1 mL de cultura foi adicionado a 0,5 ml de solução  $\alpha$ -naftol (1% (w / v)) e KOH (16% (w / v)), seguido de incubação, a 37°C, durante 10 minutos. A produção de diacetil foi indicada por uma formação de um halo vermelho nos tubos (KING, 1948). Os resultados foram classificados como fraco, médio ou forte de acordo com a intensidade da cor do halo formado. Os testes foram realizados em duplicata.

Os isolados foram testados quanto à tolerância a concentrações de NaCl entre 4% e 6,5%, de acordo com o método do Yavuzdurmaz (2007). Meios contendo indicador púrpura de bromocresol foi preparado de acordo com as concentrações acima mencionadas e transferidos para tubos de 5 mL. Os tubos foram inoculados com 1% de culturas com crescimento de 24 horas e, em seguida, incubadas, a 37°C, durante 7 dias. Uma mudança de cor de púrpura para amarelo mostrou evidência de crescimento celular.

Exceto teste de diacetil, todos os outros testes foram realizados em triplicata.

### **2.2.2.7 Produção de ácido lático e ácido cítrico**

As quatro estirpes de BAL selecionadas foram cultivadas em meio MRS, durante 48 horas, a 37°C. A quantificação do ácido lático e ácido cítrico produzidos por cada estirpe foi medida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), equipado com um detector de UV operado a 210 nm, em adição a uma coluna de SCR-101H Shim-pack (7,9 mm x 30 centímetros). As

concentrações de ácido cítrico e ácido láctico foram determinadas de acordo com Miguel et al. (2012). A análise foi realizada a 30°C, utilizando 100 mM de ácido perclórico como eluente a uma vazão de 0,6 mL/min, com um volume de amostra de 20 µl. Ácido láctico e ácido cítrico foram identificados por comparação do tempo de retenção de um padrão autêntico correspondente a cada ácido. A concentração de ácidos láctico e cítrico foi determinada utilizando-se uma curva de calibração obtida por inserção de diferentes concentrações padrão de cada ácido injetados nas mesmas condições utilizadas para a análise da amostra. O ensaio foi realizado em duplicata.

#### **2.2.2.8 BSH, $\beta$ -galactosidase e atividade de descarboxilase**

Atividade de Hidrolase de Sais Biliares (BSH) das quatro culturas selecionadas foi detectada utilizando-se um procedimento de acordo com Zago et al. (2011), com algumas modificações. Resumidamente, culturas com crescimento foram visualizadas em placas de ágar MRS contendo 0,37 g/L de CaCl<sub>2</sub> e 0,5% TDCA (Sodium taurodeoxycholate hydrate -Sigma) ou GDCA (Sodium Glycodeoxycholate hydrate - Sigma). As placas foram incubadas aerobicamente, a 37°C, durante 72 horas. A presença de halo em torno de colônias ou colônias brancas opacas indicou atividade BSH. O inóculo de cada estirpe em MRS sem suplementação foi incluído como controle negativo.

A atividade de  $\beta$ -galactosidase das quatro estirpes selecionadas foi avaliada empregando discos estéreis de papel filtro impregnados com o-nitrophenyl-b-D-galactopyranose (ONPG discos, Fluka, Buchs, Suíça), de acordo com as instruções do fabricante. Uma colônia de cada uma das estirpes, cultivadas em placas de MRS, a 37°C, durante 48 horas foi retirado e emulsionado em um tubo contendo um disco de ONPG adicionado a 0,1 mL de solução salina estéril. Os tubos foram incubados a 37°C, e observou com um intervalo de 1 hora, em até 6 horas. O aparecimento de um composto cromogênico, o-nitrofenol amarelo, indica uma colônia positiva.

Atividade da descarboxilase dos quatro micro-organismos selecionados foi avaliada de acordo com Komprda et al. (2004). Cem miligramas de cultura foi inoculado em 9,9 mL de solução fisiológica. Após 24 horas, 0,3 mL da mistura foi transferida para um tubo com o meio constituído de peptona 0,5 g,

extrato de levedura 0,3 g, 1 mL de púrpura de bromocresol (BCP 2% em etanol a 50%), 1g de ácidos aminados- L (triptofano, histidina, ornitina, lisina, fenilalanina, cisteína, tirosina e arginina) e 100 mL de água destilada. Em seguida, a mistura foi revestida de óleo de parafina estéril. A cor violeta e amarela foram considerados positivo e negativo, respectivamente, após 1, 4, 24 e 48 horas a 37°C. Um tubo com o meio base sem aminoácidos foi utilizado como um controle negativo.

Todos os testes foram realizados em triplicata.

### **2.2.2.9 Inibição da *Salmonella Typhi* em queijo de cabra artesanal**

Os queijos de cabra foram fabricados para avaliar a ação inibitória das BAL contra *S. Typhi* (ATCC 6539). Os queijos foram fabricados em conformidade com o procedimento tradicional empregado por pequenos produtores na região do semiárida de Pernambuco, como anteriormente descrito por Almeida Junior et al. (2015), mas com a modificação da temperatura do leite de pasteurização (90°C durante 10 minutos) e a concentração de inóculo. No primeiro queijo (queijo 1), o inóculo contendo  $10^7$  UFC / mL de *S. Typhi* foi adicionado como controle positivo. No segundo tipo de queijo (queijo 2) foi adicionado o inóculo contendo  $10^7$  UFC / ml *S. Typhi* e  $10^7$  UFC / mL de uma mistura de BAL selecionada. No terceiro queijo, não houve inoculação microbiana: o queijo foi o controle negativo. A massa de queijo foi distribuída em 250 g em formas perfuradas e pressionada durante 2 horas à temperatura ambiente. Os queijos foram realizados em triplicata. Posteriormente, os produtos foram embalados em sacos de plástico estéreis (Cryovac, Brasil) e armazenados a 4°C, com 90% de umidade relativa, por um total de 20 dias. A contagem bacteriana, o pH e a lactose foram realizadas nos dias 0, 5, 10, 15 e 20, depois da preparação dos queijos.

#### **2.2.2.9.1 Enumeração bacteriana**

Vinte e cinco gramas de cada queijo foi assepticamente removido através da realização de cortes radiais e homogeneizou-se no Stomach® (Mayo Homogêneo HG 400) com 225 mL de água peptonada a 1% (Himedia)

(IDF, 1995). Foram preparadas diluições em série. A enumeração de BAL foi realizada utilizando o meio MRS suplementado com EDTA a 1 mM, para inibir o crescimento de *Salmonella* de acordo com Alakomi et al. (2003). As placas, foram, então incubadas, a 37°C, durante 24 horas. Para a enumeração de *S. Typhi*, conforme descrito por Pignato et al. (1995), adicionou-se 10 g de queijo dentro de um envelope estéril de 90 ml de caldo base de Salmosyst. O material homogeneizado foi incubado, a 37°C, durante 6 horas. Após este período, 10 mL de cada amostra homogeneizada foi transferida para o tubo contendo 10 mL de caldo Salmosyst e incubou-se, durante 18 horas, a 37°C. Um total de 0,1 mL foi, então, plaqueado em Agar Rambach. As colônias típicas de cada meio foram enumeradas.

#### **2.2.2.9.2 Análise físico-química**

O valor de pH foi determinado por homogeneização de 10 g de queijo em 10 mL de água destilada usando um medidor de pH (PHS-3B, Lab Medidor de pH modelo equipado com um elétrodo T818-A, Xangai, China). O valor da lactose foi medida de acordo com o método de Brasil (2006).

#### **2.2.2.10 Análise estatística**

Para os testes de atividade antibacteriana e produção EPS, os dados foram analisados por análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott.

