

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Lígia Eleonor Prezzi

**Efeito da adição de *Lactobacillus rhamnosus* em queijos
Minas frescal sobre as contagens de *Staphylococcus
aureus* e *Listeria monocytogenes***

Pirassununga

2014

Lígia Eleonor Prezzi

Efeito da adição de *Lactobacillus rhamnosus* em queijos Minas frescal sobre as contagens de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

P944e Prezzi, Lígia Eleonor
 Efeito da adição de *Lactobacillus rhamnosus* em
 queijos minas frescal sobre as contagens de
 Staphylococcus aureus e *Listeria monocytogenes* / Lígia
 Eleonor Prezzi. -- Pirassununga, 2014.
 73 f.
 Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
 Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
 Departamento de Engenharia de Alimentos.
 Área de Concentração: Ciências da Engenharia de
 Alimentos.
 Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de
 Oliveira.

1. Probióticos 2. *L. rhamnosus* 3. Queijos
4. Contaminação microbiológica. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pela minha vida e por ter me fortalecido e guiado durante todos os momentos mais importantes da minha vida.

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes de Oliveira, pela paciência e dedicação, pela orientação e oportunidade.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos funcionários do Laticínio da Universidade de São Paulo – USP Pirassununga, Sr. Osvaldo, Aline e Sílvia, pela colaboração e ajuda na produção dos queijos Minas Frescal.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Campus Pirassununga – USP, pela oportunidade oferecida para a realização deste curso.

Ao Prof. Dr. Carlos Humberto Corassin pela ajuda na realização deste projeto e por estar sempre por perto para auxiliar nas instruções de algumas análises.

Ao Prof. Dr. Adriano Cruz pelas sugestões e pela ajuda na realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Paulo José do Amaral Sobral e à especialista de laboratório Ana Mônica Quinta Barbosa Bittante pela ajuda em algumas análises.

À Profa. Dra. Catarina Abdalla Gomide e ao especialista de laboratório Raphael Jacir Corradini Júnior pela ajuda em algumas análises.

À amiga Sarah, pelo companheirismo, paciência e essencial ajuda na realização deste projeto.

À Suzana pela ajuda em algumas análises laboratoriais.

À Roice Eliana Rosim, técnica do LMMA, por sua paciência, amizade e ajuda nas análises laboratoriais.

À Gabriela, Jessica, Bruna Leonel, Bruna Ferreira e Ian pela colaboração e ajuda na realização da parte prática deste projeto.

Às amigas Pollyana e Mayra pela companhia e incentivo em todos os momentos.

Às colegas de laboratório Keliani e Diane pelo apoio e companheirismo.

À minha amiga Monique por dividir minhas angústias e pelo incentivo nos momentos de dificuldades, por estar ao meu lado nos momentos de alegrias.

À minha amiga Luciana pelo incentivo nos momentos de dificuldades, por estar ao meu lado nos momentos de alegrias.

Aos meus pais Laudares Abel e Denise, e aos meus irmãos Joel e Diego pelos momentos de felicidade que me proporcionam e pelo incentivo.

Ao meu esposo, Renato por estar presente na minha vida, compartilhando angústias e felicidades.

