

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS

Lariane Strack

**Atividade antimicrobiana de biocompostos produzidos por bactérias
ácido lácticas via fermentação submersa usando subprodutos da
agroindústria**

Passo Fundo

2021

Lariane Strack
Médica Veterinária

**Atividade antimicrobiana de biocompostos produzidos por bactérias
ácido lácticas via fermentação submersa usando subprodutos da
agroindústria**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
Orientador: Luciane Maria Colla
Coorientador: Charise Dallazem Bertol
Linha de pesquisa: Processos biotecnológicos e não convencionais na produção de alimentos e ingredientes.

Passo Fundo
2021

CIP – Catalogação na Publicação

S894a Strack, Lariane

Atividade antimicrobiana de biocompostos produzidos por bactérias ácido lácticas via fermentação submersa usando subprodutos da agroindústria / Lariane Strack. – 2021.
73 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Luciane Maria Colla.

Coorientadora: Charise Dallazem Bertol.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.) – Universidade de Passo Fundo, 2021.

1. Bacteriocinas. 2. Probióticos. 3. Fungos.
4. Fermentação. I. Colla, Luciane Maria, orientadora.
II. Bertol, Charise Dallazem, coorientadora. III. Título.

CDU: 664

Bibliotecário Luís Diego Dias de S. da Silva – CRB 10/2241

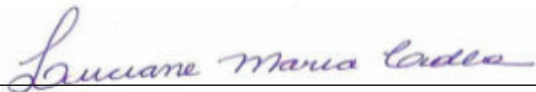
Lariane Strack
Médica Veterinária

**Atividade antimicrobiana de biocompostos produzidos por bactérias
ácido lácticas via fermentação submersa usando subprodutos da
agroindústria**

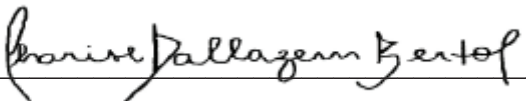
Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
Orientador: Luciane Maria Colla
Coorientador: Charise Dallazem Bertol
Linha de pesquisa: Processos biotecnológicos e não convencionais na produção de alimentos e ingredientes.

Passo Fundo, 26 de janeiro de 2021.

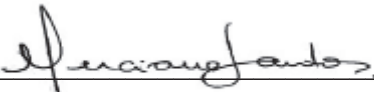
Banca Examinadora:



Prof^ª. Dr^ª. Luciane Maria Colla (UPF) – Orientador



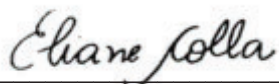
Prof^ª. Dr^ª. Charise Dallazem Bertol (UPF) – Coorientador



Prof^ª. Dr^ª. Luciana Ruschel dos Santos (UPF) – Examinador interno PPGCTA



Prof^ª. Dr^ª. Ludmila Noskoski Salazar (UPF) – Examinador



Prof^ª. Dr^ª. Eliane Colla (UTFPR) – Examinador

RESUMO

A atenção dos consumidores aos alimentos vem crescendo anualmente, como consequência, ocorre um aumento da exigência por produtos com menos adição de conservantes e que proporcionem uma alimentação mais saudável. Os probióticos são bactérias que proporcionam diversos benefícios ao organismo de quem os consome e, possuem a capacidade de produzir compostos antimicrobianos naturais, como as bacteriocinas, que auxiliam na redução do uso de conservantes e no aumento da vida de prateleira dos produtos alimentícios. As bacteriocinas são proteínas ou complexos de proteínas produzidas no ribossomo e que possuem capacidade de agir contra determinados patógenos. A produção desses compostos é de alto custo para as indústrias, por isso, foi testado a produção de bacteriocinas, a partir de probióticos, em meios de cultivo de baixo custo. As bactérias lácticas probióticas disponíveis no banco de microrganismos do laboratório da Medicina Veterinária da UPF foram selecionadas por sua capacidade de produzir compostos antimicrobianos que inibam os fungos contaminantes de queijos. Foram utilizados o *Bifidobacterium animalis* subesp. *Lactis*, *Lactobacillus lactis* e *Lactobacillus Reuteri*. Foi estudado o processo de fermentação submersa para produção de compostos antimicrobianos, analisando a influência de fatores como Sacarose, NaCl e pH na produção das bacteriocinas, utilizando como substrato o Soro de leite. A fermentação ocorreu em duas etapas, sendo a primeira para identificar as melhores condições de cultivo para produção de extratos com potencial antimicrobiano em relação à variação dos fatores testados e a segunda para validar o melhor tempo de fermentação. Foram coletadas amostras de 10 queijos coloniais produzidos em agroindústrias da região Norte do Rio Grande do Sul e Região Oeste de Santa Catarina para o isolamento e identificação de fungos contaminantes. A partir dos resultados, observou-se que o pH e a concentração de NaCl foram fatores importantes para os resultados frente aos microrganismos patogênicos estudados (*Penicillium* spp. e *Staphylococcus aureus*). Percebeu-se, também, que as condições de cultivo variaram para testes com bactérias e fungos. O potencial antibacteriano foi maior nos extratos com menor concentração de NaCl enquanto que o potencial antifúngico foi maior quando se aumentou a concentração desse fator. Os resultados obtidos neste estudo contribuem para pesquisas futuras sinalizando o potencial antifúngico dos extratos de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* e *Lactobacillus lactis*. frente ao fungo *Penicillium* spp.

Palavras-chave: Bacteriocinas. Fungos. Fermentação

ABSTRACT

Consumers' concern towards food has been increasing each year; consequently, there is an increased demand for products with less preservative addition and that could provide healthier eating habits. Probiotics are bacteria that bring out several benefits to the organism of those who eat them; they have the ability to produce natural antimicrobial compounds, such as bacteriocins, that help reducing the use of preservatives and increasing shelf life of food products. Bacteriocins are proteins or a complex of proteins produced in the ribosome; they are capable of combating certain types of pathogens. The production of these components is expensive for industry; therefore, in this study the production of bacteriocins from probiotics is tested in low cost culture media. Lactic probiotic bacteria available in the microorganism bank of the Veterinary Medicine at Universidade de Passo Fundo – UPF were selected due to their ability to produce antimicrobial compounds that could inhibit contaminating fungi in cheeses. *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*, *Lactobacillus lactis* and *Lactobacillus Reuteri* were the microorganisms used. The process of submerged fermentation for producing antimicrobial compounds was studied taking notice the influence of factors such as Sucrose, NaCl and pH in bacteriocins creation, using whey as a substratum. The fermentation happened in a two steps process; the first was identifying the best cultivation conditions for the production of extracts with antimicrobial potential in relation to the variation of the tested factors. The second one was to validate the best time of fermentation. As the object of analysis, 10 samples of country cheese produced in agro-industries from the north of Rio Grande do Sul state and western region of Santa Catarina state were collected in a way to isolate and identify contaminating fungi. From the results obtained, it was possible to realize that pH and NaCl concentration were important factors to the results in relation to the pathogenic microorganisms studied (*Penicillium* spp. and *Staphylococcus aureus*). It was possible to realize, too, that cultivation conditions varied from tests with bacteria and fungi. The antibacterial potential was more intense in extracts with less (NaCl) concentration, while anti fungi potential was higher when (NaCl) concentration was greater. The results of this study may contribute for future research, once it points the anti fungi potential of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and *Lactobacillus lactis*. in relation to the fungi *Penicillium* spp.

Keywords: Bacteriocins. Fungi. Fermentation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema geral das etapas de produção do queijo.....	15
Figura 2 - Etapas do desenvolvimento do trabalho	24
Figura 3 - Demonstrativo dos raios desenhados nas placas para medir o diâmetro do crescimento micelial.....	29
Figura 4 - Amostras de queijos contaminados coletados em agroindústrias	31
Figura 5 - Crescimento dos fungos em placas contendo meio PDA nas amostras de queijo	32
Figura 6 - Isolamento das colônias fúngicas em meio PDA.....	32
Figura 7- Microscopia do fungo isolado.....	33
Figura 8 - Erlenmeyer contendo BAL e meio MRS após 27 horas de fermentação.....	34
Figura 9 - Curva padrão de Nisina.....	35
Figura 10 - Superfícies de resposta do PI da BAL <i>Lactobacillus lactis</i> em relação a concentração de NaCl e pH (A) e sacarose e pH (B)	39
Figura 11 - Superfícies de Resposta para PI da BAL <i>Lactobacillus Reuteri</i> em relação as concentrações de Sacarose e NaCl (A) e NaCl e pH (B)	40
Figura 12 – Crescimento micelial do fungo <i>Penicilium</i> spp. após adição dos extratos da fermentação obtidos com o <i>L. lactis</i> (a- extratos dos experimentos 1 a 4 e controle; b- extratos dos experimentos 5 a 8 e controle; c- extratos dos experimentos 9 a 11 e controle)	42
Figura 13 - Crescimento micelial do fungo <i>Penicilium</i> spp. após adição dos extratos da fermentação obtidos com o <i>L. reuteri</i> (a- extratos dos experimentos 1 a 4 e controle; b- extratos dos experimentos 5 a 8 e controle; c- extratos dos experimentos 9 a 11 e controle)	46
Figura 14 - Crescimento micelial do fungo <i>Penicilium</i> spp. após adição dos extratos da fermentação obtidos com o <i>Bifidobacterium animalis subesp. lactis</i> (a- extratos dos experimentos 1 a 4 e controle; b- extratos dos experimentos 5 a 8 e controle; c- extratos dos experimentos 9 a 11 e controle).....	50
Figura 15 - Crescimento micelial do fungo <i>Penicilium</i> spp. após adição dos extratos da fermentação obtidos com o <i>Lactobacillus lactis</i> (a- extratos do experimento 1 dos tempos 0 a 72h; b- a- extratos do experimento 2 dos tempos 0 a 72h).....	54
Figura 16 - Crescimento micelial do fungo <i>Penicilium</i> spp. após adição dos extratos da fermentação obtidos com o <i>Bifidobacterium animalis subesp. lactis</i> (a- extratos do experimento 1 dos tempos 0 a 72h; b- a- extratos do experimento 2 dos tempos 0 a 72h).....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Delineamento Fatorial Completo 2 ³ com três pontos centrais para o estudo da influência das variáveis sobre a produção de compostos antimicrobianos por bactérias lácticas	27
Tabela 2 - Planejamento dos experimentos da segunda etapa de fermentação	27
Tabela 3 - Pontuação de BPF por indústria	30
Tabela 4 - Atividade equivalente de nisina (mg/mL) dos extratos da fermentação submersa do <i>L. lactis</i> , <i>L. reuteri</i> e <i>Bifidobacterium animalis</i> frente ao <i>S. aureus</i>	36
Tabela 5 - Potencial de inibição (%) dos extratos da fermentação submersa do <i>L. lactis</i> , <i>L. reuteri</i> e <i>Bifidobacterium animalis</i> frente ao <i>S. aureus</i>	37
Tabela 6 - Efeitos estimados das variáveis do delineamento experimental sobre o potencial de inibição dos extratos da fermentação do <i>L. lactis</i> , <i>L. reuteri</i> e <i>Bifidobacterium animalis</i> sobre o crescimento de <i>S. aureus</i>	38
Tabela 7 - Raio(cm) do crescimento micelial do fungo <i>Penicilium</i> spp. para extratos da fermentação obtidos com o <i>Lactobacillus lactis</i>	41
Tabela 8 - Análise de variância do PI em função das variáveis do processo fermentativo do <i>Lactobacillus lactis</i> frente ao fungo <i>Penicillium</i> spp.	43
Tabela 9 - Raio(cm) do crescimento micelial do fungo <i>Penicilium</i> spp. para extratos da fermentação obtidos com o <i>Lactobacillus reuteri</i>	45
Tabela 10 - Análise de variância do PI em função das variáveis do processo fermentativo do <i>Lactobacillus reuteri</i> frente ao fungo <i>Penicillium</i> spp.	47
Tabela 11 - Efeitos estimados das variáveis do delineamento experimental sobre o potencial de inibição dos extratos da fermentação <i>L. reuteri</i> sobre o crescimento do fungo <i>Penicillium</i> spp.	48
Tabela 12 - Raio(cm) do crescimento micelial do fungo <i>Penicilium</i> spp. para extratos da fermentação obtidos com o <i>Bifidobacterium animalis subesp. lactis</i>	49
Tabela 13 - Análise de variância do PI em função das variáveis do processo fermentativo do <i>Bifidobacterium</i> frente ao fungo <i>Penicillium</i> spp.	51
Tabela 14 - Efeitos estimados das variáveis do delineamento experimental sobre o PI dos extratos da fermentação <i>Bifidobacterium</i> sobre o crescimento do fungo <i>Penicillium</i> spp.	52
Tabela 15 - Raio(cm) do crescimento micelial do fungo <i>Penicilium</i> spp. para extratos da fermentação obtidos com o <i>Lactobacillus lactis</i>	53

Tabela 16 - Raio(cm) do crescimento micelial do fungo <i>Penicilium</i> spp. para extratos da fermentação obtidos com o <i>Bifidobacterium animalis subesp. lactis</i>	56
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 ASPECTOS DA PRODUÇÃO E CONTROLE MICROBIOLÓGICO DE QUEIJOS.....	14
2.2 BACTERIOCINAS.....	18
2.2.1 Métodos de produção de bacteriocinas	20
3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIFÚNGICA DE BÍOPOSTOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS EM BIOPROCESSOS.....	23
3.1 INTRODUÇÃO.....	23
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.3 ISOLAMENTO DE FUNGOS CONTAMINANTES DE QUEIJOS	25
3.4 SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS	26
3.5 ESTRATÉGIAS DE CULTIVOS NOS BIOPROCESSOS PARA OBTENÇÃO DE ANTIMICROBIANOS POR BAL	26
3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DAS FERMENTAÇÕES.....	28
3.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
3.7.1 Isolamento de fungos contaminantes de queijos	30
3.7.2 Seleção de bactérias ácido lácticas.....	33
3.7.3 Testes antimicrobianos com extratos da primeira fermentação	34
3.7.3.1 Potencial antibacteriano dos extratos das fermentações frente ao <i>S. aureus</i> 34	
3.7.3.2 Potencial antifúngico dos extratos das fermentações de <i>Lactobacillus lactis</i> 40	
3.7.3.3 Potencial antifúngico dos extratos das fermentações de <i>Lactobacillus reuteri</i> 44	
3.7.3.4 Potencial antifúngico dos extratos das fermentações de <i>Bifidobacterium animalis subesp. lactis</i>	48
3.7.4 Testes antifúngicos com extratos da segunda fermentação.....	52

3.7.4.1 Potencial antifúngico dos extratos das fermentações de <i>Lactobacillus lactis</i>	52
3.7.4.2 Potencial antifúngico dos extratos das fermentações de <i>Bifidobacterium animalis subesp. lactis</i>	55
3.7.5 Discussão	58
3.7 CONCLUSÃO.....	60
4 CONCLUSÃO GERAL.....	61
5 REFERÊNCIAS.....	62
APÊNDICE A – Lista de verificação das boas práticas para serviços de alimentação	67
ANEXO A – Artigo de revisão “Biopreservação de alimentos utilizando antimicrobianos de bactérias ácido-láticas”	74

1. INTRODUÇÃO

Os métodos de conservação de alimentos surgiram juntamente com o desenvolvimento da civilização, sendo aperfeiçoados ao longo da evolução do homem. Os métodos emergentes para conservação de alimentos podem ser classificados em três categorias principais, métodos físicos, químicos e biológicos (MISRA et al., 2017; MUKHOPADHYAY; UKUKU, 2018). Entre as tecnologias existentes, a biopreservação, recebe atenção devido ao seu impacto mínimo nas propriedades nutricionais e sensoriais dos produtos alimentícios, tornando possível o uso controlado de microrganismos e seus metabólitos para prolongar o prazo de validade dos alimentos (SABO et al., 2017).

A fermentação pode ser vista como um método biológico de preservação de alimentos. Os alimentos produzidos desta maneira têm um risco reduzido de contaminação quando enriquecidos com antimicrobianos, como ácidos orgânicos, etanol e bacteriocinas (MARCO et al., 2017). Os probióticos são microrganismos estudados pela sua capacidade de produzir agentes antimicrobianos naturais, e por proporcionar benefícios à microbiota e a saúde de quem os consome (PRABHURAJESHWAR; CHANDRAKANTH, 2017).

O comportamento do consumidor em relação à escolha de alimentos está mudando devido à compreensão da relação entre dieta e saúde (SHORI, 2016). A busca da população por alimentos com maiores benefícios à saúde faz com que a indústria tenha a necessidade de se atualizar. Atualmente a maioria dos conservantes utilizados em alimentos são sintéticos e, devido ao seu histórico de uso, alguns microrganismos já se adaptaram ao meio e conseguem se desenvolver mesmo com a adição desses conservantes (VARSHA; NAMPOOTHIRI, 2016; FERNANDEZ et al., 2017).

Derivados lácteos, como queijos, são muito consumidos, utilizados na alimentação diária, e na culinária mundial em diversos pratos. Um problema atual encontrado nas indústrias produtoras de queijos é a presença de microrganismos indesejáveis que se desenvolvem nesses alimentos durante a maturação, os quais são responsáveis por atribuir aspecto, sabor e aparência desagradável ao produto (FERNANDEZ et al., 2017; JURADO; NAVARRO, 2018; ZHENG et al., 2018; COSTA et al., 2018).

As exportações mundiais de lácteos em 2017 atingiram 71,6 milhões de toneladas, 1,3% a mais do que em 2016. Estima-se que o consumo per capita de produtos lácteos em países desenvolvidos deverá crescer de 22,2 kg em 2015-17 para 23,1 kg em 2027 e em países em desenvolvimento, o aumento esperado é de 10,6 kg para 13,5 kg (FAO, 2018).

O desenvolvimento de microrganismos deteriorantes em queijos ocorre naturalmente, e se torna uma fonte de prejuízos à indústria e de risco a saúde dos consumidores (COSTA et al., 2018). Desta forma, torna-se necessária a utilização de novos compostos naturais como conservantes.

As bacteriocinas são peptídeos microbianos que têm potencial uso como substitutos naturais para conservantes químicos de alimentos, particularmente aqueles produzidos por bactérias com status de Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS), como muitas bactérias ácido lácticas (BAL) (LIMA; FERNANDES; CARDARELLI, 2017; BARMAN; GHOSH; MANDAL, 2018).

Há uma extensa pesquisa realizada sobre bacteriocinas, a partir de 2012, 62 gêneros abrangendo 195 espécies bacterianas são considerados como culturas de alimentos microbianos com histórico de uso seguro para fins de fermentação (CAVERA et al., 2015). As bacteriocinas possuem grande aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica, como conservante de alimentos e medicamentos (ELAYARAJA, 2014).

Neste contexto, o trabalho se enquadra na linha de pesquisa do PPGCTA “Processos biotecnológicos e não convencionais na produção de alimentos e ingredientes” e no projeto “Produção de alimentos, ingredientes e produtos de interesse industrial por bioprocessos”, pois foram obtidos compostos antimicrobianos de microrganismos probióticos a partir de fermentações submersas.

Objetivou-se a produção de compostos antifúngicos e antimicrobianos via fermentação submersa por bactérias lácticas probióticas. Os objetivos específicos foram: a) isolar fungos contaminantes em queijos; b) selecionar bactérias lácticas probióticas capazes de produzir compostos antimicrobianos que inibissem os fungos contaminantes de queijos; e c) e estudar o processo de fermentação para produção de compostos antimicrobianos a partir das bactérias lácticas probióticas selecionadas em meios de cultivo de baixo custo.