Um delineamento em blocos casualizados com três repetições foi utilizado para os testes de autoagregação, coagregação e inibição de *S. Typhi* no queijo de cabra. Para o ensaio de autoagregação, os tratamentos foram dispostos em fatorial 58 X 4: 58 estirpes e 4 tempos (1, 2, 3 e 4 horas). Nos testes de coagregação, para cada agente patogênico testado (*S. Typhi* e *L. monocytogenes*), os tratamentos foram dispostos em fatorial 58 x 5: 58 estirpes e 5 tempos (1, 2, 3, 4 e 5 horas). Para a mensurar a inibição de *S. Typhi* no queijo de cabra, os tratamentos foram dispostos em fatorial 3 x 5: 3 queijos (queijo contendo um inóculo de *S. Typhi*, queijo contendo inóculo de *S. Typhi* e BAL, e queijo sem inóculo) e 5 tempos (0, 5, 10, 15 e 20 dias). Os dados foram

verificados por análise de variância e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott. Os dados quantitativos foram analisados por meio de regressão. A análise estatística foi realizada utilizando software SISVAR® (Lavras, Brasil), versão 4.5.

Os dados obtidos com os testes descritos nos pontos 2.2.2.2 a 2.2.2.6 foram analisados através da Análise de Componentes Principais (ACP) usando XLSTAT 7.5.2 software (Addinsoft, New York, NY, EUA).

## **2.2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **2.2.3.1 Caracterização de fatores de virulência dos isolados de BAL**

É necessária a determinação do potencial de virulência dos micro-organismos para garantir a segurança, mesmo entre um grupo de bactérias que são Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS) (FAO / WHO, 2002).

Os isolados UNIVASF CAP não mostraram atividade das enzimas DNase e coagulase, em testes fenotípicos. No teste de hemólise, apenas o isolado UNIVASF CAP 97 mostrou uma lise completa das células vermelhas do sangue, sendo classificada como  $\beta$ -hemolítica. Portanto, este isolado foi eliminado nos testes seguintes. A ausência de atividade hemolítica é um critério de seleção para potenciais candidatos de estirpes para aplicação em produtos lácteos (MARAGKOUDAKIS et al., 2006).

Em relação à segurança das estirpes probióticas, a resistência aos antimicrobianos é um dos aspectos que precisa ser analisado por causa das sérias preocupações sobre o aumento do nível de resistência aos antimicrobianos na medicina (MONTEAGUDO-MERE et al., 2012). Em testes de sensibilidade antimicrobiana, os isolados exibiram um perfil de sensibilidade semelhante aos antimicrobianos testados. Dos 60 isolados testados, 87,93% e 94,82% foram sensíveis à tetraciclina e cloranfenicol, respectivamente. Confirmando os resultados deste estudo, Ammor et al. (2007) afirmam que as BAL são mais suscetíveis aos antimicrobianos que inibem a síntese de proteínas.

No total, 98,27% dos isolados de BAL demonstraram susceptibilidade à vancomicina. Estes dados diferem dos encontrados por Shao et al. (2015), no

qual todos os isolados de lactobacilos eram resistentes a este antimicrobiano. Geralmente, as BAL exibem resistência intrínseca à vancomicina pela alteração de proteínas de ligação na parede celular (SHARMA et al., 2014).

Entre os isolados UNIVASF CAP testados, 10,34% e 5,17% foram sensíveis à penicilina e oxacilina, respectivamente. A permeabilidade da parede celular é o principal mecanismo de resistência a inibidores da síntese da parede celular, porque as espécies de BAL não possuem o mecanismo de transporte de elétrons mediada pelo citocromo (AMMOR et al., 2007; MUÑOZ et al., 2014). Danielsen e Win (2003) também observaram aumento da resistência das BAL à oxacilina. McCormick et al. (2003) sugeriram que regiões geográficas diferentes pode interferir com os níveis de resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos.

Em testes de susceptibilidade antimicrobiana, o isolado UNIVASF CAP 90 apresentou resistência a todos os antimicrobianos testados. Portanto, na caracterização de fatores de virulência, dois isolados, UNIVASF CAP 90 e 97 (lise de glóbulos vermelhos), foram excluídos como candidatos para adição em alimento. Assim, 58 isolados BAL permaneceram para os demais testes.

### **2.2.3.2 Simulação de tolerância ao Trato Gastrointestinal (TGI), agregação e atividade antibacteriana dos isolados de BAL selecionados**

Cinquenta e oito isolados de BAL demonstraram uma taxa de sobrevivência no suco intestinal e pancreático superior a 90%. Em resposta à bile, a taxa de sobrevivência foi > 95% para todos os isolados testados. Monteagudo-Mera et al. (2012) e Kaewnopparat et al. (2013) relataram resultados semelhantes. Portanto, estes isolados poderiam suportar as barreiras no TGI e ter aplicações promissoras como um probiótico em alimentos.

Houve efeito inibidor significativo ( $P < 0,05$ ) de diferentes estirpes de BAL testadas com patógenos. Neste estudo, os isolados UNIVASF CAP 58, 29 e 27 apresentaram atividade antibacteriana com *S. Typhi*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, respectivamente. O halo de inibição pelos isolados UNIVASF CAP foi de 3,04, 1,2 e 0,72 mm para *S. Typhi*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, respectivamente. *S. Typhi* ( $P = 0,00$ ) foi mais sensível às estirpes de BAL, e a



maior atividade inibitória contra este patógeno foi demonstrada por UNIVASF CAP 279 com um halo de inibição de 5,66 mm. Embora a atividade antibacteriana de BAL seja comumente mais eficaz contra bactérias Gram-positivas, como *Listeria monocytogenes* (ALMEIDA JUNIOR et al., 2015; DIAS; SANTOS; SCHWAN, 2015; SARAQUI et al., 2016), a inibição das bactérias Gram negativas por BAL também têm sido relatada (JONES et al., 2009; CÁLIX-LARA et al., 2014; OLNOOD et al., 2015). Como neste estudo, Uraipan et al. (2014) observaram que, em um meio de cultura pura, *L. plantarum* CIF17AN2 mostrou grande antagonismo frente a *Salmonella typhimurium* SA2093, por meio da atividade antibacteriana.

A capacidade de autoagregação dos isolados variou de 3,58 a 36,55% ( $P < 0,05$ ) e a média para os isolados de BAL foi de 18,55% (Tabela 1). O isolado UNIVASF CAP 84 apresentou a maior capacidade autoagregativa: 36,65%. A capacidade autoagregativa dos isolados de BAL aumentou linearmente ao longo do tempo (3,45% por hora), como pode ser explicado pela equação de primeiro grau na Tabela 1. De acordo com Del Re et al. (2000), estirpes com valores acima de 10% são autoagregantes naturalmente, portanto, 53 isolados UNIVASF CAP mostraram possuir esta característica. A capacidade de agregação é um mecanismo complexo que pode permitir a interação de micro-organismos com o hospedeiro e exercer efeitos benéficos (GARCÍA-CAYUELA et al., 2014).

**Tabela 1:** Porcentagem média da atividade de autoagregação de 58 isolados UNIVASF CAP ao longo de 1 a 4 horas:

	Tempo (h)	UNIVASF CAP <sup>1</sup>
Autoagregação (%)	1	12,50 <sup>a</sup>
	2	17,43 <sup>b</sup>
	3	21,66 <sup>c</sup>
	4	22,59 <sup>d</sup>
	Média	18,55
	Equação	3,45 x + 9,92 R <sup>2</sup> = 0,9320

Para cada coluna, os valores médios com letras diferentes são significativas ( $P < 0,005$ ) de acordo com o teste de Scott-Knott. 1 Erro padrão (EP): 0,20

Em geral, os isolados de BAL mostraram uma média baixa de coagregação (<4,0%) com *S. Typhi* e *L. monocytogenes* (Tabela 2), exceto o isolado UNIVASF CAP 45 (27,87%) com o patógeno *S. Typhi*. De acordo com Solieri et al. (2014), valores inferiores a 20% são indicativos da capacidade coagregação fraca. Os isolados de BAL apresentaram a maior capacidade de coagregação com *S. Typhi* e *L. monocytogenes* em 3,34 e 3,53 horas, correspondendo a 3,81 e 1,98%, respectivamente, seguindo um modelo quadrático (Tabela 2). Entre os isolados de BAL, o isolado UNIVASF CAP 45 apresentou também a maior interação com *L. monocytogenes* correspondente a 5,85%, o que é considerado baixo.