RESUMO

PREZZI, L.E. **Efeito da adição de *Lactobacillus rhamnosus* em queijos Minas frescal sobre as contagens de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.** 2014. 73f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito inibitório de *Lactobacillus rhamnosus* sobre as contagens de *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, aspergidos isoladamente ou em combinação sobre a superfície de queijo Minas Frescal, durante armazenamento por 21 dias a 7°C. O delineamento consistiu em esquema fatorial 2x2x2, sendo 8 tratamentos com 4 repetições. As características físico-químicas (pH, atividade de água, umidade, teor de gordura, proteína e perfil de textura) foram determinadas nos queijos dos tratamentos sem adição de *L. rhamnosus* ou contendo este probiótico (T1 e T2, respectivamente). Verificaram-se as contagens de *L. rhamnosus*, *S. aureus* e *L. monocytogenes* nos queijos de todos os tratamentos nos dias 1, 7, 14 e 21 de armazenamento. Foram também analisados os percentuais de sobrevivência dos microrganismos submetidos a condições de simulação do trato gastrointestinal (TGI) utilizando ensaios *in vitro*. Não houve efeito significativo ($P > 0,05$) entre os parâmetros físico-químicos dos queijos dos tratamentos T1 e T2. As contagens de *L. rhamnosus* aumentaram ($P < 0,05$) em todos os tratamentos a partir do dia 7 de armazenamento, estabilizando ao redor de 10^8 UFC/g, sendo que a presença concomitante de *L. monocytogenes* e/ou *S. aureus* nos queijos não influenciou a contagem de *L. rhamnosus*. *L. rhamnosus* diminuiu em cerca de 1 ciclo log as contagens de *L. monocytogenes*, e não exerceu efeito inibitório sobre *S. aureus* após 21 dias. *S. aureus* não sobreviveu ao teste de simulação ao TGI. No entanto, *L. rhamnosus* e *L. monocytogenes* apresentaram percentuais de sobrevivência entre 74,6% a 86,4%, e entre 75,8% a 94,1%, respectivamente. Os resultados demonstraram que a adição de *L. rhamnosus* não alterou as características físico-químicas dos queijos Minas frescal, porém exerceu efeito inibitório sobre *L. monocytogenes*, mas nenhum efeito sobre *S. aureus*. A utilização de *L. rhamnosus* como probiótico apresenta um potencial para inibição de *L. monocytogenes* na fabricação de queijos Minas frescal. São necessários estudos sobre os mecanismos envolvidos na competição entre as bactérias por substratos no alimento, bem como sua sobrevivência nas condições do TGI em ensaios *in vivo*.

Palavras-chave: Probióticos; *L. rhamnosus*; Queijos; Contaminação microbiológica.

ABSTRACT

PREZZI, L.E. **Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on growth of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in cheese.** 2014. 73p. MSc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

The aim of this study was to evaluate the effects of *Lactobacillus rhamnosus* on growth of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Minas frescal cheese during 21 days of storage at 7°C. The experimental design was totally randomized, in a 2x2x2 factorial arrangement with 8 treatments and 4 replicates per treatment. Physical chemical parameters such as pH, moisture, water activity, fat, protein and texture profile analysis were carried out in cheeses where no microorganism were inoculated (T1) and in the cheeses inoculated with the probiotic bacteria, *L. rhamnosus* (T2). The counts of *L. rhamnosus*, *S. aureus* and *L. monocytogenes* were examined on days 1, 7, 14, 21 of storage. Survival percentage of the bacteria after exposure to simulated gastrointestinal conditions was studied *in vitro*. Statistical analysis indicated that there were no significant differences ($P>0,05$) among the means of the physical chemical parameters analyzed in treatments 1 and 2. From day 7 on, the counts of *L. rhamnosus* increased ($P<0,05$) in all treatments, stabilizing and reaching up to 10^8 CFU/g. It was noticed that the concurring presence of *L. monocytogenes* and/or *S. aureus* in the cheese samples did not show influence in the counts of the probiotic bacteria. The *L. rhamnosus* caused about 1 log cycle reduction in the counts of *L. monocytogenes*, but showed no inhibitory effect on *S. aureus* at the end of the period of storage. *S. aureus* did not survive the exposure to simulated gastrointestinal conditions. However, *L. rhamnosus* and *L. monocytogenes* showed survival percentages varying from 74,6% to 86,4%, and from 75,8% to 94,1%, respectively. The results showed that the addition of *L. rhamnosus* had no influence on the physical chemical characteristics of the Minas frescal cheese and no inhibitory effect on *S. aureus*, nevertheless demonstrated inhibitory effect on *L. monocytogenes*. The addition of probiotic strains of *L. rhamnosus* in Minas frescal cheese represents potential for *L. monocytogenes* inhibition. It is essential to carry out studies on the mechanisms involved in the competition for substrate by bacteria, as well as their survival to simulated gastrointestinal conditions in *in vivo* experiments.