O trabalho foi dividido em 2 capítulos: uma revisão bibliográfica sobre fungos contaminantes de queijos, bacteriocinas, seu modo de produção e seu potencial de produzir extratos com ação antimicrobiana e um artigo contendo os métodos utilizados no trabalho, os resultados obtidos a partir do trabalho de pesquisa realizado e uma discussão comparando os resultados deste trabalho com os demais publicados nesta área.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS DA PRODUÇÃO E CONTROLE MICROBIOLÓGICO DE QUEIJOS

Queijo é o nome genérico para um grupo de produtos alimentares à base de leite, produzido em uma grande variedade de sabores e formas em todo o mundo (FOX; MCSWEENEY, 2017). Pode ser preparado a partir de leite de diversas espécies animais e muitas vezes faz parte da dieta regular da população devido à sua composição (alta quantidade de proteínas, cálcio, minerais e vitaminas) (COSTA et al., 2018).

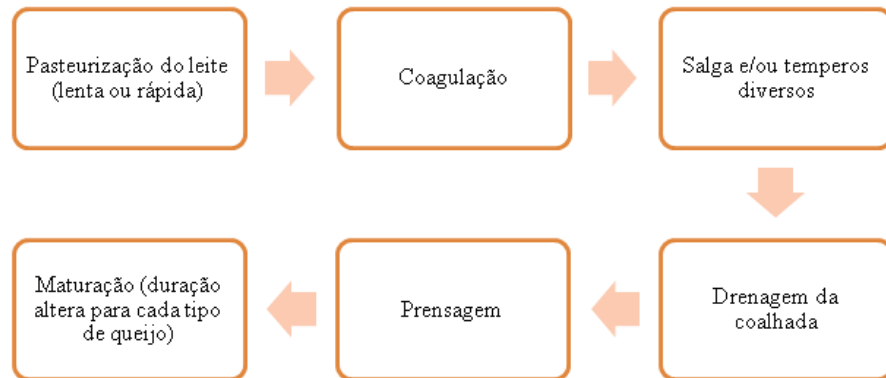
O Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define queijo como o produto lácteo fresco ou maturado que se obtém por meio da separação parcial do soro em relação ao leite, coagulados pela ação do coalho, de enzimas específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, com ou sem adição de substâncias alimentícias, de especiarias, de condimentos ou de aditivos (BRASIL, 2017).

A produção de queijo começou há cerca de 8.000 anos e se espalhou pelo mundo, isso levou a uma notável diversidade de queijos, que atualmente é estimada em mais de 1.000 tipos (ROPARS et al., 2012). O queijo é um dos mais populares produtos alimentares à base de leite, consumidos por muitas pessoas em todo o mundo (HOSSAIN; SADEKUZZAMAN; HA, 2017).

Todos os queijos, sejam coalho ou ácido, podem ser classificados como moles, semiduros, duros ou muito duros, dependendo do seu teor de umidade (CRUZ et al., 2009). A presença de bolores é necessária em alguns produtos lácteos, sendo amplamente utilizados em queijos como Camembert, Roquefort e Stilton, bem como uma série de queijos especiais feitos a partir de leite cru (BENKERROUM, 2016).

A Figura 1 apresenta as etapas genéricas da produção de queijo nos laticínios, sendo que cada tipo de queijo exige uma adição de ingredientes, temperos e maturações diferentes em algumas dessas etapas para manter a identidade e qualidade de determinado produto.

Figura 1 - Esquema geral das etapas de produção do queijo



Fonte: elaborado pelo autor.

A microbiota inicial dos queijos, geralmente inoculada artificialmente, é composta principalmente de bactérias lácticas, a secundária, principalmente proveniente do meio ambiente, torna-se dominante após alterações no substrato, ou seja, perda de água da coalhada, aumento do sal e do pH (LEGGIERI et al., 2017). Durante a maturação do queijo, a microbiota que o habita desempenha um papel importante na formação de compostos aromáticos, especialmente no consumo de lactato, proteólise, lipólise e fermentação da lactose (ZHENG et al., 2018).

Os fungos podem desempenhar papéis importantes na maturação do queijo, com efeitos positivos ou negativos na formação do sabor (ZHENG et al., 2018). Os fungos filamentosos também podem ser responsáveis pela deterioração do queijo, causando defeitos como pigmentações e acúmulo de micotoxinas (JURADO; NAVARRO, 2018). Por conferirem sabores desagradáveis de mofo ou amargo, a deterioração por fungos torna o queijo impróprio para o consumo humano e representa enormes perdas econômicas para a indústria de laticínios (FERNANDEZ et al., 2017).

A deterioração dos fungos pode ser visível devido principalmente ao crescimento do organismo, ou não visível, *via* metabolismo fúngico, resultando na produção de odores e/ou aromas anormais, produção de gás ou alteração de textura (GARNIER et al., 2017).

A presença de fungos é necessária em algumas variedades, como por exemplo, Roquefort, Gorgonzola, Camembert e Brie, nos quais são responsáveis por seu aspecto e sabor típicos (LEGGIERI et al., 2017; JURADO; NAVARRO, 2018). Porém, esses microrganismos podem atuar como agentes prejudiciais no processamento de alimentos (LEGGIERI; DECONTARDI; BATTILANI, 2018).

O crescimento intensivo de fungos e bactérias pode ocorrer na superfície do queijo devido às condições ambientais externas durante o manuseio e armazenamento (COSTA et al., 2018). Embora os fungos não sejam, por si só, agentes patogênicos transmitidos por alimentos, eles podem produzir uma série de metabólitos secundários (micotoxinas) com efeitos toxicológicos agudos ou crônicos (BENKERROUM, 2016).

Uma das principais perdas desse produto ocorre durante o armazenamento na comercialização, onde a contaminação do queijo por bactérias e fungos é comum, e, portanto, podendo ocorrer o desenvolvimento de aromas desagradáveis, diminuindo a qualidade do queijo (COSTA et al., 2018).

Uma vez que fungos filamentosos são organismos comuns de deterioração de produtos alimentícios como produtos lácteos fermentados, queijo, pão e alimentos como feno e silagem, o risco de micotoxinas incorporadas nos alimentos é muito alto (VARSHA; NAMPOOTHIRI, 2016; LEGGIERI et al., 2017).

A presença de micotoxinas em produtos lácteos é bastante comum, sendo que uma nova abordagem de segurança alimentar deve ser adotada em face da crescente demanda dos consumidores por produtos alimentícios minimamente processados e seguros (BENKERROUM, 2016).

O queijo é suscetível a deterioração por fungos das espécies de *Fusarium* (VARSHA; NAMPOOTHIRI, 2016) *Cladosporium*, *Mucor*, *Geotrichum* (FERNANDEZ et al., 2017), *Penicillium* e *Aspergillus* (VARSHA; NAMPOOTHIRI, 2016; FERNANDEZ et al., 2017; LEGGIERI et al., 2017). Garnier et al. (2017) isolaram 105 fungos a partir de produtos lácteos na França, 60% eram fungos filamentosos, com uma grande diversidade de espécies (24 espécies), *Penicillium* foi o gênero mais abundantemente, seguido por *Cladosporium* e *Didymella*.

Essa colonização pode ser influenciada por fatores extrínsecos relacionados ao ambiente, como temperatura e umidade relativa presentes nas salas de maturação, bem como por fatores intrínsecos, como a composição do queijo (JURADO; NAVARRO, 2018). Um total de 70 microrganismos foram isolados a partir de coletas do ar e superfície de indústrias lácteas na França, sendo eles 65 fungos filamentosos e 5 leveduras (GARNIER et al., 2017).

Um estudo realizado por Leggieri et al. (2017) com as principais espécies fúngicas produtoras de micotoxinas em queijo destacou que eles podem crescer em condições comparáveis àquelas usadas para o amadurecimento do queijo e que é possível uma contaminação do produto com múltiplas micotoxinas.

A deterioração desse produto pode ser reduzida utilizando a pasteurização e conservantes químicos, por exemplo, sorbatos e natamicina. Porém, alguns microrganismos adquiriram a capacidade de degradar o sorbato pela descarboxilação em *trans*-1,3-pentadieno, causando um odor e um sabor descrito como “semelhante a querosene” (FERNANDEZ et al., 2017).

Compostos antimicrobianos são usados como conservantes alimentares por sua capacidade de retardar o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis no produto (ELAYARAJA et al., 2014; BARMAN; GHOSH; MANDAL, 2018). Podem ser classificados em dois grupos, antimicrobianos sintéticos e naturais (FU et al., 2016). Entre os 36 antimicrobianos aprovados como conservantes pela Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos (EFSA, 2018) 33 são sintéticos e apenas 3 são naturais.

Os ácidos orgânicos, tais como ácido acético, láctico, propiônico, sórbico e benzóico são usados como conservantes químicos para alimentos, mas apesar da aplicação destes métodos diferentes espécies de fungos ainda são capazes de colonizar os alimentos (VARSHA; NAMPOOTHIRI, 2016; GARNIER et al., 2017).

A portaria 146 de 1996 do MAPA estabelece limites para a utilização de conservantes em queijos, permitindo a utilização de ácido sórbico e seus sais de sódio, potássio e cálcio na concentração máxima de 1000 mg/kg, nitrato de sódio ou potássio na concentração máxima de 50 mg/kg e natamicina na concentração de 5 mg/kg só na superfície do produto, não podendo ser detectável a 2 mm dos queijos cortados ou fatiados (BRASIL, 1996).

No Brasil, o uso da nisina é permitido em queijos , requeijão , queijo fundido, queijos pasteurizados e queijo em pó , na concentração de 12,5 mg.kg-1 de produto final (ANVISA, 1994).

Questões controversas e preocupações dos consumidores sobre a segurança de antimicrobianos artificiais estão fazendo com que pesquisadores e fabricantes de alimentos desenvolvam alternativas naturais para esses compostos (FU et al., 2016; FERNANDEZ et al., 2017). Mecanismos de resistência desenvolvidos por esses patógenos alimentares, tornam necessário descobrir uma nova estratégia para controlar sua ocorrência em alimentos (VARSHA; NAMPOOTHIRI, 2016).

Um dos muitos mecanismos naturais de defesa que as bactérias utilizam para competir contra microrganismos no mesmo ambiente são as bacteriocinas (CHIKINDAS et al., 2018). Sua origem ribossômica permite a manipulação do gene estrutural de uma forma mais direta do que em outras classes de antimicrobianos, tornando possível obter variantes com propriedades potencialmente benéficas (FIELD; ROSS; HILL, 2018).

2.2 BACTERIOCINAS

As bactérias ácido lácticas desempenham um papel ativo na preservação de alimentos fermentados, produzindo uma ampla gama de metabólitos antifúngicos (LE LAY et al., 2016; VARSHA; NAMPOOTHIRI, 2016) e antimicrobianos como os ácidos orgânicos, bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, ácidos graxos, reuterina, ácidos graxos, metabólitos de aminoácidos, compostos alcoólicos e diacetil (CRUZ et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2014; AHMAD et al., 2017; FERNANDEZ et al., 2017). Por isso o desenvolvimento de sistemas antimicrobianos naturais a partir de bactérias do ácido láctico são de grande importância para a indústria alimentar (LANGA et al., 2018).

As bactérias lácticas são boas candidatas para a biopreservação, pois têm um histórico de uso seguro (SINGH et al., 2015; VARSHA; NAMPOOTHIRI, 2016; LE LAY et al., 2016; FU et al., 2016; BARMAN; GHOSH; MANDAL, 2018). Ocorrem naturalmente em diferentes fontes alimentares e tornaram-se uma parte da dieta sem quaisquer efeitos adversos para a saúde (MIAO et al., 2015; VARSHA; NAMPOOTHIRI, 2016; FIELD; ROSS; HILL, 2018). São usados em vários alimentos fermentados como iogurte, kefir e queijo (LE LAY et al., 2016).

As bacteriocinas produzidas por bactérias do ácido láctico apresentam potencial aplicação na biopreservação de alimentos (BARBOSA et al., 2018; BARMAN; GHOSH; MANDAL, 2018). Muitos relatórios publicados sobre bacteriocinas afirmaram que são úteis e sem efeitos colaterais para os alimentos (AHMAD et al., 2017). Le Lay et al. (2016) confirmaram o potencial de algumas culturas de bactérias do ácido láctico, sobrenadantes ou misturas de metabólitos ativos para serem utilizados como agentes antifúngicos. *Lactobacillus* é o gênero mais estudado e de maior extensão entre as bactérias do ácido láctico (UROI et al., 2016; MORAES et al., 2018), sendo que certas cepas podem produzir mais do que uma bacteriocina (MILLS; ROSS; HILL, 2017).

As bacteriocinas foram identificadas pela primeira vez em 1925 (CAVERA et al., 2015), podem ser produzidas espontaneamente como metabólitos primários ou secundários (SINGH et al., 2015; BARBOSA et al., 2018). São produzidas em ribossomos, com uma atividade antimicrobiana pronunciada em determinadas concentrações (CHIKINDAS et al., 2018). Podem ser classificadas com base na massa molecular, estrutura química, estabilidade térmica e enzimática, modo de ação, atividade antimicrobiana ou presença de resíduos de aminoácidos modificados pós-traducionalmente (ZOU et al., 2018).

Atualmente, poucas bacteriocinas estão sendo usadas comercialmente como conservantes alimentares: nisina produzida por *Lactococcus lactis*, carnociclina A produzida

por *Carnobacterium maltaromaticum* (O'CONNOR et al.,2015; FIELD; ROSS; HILL, 2018), a pediocina PA-1 produzida por *Pediococcus acidilacticie* e Natamicina produzida por *Streptomyces natalenses* (FIELD; ROSS; HILL, 2018).

Descobriu-se que as bacteriocinas têm muitos mecanismos de ação distintos que diferem dos antibióticos (COTTER; ROSS; HILL, 2013). A faixa de atividade inibitória das bacteriocinas pode ser estreita, inibindo apenas as cepas que estão intimamente relacionadas com o organismo produtor, ou de larga escala, inibindo uma ampla gama de microrganismos Gram-positivos (FIELD; ROSS; HILL, 2018).

Os mecanismos de ação podem ser amplamente divididos naqueles que funcionam principalmente no envelope celular e naqueles que são ativos principalmente dentro da célula, afetando a expressão gênica e a produção de proteínas (COTTER; ROSS; HILL, 2013). Tem a capacidade de se ligarem a componentes da parede celular, incluindo sítios de ligação molecular de superfície ou lipídicos, via ligação específica ou não específica ao receptor, o que facilita a formação de poros ou direciona a lise celular (AHMAD et al., 2017).

A baixa atividade das bacteriocinas BAL em relação às bactérias Gram-negativas é devida à membrana externa da parede celular Gram-negativa que funciona como uma eficiente barreira de permeabilidade e é capaz de excluir macromoléculas como bacteriocinas ou enzimas (FIELD; ROSS; HILL, 2018).

Em consequência das características anfífilas e do alto conteúdo de aminoácidos hidrofóbicos, a biossíntese e a funcionalidade antimicrobiana das bacteriocinas podem ser afetadas pelos componentes da matriz alimentar (BARBOSA et al., 2018).

A fermentação é um método que permite obter contagens mais altas de probióticos em alimentos, se a seleção de cepas for realizada corretamente (CHAMPAGN; CRUZ; DAGA, 2018). O consenso geral é de que a bacteriocina que melhor se adapta ao controle de um microrganismo frequentemente será encontrada no mesmo nicho ambiental do patógeno (O'CONNOR et al.,2015).

Vários estudos conduzidos para estabelecer as melhores condições para a produção indicam que a biossíntese de bacteriocinas não é paralela ao crescimento bacteriano (BARBOSA et al., 2018). Bactérias probióticas têm muitos requisitos de crescimento nutricional, como aminoácidos, ácidos graxos e vitaminas (CHAMPAGN; CRUZ; DAGA, 2018). Os níveis de bacteriocinas são geralmente mais altos quando a temperatura, o pH e os nutrientes são mais baixos do que os requeridos para o crescimento das cepas probióticas (BARBOSA et al., 2018; ENGELHARDT et al., 2018).

As bacteriocinas utilizadas para a biopreservação podem ser introduzidas aos alimentos de três maneiras: 1) incorporação da estirpe produtora de bacteriocina no produto alimentar, 2) adição de bacteriocinas purificadas ou parcialmente purificadas ao alimento ou 3) adição de um ingrediente previamente fermentado com cepas produtoras de bacteriocinas (O'CONNOR et al., 2015; AHMAD et al., 2017; MILLS; ROSS; HILL, 2017; BARBOSA et al., 2018; CHIKINDAS et al., 2018; NEGI, Y. K. et al., 2018).

Independentemente do modo de incorporação, a efetividade das bacteriocinas como biopreservadores alimentares depende da biossíntese ótima, nível e especificidade da atividade antimicrobiana e da interação com os componentes da matriz alimentar (BARBOSA et al., 2018).

A aplicação direta de compostos antimicrobianos em sistemas alimentares enfrenta desafios como insolubilidade na água, degradação física e química e impacto nas propriedades organolépticas dos alimentos (FU et al., 2016). É necessário avaliar a funcionalidade das bacteriocinas adicionadas aos alimentos, testadas nas mesmas condições de tempo/temperatura em que são mantidas antes do consumo (BARBOSA et al., 2018).

2.2.1 Métodos de produção de bacteriocinas

A biopreservação é geralmente realizada através de processos fermentativos de BAL, que têm um alto potencial como biopreservadores porque são seguras para o consumo humano e porque produzem vários compostos antimicrobianos, tais como ácidos orgânicos e bacteriocinas (SABO et al., 2017).

A produção de bacteriocinas por BAL é geralmente realizada em meios de cultura complexos, tais como de Man Rogosa e Sharpe (MRS), All Purpose with Tween (APT), Tryptone Glucose Extract (TGE) e Trypticase Soy Broth (TSB), entretanto, seus altos custos os tornam inadequados para produção em larga escala (LIMA; FERNANDES; CARDARELLI, 2017).

A fermentação submersa é uma técnica antiga que tem sido praticada ao longo dos últimos séculos por possuir características vantajosas como a facilidade de esterilização e o controle do processo, facilidade na transferência de calor e a homogeneidade dos meios, esta técnica é mais adequada para microrganismos que requerem alto teor de umidade para crescimento como bactérias (SINGH; CHAUHAN; KENNEDY, 2017; SHARMA et al., 2017).

A produção rentável de bacteriocinas é atualmente uma área ativa de pesquisa e deve garantir que o uso de bacteriocinas puras seja uma opção mais viável no futuro (MILLS; ROSS;

HILL, 2017). Estima-se que 30% do total de recursos gastos em tal processo sejam custos associados ao meio de cultura e suplementos necessários para promover o crescimento celular do microrganismo que produz tais moléculas (SABO et al., 2017).

O caldo MRS não é ideal para a produção comercial de bacteriocinas devido ao preço mais alto e à presença de ingredientes não autorizados, como o $MnSO_4$, para aplicações alimentícias (JUTURU & WU, 2018).

O uso de resíduos orgânicos como substrato nos processos de fermentação pode ser aceito como uma das soluções para reduzir o preço total da cultura, bem como um método ambientalmente mais sustentável de remover esses resíduos (FATEMEH; KHOSRAVI-DARANI, 2019).