Em geral, os lactobacilos tem uma maior capacidade de coagregação com *Listeria monocytogenes* (DIAS et al., 2013). É possível que o tempo de incubação com o agente patogênico pode ter influenciado este estudo. Collado et al. (2007) observaram que as estirpes probióticas comerciais mostraram capacidade para agregar com agentes patogênicos depois de 20 horas de incubação, uma vez que estas características são específicas e dependem das condições de incubação.

**Tabela 2:** Porcentagem média de atividade de coagregação de 58 isolados UNIVASF CAP ao longo 1 a 5 horas.

Coagregação (%)	Tempo (h)					Média	Equação
	1	2	3	4	5		
<i>Salmonella Typhi</i> <sup>1</sup>	0,71 <sup>a</sup>	2,99 <sup>c</sup>	3,57 <sup>d</sup>	3,68 <sup>d</sup>	2,28 <sup>b</sup>	2,64	$y = -0,56x^2 + 3,74x - 2,43$ $R^2 = 0,9869$
<i>L.monocytogenes</i> <sup>2</sup>	0,21 <sup>a</sup>	1,52 <sup>b</sup>	1,85 <sup>d</sup>	1,67 <sup>c</sup>	1,39 <sup>b</sup>	1,33	$y = -0,26x^2 + 1,84x - 1,27$ $R^2 = 0,9544$

Para cada linha, os valores médios com letras diferentes são significativas (P <0,005) de acordo com o teste de Scott-Knott. 1EP: 0,073; 2EP: 0,053

### 2.2.3.3 Propriedades tecnológicas dos isolados UNIVASF CAP

A produção de EPS entre isolados de BAL variou de 0 a 44 mg/L, com uma produção média de 12,50 mg/L. O isolado UNIVASF CAP 46 apresentou a

maior produção de EPS: 44 mg/L. Em geral, *Lactobacillus* spp. não são os melhores produtores de polissacarídeos, em comparação com algumas bactérias do solo, comumente citados como *Xanthomonas campestris*. Para uma maior produção de EPS, o meio deve ser suplementado com uma considerável quantidade de uma fonte de carbono. Além disso, a temperatura e o pH podem ser influenciados (VAN GEEL-SCHUTTE et al., 1998; BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011). A otimização da produção de EPS por BAL é interessante. Na indústria de laticínios, por exemplo, EPS contribui para a capacidade de retenção de água no queijo que melhora a textura e permite uma redução de calorias no produto final. Em iogurte, polissacarídeos aumentam a viscosidade e atingem uma textura mais favorável. Em relação à saúde do hospedeiro, EPS, poderão desempenhar um papel na homeostase intestinal através da interação específica com as células epiteliais intestinais. No entanto, a principal desvantagem que limita a sua exploração na indústria de laticínios é o baixo rendimento do produto, e essa questão permanece não resolvida (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011; PATTEN et al., 2014).

O sabor é uma propriedade sensorial importante em produtos alimentares fermentados, incluindo queijo, e, em, grande parte, resulta da produção de compostos aromáticos produzidos por micro-organismos (YEE et al., 2014). Diacetil é um componente essencial de muitos produtos lácteos, mesmo em baixas concentrações, fornecendo sabor típico e um aroma amanteigado (MACCIOLA; CANDELA; DE LEONARDIS, 2008). A produção de diacetil pelos isolados de BAL variou de acordo com o isolado. Dos isolados testados, 41, 11, 3 e 3 foram negativo, fraco, médio e forte produtores de diacetil, respectivamente.

Nove isolados produziram gás a partir de glicose. Culturas homo e heterofermentativas aumentam a produção de compostos aromatizados ou precursores. Vias metabólicas complementares das estirpes de BAL podem melhorar o nível e a qualidade do sabor dos queijos (PEREIRA et al., 2010).

Todos os isolados foram tolerantes a concentrações de NaCl de 4,0% e 6,5%. Reale et al. (2015) relataram que várias estirpes isoladas de queijo e de fezes humana parece ser muito tolerantes a altas concentrações de NaCl e destacaram que osmotolerância é um critério importante para a seleção de estirpes para aplicações tecnológicas. Neste estudo, halotolerância de BAL é

importante porque o queijo de cabra produzido no nordeste do Brasil contém sal na massa.

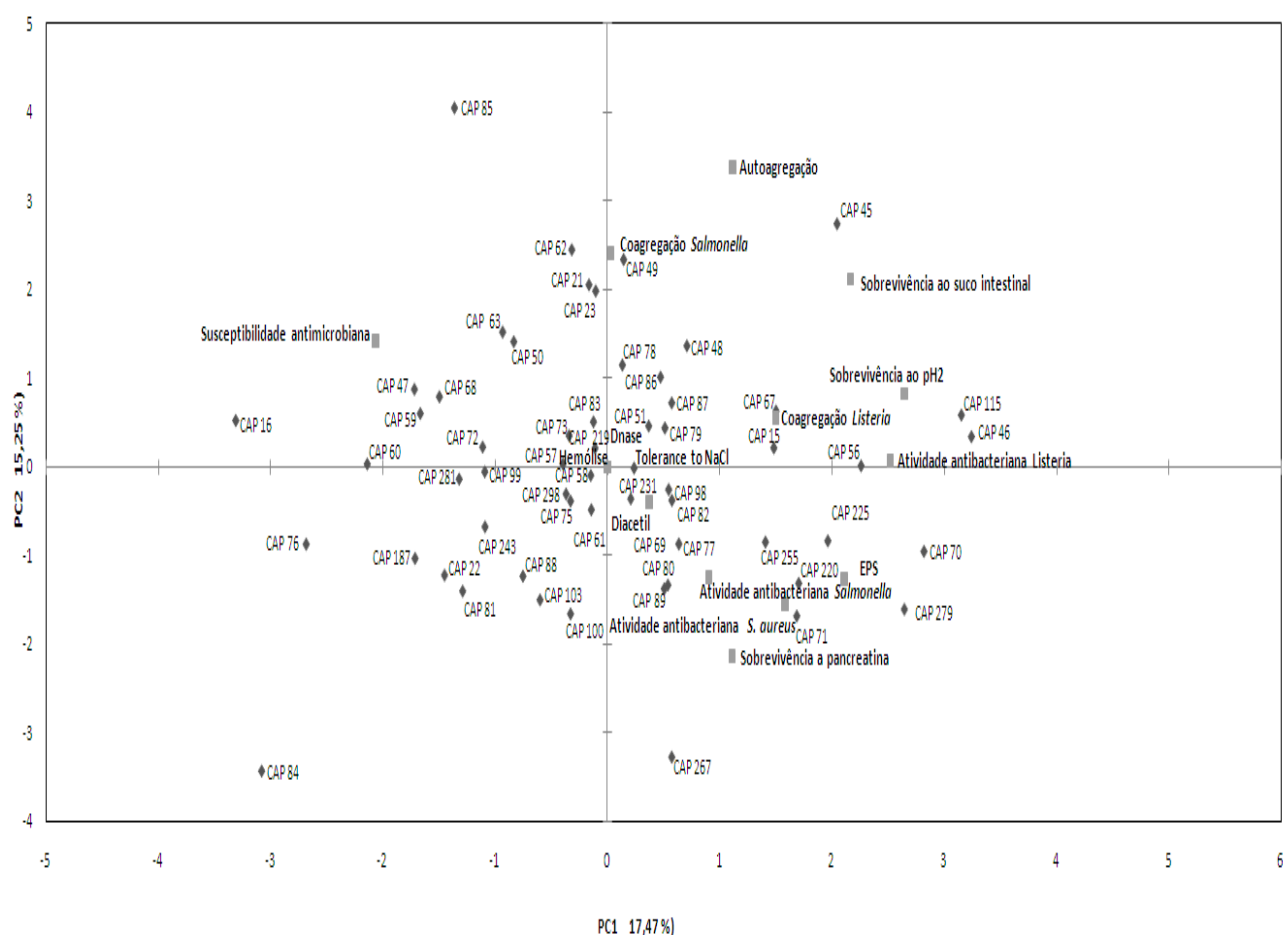
#### **2.2.3.4 Identificação e produção de ácidos orgânicos em isolados UNIVASF CAP**

Os resultados obtidos a partir dos testes acima citados (fatores de virulência, simulação de tolerância ao TGI, agregação, atividade antibacteriana e propriedades tecnológicas) foram avaliados por meio da análise de ACP (Figura 1). Os primeiros seis componentes foram responsáveis por 72,42% da variância total. Entre eles, CP1 e CP2 formaram 17,47 e 15,25% da variância total, respectivamente. Com base nesses testes e no cenário de ACP, foram selecionados quatro isolados de BAL (UNIVASF CAP 16, 45, 84 e 279) (Figura 1).