Keywords: Probiotics; *L. rhamnosus*; Cheeses; Microbiological contamination.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma da fabricação do queijo Minas e amostragens.....	28
Figura 2. Amostras de queijo Minas em processo de embalagem em sacos estéreis.....	29
Figura 3. Inoculação das suspensões bacterianas sobre a massa dos queijos em seguida ao processo de dessoragem.....	31
Figura 4. Diluições seriadas para o isolamento de <i>L. monocytogenes</i>	33
Figura 5. Evolução dos valores médios ($n = 2$) de pH, atividade de água, umidade, proteína e teor de gordura nos queijos Minas frescal durante os 21 dias de armazenamento.....	38
Figura 6. Evolução dos valores médios ($n = 2$) dos parâmetros de textura (dureza, adesividade, elasticidade, coesividade e mastigabilidade) nos queijos Minas frescal durante os 21 dias de armazenamento.....	41
Figura 7. Tubos de caldo Lauryl Sulfato Triptose incubados a 35°C com crescimento e produção de gás no dia 21 de armazenamento	44
Figura 8. Placa de petri com colônias de <i>E. coli</i> em ágar Eosina Azul de Metileno.....	46
Figura 9. Contagens de <i>L. rhamnosus</i> nos dias 1, 7, 14 e 21 de armazenamento.	48
Figura 10. Contagem de <i>L. monocytogenes</i> nos dias 1, 7, 14 e 21 de armazenamento.....	50
Figura 11. Contagens de <i>S. aureus</i> nos dias 1, 7, 14 e 21 de armazenamento	52
Figura 12. Percentuais de sobrevivência de <i>L. rhamnosus</i> nos dias 1, 7, 14 e 21 de armazenamento nos tratamentos.....	55
Figura 13. Percentuais de sobrevivência de <i>L. monocytogenes</i> nos dias 1, 7, 14 e 21 de armazenamento nos tratamentos.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamentos utilizados no experimento com queijo Minas Frescal adicionado de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> e/ou <i>Listeria monocytogenes</i> e/ou <i>Staphylococcus aureus</i>	27
Tabela 2. - Resultados das análises de pH, Aw, umidade, proteína e teor de gordura dos queijos Minas frescal nos tratamentos com ou sem adição de <i>L.rhamnosus</i>	37
Tabela 3. Valores obtidos das curvas de análise de perfil de textura (TPA) dos queijos dos tratamentos com ou sem adição de <i>L. rhamnosus</i>	40
Tabela 4. Evolução das populações de coliformes a 30°C e coliformes a 45°C nos queijos nos dias 1 e 21 de armazenamento	44
Tabela 5. Contagens de <i>L. rhamnosus</i> , expressos em Log UFC/g, nos queijos Minas frescal durante 21 dias de armazenamento	47
Tabela 6. Contagens de <i>L. monocytogenes</i> , expressos em Log UFC/g, nos queijos Minas frescal durante 21 dias de armazenamento	49
Tabela 7. Contagens de <i>S. aureus</i> , expressos em Log UFC/g, nos queijos Minas frescal durante 21 dias de armazenamento	51
Tabela 8. Percentuais de sobrevivências de <i>L. rhamnosus</i> e <i>L. monocytogenes</i> nos queijos Minas frescal submetidos à simulação dos conteúdos do trato gastrointestinal	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1. Queijo Minas Frescal: Aspectos Microbiológicos e Físico-Químicos.....	13
2.1.1 Contaminação por coliformes a 30° C e termotolerantes (45°C).....	15
2.1.2 Contaminação por <i>Staphilococcus</i> spp.....	16
2.1.3. Contaminação por <i>Listeria monocytogenes</i>	17
2.2 . Alimentos Funcionais: Probióticos.....	19
2.3. As Bactérias Láticas e o Grupo <i>Lactobacillus casei</i>	23
2.4. Utilização de Queijos como Veículo de Probióticos.....	24
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo Geral.....	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Delineamento experimental.....	27
4.2. Elaboração do Queijo Minas Frescal.....	27
4.3. Análises Microbiológicas do Leite Pasteurizado.....	29
4.4. Preparo das Suspensões Bacterianas.....	30
4.5. Adição das Suspensões Bacterianas nas Amostras de Queijos.....	31
4.6. Análises Físico-Químicas dos Queijos.....	31
4.7. Análises Microbiológicas dos Queijos.....	33
4.8. Análise da Sobrevivência das Bactérias em Condições Simuladas do Trato Gastrointestinal.....	34
4.9. Análise dos Resultados.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36