Bacteriocinas parcialmente purificadas, produzidas usando substratos de qualidade alimentar, como leite ou soro de leite, são uma opção alternativa e mais barata (MILLS; ROSS; HILL, 2017). Os subprodutos industriais estão sendo explorados como substratos de cultura alternativos (LIMA; FERNANDES; CARDARELLI, 2017).

A indústria de laticínios produz uma quantidade considerável de subprodutos (VERA et al., 2018), o soro de leite gerado durante a produção de queijo é o maior subproduto dessa indústria (LIMA; FERNANDES; CARDARELLI, 2017). O uso de soro como substrato para cultura de organismos fermentativos foi proposto para reduzir esse descarte de resíduos (VERA et al., 2018).

Resíduos agroindustriais são uma fonte rica de nutrientes, matéria orgânica e inorgânica. Estes resíduos podem ser usados como substratos alternativos de carbono ou nitrogênio para a produção de vários produtos microbianos (SINGH; KAUR; KENNEDY, 2019).

O processamento de queijo do leite envolve a coagulação da gordura do leite e proteínas, juntamente com a geração de um subproduto líquido conhecido como soro de leite. O soro contém lactose (4,5%), sais (1,0%), proteínas (0,8%) e ácido láctico (0,1-0,8%) (SINGH; KAUR; KENNEDY, 2019).

A alta concentração de lactose e a presença de vitaminas, minerais, proteínas (SABO et al., 2017) e valores de pH próximos ao neutro (LIMA; FERNANDES; CARDARELLI, 2017) tornam o soro de leite um meio interessante para o crescimento de BAL e atende ao objetivo de promover a produção econômica de bioprodutos de interesse industrial (SABO et al., 2017). O substrato de baixo custo pode ser suplementado com sacarose como fonte de carbono (VERA et al., 2018).

Embora várias linhagens BAL tenham sido reportadas como produtoras de bacteriocinas antimicrobianas, sua produção depende de múltiplos fatores, tais como: linhagem BAL, pH, temperatura, condições de crescimento bacteriano (ELAYARAJA et al., 2014; MIAO et al., 2015; LIMA; FERNANDES; CARDARELLI, 2017; BARMAN; GHOSH; MANDAL, 2018) e concentração de NaCl (ENGELHARDT et al., 2018; BARBOSA et al., 2018).

O pH da cultura afeta todos os processos enzimáticos e transporte de vários componentes através da membrana celular, por isso, é um parâmetro importante para otimizar (SHARMA et al., 2017). Aeração e agitação são características significativas para esta técnica, especialmente em grandes fermentadores (SINGH; CHAUHAN; KENNEDY, 2017).

A agitação é importante para manter o calor, a taxa de transferência de oxigênio e massa e aumentar a absorção da superfície (SINGH; CHAUHAN; KENNEDY, 2017). A temperatura é um parâmetro crítico que deve ser controlado e variado de organismo para organismo para o máximo crescimento celular (SHARMA et al., 2017).

Após a identificação de novas bacteriocinas, o passo mais crítico e complexo é a sua purificação a partir de caldos de fermentação (ZOU et al., 2018). Métodos de purificação mais simples e mais econômicos precisam ser desenvolvidos em comparação com a cromatografia para aumentar sua viabilidade comercial (WONG et al., 2017).

Um estudo sistemático sobre a substituição do meio caro por outro mais barato seria de máxima prioridade para a promoção de produção e aplicação de bacteriocinas com boa relação custo-benefício (JUTURU; WU, 2018).

3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIFÚNGICA DE BIOCOMPOSTOS PRODUZIDOS POR BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS EM BIOPROCESSOS

3.1 INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos capazes de crescer em todos os tipos de alimentos, são organismos deteriorantes importantes que causam perdas econômicas significativas na indústria (GEREZ et al., 2013). Os produtos lácteos, apesar de seu pH ácido e alto teor em ácidos orgânicos, podem proporcionar um ambiente favorável para o desenvolvimento de fungos e outros microrganismos indesejáveis (GARNIER et al., 2019).

A deterioração fúngica é geralmente fácil de detectar devido à presença de colônias na superfície do produto, e, produtos de seu metabolismo também podem causar alteração de sabor ou textura do alimento (LEDENBACH; MARSHALL, 2009).

Atualmente existem métodos de controle de processo na indústria que reduzem a contaminação dos produtos como a implantação de Boas Práticas de Fabricação e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, outra forma de controle é através do uso de conservantes. No entanto, os consumidores estão procurando cada vez mais por alimentos sem conservantes químicos, mais naturais e menos processados, sendo assim a indústria precisa buscar soluções eficientes para substituir conservantes químicos, mantendo a vida útil dos produtos alimentícios (VARSHA et al., 2016).

Bactérias Ácido Láticas são uma opção viável de biopreservadores para serem usados em alimentos. Esses microrganismos podem ser usados como culturas auxiliares, sendo inoculados no produto durante o processo produtivo ou também, para produzir fermentados que posteriormente serão adicionados aos alimentos como um ingrediente (VARSHA et al., 2016 ; GARNIER et al., 2017).

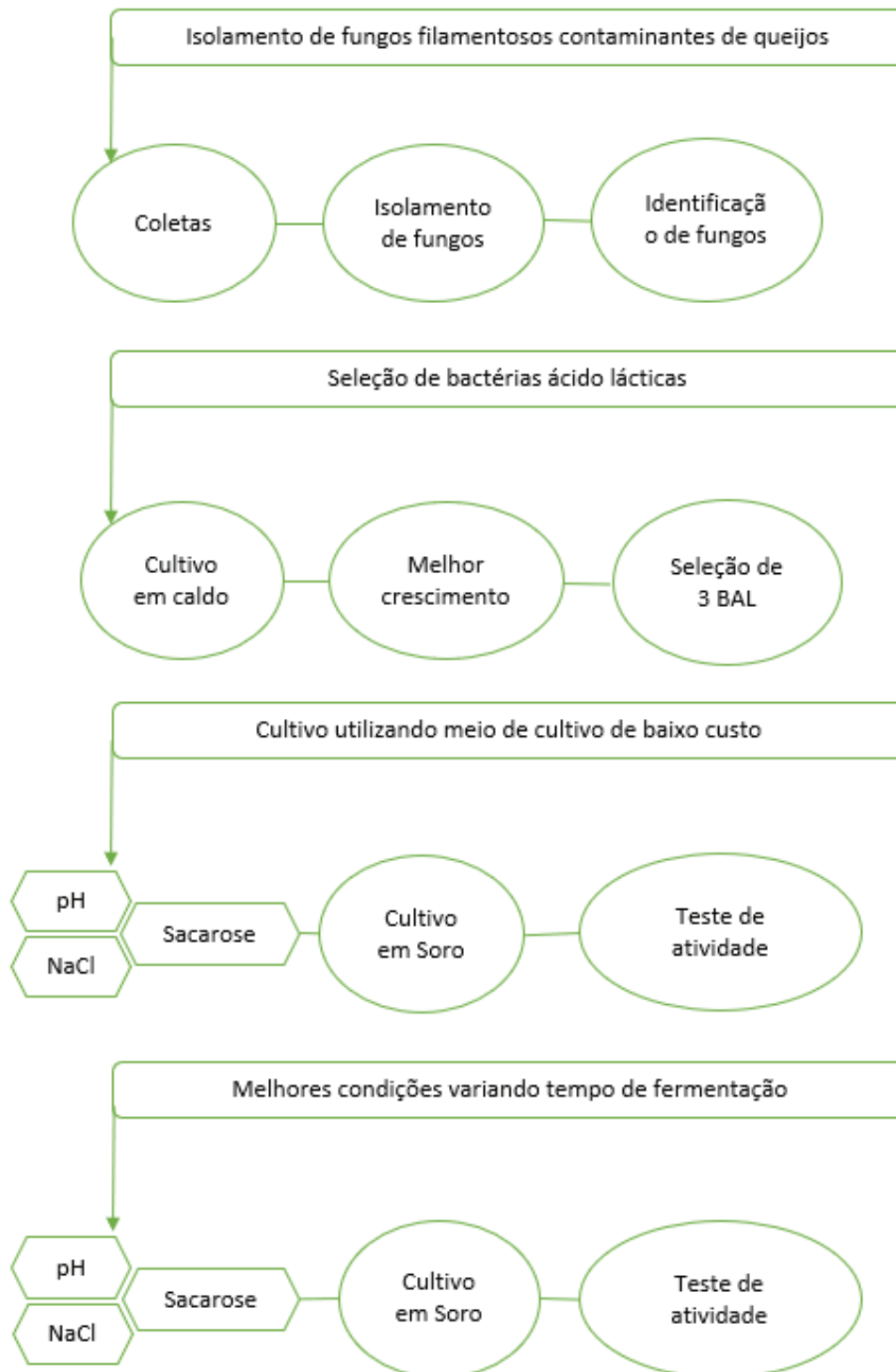
Os compostos antifúngicos das BAL'S são relatados como próprios para controlar leveduras e bolores que causam a deterioração dos alimentos, porém em comparação com amplos estudos de atividade antibacteriana os estudos que descrevem as atividades antifúngicas são escassos (AHMADOVA et al., 2013; SHEHATA et al., 2019).

Objetivou-se a produção de bacteriocinas em meio de cultivo alternativo via SSF visando a futura aplicação na redução da contaminação fúngica em queijos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento do trabalho consistiu em quatro etapas distintas. Na Figura 2 pode-se visualizar um esquema das etapas que foram realizadas no trabalho.

Figura 2 - Etapas do desenvolvimento do trabalho



Fonte: elaborado pelo autor.

3.3 ISOLAMENTO DE FUNGOS CONTAMINANTES DE QUEIJOS

Foram coletadas amostras de queijos coloniais de agroindústrias, distribuídas em diferentes regiões do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Para a escolha das agroindústrias foi realizada uma pré-seleção através de um questionário de Boas Práticas de Fabricação adaptado da RDC N° 216 de 2004 –ANVISA (Apêndice A). O questionário foi aplicado em cinco agroindústrias, para selecionar as com melhores práticas higiênicas, a fim de garantir que a contaminação existente no produto não fosse oriunda de falhas de boas práticas de fabricação no processo produtivo.

Depois de aplicado o questionário e analisadas as respostas foram selecionadas duas agroindústrias de onde foram coletadas 10 amostras de diferentes queijos coloniais que apresentavam crescimento visível de bolores e colocados cada um em uma placa de petri estéril. Posteriormente cada amostra foi cortada em quatro pedaços menores e estes foram distribuídos nos quatro lados de uma placa de petri com meio Potato Dextrose Agar (PDA), estas placas foram incubadas por oito dias a 35°C.

Para os fungos que cresceram no ágar e apresentaram características diferentes em termos de cor, textura e zonação, foi realizado o repique para o isolamento. Uma alíquota da colônia previamente crescida foi transferida com uma alça de platina para uma nova placa contendo o meio de cultura PDA, até a obtenção de colônias visualmente isoladas e homogêneas (SILVA et al., 2017).

A identificação e caracterização dos fungos isolados foi realizada através de suas características morfológicas, macro e microscópicas conforme Garnier et al. (2017). A observação macroscópica das características das colônias fúngicas foi realizada pela pigmentação, textura e topografia, segundo Fischer et al. (2001).

A identificação microscópica foi feita pelo tipo de ramificação, comprimento e largura dos conidióforos, utilizando a técnica de Microcultivo. Nesta técnica, foi recortado um pequeno quadrado de aproximadamente 2cm² de meio de cultura Ágar PDA e o mesmo foi colocado sobre uma lâmina histológica. Realizou-se a inoculação dos fungos nos quatro lados do pedaço do ágar, depois este foi coberto com uma lamínula. Todo o conjunto foi colocado no interior de uma placa de Petri com um papel filtro embebido com solução fisiológica. Foram incubados em estufa a 35°C durante 7 dias. Após o crescimento fúngico, a lamínula foi retirada e colocada em nova lâmina com uma gota de corante azul de metileno para visualização em um aumento de 40 vezes no microscópio óptico Olympus CX21.

3.4 SELEÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Foram utilizadas bactérias ácido lácticas disponíveis no laboratório da Medicina Veterinária da UPF, sendo o critério de seleção as mais citadas nos artigos como produtoras de bacteriocinas e que apresentaram facilidade de repique e cultivo. Foram testadas oito BAL's: *Bifidobacterium animalis* subesp. *Lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivaris*, *Lactobacillus reuteri*.

Para a ativação das bactérias, as culturas que se encontravam congeladas em Eppendorf (700 microlitros de BAL + 300 microlitros de glicerol) foram adicionadas ao caldo MRS (Man Rogosa e Sharpe) e incubadas durante 24 h a 37°C. Após ativação, as BAL'S foram transferidas com auxílio de uma alça de platina para placas de petri contendo ágar MRS, posteriormente foram incubadas por 72 horas a 37°C. Realizou-se coloração de Gram para comprovar que eram colônias de BAL sem contaminação. As bactérias lácticas com maior facilidade de cultivo e repicagem foram selecionadas para a etapa posterior.

3.5 ESTRATÉGIAS DE CULTIVOS NOS BIOPROCESSOS PARA OBTENÇÃO DE ANTIMICROBIANOS POR BAL

As 3 bactérias lácticas que apresentaram melhor desenvolvimento na etapa de seleção, com maior turvação durante a ativação foram: *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* (LEMMA), *Lactobacillus lactis* (T.H.T. S.A), *Lactobacillus reuteri* (Pharmanostra). Essas cepas foram utilizadas para a realização da fermentação submersa utilizando soro de leite como componente principal do meio de cultivo, segundo o Delineamento Fatorial Completo 2³ com pontos centrais apresentado na Tabela 1.

Os ensaios realizados com o *Lactobacillus lactis* foram identificados como L, os com o *Lactobacillus reuteri* como R e com o *Bifidobacterium sp* como B, seguidos dos números dos experimentos. Posteriormente, a partir das melhores condições experimentais obtidas a partir do primeiro planejamento experimental em relação a capacidade antifúngica, foram realizados novos ensaios (em duplicatas), conforme Tabela 2. Nesta etapa, os ensaios foram numerados na sequência dos ensaios da Tabela 1 e foram variados os tempos de fermentação sendo retiradas amostras nos tempos 0h (usado como controle), 24h, 48h e 72h.

Tabela 1 - Delineamento Fatorial Completo 2³ com três pontos centrais para o estudo da influência das variáveis sobre a produção de compostos antimicrobianos por bactérias lácticas

Ensaio	X ₁ (pH inicial)	X ₂ (NaCl %)	X ₃ (Sacarose %)
1	-1 (5)	-1 (1)	-1 (0,5)
2	+1 (7)	-1 (1)	-1 (0,5)
3	-1 (5)	+1 (4)	-1 (0,5)
4	+1 (7)	+1 (4)	-1 (0,5)
5	-1 (5)	-1 (1)	+1 (2,5)
6	+1 (7)	-1 (1)	+1 (2,5)
7	-1 (5)	+1 (4)	+1 (2,5)
8	+1 (7)	-1 (1)	+1 (2,5)
9	0 (6)	0 (2,5)	0 (1,5)
10	0 (6)	0 (2,5)	0 (1,5)
11	0 (6)	0 (2,5)	0 (1,5)

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 2 - Planejamento dos experimentos da segunda etapa de fermentação

Microrganismo	Experimento	pH	NaCl (%)	Sacarose (%)
<i>Lactobacillus lactis</i>	L12	6	2,5	1,5
<i>Bifidobacterium</i>	B12	7	4	2,5

Fonte: elaborado pelo autor.

O soro de leite foi preparado como descrito por Guerra, Rua e Pastrana (2001) e Lima, Fernandes e Cardarelli (2017) com algumas adaptações. Em frascos de erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 60 mL de soro de leite e ajustadas as concentrações de NaCl, sacarose e pH segundo o delineamento fatorial. Após foi realizado uma pasteurização em banho metabólico sob agitação de 100 rpm durante 15 minutos a 90°C.

Para produção do pré-inóculo as BAL's foram cultivadas em caldo MRS em frascos Erlenmeyer sendo considerada uma alçada de inóculo para cada 50 mL de meio. Após a inoculação, foram incubados em agitador rotativo a 100 rpm e 37 ± 1°C por 24 h.

Para inoculação dos meios de fermentação, foram adicionados 5 mL do pré-inóculo aos meios de cultivo preparados para iniciar a fermentação. Antes de iniciar a fermentação foi

retirada amostra correspondente ao tempo 0h (10 mL de cada extrato). As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos e congeladas para posterior uso no teste de atividade antimicrobiana. Os demais frascos foram incubados em agitador rotativo marca Tecnal (modelo TE-421) a 100 rpm, 37°C por 72 h. Ao fim da fermentação, os meios foram centrifugados (Hitachi, CR 22N) para separação da biomassa microbiana a 10.000 rpm por 10 min (BARMAN; GHOSH; MANDAL, 2018; WONG et al. 2017). Após a centrifugação, os extratos foram congelados até a realização das análises de atividade antimicrobiana frente aos fungos isolados na etapa 3.3 e as bactérias selecionadas para o estudo.

3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DAS FERMENTAÇÕES

Para o teste do potencial antimicrobiano, o extrato foi testado frente aos seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas* spp.. Foi construída uma curva padrão da bacteriocina nisina. Para construção da curva foi utilizada a nisina N 5764 (Sigma-Aldrich Co. LLC. Tbilisi, Geórgia, Alemanha) contendo 2,5% de nisina (10⁶ UI/g). Foi preparada uma solução padrão (2 mg/mL) de nisina pela dissolução do pó de nisina em água destilada estéril. A partir dessa solução, denominada solução-mãe, foram realizadas diluições de forma a obter soluções contendo de 0 a 2 mg/mL de nisina (0; 0,2; 0,6; 0,8; 1; 1,2; 1,6; 1,8 e 2 mg/mL). Foram adicionados 500 µL de cada diluição de nisina em 5 mL de caldo BHI.

Em seguida, 100 µL de uma suspensão do microrganismo indicador com densidade ótica de 0,1 a 630 nm foram adicionados aos tubos. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas, sendo posteriormente realizada a leitura da absorbância de cada tubo em espectrofotômetro a 630 nm.

Para realizar a análise antimicrobiana dos extratos realizou-se o mesmo procedimento descrito no parágrafo acima, substituindo a nisina pelos extratos produzidos pelas bactérias ácido lácticas.

O potencial de inibição do crescimento do organismo indicador foi calculado para os extratos BAL através da Equação 1, na qual PI é o potencial de inibição (%), Ao é a absorbância do controle (tempo inicial de fermentação, sem a produção de compostos antimicrobianos) e Am a absorbância de cada amostra.

$$PI = \frac{(Ao - Am)}{Ao} \times 100 \quad (1)$$

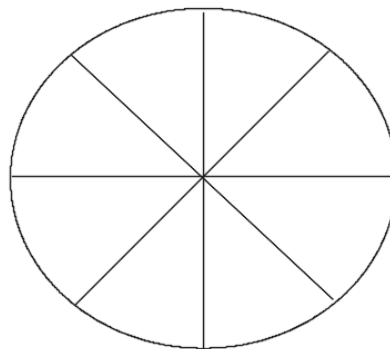
Os resultados também foram expressos em equivalência de nisina, inserindo-se na curva-padrão os valores de potencial de inibição obtidos e relacionando-se com a concentração de nisina.