Isolados UNIVASF CAP foram identificados com 98 e 100% de similaridade, pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, como *Lactobacillus paracasei* (UNIVASF CAP 45 e 84) e *Lactobacillus brevis* (UNIVASF CAP 16 e 279) (Tabela 3). *Lactobacillus paracasei* são bactérias lácticas mesófilas de importância tecnológica na fermentação de alimentos, especialmente na fermentação de laticínios (ANCHILLEIS;BERTHIER, 2013). *Lactobacillus brevis* são lactobacilos heterofermentativos obrigatórios e também podem ser adicionados durante a produção do queijo, o que contribui para a textura e o sabor no produto final (SOHIER et al., 2012). *Lactobacillus paracasei* e *L. brevis* estão presentes no leite e outros produtos lácteos e são candidatos promissores para o uso de probióticos (CAGGIA et al., 2015; ZENG et al., 2016). UNIVASF CAP 16, 45, 84 e 279 foram depositados na CCMA sob o código: CCMA 0351, 0352, 0354 e 0355, respectivamente.

A análise por HPLC mostrou que isolados de BAL a partir de leite de cabra produziram um teor relativamente alto de ácido láctico, destacando UNIVASF CAP 45, com uma produção de 24,44 g / L (Tabela 4). Zhang et al. (2011) relatou a produção de 20,45 g / L de ácido láctico por *Lactobacillus paracasei*. Em relação ao ácido cítrico, isolados BAL foram considerados produtores de ácido cítrico fracos. Estirpes de *L. brevis* apresentaram maior

produção, em comparação com as estirpes *L. paracasei*. Chaves-Lopez et al. (2014) demonstraram que a produção de ácido lático e cítrico durante a fermentação do leite de diferentes co-culturas (leveduras e estirpes de BAL), nas amostras incubadas a 28°C durante 36 horas, alcançou 0,45 mg/mL e 14 mg/mL de ácido cítrico e ácido lático, respectivamente. Buffa et al. (2004) afirmaram que a produção de ácido lático e cítrico pelas BAL aumentou em queijo de cabra durante a maturação do produto. De acordo com Ammor et al. (2007), a produção de ácidos orgânicos é, certamente, um fator determinante para a qualidade, segurança e vida útil do produto final.



**Figura 1:** Análise de Componentes Principais (ACP) com base nas características probióticas e tecnológicas de 58 isolados de BAL para aplicação em queijo de cabra. Os seis primeiros componentes explicaram 72,42% da variância total; entre eles, CP1 e CP2 explicou 17,47% e 15,25% da variância total, respectivamente.

**Tabela 3:** Identificação de quatro isolados UNIVASF CAP selecionados autóctones de leite de cabra.

UNIVASF CAP Isolados	Micro-organismo Identificado	Porcentagem De Identidade (%)	Número de acesso – GenBank
16	<i>Lactobacillus brevis</i>	98%	NR 075024.1
45	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99%	NR 121787.1
84	<i>Lactobacillus paracasei</i>	100%	NR 121787.1
279	<i>Lactobacillus brevis</i>	100%	NR 075024.1

### 2.2.3.5 BSH, $\beta$ -galactosidase e a atividade de descarboxilase

Todos os quatros isolados demonstraram a capacidade de hidrolisar tanto glicodesoxicolato de sódio e taurodesoxicolato de sódio (Tabela 4), e, por consequência, isolados de BAL produziram a enzima BSH. A desconjugação de sais biliares pode ser um mecanismo de desintoxicação e a enzima BSH pode desempenhar um papel na tolerância biliar e, conseqüentemente, a sobrevivência da estirpe no TGI (BEGLEY; GAHAN; HILL, 2005). BAL têm um papel chave na redução da absorção de gordura pelo corpo, devido à presença da enzima hidrolase de sais biliares, ou BSH, que é a enzima responsável pela desconjugação de sais biliares na circulação entero-hepática. Na verdade, esta propriedade funcional também tem sido sugerida por ser importante na redução dos níveis de colesterol por meio do aumento da procura deste composto para síntese de sais biliares de novo no fígado (LAVILLA-LERMA et al., 2013).

Isolados UNIVASF CAP 16, 45, 84 e 279 apresentaram atividade  $\beta$ -galactosidase (Tabela 4).  $\beta$ -galactosidase (CE 3.2.1.23) é uma enzima que catalisa a hidrólise de lactose (dissacarídeo abundante encontrado no leite) em glicose e galactose. De acordo com Favaro et al. (2014), a capacidade de micro-organismos para fermentar a lactose no leite é uma propriedade tecnológica importante para BAL, com potenciais aplicações na indústria de laticínios.  $\beta$ -galactosidase melhora as características tecnológicas e sensoriais dos alimentos, aumentando a solubilidade e a formação de galacto-oligossacarídeos, e por meio da conversão de soro de queijo em diferentes

produtos de valor agregado (USTOK; TARI; HARSA, 2010). Além da sua importância tecnológica, enzimas puras ou os micro-organismos viáveis que os contêm têm sido usados para aliviar desordens intestinais, tais como a intolerância à lactose. A intolerância à lactose é encontrada em pessoas que não possuem a enzima  $\beta$ -galactosidase, devido à lactose não ser quebrada nas regiões superiores do intestino delgado e conseqüentemente ser usada pela microbiota indígena (DE VRESE et al., 2001; ZAGO et al., 2011). Assim, a produção de  $\beta$ -galactosidase pelos isolados de BAL de leite de cabra é interessante, do ponto de vista tecnológico e probiótico, para elaboração de queijo de cabra artesanal.

Os quatro isolados de BAL selecionados não apresentaram atividade da enzima descarboxilase (Tabela 4). Descarboxilação de aminoácidos é o modo mais comum de síntese de aminas em alimentos, e as aminas aromáticas podem tornar um alimento tóxico. Quando estas aminas são formadas pela ação de micro-organismos vivos através do processo de descarboxilação de aminoácidos, são designados biogênicos (SHALABY, 1996). Aminas biogênicas são bases orgânicas de baixo peso molecular que são produzidas principalmente pela descarboxilação microbiana de certos aminoácidos através da enzima descarboxilase. A presença de aminas biogênicas em alimentos podem causar vários problemas para os consumidores sensíveis, tais como dor de cabeça, vertigem, náusea e vômitos, e um aumento na pressão sanguínea arterial (LADERO et al., 2010; POVEDA; CHICÓN; CABEZAS, 2015). Como as aminas biogênicas podem ser produzidas por certas estirpes de BAL, é importante caracterizar a atividade de descarboxilase em estirpes com potenciais propriedades probióticas.