5.1 Avaliação Microbiológica do Leite Pasteurizado	36
5.2 Avaliação Físico-Química dos Queijos.....	36
5.3. Avaliação Microbiológica dos Queijos.....	42
5.3.1. Contagem de Microrganismos Indicadores.....	42
5.3.2. Contagem das Bactérias Probiótica e Patogênicas.....	46
5.3.3. Sobrevivência das Bactérias Probiótica e Patogênicas em Condições Simuladas do Trato Gastrointestinal.....	53
6. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1. INTRODUÇÃO:

A indústria de alimentos procura constantemente criar sistemas de preservação dos alimentos mais eficientes, mantendo sua qualidade e a atratividade ao mercado consumidor. A procura por alimentos naturais, saudáveis e livres de conservadores tem aumentado entre os consumidores (ZINK, 1997).

O efeito benéfico de determinados tipos de alimentos, atualmente denominados alimentos funcionais, sobre a saúde do hospedeiro é conhecido há muito tempo. Segundo Ziemer e Gibson (1998) a suplementação de componentes com atividades reconhecidamente benéficas à saúde incluem cálcio e vitaminas, entre outros nutrientes, além de aditivos que podem exercer efeitos benéficos sobre a composição da microbiota intestinal. Esses aditivos alimentares são denominados probióticos e prebióticos. Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando consumidos, agem no trato gastrintestinal do organismo hospedeiro melhorando o balanço microbiano intestinal (KURMANN, 1988; FULLER, 1989). O emprego de bactérias lácticas em alimentos é de longa data e a maioria das cepas empregadas é considerada microrganismos comensais, sem potencial patogênico. Dentre esses microrganismos, as bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são mais frequentemente consideradas seguras (COLLINS et al., 1998; LEE et al., 1999).

A espécie *Lactobacillus rhamnosus* está entre o grupo chamado "*Lactobacillus casei*", e o seu emprego como probiótico em alimentos industrializados tem sido amplamente estudado (ITSARANUWAT et al., 2003). As espécies *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei* são bactérias lácticas adicionadas à produção de leites fermentados e como culturas iniciadoras de fermentação na fabricação de queijos, e por isso apresentam importante valor comercial na indústria alimentícia (FERRERO et al., 1996).

Os queijos podem ser uma alternativa como veículo para a administração de bactérias probióticas viáveis conferindo, portanto, benefícios à saúde (BURITI; ROCHA; SAAD, 2005). Recentes estudos referentes à adição de culturas probióticas em queijos tem demonstrado a viabilidade desta prática uma vez que são alcançadas as propriedades tecnológicas desejáveis no produto final. Os queijos são também os produtos lácteos mais comumente contaminados por *L. monocytogenes*, principalmente os de alta e média umidade. Neste contexto, a presença deste patógeno em queijos é preocupante já que estes geralmente são produtos armazenados por longos períodos sob refrigeração, o que pode permitir a multiplicação da bactéria.