Os resultados de potencial de inibição foram avaliados conforme a metodologia de superfície de resposta, na qual se estima os efeitos principais e de interação das variáveis analisadas, com nível de significância de 10% ($\alpha < 0,1$) e intervalo de confiança de 90%.

Para o preparo do inóculo fúngico para os testes de atividade antifúngica, foram utilizados 1 mL de suspensão preparada pela adição de 5 mL solução de Tween 0,1% em um tubo de ensaio contendo fungo isolado foram transferidos de tubos de ensaio para placas de Petri contendo PDA, e incubados a 30°C por 48 h. Após o período de crescimento do fungo, foram confeccionados os discos para uso nos ensaios de atividade antifúngica com um perfurador de aço inoxidável.

Os extratos foram testados quanto à atividade antifúngica contra os fungos isolados na primeira etapa através da técnica descrita por Gerbaldo et al. (2012), com algumas adaptações. Foram adicionados 2 mL do extrato das BAL's às placas de petri contendo 20 mL de ágar PDA solidificado. A seguir, no centro das placas de Petri foram adicionados discos contendo ágar coberto com micélio fúngico previamente preparado. As placas foram incubadas a 25°C durante 72 horas. Após o período de incubação, foram desenhados nas placas de Petri 8 raios, conforme Figura 3. Foi realizada a leitura dos oito raios, com auxílio de uma régua, medindo-se o raio do crescimento micelial (RCM) das colônias do centro em direção a lateral da placa, até onde havia crescimento fúngico. Paralelamente, foram realizados controles negativos, adicionando-se solução de Tween 0,1% em lugar do extrato das BAL's. Os testes com os extratos e os controles foram realizados em quintuplicata.

Figura 3 - Demonstrativo dos raios desenhados nas placas para medir o diâmetro do crescimento micelial



Fonte: elaborado pelo autor.

O potencial de inibição do crescimento fúngico foi calculado através da Equação 2, na qual PI é o potencial de inibição (%), Rc é a média dos raios do controle e Ra é a média dos raios de cada amostra.

$$PI = \frac{(Rc - Ra)}{Rc} \times 100 \quad (2)$$

3.7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.7.1 Isolamento de fungos contaminantes de queijos

O questionário da RDC nº 216 foi adaptado para se adequar a realidade das pequenas agroindústrias que seriam alvo do estudo. Após a pré-seleção dos itens de verificação da lista, cada um recebeu uma pontuação de “1” ou “2”, sendo a nota mais alta atribuída aos itens que influenciam diretamente da qualidade do alimento, que entram em contato com o mesmo e que poderiam causar alguma contaminação durante o processo produtivo. Somando-se o valor de cada subitem, foram atribuídos os pontos totais daquela seção. Após o preenchimento, todos os itens marcados na opção “sim” foram somados e tabelados (Tabela 3). Após avaliação da pontuação final de cada agroindústria, as que apresentaram os maiores escores foram selecionadas para a etapa de coleta.

As agroindústrias foram selecionadas pois apesar de seguirem as normas de Boas Práticas de Fabricação e de terem todos os cuidados necessários de segurança e higiene do processo produtivo ainda assim o produto final continha contaminação por fungos. Fontes de contaminação por fungos em produtos lácteos podem ser o ar, outras fontes ambientais em instalações de processamento, umidade relativa elevada das salas. Alguns estudos identificaram a sala de embalagem, a câmara fria e o ar da sala de produção como fontes de contaminação ambiental por fungos (BUEHLER et al., 2017).

De modo a evitar ou retardar a deterioração por fungos e, conseqüentemente, prolongar a vida de prateleira dos queijos, os métodos de prevenção aplicados na indústria de laticínios incluem boas práticas de fabricação e higiene, implementação do sistema HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) e uso de filtragem de ar (GARNIER et al., 2018).

Tabela 3 - Pontuação de BPF por indústria

ITEM	PONTOS	IND. 1	IND. 2	IND. 3	IND. 4	IND. 5
------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

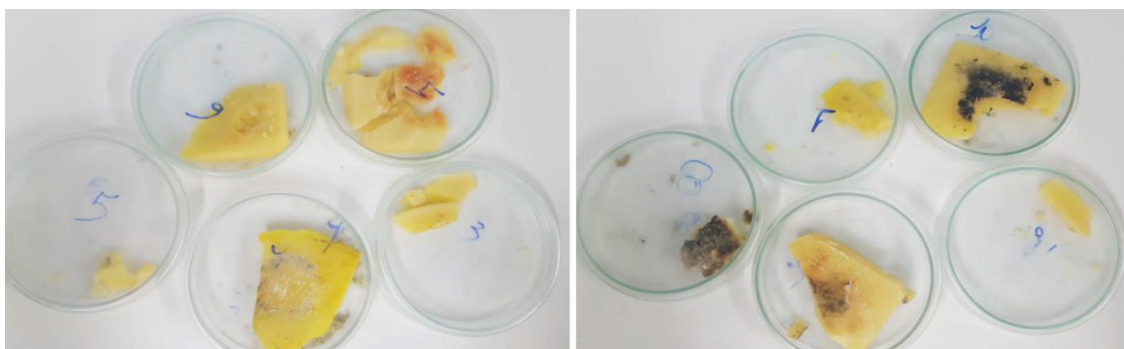
Edificação e Instalações	51	48	41	49	35	40
Equipamentos, Móveis e Utensílios	18	17	12	18	12	13
Manipuladores	10	9	9	9	8	9
Preparação do Alimento Armazenamento e Transporte do Alimento Preparado	12	11	10	11	8	8
Documentação e Registro	5	5	4	5	3	3
Total	100	94	80	96	70	77

Fonte: elaborado pelo autor.

Observando a Tabela 3 verificou-se que as agroindústrias 1 e 3 se destacaram pois possuem instalações mais adequadas ao processo produtivo, assim como apresentaram maiores cuidados nas boas práticas durante o preparo do produto, reduzindo o risco de uma contaminação durante o processo.

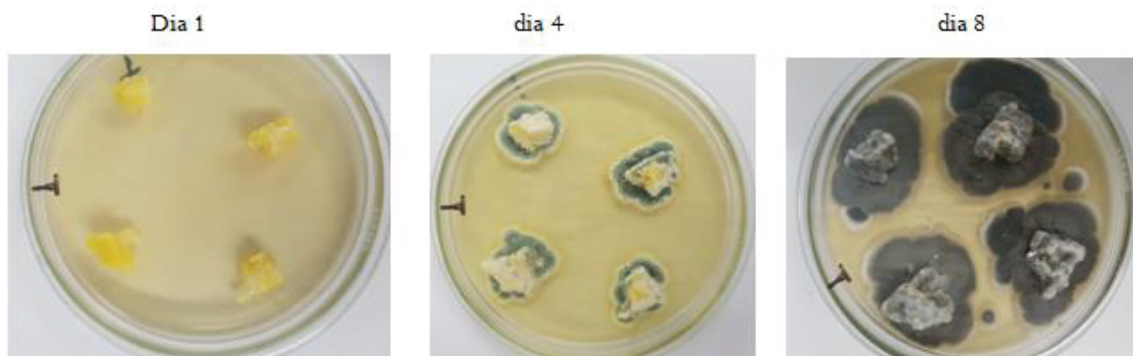
Das agroindústrias selecionadas, foram coletadas cinco amostras de queijo de cada. O critério de coleta dos queijos foi a apresentação de contaminação fúngica visível, como mostrado na Figura 4. Após incubação, o crescimento de cada fungo foi sendo observado diariamente, como mostrado na Figura 5. Para os fungos que cresceram no ágar e apresentaram características diferentes em termos de cor, textura e zonação, foi realizado o isolamento para posterior identificação, como mostra a Figura 6.

Figura 4 - Amostras de queijos contaminados coletados em agroindústrias



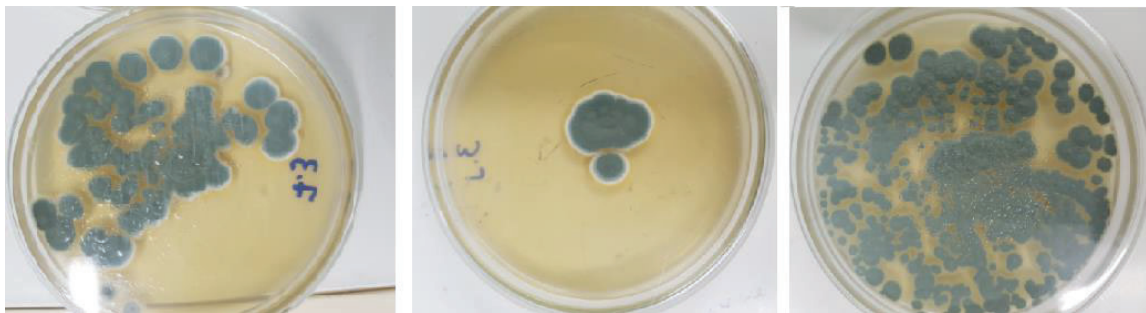
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 5 - Crescimento dos fungos em placas contendo meio PDA nas amostras de queijo



Fonte: elaborado pelo autor.

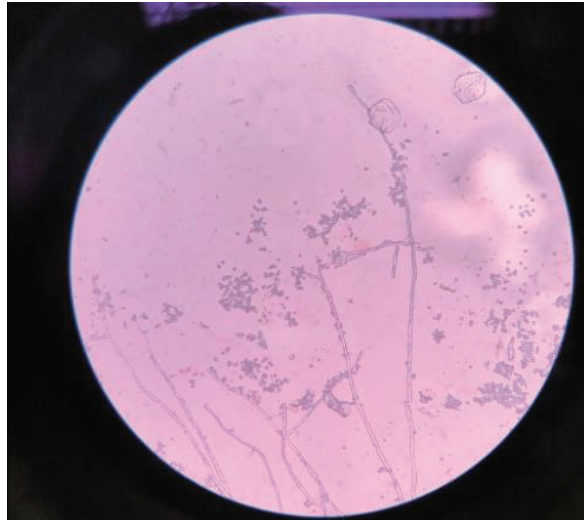
Figura 6 - Isolamento das colônias fúngicas em meio PDA



Fonte: elaborado pelo autor.

Após o isolamento do fungo, seguiu-se a etapa de identificação, através das quais identificou-se o gênero como *Penicillium* spp. A observação das características macroscópicas foi realizada seguindo as descrições de Fisher et al., (2001), que relata que colônias de *Penicillium* spp. são caracteristicamente verde-azuladas com periferia branca, apresentam textura aveludada e topografia rugosa. Microscopicamente apresentam hifas finas e septadas, conidióforos eretos e septados, apresenta um penicilo que se ramifica e suporta fiálides secundárias das quais, cadeias de conidióforos crescem (FISCHER et al, 2001). A Figura 7 mostra a microscopia do fungo isolado em um aumento de 40 vezes.

Figura 7- Microscopia do fungo isolado



Fonte: elaborado pelo autor.

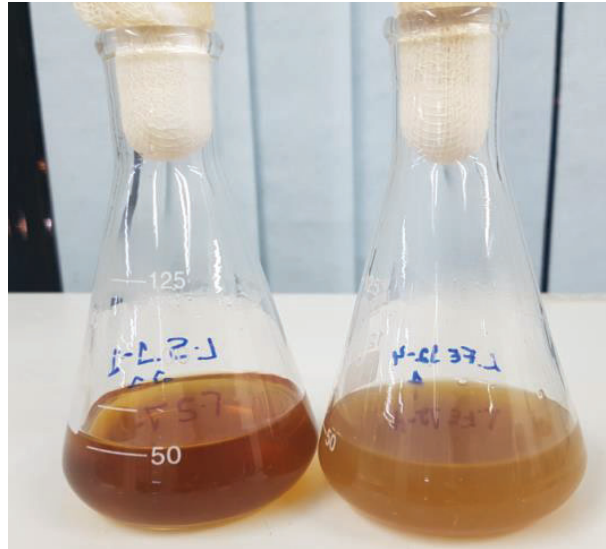
De acordo com a literatura, este é o gênero que mais se adapta para crescer na matriz de queijo, sendo assim o mais encontrado em estudos de isolamentos de fungos nesse produto (CASQUETE et al., 2018; GARNIER et al., 2019).

Em um estudo na França onde foram isoladas 133 cepas contaminantes de queijos provenientes de diferentes áreas do país, 106 delas eram *Penicillium* spp. (ROPARS et al., 2012). Entre 63 fungos filamentosos isolados de queijos deteriorados, 46 foram do gênero *Penicillium* spp. sendo estes isolados principalmente em amostras de queijos semiduro (GARNIER et al., 2017).

3.7.2 Seleção de bactérias ácido lácticas

O critério de escolha das bactérias ácido lácticas foi selecionar dentre as disponíveis na Universidade de Passo Fundo, sendo o critério de seleção as mais citadas nos artigos como produtoras de bacteriocinas e que apresentaram facilidade de repicagem e cultivo. O crescimento bacteriano foi evidenciado pela turvação do meio de cultivo (Figura 8).

Figura 8 - Erlenmeyer contendo BAL e meio MRS após 27 horas de fermentação



Fonte: elaborado pelo autor.

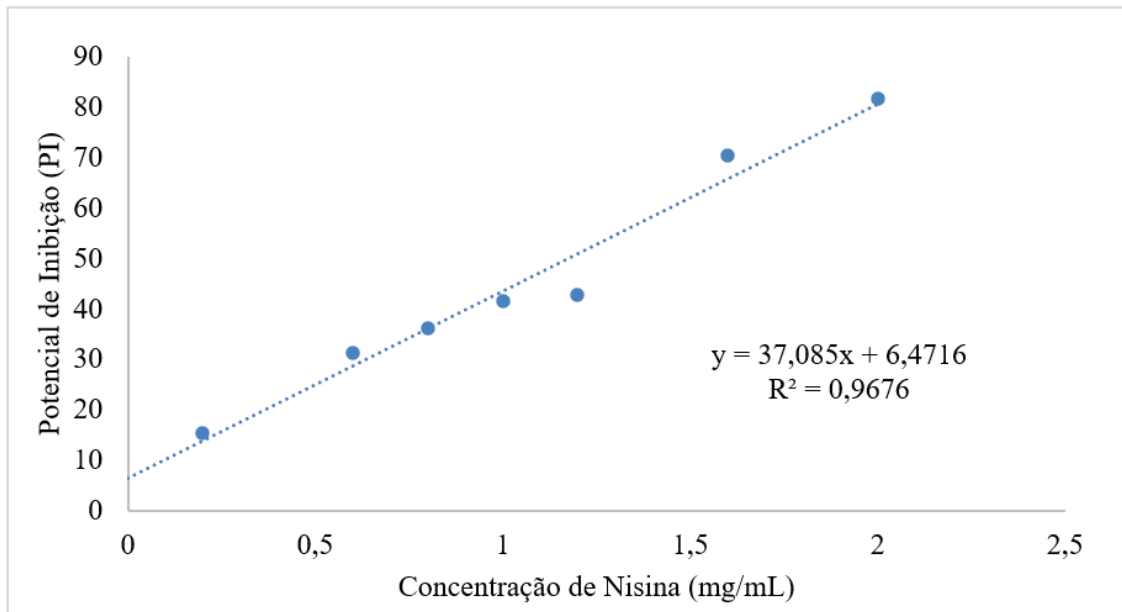
3.7.3 Testes antimicrobianos com extratos da primeira fermentação

3.7.3.1 Potencial antibacteriano dos extratos das fermentações frente ao *S. aureus*

Os extratos da primeira etapa de fermentação de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus reuteri*, foram testados frente aos seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.* e *Penicillium spp.* Entretanto, a única bactéria que foi inibida pela nisina ou pelos extratos obtidos do processo fermentativo foi a *Staphylococcus aureus*, desta forma nos itens a seguir estes resultados são apresentados.

A curva padrão de nisina (Figura 9) foi expressa através do potencial de inibição em relação às concentrações de nisina, em que o R^2 obtido foi de 0,9676. A mesma possibilitou encontrar os resultados da equivalência de nisina dos extratos das BAL's, conforme Figura 9.

Figura 9 - Curva padrão de Nisina



Fonte: elaborado pelo autor.

Os resultados de inibição do *Staphylococcus aureus* mensurados em atividade equivalente de nisina (mg/mL), obtidos dos extratos de cada ensaio do delineamento experimental para o *Lactobacillus lactis*, para o *Lactobacillus reuteri* e para o *Bifidobacterium animalis subesp. Lactis*, bem como o potencial de inibição, estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

A Tabela 6 apresenta os efeitos estimados das variáveis do delineamento experimental sobre os potenciais de inibição dos extratos de *L. lactis*, *L. reuteri* e *Bifidobacterium animalis subesp. Lactis*, sobre o crescimento de *S. aureus*.