**Tabela 4:** Resumo das características fenotípicas *in vitro* mais promissoras das estirpes de BAL discriminados através ACP:

Características fenotípicas	<i>Lactobacillus Brevis</i>		<i>Lactobacillus paracasei</i>	
	UNIVASF CAP 16	UNIVASF CAP 279	UNIVASF CAP 45	UNIVASF CAP 84
Produção de DNase	Não	Não	Não	Não
Coagulase	Não	Não	Não	Não
Hemólise	Não	Não	Não	Não
Suceptibilidade microbiana(para o número de agentes	5	4	4	4

antimicrobianos)				
Taxa de sobrevivência à bÍlis (%)	98,44	99,12	98,02	98,89
Taxa de sobrevivência ao fluido pancreático (%)	98,70	98,26	99,35	98,37
Taxa de sobrevivência ao suco intestinal (%)	98,20	98,96	98,84	99,24
Atividade antibacteriana de <i>Salmonella</i> Typhi (raio-mm)	3	5,66	3	5
Atividade antibacteriana de <i>Listeria monocytogenes</i> (raio-mm)	2	3	3	3
Atividade antibacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i> (raio - mm)	2	2	2	2
Autoagregação (%)	32,80	27,42	30,70	36,65
Coagregação da <i>Salmonella</i> Typhi (%)	14,14	10,83	27,87	10,63
Coagregação <i>L. monocytogenes</i> (%)	5,29	5,16	5,85	5,43
Produção de EPS (mg/L)	28,90	34,10	27,70	26,20
Produção de Gás	Sim	Sim	Não*	Não*
Produção de Diacetil	Alta	Alta	Alta	Média
Tolerância a NaCl	Sim	Sim	Sim	Sim
Produção de ácido Láctico(g/L)	17,02	24,02	24,44	23,42
Produção de ácido CÍtrico(g/L)	0,28	0,27	0,24	0,23
Atividade de BSH	Sim	Sim	Sim	Sim
Atividade de β-galactosidase	Sim	Sim	Sim	Sim
Atividade de Decarboxylase	Não	Não	Não	Não

\*Heterofermentativo Facultativo

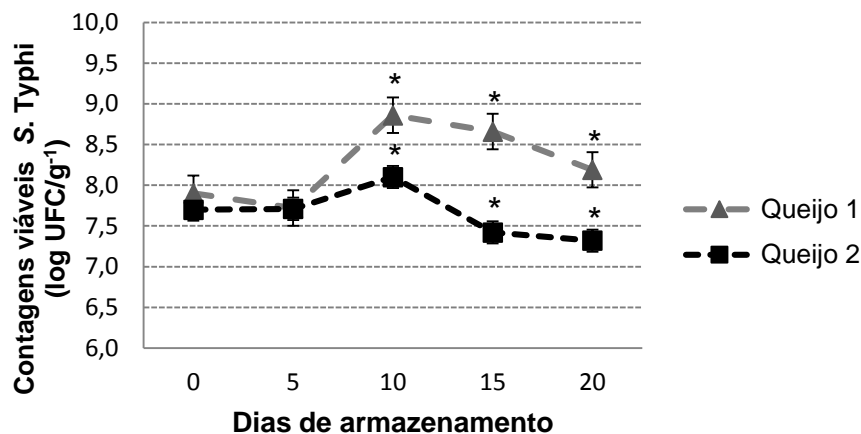
### 2.2.3.6 A inibição da *S.Typhi* e acompanhamento físico-químico em queijo de cabra artesanal

O queijo artesanal foi produzido a partir de leite de cabra com uma acidez de 18°D e índice crioscópico de -0,571°H. Após o tratamento térmico de 90°C / 10 min no leite, o patógeno *S. Typhi* e BAL não foram detectados no queijo 3, o controle negativo. BAL também não foram detectadas no queijo 1, o controle positivo (queijo inoculado com *S. Typhi*). A alta temperatura empregada no processamento térmico visou eliminar a microbiota do produto, particularmente BAL autóctone, de modo que apenas o inóculo de *Lactobacillus* selecionado foi avaliado para a inibição do patógeno *Salmonella* em queijo de cabra artesanal.

Houve diferenças significativas nas contagens de *S. Typhi* em queijo de cabra sem (queijo 1) e com (queijo 2) inoculação de *Lactobacillus* a partir do 10º dia de armazenamento dos queijos ( $P < 0,05$ ) (Figura 2). A população de *S. Typhi* foi de 7,90 log<sub>10</sub> UFC/g e 7,70 log<sub>10</sub> UFC/g no tempo 0 dias em queijos 1 e 2, respectivamente. No vigésimo dia, a população do patógeno foi 8,19 log<sub>10</sub>

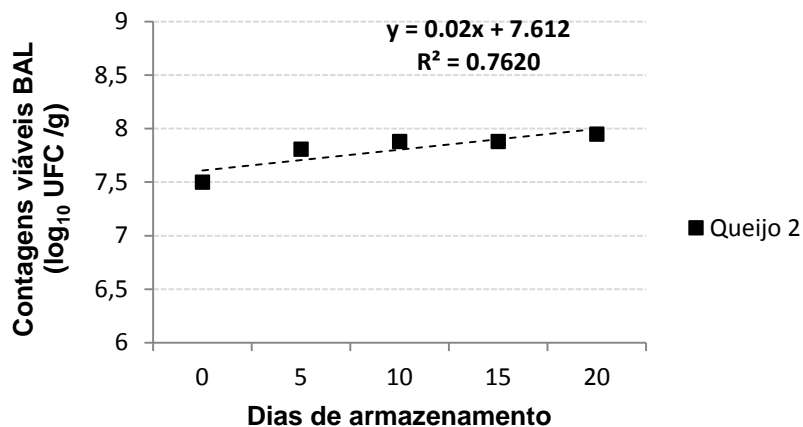


UFC / g e 7,32 log<sub>10</sub> UFC / g nos queijos 1 e 2, respectivamente. Assim, a população de agentes patogênicos manteve-se elevada em queijos sem o inóculo *Lactobacillus* quando comparado com o queijo contendo o inóculo BAL.



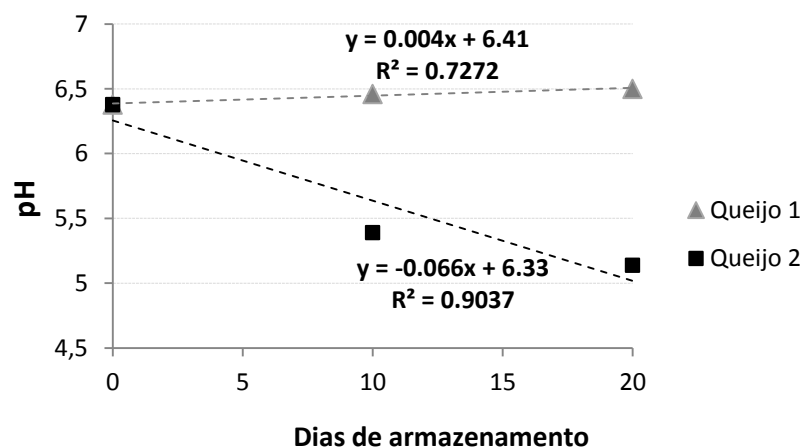
**Figura 2:** Contagens viáveis (log<sub>10</sub> UFC / g) de *S. Typhi* em queijo sem (queijo 1) e com (queijo 2) uma mistura de BAL durante o armazenamento por até 20 dias, a 4°C. (\*) P < 0,05, indicando diferenças estatisticamente significativas, segundo o teste de Scott-Knott. EP = 0,032.

Houve correlação significativa (P < 0,05) entre o queijo 2 e tempo de avaliação, durante a enumeração da BAL. A população da BAL aumentou linearmente até o período final por 0,02 unidades log por dia em queijo 2 (Figura 3). A população de BAL permaneceu viável até o período final de avaliação e foi eficiente na redução da população de *S. Typhi* no queijo de cabra. Os isolados selecionados de BAL apresentaram inibição *in vitro* de *Salmonella* e no produto de cabra. Rolim et al. (2015) também demonstraram a redução de *Salmonella* em queijo de cabra pela ação de *Lactobacillus rhamnosus*. Substâncias antimicrobianas produzidas pelas BAL (isto é, ácidos orgânicos, peróxidos, e polipeptídios antimicrobianos) fornecem benefício tanto para a prevenção do crescimento de agentes patogênicos de origem alimentar quanto para a preservação do queijo (STILES, 1996; CALLON; ARLIGUIE; MONTEL, 2016).