Tabela 4 - Atividade equivalente de nisina (mg/mL) dos extratos da fermentação submersa do *L. lactis*, *L. reuteri* e *Bifidobacterium animalis* frente ao *S. aureus*

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Atividade equivalente de nisina (mg/mL)		
				(pH inicial)	(NaCl %)	(Sacarose %)
				<i>L. lactis</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>Bifidobacterium animalis subesp. lactis</i>
1	-1 (5)	-1 (1)	-1 (0,5)	0,901±0,012	0,796±0,081	0
2	+1 (7)	-1 (1)	-1 (0,5)	0	1,318±0,112	0,407±0,070
3	-1 (5)	+1 (4)	-1 (0,5)	0,567±0,422	0,792±0,120	0,010±0,083
4	+1 (7)	+1 (4)	-1 (0,5)	0,471±0,548	0,501±0,097	0
5	-1 (5)	-1 (1)	+1 (2,5)	0,931±0,499	1,288±0,028	0,280±0,051
6	+1 (7)	-1 (1)	+1 (2,5)	0,286±0,021	1,252±0,022	0,607±0,088
7	-1 (5)	+1 (4)	+1 (2,5)	0,789±0,115	0,545±0,265	0,157±0,160
8	+1 (7)	-1 (1)	+1 (2,5)	0,223±0,086	1,114±0,059	0,096±0,032
9	0 (6)	0 (2,5)	0 (1,5)	0,863±0,133	0,999±0,066	0,411±0,006
10	0 (6)	0 (2,5)	0 (1,5)	0,973±0,025	1,086±0,037	0,731±0,039
11	0 (6)	0 (2,5)	0 (1,5)	0,937±0,059	1,582±0,004	0,834±0,040

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 5 - Potencial de inibição (%) dos extratos da fermentação submersa do *L. lactis*, *L. reuteri* e *Bifidobacterium animalis* frente ao *S. aureus*

Ensaio	X ₃			Potencial de inibição (%)		
	X ₁	X ₂	X ₃	<i>L. lactis</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>
	(pH inicial)	(NaCl %)	(Sacarose %)			
1	-1 (5)	-1 (1)	-1 (0,5)	39,88±0,43	36,01±3,01	3,56±5,84
2	+1 (7)	-1 (1)	-1 (0,5)	0	55,34±4,16	21,57±2,59
3	-1 (5)	+1 (4)	-1 (0,5)	27,50±15,66	35,86±4,47	6,83±3,07
4	+1 (7)	+1 (4)	-1 (0,5)	23,94±20,32	25,05±3,60	1,10±4,87
5	-1 (5)	-1 (1)	+1 (2,5)	40,99±18,52	54,24±1,03	16,87±1,91
6	+1 (7)	-1 (1)	+1 (2,5)	17,07±0,77	52,91±0,81	28,96±3,27
7	-1 (5)	+1 (4)	+1 (2,5)	35,73±4,26	26,70±9,82	12,28±5,93
8	+1 (7)	-1 (1)	+1 (2,5)	14,73±3,17	47,79±2,20	10,01±1,20
9	0 (6)	0 (2,5)	0 (1,5)	38,47±4,93	43,52±2,45	21,70±0,23
10	0 (6)	0 (2,5)	0 (1,5)	42,54±0,92	46,76±1,38	33,59±1,45
11	0 (6)	0 (2,5)	0 (1,5)	41,22±2,20	65,14±0,13	37,38±1,50

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 6 - Efeitos estimados das variáveis do delineamento experimental sobre o potencial de inibição dos extratos da fermentação do *L. lactis*, *L. reuteri* e *Bifidobacterium animalis* sobre o crescimento de *S. aureus*

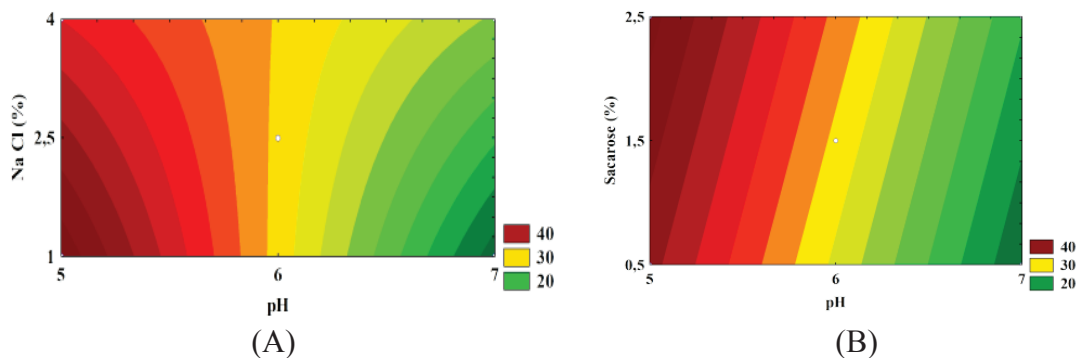
Fator	<i>Lactobacillus lactis</i>		<i>Lactobacillus reuteri</i>		<i>Bifidobacterium animalis subesp. Lactis</i>	
	Efeitos	p	Efeitos	p	Efeitos	pP
pH x ₁	-22,439	0,003	7,0710	0,095338	5,7842	0,375948
NaCl (%) x ₂	0,641	0,922	-15,7723	0,001343	-9,9644	0,134568
Sacarose (%) x ₃	3,949	0,550	7,3452	0,084334	8,40179	0,202212
X ₁ .X ₂	10,158	0,136	-1,9297	0,633038	-9,16065	0,166515
X ₁ .X ₃	-0,021	0,997	2,8116	0,488660	-0,83126	0,896777
X ₂ .X ₃	-4,441	0,502	-0,5553	0,890301	-1,80775	0,778073
X ₁ .X ₂ .X ₃	-8,704	0,079	13,1418	0,000010	-	-

Fonte: elaborado pelo autor.

*Intervalo de confiança utilizado na análise estatística para definição de variáveis significativas = 90%

Ao comparar os PI dos extratos da fermentação da bactéria *Lactobacillus lactis*, verificou-se que o pH do processo fermentativo apresentou efeito negativo -22,439 e significativo ($p=0,003$). Avaliando-se os ensaios 1 a 8, verifica-se que quando o nível do pH passa do nível inferior para o superior, ou seja, quando se aumenta o pH, há uma redução no potencial de inibição dos extratos da *L. lactis*, indicando que o pH nos níveis inferiores possibilitaram maior produção de compostos antimicrobianos. Além disso, a interação das três variáveis foi significativa em um intervalo de confiança de 90%, sendo que os efeitos podem ser observados nas superfícies de resposta da Figura 10. As maiores produções de compostos antimicrobianos foram obtidas em pH 5, concentração de NaCl no nível inferior (1%), sacarose não teve efeito significativo.

Figura 10 - Superfícies de resposta do PI da BAL *Lactobacillus lactis* em relação a concentração de NaCl e pH (A) e sacarose e pH (B)



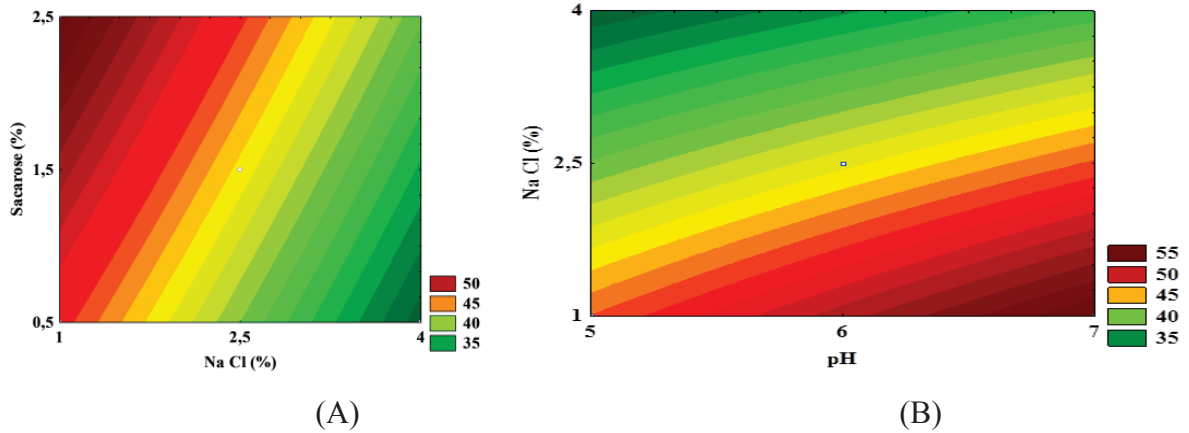
Fonte: elaborado pelo autor.

As três variáveis apresentaram efeito significativo a 90 % de intervalo de confiança para a produção de antibacterianos pela *Lactobacillus reuteri*, bem como a interação dos fatores, devendo esta ser avaliada em detrimento dos fatores individuais.

A variável NaCl apresentou influência significativa sobre o potencial de inibição dos extratos da bactéria ácido láctica *Lactobacillus reuteri*, sendo o efeito de -15,772% ($p=0,001$). Os ensaios que apresentaram os maiores PI foram o 2 ($55,33\pm 4,16$) e 5 ($54,24\pm 1,03$) (menores concentrações de NaCl) em comparação com os extratos dos ensaios 4 ($25,05\pm 3,60$) e 7 ($26,70\pm 9,82$) que tiveram menores PI, contendo maior concentração de NaCl.

As superfícies de resposta da influência das variáveis sobre a produção de compostos antibacterianos pela *Lactobacillus reuteri* estão apresentadas na Figura 11.

Figura 11 - Superfícies de Resposta para PI da BAL *Lactobacillus Reuteri* em relação as concentrações de Sacarose e NaCl (A) e NaCl e pH (B)



Fonte: elaborado pelo autor.

A produção de compostos antimicrobianos pela bactéria ácido láctica *Bifidobacterium animalis subesp. lactis* não foi influenciada por nenhuma das variáveis, mas mostrou uma tendência que quanto maior a concentração de sacarose, pH próximo ao 7 e menor concentração de NaCl, obtendo assim maior PI.

3.7.3.2 Potencial antifúngico dos extratos das fermentações de *Lactobacillus lactis*

A Tabela 7 apresenta os resultados das medições dos 8 raios médios (originados de quintuplicatas) para os extratos de cada experimento do delineamento experimental e para o controle.

Tabela 7 - Raio(cm) do crescimento micelial do fungo *Penicillium* spp. para extratos da fermentação obtidos com o *Lactobacillus lactis*

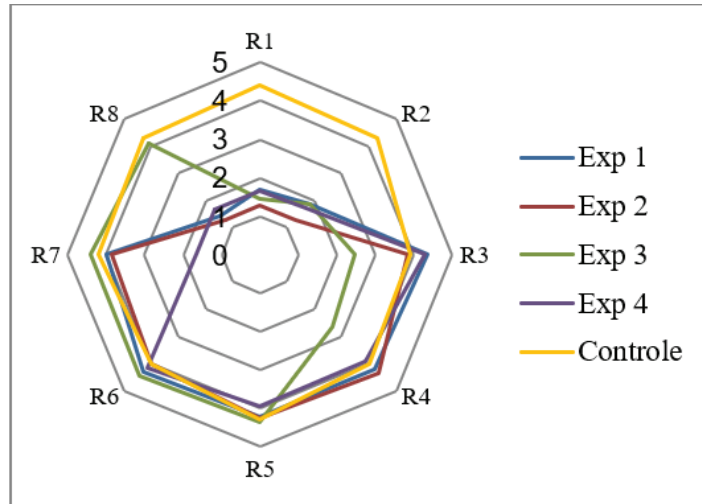
Experimento	Raios (cm)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1,70 ± 0,27	1,85 ± 1,09	4,35 ± 0,90	4,20 ± 0,49	4,20 ± 0,32	4,30 ± 0,43	4,00 ± 0,29	1,45 ± 1,36
2	1,30 ± 0,22	1,30 ± 0,37	3,85 ± 1,19	4,35 ± 0,51	4,25 ± 0,17	4,00 ± 0,40	3,85 ± 1,42	1,30 ± 0,15
3	1,45 ± 0,78	1,85 ± 0,61	2,45 ± 0,80	2,65 ± 0,78	4,35 ± 0,21	4,45 ± 0,51	4,40 ± 0,25	4,10 ± 0,52
4	1,65 ± 0,67	1,70 ± 1,02	4,30 ± 0,41	3,90 ± 0,88	3,95 ± 1,03	4,15 ± 0,66	1,65 ± 1,36	1,65 ± 1,11
5	2,10 ± 0,62	3,35 ± 0,63	1,80 ± 1,17	3,95 ± 0,77	4,35 ± 0,33	3,85 ± 0,84	3,00 ± 0,91	2,50 ± 0,29
6	3,00 ± 0,55	2,35 ± 0,67	3,90 ± 1,06	3,85 ± 0,91	4,15 ± 0,53	3,75 ± 0,95	3,25 ± 0,73	3,60 ± 1,09
7	1,50 ± 0,76	2,00 ± 1,26	3,20 ± 1,16	3,35 ± 0,85	4,00 ± 0,55	4,00 ± 0,15	4,00 ± 0,50	4,00 ± 0,00
8	2,55 ± 0,66	4,00 ± 0,65	4,10 ± 0,55	3,08 ± 0,39	3,75 ± 0,32	3,85 ± 0,98	1,30 ± 0,55	1,95 ± 0,87
9	4,00 ± 0,63	4,00 ± 0,41	4,15 ± 0,33	3,00 ± 0,63	3,75 ± 0,48	3,50 ± 1,11	4,00 ± 1,11	4,00 ± 0,63
10	3,80 ± 0,95	1,50 ± 0,68	1,10 ± 0,48	1,10 ± 0,62	1,55 ± 0,61	1,25 ± 0,95	1,00 ± 0,58	1,00 ± 0,50
11	3,50 ± 0,41	3,50 ± 0,63	1,50 ± 0,41	1,75 ± 0,29	1,00 ± 0,42	1,50 ± 0,05	1,45 ± 1,22	2,45 ± 0,41
Controle	4,40 ± 0,24	4,30 ± 0,20	3,90 ± 0,26	4,00 ± 0,21	4,30 ± 0,00	4,00 ± 0,41	4,20 ± 0,68	4,30 ± 0,25

*resultados de média e desvio padrão

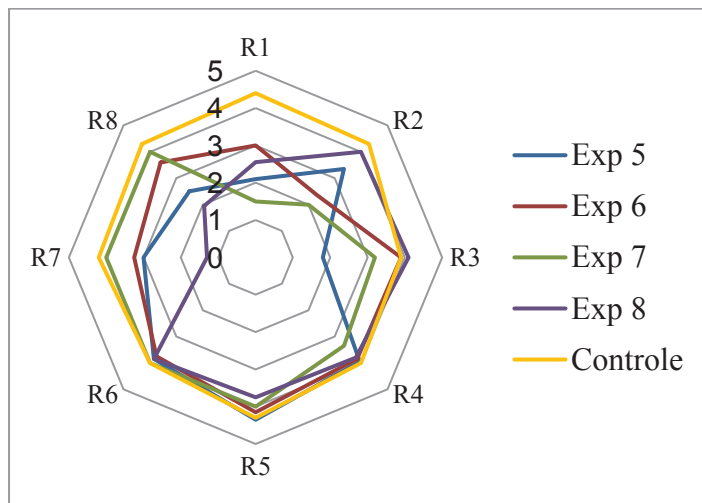
Fonte: elaborado pelo autor.

A Figura 12 apresenta o crescimento micelial do fungo *Penicillium* spp. após adição dos extratos da fermentação com o *Lactobacillus lactis*, em comparação com o controle.

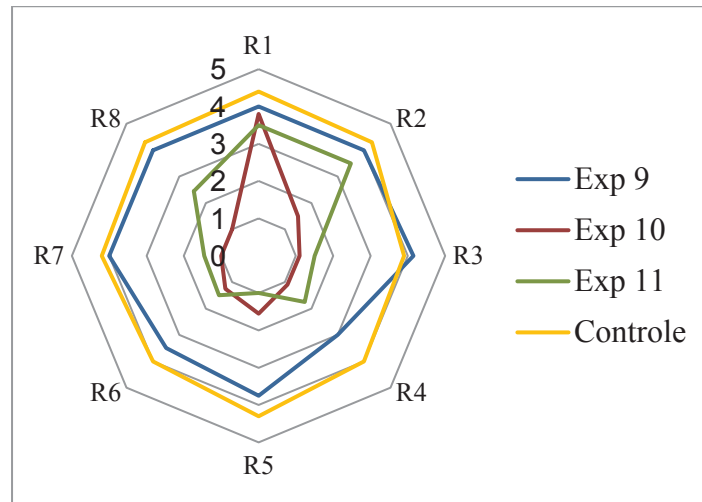
Figura 12 – Crescimento micelial do fungo *Penicillium* spp. após adição dos extratos da fermentação obtidos com o *L. lactis* (a- extratos dos experimentos 1 a 4 e controle; b- extratos dos experimentos 5 a 8 e controle; c- extratos dos experimentos 9 a 11 e controle)



(a)



(b)



(c)

Fonte: elaborado pelo autor.

Com os gráficos do crescimento micelial do experimento comparados com o crescimento micelial do controle verificou-se que todos os extratos apresentaram inibição sendo todos menores do que o crescimento micelial do controle. Observou-se também que os experimentos 10 e 11 se destacam como os melhores para esse microrganismo, sendo esse extrato obtido em condições de cultivo de pH 6, NaCl 2,5% e Sacarose 1,5%.

A Tabela 8 apresenta análise de variância dos resultados de PI em função das condições do processo fermentativo utilizado para o microrganismo *Lactobacillus lactis*, frente ao fungo *Penicillium* spp. verificou-se que nenhuma das condições experimentais utilizadas no ensaio diferenciou-se para a produção de compostos antifúngicos a partir desta BAL.

Tabela 8 - Análise de variância do PI em função das variáveis do processo fermentativo do *Lactobacillus lactis* frente ao fungo *Penicillium* spp.

Fatores	SQ	gl	MQ	F	P
pH X ₁	51,51	1	51,5098	0,61367	0,804983
NaCl X ₂	80,48	1	80,4841	0,095886	0,757629
Sacarose X ₃	241,81	1	241,8099	0,288083	0,5929941
X ₁ .X ₂	189,23	1	189,2270	0,225438	0,636221
X ₁ .X ₃	413,51	1	413,5093	0,492639	0,484789
X ₂ .X ₃	0,36	1	0,3577	0,000426	0,9835581
X ₁ .X ₂ .X ₃	70,11	1	70,1106	0,083527	0,773321
Erro	67150,01	80	839,3752		
Total SQ	68197,02	87			

Fonte: elaborado pelo autor.

*3.7.3.3 Potencial antifúngico dos extratos das fermentações de *Lactobacillus reuteri**

A Tabela 9 apresenta os resultados das medições dos 8 raios médios (originados de quintuplicatas) para os extratos de cada experimento e do controle.

Tabela 9 - Raio(cm) do crescimento micelial do fungo *Penicillium* spp. para extratos da fermentação obtidos com o *Lactobacillus reuteri*

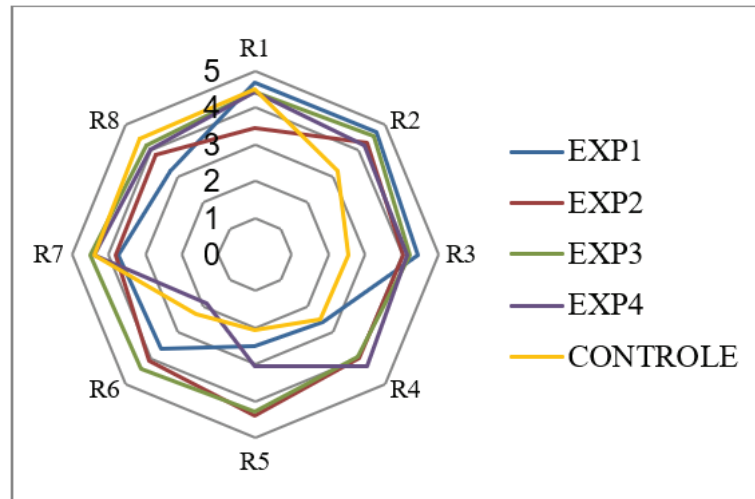
Experimentos	Raios							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	4,70 ± 0,53	4,70 ± 0,55	4,45 ± 1,59	2,60 ± 1,45	2,50 ± 0,85	3,65 ± 0,64	3,75 ± 1,06	3,25 ± 1,32
2	3,45 ± 0,37	4,30 ± 0,46	4,05 ± 0,76	4,00 ± 0,38	4,40 ± 0,29	4,10 ± 0,33	3,80 ± 0,26	3,85 ± 0,38
3	4,45 ± 0,58	4,55 ± 0,21	4,20 ± 0,37	3,95 ± 1,15	4,30 ± 0,26	4,40 ± 0,36	4,50 ± 0,17	4,20 ± 0,29
4	4,45 ± 0,41	4,20 ± 0,15	4,15 ± 0,65	4,30 ± 0,67	3,05 ± 0,53	1,90 ± 0,83	4,40 ± 1,46	4,05 ± 0,80
5	4,70 ± 0,42	4,00 ± 0,23	4,20 ± 0,25	4,15 ± 0,50	4,20 ± 0,38	4,35 ± 0,10	4,55 ± 0,10	4,40 ± 0,70
6	4,45 ± 0,61	4,35 ± 0,29	4,55 ± 0,24	4,55 ± 0,10	4,25 ± 0,21	4,30 ± 0,44	4,30 ± 0,77	3,85 ± 0,49
7	4,35 ± 1,42	4,30 ± 0,87	4,30 ± 0,27	4,35 ± 0,13	4,75 ± 0,13	4,55 ± 0,21	4,60 ± 0,10	4,45 ± 0,10
8	3,70 ± 0,17	4,55 ± 0,29	4,55 ± 0,25	4,35 ± 0,88	4,45 ± 0,06	4,45 ± 0,32	4,20 ± 0,21	4,65 ± 0,14
9	4,30 ± 0,24	4,40 ± 0,25	4,55 ± 0,10	4,30 ± 0,44	4,30 ± 1,13	4,65 ± 0,22	4,45 ± 0,29	4,35 ± 0,26
10	4,50 ± 0,42	1,80 ± 0,45	4,25 ± 0,85	4,10 ± 0,90	4,00 ± 0,46	3,70 ± 1,09	4,50 ± 0,13	4,60 ± 0,13
11	2,00 ± 1,54	4,55 ± 0,36	4,50 ± 0,26	4,50 ± 0,47	4,45 ± 1,35	3,00 ± 1,36	4,40 ± 1,33	4,75 ± 0,31
Controle	4,50 ± 0,77	3,20 ± 0,64	2,55 ± 0,70	2,50 ± 0,38	2,05 ± 0,42	2,30 ± 1,07	4,40 ± 0,08	4,45 ± 1,57

*resultados de média e desvio padrão

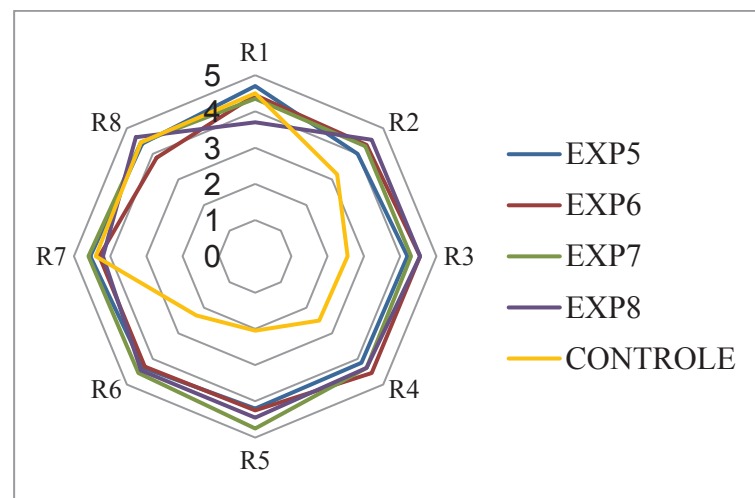
Fonte: elaborado pelo autor.

A Figura 13 apresenta o crescimento micelial do fungo *Penicillium* spp. após adição dos extratos da fermentação com o *Lactobacillus reuteri*, em comparação com o controle.

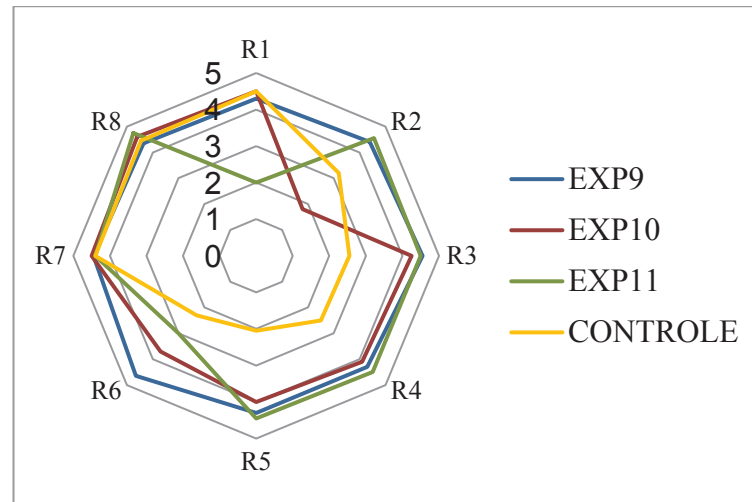
Figura 13 - Crescimento micelial do fungo *Penicillium* spp. após adição dos extratos da fermentação obtidos com o *L. reuteri* (a- extratos dos experimentos 1 a 4 e controle; b- extratos dos experimentos 5 a 8 e controle; c- extratos dos experimentos 9 a 11 e controle)



(a)



(b)



(c)

Fonte: elaborado pelo autor.

Com os gráficos de crescimento micelial do experimento comparados com crescimento micelial do controle podemos perceber que todos os experimentos tiveram uma inibição menor do que o controle, ficando todos com crescimento micelial maior do que o controle.

A Tabela 10 apresenta Análise de variância dos resultados de potencial de inibição em função das condições do processo fermentativo utilizado para o microrganismo *Lactobacillus reuteri*. Verificou-se que a sacarose foi o único fator que apresentou significância para a produção de compostos antifúngicos a partir desta bactéria láctica.

Tabela 10 - Análise de variância do PI em função das variáveis do processo fermentativo do *Lactobacillus reuteri* frente ao fungo *Penicillium* spp.

Fatores	SQ	gl	MQ	F	P
pH X ₁	85,73	1	85,734	0,265155	0,608020
NaCl X ₂	357,37	1	357,373	1,105274	0,296277
Sacarose X ₃	2554,30	1	2554,304	7,899876	0,006214
X ₁ .X ₂	771,60	1	771,605	2,386397	0,126342
X ₁ .X ₃	14,88	1	14,884	0,046034	0,830660
X ₂ .X ₃	65,64	1	65,640	0,203009	0,653521
X ₁ .X ₂ .X ₃	466,77	1	466,773	1,443623	0,233099
Erro	25866,78	80	323,335		
Total SQ	30183,09	87			

Fonte: elaborado pelo autor.

A Tabela 11 apresenta os efeitos estimados das variáveis sobre o PI do fungo *Penicillium* spp., demonstrando que a sacarose foi o único fator que influenciou nos resultados dessa

fermentação, com efeito negativo, o que significa que quanto menor a quantidade de sacarose adicionada ao cultivo, melhor será a produção de compostos com atividade antifúngica.

Tabela 11 - Efeitos estimados das variáveis do delineamento experimental sobre o potencial de inibição dos extratos da fermentação *L. reuteri* sobre o crescimento do fungo *Penicillium* spp.

Fatores	Efeito	P
pH X ₁	2,3148	0,608020
NaCl X ₂	-4,7261	0,296277
Sacarose X ₃	-12,6350	0,006214
X ₁ .X ₂	6,9444	0,126342
X ₁ .X ₃	-0,9645	0,830660
X ₂ .X ₃	2,0255	0,653521
X ₁ .X ₂ .X ₃	-5,4012	0,233099

Fonte: elaborado pelo autor.

3.7.3.4 Potencial antifúngico dos extratos das fermentações de *Bifidobacterium animalis subesp. lactis*

A Tabela 12 apresenta os resultados das medições dos 8 raios médios (originados de quintuplicatas) para os extratos de cada experimento e do controle.

Tabela 12 - Raio(cm) do crescimento micelial do fungo *Penicillium* spp. para extratos da fermentação obtidos com o *Bifidobacterium animalis subesp. lactis*

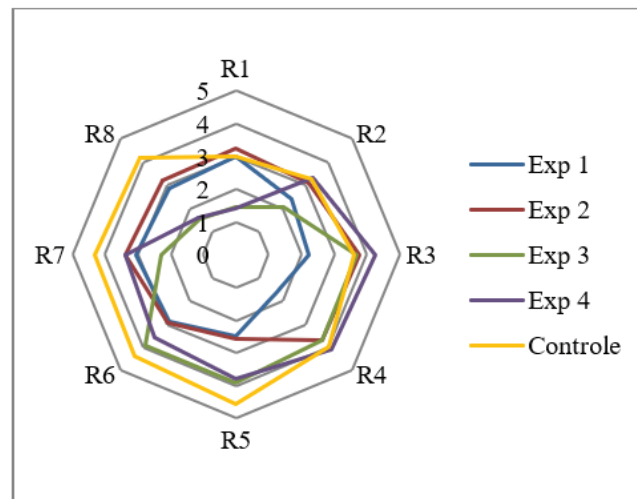
Experimentos	Raios							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	3,00±0,67	2,43±0,67	2,23±0,49	1,70±0,22	2,50±0,45	2,88±1,01	3,05±0,48	2,88±0,54
2	3,25±0,82	3,13±0,43	3,78±0,79	3,70±0,64	2,57±0,85	2,95±0,62	3,38±0,39	3,20±0,43
3	1,45±0,37	2,05±0,82	3,70±0,73	3,70±0,90	3,90±0,33	3,93±0,39	2,30±1,23	1,58±0,78
4	1,43±0,51	3,33±0,50	4,28±0,34	4,10±0,48	3,80±1,22	3,55±1,16	3,38±0,92	1,60±0,35
5	2,15±0,35	2,98±0,76	4,03±0,59	3,70±0,61	2,40±0,36	1,93±0,95	2,83±0,97	2,15±0,33
6	2,28±0,79	4,38±0,10	4,03±0,56	4,25±0,10	4,08±0,19	3,55±1,12	3,50±1,49	3,70±1,21
7	3,84±0,48	3,92±0,44	3,82±0,50	4,28±0,43	4,32±0,40	4,50±0,55	4,66±0,34	4,68±0,28
8	1,65±0,37	2,13±0,49	2,78±1,22	3,03±0,54	2,20±0,76	2,38±0,64	2,65±0,62	2,20±0,54
9	2,30±0,66	3,77±0,55	4,23±0,54	2,95±1,04	3,90±1,12	3,80±1,34	3,88±1,06	3,55±1,32
10	3,05±0,52	3,93±0,73	4,30±0,18	4,12±0,40	3,36±1,00	4,10±0,48	4,33±0,68	3,47±1,01
11	2,48±0,29	2,40±0,83	3,20±0,34	3,65±0,19	3,64±0,69	3,80±0,49	3,68±0,86	3,20±0,45
Controle	3,03±0,29	3,28±0,56	3,60±0,91	4± 1,08	4,54±0,15	4,40±0,67	4,34±0,86	4,18±0,39

*resultados de média e desvio padrão

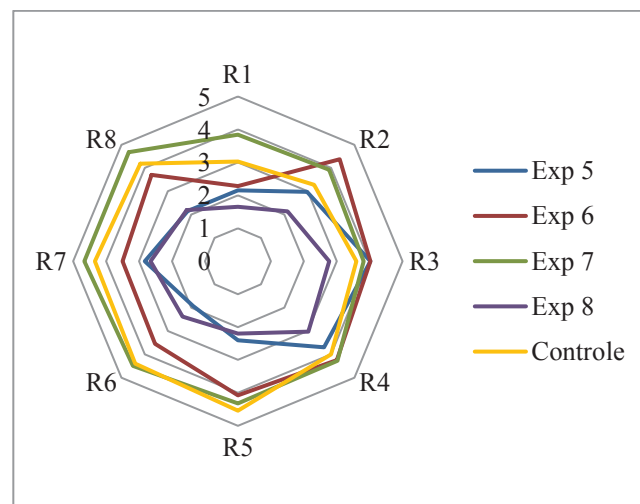
Fonte: elaborado pelo autor.

A Figura 14 apresenta o crescimento micelial do fungo *Penicillium* spp. após adição dos extratos da fermentação com o *Bifidobacterium animalis subesp. lactis* frente ao fungo *Penicillium* spp., em comparação com o controle.

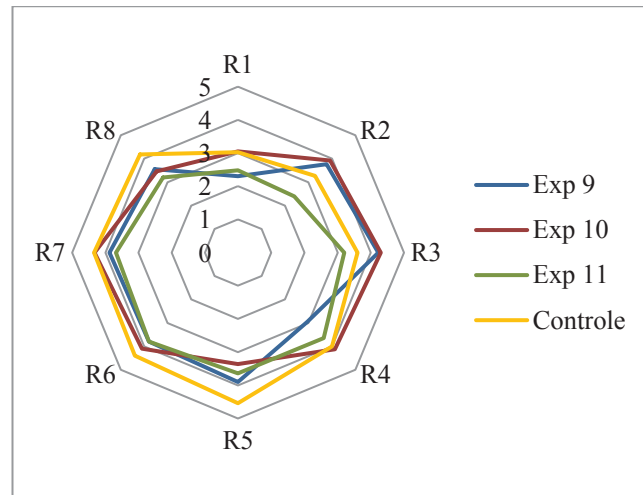
Figura 14 - Crescimento micelial do fungo *Penicillium* spp. após adição dos extratos da fermentação obtidos com o *Bifidobacterium animalis subesp. lactis* (a- extratos dos experimentos 1 a 4 e controle; b- extratos dos experimentos 5 a 8 e controle; c- extratos dos experimentos 9 a 11 e controle)



(a)



(b)



(c)

Fonte: elaborado pelo autor.

Com os gráficos do crescimento micelial do experimento comparados com o crescimento micelial do controle podemos perceber que os experimentos de 1,2,3,4,5,8 e 11 tiveram uma inibição, mesmo que mínima, ficando todos menores do que o crescimento micelial do controle. Já nos experimentos 6,7,9 e 10 as inibições foram menores e os raios encontram-se em alguns pontos maiores que o raio do controle.

Ao observar as tabelas 13 e 14 para o PI percebemos que para o *Bifidobacterium*, nenhuma variável isolada apresentou efeito significativo (tabela 13), mas tivemos interação de segunda ordem entre o pH e o NaCl e entre o pH e a sacarose, também tivemos a interação de terceira ordem entre os três fatores. Podemos perceber também que as melhores condições estão no experimento 1 e no 8, sendo o 8 o que apresenta maior potencial de inibição, com pH 7, NaCl 4% e Sacarose 2,5%.

Tabela 13 - Análise de variância do PI em função das variáveis do processo fermentativo do *Bifidobacterium* frente ao fungo *Penicillium* spp.

Fatores	SQ	Gl	MQ	F	P
pH X ₁	5,54	1	5,543	0,01734	0,895573
NaCl X ₂	68,47	1	68,474	0,21417	0,644772
Sacarose X ₃	1074,22	1	1074,220	3,35998	0,070519
X ₁ .X ₂	6378,08	1	6378,080	19,94954	0,000026
X ₁ .X ₃	2462,41	1	2462,409	7,70199	0,006865
X ₂ .X ₃	1,16	1	1,164	0,00364	0,952037
X ₁ .X ₂ .X ₃	4140,17	1	4140,173	12,94975	0,000553
Erro	25576,85	80	319,711		
Total SQ	39706,91	87			

Fonte: elaborado pelo autor.

Tabela 14 - Efeitos estimados das variáveis do delineamento experimental sobre o PI dos extratos da fermentação *Bifidobacterium* sobre o crescimento do fungo *Penicillium* spp.

Fatores	Efeito	P
pH X ₁	-0,58859	0,895573
NaCl X ₂	-2,06872	0,644772
Sacarose X ₃	-8,19382	0,070519
X ₁ .X ₂	19,96572	0,000026
X ₁ .X ₃	12,40567	0,006865
X ₂ .X ₃	0,26972	0,952037
X ₁ .X ₂ .X ₃	16,08604	0,000553

Fonte: elaborado pelo autor.

3.7.4 Testes antifúngicos com extratos da segunda fermentação

3.7.4.1 Potencial antifúngico dos extratos das fermentações de *Lactobacillus lactis*

A Tabela 15 apresenta os resultados das medições dos 8 raios médios para os extratos de cada experimento (T24h, 48h e 72h) e do controle (T0h).

Tabela 15 - Raio(cm) do crescimento micelial do fungo *Penicillium* spp. para extratos da fermentação obtidos com o *Lactobacillus lactis*

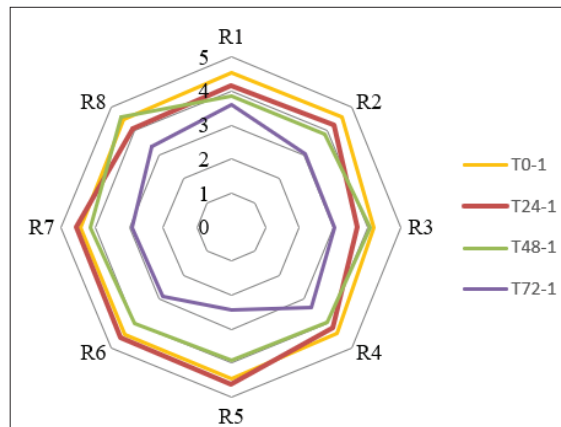
Experimento	Raios (cm)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
T 0h 1	4,53 ± 0,15	4,60 ± 0,20	4,20 ± 0,20	4,40 ± 0,10	4,47 ± 0,21	4,43 ± 0,12	4,43 ± 0,06	4,47 ± 0,15
T 24h 1	4,17 ± 0,35	4,27 ± 0,35	3,70 ± 0,82	4,20 ± 0,53	4,60 ± 0,10	4,60 ± 0,00	4,57 ± 0,15	4,10 ± 0,26
T 48h 1	3,87 ± 0,60	3,87 ± 0,57	4,07 ± 0,67	3,97 ± 0,45	3,90 ± 0,62	4,00 ± 0,56	4,13 ± 0,47	4,57 ± 0,06
T 72h 1	3,60 ± 0,80	3,07 ± 0,40	3,03 ± 1,00	3,33 ± 0,55	2,43 ± 0,86	2,87 ± 1,03	2,93 ± 1,12	3,33 ± 1,16
T 0h 2	3,83 ± 1,08	4,27 ± 0,32	3,73 ± 0,70	4,43 ± 0,47	4,33 ± 0,55	4,43 ± 0,38	4,43 ± 0,21	4,57 ± 0,06
T 24h 2	4,13 ± 0,32	3,37 ± 0,15	4,17 ± 0,29	4,33 ± 0,21	4,40 ± 0,20	3,90 ± 0,79	4,43 ± 0,15	4,20 ± 0,26
T 48h 2	3,53 ± 1,06	3,87 ± 0,70	4,37 ± 0,35	3,97 ± 0,67	3,40 ± 0,85	3,43 ± 1,02	3,43 ± 0,85	3,17 ± 1,06
T 72h 2	2,83 ± 0,61	3,50 ± 0,89	3,57 ± 1,01	4,23 ± 0,38	2,87 ± 0,23	2,60 ± 0,20	3,73 ± 0,45	3,23 ± 0,90

*resultados de média e desvio padrão

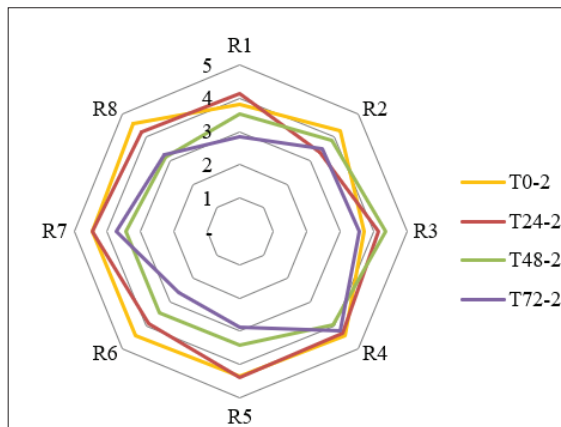
Fonte: elaborado pelo autor.

A Figura 15 apresenta o crescimento micelial do fungo *Penicillium* spp. após adição dos extratos da fermentação com o *Lactobacillus lactis* frente ao fungo *Penicillium* spp., em comparação com o controle.

Figura 15 - Crescimento micelial do fungo *Penicillium* spp. após adição dos extratos da fermentação obtidos com o *Lactobacillus lactis* (a- extratos do experimento 1 dos tempos 0 a 72h; b- extratos do experimento 2 dos tempos 0 a 72h)



(a)



(b)

Fonte: elaborado pelo autor.