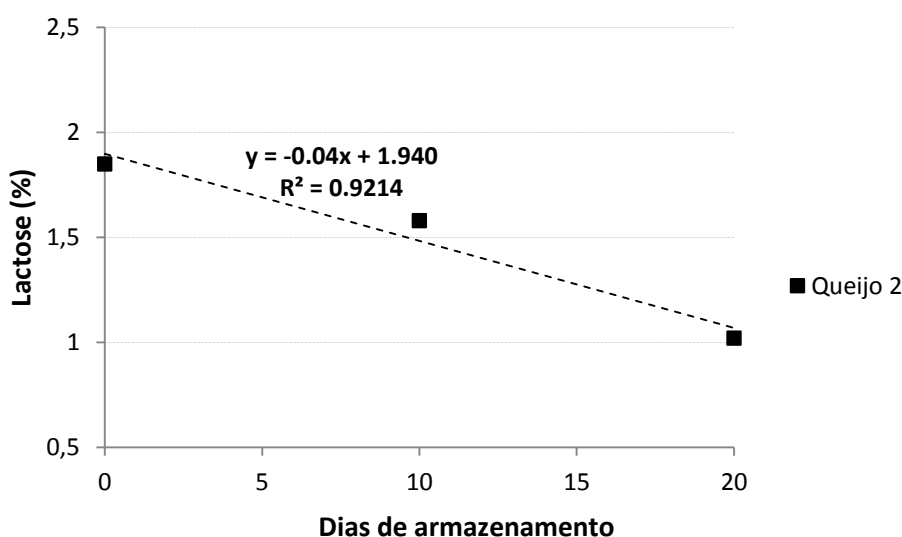
**Figura 3:** Contagens viáveis ( $\log_{10}$  UFC / g) de BAL inoculadas no queijo (queijo 2) durante o armazenamento por até 20 dias, a 4°C

Houve uma correlação significativa ( $P < 0,05$ ) entre o valor do pH e o tempo de avaliação do queijo (Figura 4). No queijo 1, os valores de pH aumentaram linearmente ao longo do tempo, por 0,004 unidades por dia. Este aumento no pH pode ser associado com a capacidade da *Salmonella* em descarboxilar aminoácidos, gerando aminas em queijo (MARINO et al., 2000). No queijo 2, o valor de pH diminuiu linearmente ao longo do tempo, por 0,066 unidades por dia. Posteriormente, a produção de ácidos orgânicos produzidos por BAL neste estudo contribuiu de forma eficaz para a diminuição do pH.



**Figura 4:** Valores de pH nos queijos sem (queijo 1) e com (queijo 2) uma mistura de BAL durante armazenamento de até 20 dias, a 4°C. EP = 0,030.

Em relação ao conteúdo de lactose, no queijo 1 não houve redução no teor de lactose (*S.Typhi* ATCC 6539 não fermenta a lactose). O valor do teor de lactose no queijo 1 foi determinado a 1,96% até o final do armazenamento. No queijo 2, houve uma correlação significativa ( $P < 0,05$ ) entre o tempo de avaliação e o conteúdo de lactose (Figura 5). O teor de lactose diminuiu linearmente ao longo do tempo, especificamente, em 0,04 unidades por dia, no queijo 2. O metabolismo da lactose pela BAL contribuiu para a preservação, a textura e o sabor dos queijos (WALSTRA et al., 2006). Assim, a incorporação de culturas de BAL selecionadas em queijo de cabra pode ajudar a mascarar o sabor desagradável "de cabra" característico, relatado por Slačanac et al. (2010), e, potencialmente, aumentar a aceitação entre os consumidores.



**Figura 5:** Teor de lactose em queijos com uma mistura de BAL (queijo 2) durante o armazenamento por até 20 dias, a 4°C. EP = 0,020

Em conclusão, o leite de cabra apresenta-se como uma potencial fonte para isolar BAL com propriedades probióticas e tecnológicas. Os quatro isolados, UNIVASF CAP 16, 45, 84 e 279, apresentaram atividade antibacteriana contra *Salmonella Typhi* *in vitro* e em queijo de cabra artesanal. Assim, estas culturas podem ser usadas para inibir o crescimento da população

de *Salmonella* em produtos lácteos de cabra, contribuindo para um aumento do valor funcional do produto.

## 2.2.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMADOVA, A.; TODOROV, S.D.; CHOISET, Y.; RABESONA, H.; ZADI, T.M.; KULIYEV, A.; FRANCO, B.D.G.M.; CHOBERT, J-M.; HAERTLÉ, T. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. **Food Control**, v.30, p.631- 641, 2012.

ALAKOMI, H.L.; SAARELA, M.; HELANDER, I.M. Effect of EDTA on *Salmonella* enteric serovar *Typhimurium* involves a component not assignable to lipopolysaccharide release. **Microbiology**, v.149, p.2015-2021, 2003.

ALMEIDA JUNIOR, W.L.; FERRARI, I.S.; SOUZA, J.V.; SILVA, C.D.A.; COSTA, M.M.; DIAS, F. S. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. **Food Control**, v.53, p.96-103, 2015.

AMMOR, M.S.; MAYO, B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. **Meat Science**, v.76, p.138-14, 2007.

ANCHILLEIS, C.; BERTHIER, F. Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples. **Food Microbiology**, v.36, p.286-295, 2013.

BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for lactobacilli exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v.29, p.54-66, 2011.

BAO, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; WANG, S.; DONG, X.; WANG, Y.; ZHANG, H. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. **Food Control**, v.21, p.695-701, 2010.

BEGLEY, M.; GAHAN, C.G.M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS, Microbiology**, v.29, p.625-651, 2005.

BEZERRA, T.K.A.; ARAUJO, A.R.R.; NASCIMENTO, E.S.; PAZ, J.E.M.; GADELHA, C.A.; GADELHA, T.S.; PACHECO, M.T.B.; QUEIROGA, R.C.R.E.; OLIVEIRA, M.E.G.; MADRUGA, M.S. Proteolysis in goat “coalho” cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. **Food Chemistry**, v.196, p.359-366, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa métodos analíticos oficiais físico-químicos para o controle de leite e produtos lácteos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Seção 1, p. 08.

BUFFA, M.; GUAMIS, B.; SALDO, J.; TURIJILLO, A.J. Changes in organic acids during ripening of cheeses made from raw, pasteurised or high-pressure treated goats milk. **LWT- Food Science and Technology**, v.37, p.247-253, 2004.

CAGGIA, C.; DE ANGELIS, M.; PITINO, L.; PINO, A.; RANDAZZO, C.L. Probiotic features of *Lactobacillus* strains isolated from Ragusano and Pecorino Siciliano cheeses. **Food Microbiology**, v.50, p.109-117, 2015.

CAI, Y.; PUANGPEN, S.; SAMAN, P.; BENNO, Y. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and fresh water prawns. **Microbiology**, v.45, p.177-184, 1999.

CÁLIX-LARA, T.F.; RAJENDRAN, M.; TALCOTT, S.T.; SMITH, S.B.; MILLER, R.K.; CASTILLO, A.; STURINO, J.M.; TAYLOR, T.M. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on spinach and identification of antimicrobial substances produced by a commercial Lactic Acid Bacteria food safety intervention. **Food Microbiology**, v.38, p.192-200, 2014.

CALLON, C.; ARLIGUIE, C.; MONTEL, M.C. Control of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* in cheese by dairy bacterial strains. **Food Microbiology**, v.53, p.63-70, 2016.

CHAVES-LOPEZ, C.; SERIO, A.; GRANDE-TOVAR, C.D.; CUERVO-MULET, R.; DELGADO-OSPINA, J.; PAPARELLA, A. Traditional Fermented Foods and Beverages from a Microbiological and Nutritional Perspective: The Colombian Heritage. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.13, p.1031-1048, 2014.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty two informational supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, Pa.: CLSI. p.188, 2012.