Com os gráficos dos crescimento micelial do experimento comparados com o crescimento micelial do controle (T0h) podemos perceber que quanto maior o tempo de fermentação de cada experimento, menor é o crescimento do fungo *Penicillium* spp., sendo os menores raios de crescimento os dos experimentos com 72h de fermentação em ambos os testes.

3.7.4.2 Potencial antifúngico dos extratos das fermentações de Bifidobacterium animalis subesp. lactis

A Tabela 16 apresenta os resultados das medições dos 8 raios médios para os extratos de cada experimento (T24h, 48h e 72h) e do controle (T0h).

Tabela 16 - Raio(cm) do crescimento micelial do fungo *Penicillium* spp. para extratos da fermentação obtidos com o *Bifidobacterium animalis subesp. lactis*

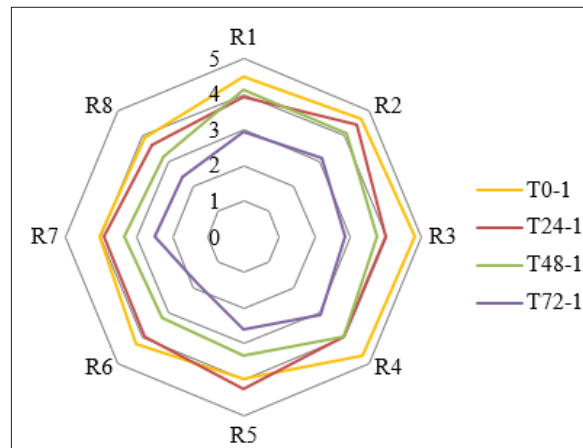
Experimento	Raios (cm)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
T 0h 1	4,50 ± 0,10	4,67 ± 0,21	4,80 ± 0,10	4,73 ± 0,12	3,97 ± 0,84	4,27 ± 0,15	4,03 ± 0,38	3,93 ± 0,81
T 24h 1	3,93 ± 0,75	4,47 ± 0,21	3,97 ± 0,78	3,97 ± 0,84	4,27 ± 0,42	3,93 ± 0,59	3,90 ± 0,35	3,63 ± 0,60
T 48h 1	4,13 ± 0,99	4,10 ± 1,04	3,73 ± 1,10	3,97 ± 0,64	3,33 ± 1,12	3,23 ± 1,23	3,33 ± 1,10	3,20 ± 0,20
T 72h 1	2,93 ± 0,70	3,13 ± 1,10	2,83 ± 1,45	3,07 ± 1,26	2,60 ± 0,75	1,83 ± 0,65	2,50 ± 0,72	2,40 ± 0,52
T 0h 2	4,40 ± 0,26	4,23 ± 0,25	4,30 ± 0,36	4,00 ± 0,79	4,53 ± 0,12	4,53 ± 0,15	4,57 ± 0,06	4,53 ± 0,12
T 24h 2	3,07 ± 1,25	4,27 ± 0,32	4,47 ± 0,12	4,10 ± 0,61	3,30 ± 1,15	4,13 ± 0,64	3,27 ± 0,46	2,83 ± 0,85
T 48h 2	3,47 ± 1,43	3,40 ± 1,45	3,10 ± 1,15	2,73 ± 0,61	3,30 ± 1,28	4,40 ± 0,10	4,03 ± 0,81	2,83 ± 0,15
T 72h 2	2,83 ± 0,59	2,33 ± 0,15	3,07 ± 1,10	3,70 ± 0,89	3,60 ± 0,30	3,33 ± 0,75	2,87 ± 0,81	3,23 ± 1,05

*resultados de média e desvio padrão

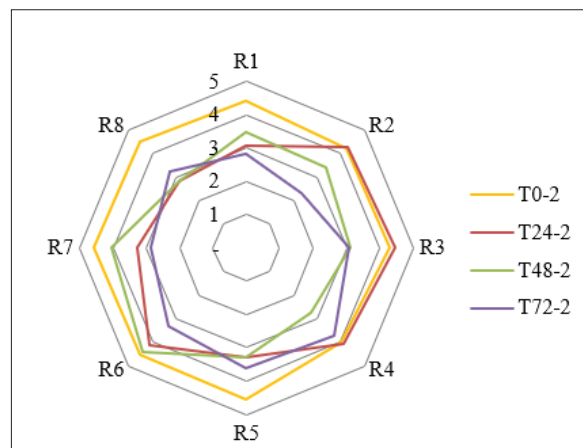
Fonte: elaborado pelo autor.

A Figura 15 apresenta o crescimento micelial do fungo *Penicillium* spp. após adição dos extratos da fermentação com o *Bifidobacterium animalis subesp. lactis* frente ao fungo, em comparação com o controle.

Figura 16 - Crescimento micelial do fungo *Penicillium* spp. após adição dos extratos da fermentação obtidos com o *Bifidobacterium animalis subesp. lactis* (a- extratos do experimento 1 dos tempos 0 a 72h; b- extratos do experimento 2 dos tempos 0 a 72h)



(a)



(b)

Fonte: elaborado pelo autor.

Com os gráficos do crescimento micelial do experimento comparados com o crescimento micelial do controle (T0h) podemos perceber que quanto maior o tempo de fermentação de cada experimento, menor é o crescimento do fungo *Penicillium* spp., sendo os menores raios de crescimento os dos experimentos com 72h de fermentação em ambos os testes.

3.7.5 Discussão

Neste estudo os extratos da fermentação de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus reuteri*, foram testados em relação ao seu potencial antibacteriano e antifúngico frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.* e *Penicillium spp.*

O potencial antimicrobiano somente foi observado nos extratos de *Lactobacillus lactis* e *Lactobacillus reuteri* em relação ao *Staphylococcus aureus*. E o potencial antifúngico frente ao *Penicillium spp.* foi observado nos extratos de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* e *Lactobacillus lactis*.

As melhores condições de cultivo das BAL's, que propiciaram a produção de extratos com maior atividade antimicrobiana foram: pH 5, NaCl 1% e Sacarose 1,5 a 2,5% para *Lactobacillus lactis* frente ao *Staphylococcus aureus*; as menores concentrações de NaCl para *Lactobacillus reuteri* frente ao *Staphylococcus aureus*; pH 6, NaCl 2,5% e Sacarose 1,5% para *Lactobacillus lactis* frente ao *Penicillium spp.*; pH 7, NaCl 4% e Sacarose 2,5% para *Bifidobacterium animalis* subesp. *Lactis* frente ao *Penicillium spp.*

Um estudo realizado por Garnier et al. (2019) com 430 extratos de fermentação de BAL com dois substratos lácteos diferentes mostrou que com o primeiro substrato apenas 81 (18,9%) deles apresentaram atividade antifúngica frente ao *P. commune*, e com o segundo substrato o número caiu para 8 (1,8%), neste estudo também foi identificado que as BAL com maior potencial antifúngico eram principalmente de espécies de *Lactobacillus*.

Castro et al. (2015) perceberam que com o tempo de fermentação de 72 h houve a maior atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* das bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus spp.* Miao et al. (2015) obteve resultados de inibição de fungos (*A. flavus*, *A. niger*, *R. nigricans* e *P. glaucum*) e bactérias (*E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *S. dysenteriae*, *S. aureus* e *B. thuringiensis*) utilizando o tempo de fermentação de 72h para o *Lactobacillus spp.* assim como o encontrado em nosso estudo.

Dez cepas de três bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus sucicola*, *Weissella paramesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*), tiveram efeitos promissores frente a inibição de *P. digitatum*, quando cultivados por 48h e o efeito aumentou com o prolongamento do tempo de fermentação das BAL, provavelmente pelo acúmulo de substâncias antifúngicas junto com a fermentação das BAL (MA et al., 2019).

Na segunda etapa de fermentação desse estudo obtivemos uma clara comprovação de que quanto maior o tempo de fermentação, maior se torna o potencial de inibição dos extratos de fermentação das bactérias ácido lácticas. O tempo de 72h mostrou-se nos quatro testes feitos na segunda etapa ser o mais eficaz no controle do *Penicillium* spp. Em geral, quanto maior o tempo de incubação e quanto maior a concentração de células, mais significativa a atividade antifúngica (GARNIER et al., 2019).

Em um estudo com *Lactobacillus curvatus*, Ahmadova et al. (2013) observaram inibição do crescimento de fungos (*Cladosporium* e *Fusarium*) e maior crescimento da bactéria ácido láctica em fermentação com pH 7,0 e 9,0. Assim como o encontrado nesse estudo para o *Bifidobacterium animalis* subesp. *Lactis* que apresentou melhores resultados em fermentação com pH 7,0.

Em nosso teste o *Lactobacillus lactis* apresentou melhores resultados frente ao fungo quando cultivado em pH 6,0. A atividade antifúngica de 36 culturas de BAL foi avaliada após fermentação em pH 6,5 e temperatura de 37°C, 83% das cepas inibiram *Penicillium* spp. 62 % apresentaram resultados contra *P. digitatum* e 52% tiveram ação frente *A. niger* (GEREZ et al., 2013).

Miao et al (2015) realizou um estudo com experimentos com pH inicial de 6,84 e 3,44%, de glicose e observou que os extratos apresentaram amplo espectro antibacteriano contra *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *S. dysenteriae*, *S. aureus* e *B. thuringiensis* e um efeito menor como antifúngico contra *A. flavus*, *A. niger*, *R. nigricans* e *P. glaucum*. Extratos de *Lactobacillus* spp. tiveram uma ampla ação antimicrobiana frente a fungos e bactérias, um aumento dessa atividade foi observado quando a temperatura passou de 28 para 37°C e também o aumento do pH de 5,0 para 7,0 causou um aumento gradual da produção de BAL (SHEHATA et al., 2019).

Nesse estudo para *Lactobacillus reuteri* e *Bifidobacterium animalis* subesp. *Lactis* o pH 7 mostrou uma maior tendência na produção de compostos antimicrobianos, o mesmo foi observado por (LEE; KIM; KIM, 2012) que avaliou o efeito do pH inicial de 4,5 até 8,5 encontrando a produção máxima de bacteriocinas no pH de 6,8.

Em um estudo com *Lactococcus lactis* subsp. *Hordniae* onde e *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* frente a *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, o pH ideal para produção de bacteriocina e para a maior contagem de UFC por cepa foi estimado entre 5,0 e 7,0 (BARMAN; GHOSH; MANDAL, 2018). O que se manteve em nosso estudo onde para produção de extratos com efeitos antibacterianos o pH ideal foi de 5,0 e para produção de extratos com efeitos antifúngicos foi de 6,0 e 7,0.

Barbosa et al., 2018 em um estudo com *Lactobacillus sakei* subsp. *Sakei*, contra *Listeria monocytogenes* concluíram que o NaCl teve um efeito negativo na produção de bacteriocinas, enquanto que a glicose teve um efeito positivo. Para Engelhardt et al., 2018, o aumento da concentração de NaCl na fermentação de *Lactobacillus plantarum* resultou na diminuição da atividade antibacteriana do sobrenadante frente a *Listeria monocytogenes*.

Em nosso estudo a Sacarose também teve uma influência positiva na produção de extratos com potencial antimicrobiano, já o NaCl se comportou de formas diferentes, nos ensaios de *Lactobacillus lactis* e *Lactobacillus reuteri* frente ao *Staphylococcus aureus* teve efeito negativo, corroborando com os resultados citados nos estudos acima. Porém, o maior efeito antifúngico sobre o *Penicillium* spp. foi percebido nos ensaios de *Lactobacillus lactis* e *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* com concentrações maiores de NaCl.

Moghanjoui et al. (2020) testou os efeitos antifúngicos dos filmes bioativos com *L. acidophilus* encapsulado e concluiu que o uso de cepas probióticas pode aumentar a vida útil do queijo, pois após 45 dias de maturação a quantidade de fungos presentes nas amostras com a substância antifúngica foi significativamente menor do que os queijos usados como controle.

3.7 CONCLUSÃO

Os extratos de *Lactobacillus lactis* e *Lactobacillus reuteri* apresentaram efeito antimicrobiano frente ao *Staphylococcus aureus*. Os extratos de *Bifidobacterium animalis* subesp. *lactis* e *Lactobacillus lactis*. apresentaram efeito antifúngico frente ao *Penicillium* spp. As condições de cultivo das BAL's influenciam diretamente na atividade antimicrobiana dos extratos. As melhores condições de cultivo foram: pH 5, NaCl 1% e Sacarose 1,5 a 2,5% para *Lactobacillus lactis* frente ao *Staphylococcus aureus*; as menores concentrações de NaCl para *Lactobacillus reuteri* frente ao *Staphylococcus aureus*; pH 6, NaCl 2,5% e Sacarose 1,5% para *Lactobacillus lactis* frente ao *Penicillium* spp.; pH 7, NaCl 4% e Sacarose 2,5% para *Bifidobacterium animalis* subesp. *Lactis* frente ao *Penicillium* spp. Esses extratos poderão ser utilizados como bioconservantes em queijos e poderão ser produzidos com um meio de cultivo de baixo custo.

4 CONCLUSÃO GERAL

Atualmente, existe uma demanda crescente da população por alimentos mais naturais, com menos conservantes químicos e com propriedades benéficas ao organismo. Cada vez mais se fala da correlação entre alimentação e saúde, o que torna os alimentos funcionais uma grande aposta para o futuro das indústrias.

A eficácia da produção de microrganismos com potencial antimicrobiano a partir de bactérias ácido lácticas já é comprovado através de diversos estudos científicos e está cada vez mais sendo explorada para que no futuro possa ser ainda mais utilizada em escala industrial.

O potencial antifúngico de extratos de BAL é uma área que ainda precisa ser melhor explorada, tendo em vista a dificuldade de resultados satisfatórios contra fungos contaminantes de alimentos. Com os resultados obtidos neste estudo conseguimos contribuir para pesquisas futuras sinalizando o potencial antifúngico dos extratos de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e *Lactobacillus lactis*. frente ao *Penicillium* spp.

5 REFERÊNCIAS

- AHMAD, V. et al. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, p. 1–11, 2017.
- AHMADOVA, A. et al. Antimicrobial and antifungal activities of *Lactobacillus curvatus* strain isolated from homemade Azerbaijani cheese. **Anaerobe**. v. 20, p. 42-49, 2013.
- Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), mercosul/GMC/Res. N° 79/1994.
- BARBOSA, M. S. et al. Effect of proteins, glucose and NaCl on growth, biosynthesis and functionality of bacteriocins of *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in foods during storage at 4 °C: Tests in food models. **LWT - Food Science and Technology**, v. 95, p. 167–171, 2018.
- BARMAN, S.; GHOSH, R.; MANDAL, N. C. Production optimization of broad spectrum bacteriocin of three strains of *Lactococcus lactis* isolated from homemade buttermilk. **Annals of Agrarian Science**, v. 16, p. 286–296, 2018.
- BENKERROUM, N. Mycotoxins in dairy products: A review. **International Dairy Journal**, v. 62, p. 63-75, 2016.
- BUEHLER, A. J. et al. Internal transcribed spacer (ITS) sequencing reveals considerable fungal diversity in dairy products. **Journal Dairy Science**. v. 100, p. 814-825, 2017.
- BRASIL. Decreto N° 9.013, de 29 de março de 2017. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2017.
- BRASIL. Portaria N° 146 de 1996. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 1996.
- CASQUETE, R. et al. Physicochemical factors affecting the growth and mycotoxin production of *Penicillium* strains in a synthetic cheese medium. **LWT - Food Science and Technology**. v. 89, p. 179-185, 2018.
- CASTRO, P. Y. H. et al. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocinlike inhibitory substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from artisanal Mexican cheese. **Journal of Dairy Science**. v. 98, p. 8285-8293, 2015.
- CAVERA, V. L. et al. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 46, p. 494–501, 2015.
- CHAMPAGN, C. P.; CRUZ, A. G.; DAGA, M. Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. **Food Science, Current Opinion**, v. 22, p. 160–166, 2018.
- CHIKINDAS, M. L. et al. Functions and emerging applications of bacteriocins. **Biotechnology, Current Opinion**, v.49, p. 23–28, 2018.
- COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics?. **Nature**, v. 11, p. 95-105, 2013.

COSTA, M. J. et al. Use of edible films and coatings in cheese preservation: Opportunities and challenges. **Food Research International**, v. 107, p. 84–92, 2018.

CRUZ, A. G. et al. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 344-354, 2009.

DASARI, S. et al. Surfacing role of probiotics in cancer prophylaxis and therapy: A systematic review. **Clinical Nutrition**, v. 36, p. 1465-1472, 2017.

EFSA. **Current EU approved additives and their E Numbers**. Disponível em: <<https://www.food.gov.uk/business-guidance/eu-approved-additives-and-e-numbers>>. Acesso em: 02 out. 2018.

ELAYARAJA, S. et al. Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 4, p. 305-311, 2014.

ENGELHARDT, T. et al. Combined effect of NaCl and low temperature on antilisterial bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* ST202Ch. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, p. 104–109, 2018.

FAO. **Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria**, 2006. Disponível em: <<http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2018.

FAO. **Dairy Market Review**, 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/I9210EN/i9210en.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2018.

FATEMEH, S.; KHOSRAVI-DARANI, S. R. K. Influencing factors on single-cell protein production by submerged fermentation: A review. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 37, p. 34-40, 2019.

FERNANDEZ, B. et al. Antifungal activity of lactic and propionic acid bacteria and their potential as protective culture in cottage cheese. **Food Control**, v. 78, p. 350-356, 2017.

FIELD, D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives. **Food Science, Current Opinion**, v. 20, p.1–6, 2018.

FISCHER, F. et al. Fundamentals of Diagnostic Mycology. **Saunders Company**. 2001.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Cheese: An Overview**, Chapter 1. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, **Elsevier**, 4ª edição, p. 5-21, 2017.

FU, Y. et al. Delivery systems of antimicrobial compounds to food. **Trends in Food Science & Technology**, v. 57, p. 165-177, 2016.

GARNIER, L. et al. Development of antifungal ingredients for dairy products: From in vitro screening to pilot scale application. **Food Microbiology**. v. 81, p. 97-107, 2019.

- GARNIER, L. et al. Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 191–197, 2017.
- GARNIER, L. et al. Technical note: High-throughput method for antifungal activity screening in a cheese-mimicking model. **Journal Dairy Science**. v. 101, p. 1-6, 2018.
- GEREZ, C. L. et al. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. **Biological control**. v. 64, p. 231-237, 2013.
- GUERRA, N. P.; RUA, M. L.; PASTRANA, L. Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, p. 267–281, 2001.
- HOSSAIN, I.; SADEKUZZAMAN, M.; HA, S. Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: A review. **Food Research International**, v. 100, p. 63–73, 2017.
- JURADO, M.; NAVARRO, P. R. Effects of fungal growth on the firmness of a cheese analogue formulated with different casein-to-fat ratios. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 145–151, 2018.
- JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. **Biotechnology Advances**. v. 36, p. 2187-2200, 2018.
- LANGA, S. et al. Protective effect of reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in semi-hard Cheese. **Food Control**, v. 84, p. 284-289, 2018.
- LEE, Yu Mi; KIM, Jun Soo; KIM, Wang June. Optimization for the maximum bacteriocin production of *Lactobacillus brevis* DF01 using response surface methodology. **Food science and biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 653-659, 2012.
- LEDENBACH, L.H.; MARSHALL, R. T. Microbiological Spoilage of Dairy Products. **Food Microbiology and Food Safety**. p. 41-67, 2009.
- LEGGIERI, M. C. et al. Modeling Growth and Toxin Production of Toxigenic Fungi Signaled in Cheese under Different Temperature and Water Activity Regimes. **Toxins**, p. 1-17, 2017.
- LEGGIERI, M. C.; DECONTARDI, S.; BATTILANI, P. Modelling the sporulation of some fungi associated with cheese, at different temperature and water activity regimes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 278, p. 52–60, 2018.
- LE LAY, C. et al. Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and propioni bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 239, p. 79–85, 2016.
- LIMA, E. L. C.; FERNANDES, J. M.; CARDARELLI, H. R. Optimized fermentation of goat cheese whey with *Lactococcus lactis* for production of antilisterial bacteriocin-like substances. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 710-716, 2017.

- MA, J. et al. Screening and characterization of lactic acid bacteria with antifungal activity against *Penicillium digitatum* on citrus. **Biological Control**, v. 138, p. 104044, 2019.
- MARCO, M. L. et al. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. **Biotechnology, Current Opinion**, v. 44, p. 94–102, 2017.
- MIAO, J. et al. Optimization of culture conditions for the production of antimicrobial substances by probiotic *Lactobacillus paracasei* subsp. *Tolerans* FX-6. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 244–253, 2015.
- MILLS, S.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins and bacteriophage; a narrow-minded approach to food and gut microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, p. 129–153, 2017.
- MISRA, N. N. et al. Landmarks in the historical development of twenty first century food processing technologies. **Food Research International**, v. 97, p. 318–339, 2017.
- MOGHANJOUGI, Z. M. et al. Bio-preservation of white brined cheese (Feta) by using probiotic bacteria immobilized in bacterial cellulose: Optimization by response surface method and characterization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 117, p. 108603, 2020.
- MORAES, G. M. D. et al. Potentially probiotic goat cheese produced with autochthonous adjunct culture of *Lactobacillus mucosae*: Microbiological, physicochemical and sensory attributes. **LWT - Food Science and Technology**, v. 94, p. 57–63, 2018.
- MUKHOPADHYAY, S.; UKUKU, D. O. The role of emerging technologies to ensure the microbial safety of fresh produce, milk and eggs. **Food Science, Current Opinion**, v. 19, p. 145–154, 2018.
- NEGI, Y. K. et al. Isolation of antibacterial protein from *Lactobacillus spp.* and preparation of probiotic curd. **Journal Food Science Technology**, v. 55, p. 2011–2020, 2018.
- OLIVEIRA, M. E. G. et al. Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 241–247, 2014.
- O'CONNOR, P.M. et al. Antimicrobial antagonists against food pathogens. **ScienceDirect, Current Opinion**, v.2, p.51–57, 2015.
- PRABHURAJESHWAR, C.; CHANDRAKANTH, R. K. Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: An in vitro validation for the production of inhibitory substances. **Biomedical journal**, v. 40, p. 270-283, 2017.
- ROPARS, J. et al. A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, p. 199–210, 2012.
- SABO, S. S. et al. Inhibitory substances production by *Lactobacillus plantarum* ST16Pa cultured in hydrolyzed cheese whey supplemented with soybean flour and their antimicrobial efficiency as biopreservatives on fresh chicken meat. **Food Research International**, v. 99, p. 762–769, 2017.

- SHARMA, K. M.; KUMAR, R.; PANWAR, S.; KUMAR, A. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. v. 15, p. 115-126, 2017.
- SHEHATA, M. G. et al. Characterization of antifungal metabolites produced by novel lactic acid bacterium and their potential application as food biopreservatives. **Annals of Agricultural Sciences**. v. 64, p. 71-78, 2019.
- SHORI, A. B. 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.
- SILVA, N. et al. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. **Edgard Blücher Ltda**, 5ª Edição, 2017.
- SINGH, N. P. et al. Genome level analysis of bacteriocins of lactic acid bacteria. **Computational Biology and Chemistry**, v. 56, p. 1–6, 2015.
- SINGH, R. S.; CHAUHAN, K.; KENNEDY, J. F. A panorama of bacterial inulinases: Production, purification, characterization and industrial applications. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.96, p. 312-322, 2017.
- SINGH, R. S.; KAUR, N.; KENNEDY, J. F. Pullulan production from agro-industrial waste and its applications in food industry: A review. **Carbohydrate Polymers**. v. 217, p. 46-57, 2019.
- UNDERWOOD, M. A. Probiotics and the prevention of necrotizing enterocolitis. **Journal of Pediatric Surgery**, aceito em 16 de agosto de 2018. Disponível em: <[https://www-sciencedirect.ez116.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0022346818305633](https://www.sciencedirect.ez116.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0022346818305633)>. Acesso em 08 out. 2018.
- UROI, K. et al. 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.
- VARSHA, K. K.; NAMPOOTHIRI, V. K. Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures. **Food Control**, v. 69, p. 61-64, 2016.
- VERA, E. C. S. et al. Optimization of biosurfactant and bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) production by *Lactococcus lactis* CECT-4434 from agroindustrial waste. **Biochemical Engineering Journal**, v. 133, p. 168–178, 2018.
- ZHENG, X. et al. Dynamic correlations between microbiota succession and flavor development involved in the ripening of Kazak artisanal cheese. **Food Research International**, v. 105, p. 733-742, 2018.
- ZOU, J. et al. Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 781–789, 2018.
- WONG, F. et al. Recovery of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Pediococcus acidilactici* Kp10 using surfactant precipitation. **Food Chemistry**, v. 232, p. 245–252, 2017.

APÊNDICE A – Lista de verificação das boas práticas para serviços de alimentação

Lista de verificação das boas práticas para serviços de alimentação – Adaptada da RDC Nº 216 de
15/09/2004 - ANVISA

Aluna: Lariane Strack

Orientadora: Luciane Maria Colla

Coorientadora: Charise Dallazem Bertol

A - IDENTIFICAÇÃO DA EMPRESA			
1-Nome:			
2-Inscrição estadual:			
3-CNPJ / CPF:			
4-Fone:			
5-Endereço:			
6-Município:		7-UF:	
8-Ramo de atividade:			
B – AVALIAÇÃO	S-SIM	N-NÃO	NA(*)
1. EDIFICAÇÃO E INSTALAÇÕES			
1.1 AREA EXTERNA:			
1.1.1 Área externa do estabelecimento, livre de objetos em desuso ou estranhos ao ambiente.			
1.2 ACESSO:			
1.2.1 Controlado, independente, não comum a outros usos (habitação, etc.).			
1.3 AREA INTERNA:			
1.3.1 Área interna do estabelecimento, livre de objetos em desuso ou estranhos ao ambiente, sem a presença de animais.			
1.4 PISO:			
1.4.1 Revestimento liso, impermeável e lavável.			
1.4.2 Em adequado estado de conservação (livre de trincas, rachaduras, infiltrações e outros).			
1.5 TETOS:			
1.5.1 Revestimento liso, impermeável e lavável.			
1.5.2 Em adequado estado de conservação (livre de trincas, rachaduras, infiltração, goteiras, vazamentos, bolores,			

descascamentos e outros).			
1.6 PAREDES E DIVISÓRIAS:			
1.6.1 Revestimento liso, impermeável e lavável.			
1.6.2 Em adequado estado de conservação (livre de trincas, rachaduras, infiltrações, bolores, descascamentos e outros).			
1.7 PORTAS:			
1.7.1 Ajustadas aos batentes.			
1.7.2 Portas da área de preparação e armazenamento de alimentos, dotadas de fechamento automático.			
1.7.3 Portas externas das áreas de armazenamento e preparação de alimentos, providas de telas milimetradas para impedir o acesso de vetores e pragas urbanas.			
1.8 JANELAS E OUTRAS ABERTURAS:			
1.8.1 Ajustadas aos batentes.			
1.8.2 Janelas e outras aberturas das áreas de armazenamento e preparação de alimentos, inclusive o sistema de exaustão, providas de telas milimetradas para impedir o acesso de vetores e pragas urbanas.			
1.9 INSTALAÇÕES SANITÁRIAS E VESTIÁRIOS:			
1.9.1 Instalações sanitárias e vestiários sem comunicação direta com a área de preparação e armazenamento de alimentos ou refeitórios.			
1.9.2 Mantidos organizados e em adequado estado de conservação.			
1.9.3 Instalações sanitárias com lavatórios e supridas de produtos destinados à higiene pessoal tais como papel higiênico, sabonete líquido inodoro antisséptico ou sabonete líquido inodoro e produto antisséptico e toalhas de papel não reciclado ou outro sistema higiênico e seguro para secagem das mãos.			
1.9.4 Coletores dos resíduos dotados de tampa e acionados sem contato manual.			
1.10 LAVATÓRIOS NA ÁREA DE MANIPULAÇÃO:			
1.10.1 Existência de lavatórios exclusivos para a higiene das mãos na área de manipulação, em posições estratégicas em relação ao fluxo de preparo dos alimentos e em número suficiente de modo a atender toda a área de preparação.			
1.10.2 Lavatórios em condições de higiene, dotados de sabonete líquido inodoro antisséptico ou sabonete líquido inodoro e produto antisséptico, toalhas de papel não reciclado ou outro sistema higiênico e seguro de secagem das mãos e coletor de papel, acionados sem contato manual.			
1.11 ILUMINAÇÃO E INSTALAÇÃO ELÉTRICA:			
1.11.1 Iluminação da área de preparação proporcionando a visualização de forma que as atividades sejam realizadas sem comprometer a higiene e as características sensoriais dos alimentos.			
1.11.2 Luminárias localizadas sobre a área de preparação			

dos alimentos apropriadas e protegidas contra explosão e quedas acidentais.			
1.11.3 Instalações elétricas embutidas ou protegidas em tubulações externas e íntegras de tal forma a permitir a higienização dos ambientes.			
1.12 VENTILAÇÃO E CLIMATIZAÇÃO:			
1.12.1 Ventilação garantindo a renovação do ar e a manutenção do ambiente, livre de fungos, gases, fumaça, pós, partículas em suspensão, condensação de vapores dentre outros que possam comprometer a qualidade higiênico-sanitária do alimento.			
1.13 HIGIENIZAÇÃO DAS INSTALAÇÕES:			
1.13.1 Higienização das instalações adequada e com frequência.			
1.13.2 Instalações mantidas em condições higiênico-sanitárias apropriadas.			
1.13.3 Produtos saneantes utilizados, regularizados no Ministério da Saúde.			
1.13.4 Diluição, o tempo de contato e modo de uso/aplicação dos produtos saneantes obedecem às instruções recomendadas pelo fabricante.			
1.13.5 Produtos de higienização identificados e guardados em local reservado para essa finalidade.			
1.14 CONTROLE INTEGRADO DE VETORES E PRAGAS URBANAS:			
1.14.1 Ausência de vetores e pragas urbanas ou qualquer evidência de sua presença como fezes, ninhos e outros.			
1.14.2 Existe um conjunto de ações eficazes e contínuas de controle de vetores e pragas urbanas, com o objetivo de impedir a atração, o abrigo, o acesso e ou proliferação dos mesmos.			
1.14.3 Em caso de adoção de controle químico, existência de comprovante de execução do serviço expedido por empresa especializada, conforme legislação específica, com produtos desinfetantes regularizados pelo Ministério da Saúde.			
1.15 ABASTECIMENTO DE ÁGUA:			
1.15.1 Instalações abastecidas com água corrente.			
1.15.2 Utiliza solução alternativa de abastecimento de água com potabilidade atestada semestralmente mediante laudos laboratoriais.			
1.15.3 Reservatório de água edificado e ou revestido de materiais que não comprometam a qualidade da água, livre de rachaduras, vazamentos, infiltrações, descascamentos entre outros defeitos e em adequado estado de conservação e higiene e devidamente tampados.			
1.16 MANEJO DOS RESÍDUOS:			
1.16.1 Resíduos frequentemente coletados e estocados em			

local fechado e isolado das áreas de preparação e armazenamento de alimentos.			
1.17 ESGOTAMENTO SANITÁRIO:			
1.17.1 Dispõe de conexões com rede de esgoto ou fossa séptica.			
1.17.2 Ralos sifonados e grelhas com dispositivo que permitam seu fechamento.			
1.17.3 Caixas de gordura e esgoto localizadas fora da área de preparação, armazenamento de alimentos em adequado estado de conservação e funcionamento.			
1.18 LEIAUTE:			
1.18.1 Edificação e instalações projetadas de forma a possibilitar um fluxo ordenado e sem cruzamentos em todas as etapas da preparação de alimentos facilitando as operações de manutenção, limpeza e, quando for o caso, desinfecção.			
1.18.2 Dimensionamento da edificação e das instalações compatível com todas as operações.			
1.18.3 Separação entre as diferentes atividades por meios físicos ou por outros meios eficazes de forma a evitar a contaminação cruzada.			
2. EQUIPAMENTOS, MÓVEIS E UTENSÍLIOS.			
2.1 EQUIPAMENTOS:			
2.1.1 Os que entram em contato com alimentos são de materiais que não transmitam substâncias tóxicas, odores, nem sabores, conforme estabelecido em legislação específica.			
2.1.2 Em adequado estado de conservação, resistentes à corrosão e a repetidas operações de limpeza e desinfecção.			
2.1.3 Realiza manutenção programada e periódica dos equipamentos e calibração dos instrumentos ou equipamentos de medição. Mantém registro da realização dessas operações.			
2.1.4 Possui superfícies lisas, impermeáveis, laváveis e isentas de rugosidades, frestas e outras imperfeições que possam comprometer a higienização, nem serem fontes de contaminação dos alimentos.			
2.2 MOVEIS E UTENSÍLIOS:			
2.2.1 Os que entram em contato com alimentos são de materiais que não transmitem substâncias tóxicas, odores, nem sabores, conforme estabelecido em legislação específica.			
2.2.2 Adequado estado de conservação e resistentes à corrosão e a repetidas operações de limpeza e desinfecção.			
2.2.3 Possuem superfícies lisas, impermeáveis, laváveis e isentas de rugosidades, frestas e outras imperfeições que possam comprometer a higienização e serem fontes de contaminação dos alimentos.			
2.3 HIGIENIZAÇÃO DOS EQUIPAMENTOS, MÓVEIS E UTENSÍLIOS:			

2.3.1 Frequência de higienização adequada.			
2.3.2 Produtos saneantes utilizados, regularizados no Ministério da Saúde.			
2.3.3 Diluição, tempo de contato e modo de uso/aplicação dos produtos saneantes obedecem às instruções recomendadas pelo fabricante.			
2.3.4 Produtos de higienização identificados e guardados em local reservado para essa finalidade.			
2.3.5 Utiliza utensílios de uso exclusivo para higienização.			
3 MANIPULADORES			
3.1 VESTUÁRIO:			
3.1.1 Utilização de uniforme compatível com a atividade, conservados e limpos. Trocados no mínimo diariamente.			
3.1.2 Usados exclusivamente nas dependências internas. As roupas e objetos pessoais guardados, em local específico, e reservado para este fim.			
3.1.3 Asseio pessoal: mãos limpas, unhas curtas, sem esmalte ou base, sem adornos (anéis, pulseiras, brincos, etc.). Maquiagem; cabelos presos e protegidos por redes, tocas ou outro acessório apropriado para esse fim, não sendo permitido o uso de barba.			
3.2 HÁBITOS HIGIÊNICOS:			
3.2.1 Lavagem cuidadosa das mãos ao chegar ao trabalho, antes e após a manipulação de alimentos, principalmente após qualquer interrupção, tocar materiais contaminados, depois do uso de sanitários e sempre que se fizer necessário.			
3.2.2 Manipuladores fumam, falam desnecessariamente, cantam, assobiam, espirram, cospem, tosem, comem, manipulam dinheiro ou praticam outros atos que possam contaminar o alimento, durante o desempenho das atividades.			
3.2.3 Cartazes de orientação aos manipuladores sobre a correta lavagem e antissepsia das mãos e demais hábitos de higiene, afixados em locais de fácil visualização, inclusive nas instalações sanitárias e lavatórios.			
3.3 CONTROLE DE SAÚDE:			
3.3.1 Existência de registro do controle da saúde dos manipuladores, realizado de acordo com a legislação específica.			
4 PREPARAÇÃO DO ALIMENTO			
4.1 CUIDADOS NA PREPARAÇÃO DO ALIMENTO:			
4.1.1 Utilizadas matérias-primas, ingredientes e embalagens em condições higiênico-sanitárias adequadas e em conformidade com a legislação específica.			
4.1.2 Durante a preparação dos alimentos são adotadas medidas a fim de minimizar o risco de contaminação cruzada.			
4.1.3 Evita-se o contato direto ou indireto entre alimentos			

crus, semipreparados e prontos para o consumo.			
4.2 CONSERVAÇÃO A FRIO:			
4.2.1 Os alimentos são conservados sob refrigeração a temperaturas inferiores a 5°C (cinco graus Celsius).			
4.2.2 Alimentos preparados armazenados sob refrigeração possuem invólucro contendo no mínimo as seguintes informações: designação, data de preparo e prazo de validade.			
4.2.3 Temperatura de armazenamento regularmente monitorada e registrada.			
4.3 CONTROLE E GARANTIA DA QUALIDADE:			
4.3.1 Estabelecimento implementou e mantém documentado o controle e garantia da qualidade dos alimentos preparados.			
4.4 RESPONSABILIDADE:			
4.4.1 Existe um responsável pelas atividades de manipulação dos alimentos.			
5 ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DO ALIMENTO PREPARADO			
5.1 CUIDADOS NECESSÁRIOS:			
5.1.1 Alimentos preparados mantidos na área de armazenamento ou aguardando o transporte, identificados e protegidos contra contaminantes. Na identificação deve constar no mínimo: designação do produto, data de preparo e prazo de validade.			
5.1.2 Armazenamento e o transporte do alimento preparado, da distribuição até a entrega ao consumo, ocorrem em condições de tempo e temperatura que não comprometam sua qualidade higiênico-sanitária.			
5.2 TRANSPORTE:			
5.2.1 Meios de transporte do alimento preparado higienizados, sendo adotadas medidas, a fim de garantir a ausência de vetores e pragas urbanas.			
5.2.2 Veículos dotados de cobertura para proteção da carga, não transportando outras cargas que comprometam a qualidade higiênico-sanitária do alimento preparado.			
6 DOCUMENTAÇÃO E REGISTRO			
6.1 MANUAL DE BPF E POP:			
6.1.1 Serviço de alimentação dispõe de Manual de Boas Práticas e de Procedimentos Operacionais Padronizados.			
6.1.2 Esses documentos estão acessíveis aos funcionários envolvidos e disponíveis à Autoridade Sanitária, quando requerido.			

<p>6.1.3 Os POP's contêm as instruções sequenciais das operações e a frequência de execução, especificando o nome, o cargo e ou a função dos responsáveis pelas atividades. Estão aprovados, datados e assinados pelo responsável do estabelecimento.</p>			
6.2 REGISTROS:			
<p>6.2.1 Registros mantidos por período mínimo de 30 (trinta) dias contados a partir da data de preparação dos alimentos.</p>			
<p style="text-align: center;">LOCAL: _____ DATA: ____ / ____ / ____</p>			

(*) NA: Não se aplica

ANEXO A – Artigo de revisão “Biopreservação de alimentos utilizando antimicrobianos de bactérias ácido-láticas”