COELHO, M.C.; SILVA, C.C.G.; RIBEIRO, S.C.; DAPKEVICIUS, M.L.N.E.; ROSA, H.J.D. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v.191, p.53-59, 2014.

COLLADO, M.C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: *In vitro* evaluation of different method. **Microbiology Methods**, v.71, p.71-74, 2007.

DANIELSEN, M.; WIND, A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. **Food Microbiology**, v.82, p.1-11, 2003.

DEL RE, B.; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M.; PALENZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Letters in Applied Microbiology**, v.31, p.438-442, 2000.

DE.VRESE, M.; STEGELMANN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHREZENMEIE, J. Probiotics compensation of lactase insufficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.421-429, 2001.

DIAS, F.S; DUARTE, W.F.; SANTOS, M.R.R.M.; RAMOS, E.M.; SCHWAN, R.F. Screening of *Lactobacillus* isolated from pork sausages for potential probiotic use and evaluation of the microbiological safety of fermented products. **Journal of Food Protection**, v.76, p.991-998, 2013.

DIAS, F.S.; SANTOS, M.R.R. M.; SCHWAN, R.F. Enumeration, identification and safety proprieties of lactic acid bacteria isolated from pork sausage. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.67, p.918-926, 2015.

EL-SHAROUD, W.M. Developing a time and effort-effective, highly sensitive Taq Manprobe-based real-time polymerase chain reaction protocol for the detection of *Salmonella* in milk, yoghurt, and cheese. **International Dairy Journal**, v.40, p.62-66, 2015.

FAVARO, L.; BASAGLIA, M.; CASELLA, S.; HUE, I.; DOUSSET, X.; FRANCO, B.D.G.M.; TODOROV, S.D. Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese. **Food Microbiology**, v.38, p.228-239, 2014.

FONTANA, C.; LI, S.; YANG, Z.; WIDMALM, G. Structural studies of the exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* C88 using NMR spectroscopy and the program CASPER. **Carbohydrate Research**, v.402, p.87-94, 2015.

GARCÍA-CAYUELA, T.; KORANY, A. M.; BUSTOS, I.; GÓMEZ DE CALDINANOS, L. P.; REQUENA, T.; PELAEZ, C.; MARTINEZ-CUESTA, M. C. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. **Food Research International**, v.57, p.44-50, 2014.

GIRAFFA, G. Selection and design of lactic acid bacteria probiotic cultures. **Engineering in Life Sciences**, v.12, p.391-398, 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção da Pecuária Municipal*. Available at [http://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Producao\\_da\\_Pecuaria\\_Municipal/2011/ppm2011.pdf](http://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/ppm2011.pdf) Acesso 10.06.16, 2011.

IDF. International Dairy Federation. Milk and milk products— Guidance on methods of sampling. Standard 50C. IDF, Brussels, Belgium, 1995.

FAO/WHO. Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, 2002.

JONES, R.J.; ZAGOREC, M.; BRIGHTWELL, G.; TAGG, J.R. Inhibition by *Lactobacillus sakei* of other species in the flora of vacuum packaged raw meats during prolonged storage. **Food Microbiology**, v.26, p.876-881, 2009.

KAewnOPPARAT, S.; DANGMANEE, N.; KAewnOPPARAT, N.; SRICHANA, T.; CHULASIRI, M.; SETTHARAKSA, S. In vitro probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. **Anaerobe**, v.22, p.6-13, 2013.

KING, N. Modification of Vogues-Proskauer test for rapid colorimetric determination of acetyl methyl carbinol plus diacetyl in butter. **Dairy Industries**, v.13, p.860-866, 1948.

KOMPRDA, T.; SMELÁ, D.; PECHOVÁ, P.; KALHOTKA, L.; STENCL, J.; KLEDJDUS, B. Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. **Meat Science**, v.67, p.607-616, 2004.

KOS, B.; SUSKOVIC, J.; VUKOVIC, S.; SIMPRAGA, M.; FRECE, J.; MATOSIC, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.981-987, 2003.

LADERO, V.; CALLES-ENRÍQUEZ, M.; FERNÁNDEZ, M.; ALVAREZ, M. A. Toxicological effects of dietary biogenic amines. **Current Nutrition & Food Science**, v.6, p.145-156. 2010.

LAVILLA-LERMA, L.; PEREZ-PULIDO, R.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; MAQUEDA, M.; VALDIVIA, E. Characterization of functional, safety, and gut survival related characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from farmhouse goat's milk cheeses. **Food Microbiology**, v.163, p.136-145, 2013.



LYNNE, A.M.; FOLEY, S.L.; HAN, J. *Salmonella*: properties and occurrence. **Encyclopedia of Food Health**, v.695-700, 2016.

MACCIOLA, V.; CANDELA, G.; DE LEONARDIS, A. Rapid gas-chromatographic method for the determination of diacetyl in milk, fermented milk and butter. **Food Control**, v.19, p.873-878, 2008.

MCCORMICK, A.W.; WHITNEY, C.G.; FARLEY, M.M.; LYNFIELD, R.; HARRISON, L.H.; BENNETT, N.M.; SCHAFFNER, W.; REINGOLD, A.; HADLER, J.; CIESLAK, P.; SAMORE, M.H.; LIPSITCH, M. Geographic diversity and temporal trends of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* in the United States. **Nature Medicine**, v.9, p.420-430, 2003.

MARAGKOUidakis, P.A.; ZOUMPOPOULOU, G.; MIARIS, C.; KALANTZOPOULOS, G.; POT, B.; TSAKALIDOU, E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**, v.16, p.189-199, 2006.

MARINO, M.; MAIFRENI, M.; MORET, S.; RONDININI, G. The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v.31, p.169-173, 2000.

MIGUEL, M.G.C.P.; SANTOS, M.R.R.M.; DUARTE, W.F.; ALMEIDA, E.G.; SCHWAN, R.F. Physico-chemical and microbiological characterization of corn and rice 'calugi' produced by Brazilian Amerindian people. **Food Research International**, v.49, p.524-532, 2012.

MONTEAGUDO-MERA, A.; RODRÍGUEZ-APARICIO, L.; RÚA, J.; MARTÍNEZ-BLANCO, H.; NAVASA, N.; GARCÍA-ARRESTO, M. R.; FERRERO, M. A. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. **Journal of Functional Foods**, v.4, p.531-541, 2012.

MUÑOZ, M.C.C.; BENOMAR, N.; LERMA, L.L.; GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H. Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudo mesenteroides* isolated from naturally-fermented Aloreña table olives throughout fermentation process. **Food Microbiology**, v.172, p.110-118, 2014.

NIETO-ARRIBAS, P.; POVEDA, J.M.; SESEÑA, S.; PALOP, L.; CABEZAS, L. Technological characterization of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter cultures. **Food Control**, v.20, p.1092-1098, 2009.

OLIVEIRA, C.J.B.; HISRICH, E.R.; MOURA, J.F.P.; GIVISIEZ, P.E.N.; COSTA, R. G.; GEBREYES, W.A. On farm risk factors associated with goat milk quality in Northeast Brazil. **Small Ruminant Research**, v.98, p.64-69, 2011.

OLNOOD, C.G.; BESKI, S.S.M.; CHOCT, M.; IJI, P. Antagonistic mechanisms of synbiosis between *Lactobacillus plantarum* CIF17AN2 and green banana starch in the proximal colon model challenged with *Salmonella Typhimurium* Supansa Uraipan a, PatriziaBrigidi b, Tippar at Hong patta rakere. **Anaerobe**, v.28, p.44-53, 2015.

PATTEN, D.A.; LEIVERS, S.; CHADHA, M.J.; MAQSOOD, M.; HUMPHREYS, P.N.; LAWS, A.P.; COLLETT, A. The structure and immunomodulatory activity on intestinal epithelial cells of the EPSs isolated from *Lactobacillus helveticus* sp. Rosyjski and *Lactobacillus acidophilus* sp. **Carbohydrate Research**, v.384, p.119-127, 2014.

PEREIRA, C.L.; GRAÇA, J.A.; OGANDO, N.S.; GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Influence of bacterial dynamics upon the final characteristics of model Portuguese traditional cheeses. **Food Microbiology**, v.27, p.339-346, 2010.

PERIN, L.M., DAL BELLO, B., BELVISO, S., ZEPPA, G., DE CARVALHO, A.F., COCOLIN, L., NERO, L.A. Microbiota of Minas cheese as influenced by the nisin producer *Lactococcus lactis subsp. lactis* GLc05. **International Journal Food Microbiology**, v.214, p.159-167, 2015.

PERIN, L.M.; MIRANDA, R.O.; TODOROV, S.D.; FRANCO, B.D.G.; DE M.; NERO, L.A. Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk. **International Journal Food Microbiology**, v.185, p.121-126, 2014.

PIGNATO, S.; MARINO, A.M.; EMANUELE, M.C.; IANNOTTA, V.; CARACAPPA, S.; GIAMMANCO, G. Evaluation of new culture media for rapid detection and isolation of *Salmonella* in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.1996-1999, 1995.

POINTON, A.; KIERMEIER, A.; FEGAN, N. Review of the impact of pre-slaughter feed curfews of cattle, sheep and goats on food safety and carcass hygiene in Australia. **Food Control**, v.26, p.313-321, 2012.

POVEDA, J.M.; CHICÓN, R.; CABEZAS, L. Biogenic amine content and proteolysis in Manchego cheese manufactured with *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* as adjunct and other autochthonous strains as starters. **International Dairy Journal**, v.47, p.94-101, 2015.

REALE, A.; DI RENZO, T.; ROSSI, F.; ZOTTA, T.; IACUMIN, L.; PREZIUSO, M.; PARENTE, E.; SORRENTINO, E.; COPPOLA, R. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastrointestinal tract. **LWT - Food Science and Technology**, v.60, p.721-728, 2015.

ROLIM, F.R.L.; SANTOS, K.M.O.; BARCELOS, S.C.; EGITO, A.S.; RIBEIRO, T.S.; CONCEIÇÃO, M.L.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, M.E.G.; QUEIROGA, R.C.R.E. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v.63, p.807-813, 2015.

RÖNKÄ, E.; MALINEN, E.; SAARELA, M.; RINTA-KOSKI, M.; AARNIKUNNAS, J.; PALVA, A. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. **Food Microbiology**, v.83, p.63-74, 2003.

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

SARAOUI, T.; FALL, A.P.; LEROI, F.; ANTIGNAC, J.P.; CHEREAU, S.; PILET, M.F. Inhibition mechanism of *Listeria monocytogenes* by a bioprotective bacteria *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. **Food Microbiology**, v.53, p.70-78, 2016.

SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v.29, p.675-690, 1996.

SHAO, Y.; ZHANG, W.; GUO, H.; PAN, L.; ZHANG, H.; SUN, T. Comparative studies on antibiotic resistance in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. **Food Control**, v.50, p.250-258, 2015.

SHARMA, P.; TOMAR, S.K.; GOSWAMI, P.; SANGWAN, V.; SINGH, R. Antibiotic resistance among commercially available probiotics. **Food Research International**, v.57, p.176-195, 2014.

SLAČANAC, V.; BOŽANIĆ, R.; HARDI, J.; REZESSYNÉ SZABÓ, JUDIT, LUČAN, M.; KRSTANOVIĆ, V. Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.63, p.171-189, 2010.

SOHIER, D.; JAMET, E.; DIZES, A-S.L.; DIZIN, M.; PAVAN, S.; POSTOLLEC, F.; COTON, E. Polyphasic approach for quantitative analysis of obligately heterofermentative *Lactobacillus* species in cheese. **Food Microbiology**, v.31, p.271-277, 2012.

SOLIERI, L.; BIANCHI, A.; MOTTOLESE G.; LEMMETTI, F.; GIUDICI, P. Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by in vitro screening and principal component analysis. **Food Microbiology**, v.38, p.240-249, 2014.

STILES, M. E. Biopreservation by lactic acid bacteria. **Anthony van Leeuwenhoek**, v.70, p.331-345, 1996.

TAMAGNINI, L.M.; SOUSA, G.B.; GONZALEZ, R.D.; BUDDE, C.E. Behavior of *Enterobacter amnigenus* and *Salmonella typhimurium* in Crottin goat's cheese: Influence of fluctuating storage temperature. **Small Ruminant Research**, v.76, p.177-182, 2008.

URAIKAN, S.; BRIGIDI, P.; HONGPATTARAKERE, T. Antagonistic mechanisms of symbiosis between *Lactobacillus plantarum* C1F17AN2 and green banana starch in the proximal colon model challenged with *Salmonella Typhimurium*. **Anaerobe**, v.28, p.44-53. 2014.

USTOK, F.I.; TARI, C.; HARSA, S. Biochemical and thermal properties of  $\beta$ -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. **Food Chemistry**, v.119, p.1114-1120, 2010.

VAN GEEL-SCHUTTE, G.H.; FLESCHE, F.; TEN BRINK, B.; SMITH, M. R.; DIJKHUIZEN, L. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.50, p.697-703, 1998.

WALSTRA, P.; WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. Lactic Fermentations. In: Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J. (Eds.), **Dairy science and technology**. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, pp.357-397, 2006.

WOLDEMARIAM, E.; MOLLA, B.; ALEMAYEHU.D.; MUCKLE, A. Prevalence and distribution of *Salmonella* apparently healthy slaughtered sheep and goats in DebreZeit, Ethiopia. **Small Ruminant Research**, v.58, p.19-24, 2005.

YANG, B.; ZHAO, H.; CUI, S.; WANG, Y.; XIA, X.; XI, M.; WANG, X.; MENG, J.; W. GE. Prevalence and characterization of *Salmonella enterica* in dried milk-related infant foods in Shaanxi, China. **Journal of Dairy Science**, v.11, p.6754-6760, 2014.

YAVUZDURMAZ, H. Isolation, characterization, determination of probiotic properties of lactic acid bacteria from human milk. **Dissertation (Master of Science in Food Engineering) - Izmir Institute of Technology**, İzmir, 2007.

YEE, A.L.; MAILLARD, M.B.; ROLAND, N.; CHUAT, V.; LECLERC, A.; POGAČIĆ, T.; VALENCE, F.; THIERRY, A. Great interspecies and intraspecies diversity of dairy propionibacteria in the production of cheese aroma compounds. **Food Microbiology**, v.191, p.60-68, 2014.

ZAGO, M.; FORNASARI, M.E.; CARMINATI, D.; BURNS, P.; SUÀREZ, V.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J.; GIRAFFA, G. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. **Food Microbiology**, v.28, p.1033-40, 2011.

ZENG, Z.; LUO, J.; ZUO, F.; ZHANG, Y.; MA, H.; CHEN, S. Screening for potential novel probiotic *Lactobacillus* strains based on high dipeptidyl peptidase IV and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. **Journal of Functional Foods**, v.20, p.486-495, 2016

ZHANG, Y.; ZHANG, L.; DUA, M.; YIA, H.; GUO, C.; TUO, Y.; HAN, X. Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented. **Food Microbiology**, v.167, p.27-31, 2011.

### 3.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do estudo realizado, a seleção de bactérias ácido lácticas autóctones de leite caprino com potencial probiótico e tecnológico nos testes *in vitro*, apresentaram resultados promissores na atividade antibacteriana, frente *S.Typhi*, em queijo caprino artesanal. Além disso, o queijo artesanal é uma fonte de renda para os pequenos produtores por se tratar de um recurso disponível em sua propriedade devido a produção de caprinos leiteiros, e pode vir a contribuir, pois eles terão acesso a tecnologias alternativas para agregar valor e qualidade ao seu produto lácteo.

## **4.0 ANEXO**

### **ARTIGO CIENTÍFICO**