Staphylococcus aureus, frequentemente pesquisado em alimentos como o queijo, um dos principais veículos causadores de toxinfecção alimentar, estão entre os microrganismos mais importantes encontrados em leite e seus derivados, podendo ser transmitidos pelo leite contaminado por vacas que apresentem mastite estafilocócica e também pela manipulação e contaminação através do ser humano (GERMANO; GERMANO, 2001). Ressalte-se que a ocorrência simultânea de 2 ou mais espécies de patógenos em um mesmo alimento é possível, embora não existam relatos desta co-ocorrência na flora microbiana presente no ambiente de laticínios ou em produtos lácteos no Brasil. Neste contexto, é particularmente importante verificar a presença concomitante de *L. monocytogenes* e *S. aureus* em produtos lácteos.

Além de exercerem uma influência considerável sobre as características físico-químicas e sensoriais do queijo, muitas bactérias lácticas podem ser úteis por possuírem atividade inibitória através da criação de um ambiente hostil para os microrganismos patogênicos e deteriorantes presentes (SHAH, 2000).

Tendo em vista o exposto, delineou-se o presente estudo com a finalidade de verificar o potencial efeito inibitório de *L. rhamnosus* sobre as contagens de *S. aureus* e *L.*

monocytogenes em queijo Minas Frescal, tendo em vista a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias para controle de perigos microbiológicos na indústria de laticínios.

2. REVISÃO DE LITERATURA:

2.1- Queijo Minas Frescal: Aspectos Microbiológicos e Físico-Químicos:

O queijo, produto derivado lácteo concentrado, apresenta elevado valor nutricional e pertence ao grupo mais diverso de derivados do leite. Os queijos são bioquimicamente dinâmicos, o que acarreta na sua natureza instável (FOX; McSWEENEY, 2004). O queijo Minas Frescal pode ter suas características de durabilidade afetadas e apresentar vida de prateleira curta devido à susceptibilidade aos fenômenos bioquímicos e microbiológicos (FURTADO et al., 1980).

O queijo Minas Frescal, uma das atividades das indústrias de laticínios mais importantes, é comercializado em todas as regiões do Brasil, podendo ser produzido com utilização de equipamentos tradicionais em fábricas de pequeno, médio e de grande porte (FURTADO, 2005). Sua fabricação possibilita um retorno de investimento rápido e gera menores custos ao consumidor uma vez que apresenta alto rendimento pela ausência de período de maturação (OLIVEIRA et al., 1998). Em seu processo de fabricação por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes, este queijo fresco pode ou não ser complementado com bactérias lácticas específicas (BRASIL, 1997).

Os queijos contêm proteínas de alto valor biológico, cálcio, lipídeos, lactose e vitaminas lipossolúveis e possui papel fundamental na dieta humana. De acordo com Campos et.al (2006) o queijo Minas Frescal é classificado como um queijo macio, semi-gordo com

teor de gordura entre 25 e 44,9 %, apresenta porcentagem de cloreto de sódio entre 1,4% a 1,6%, pH pouco ácido (5,1 a 5,6), alta umidade (> 55,0 %).

Aspectos como sabor, aroma e textura são atributos sensoriais que exercem influência sobre a aceitação dos alimentos pelo consumidor. A textura está associada à satisfação de comer, além de confirmar a expectativa quanto à qualidade do produto (TUNICK, 2000).

O queijo Minas frescal tem sua vida de prateleira influenciada pelas condições de transporte, pela temperatura em que é mantido enquanto é comercializado, e principalmente pela composição físico-química, destacando-se a elevada umidade deste produto (RIBEIRO; SIMÕES; JURKIEWICKZ, 2009; FURTADO, 2005). Sua composição química o torna susceptível ao crescimento microbiano, sendo, portanto, um veículo frequente de microrganismos patogênicos que podem causar infecções e intoxicações alimentares.

A contaminação microbiana do queijo tem papel importante tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, quanto para a saúde pública por causar doenças transmitidas por alimentos (DTA) (FEITOSA et al., 2003). Doenças Transmitidas por Alimentos são causadas pela ingestão de alimentos ou bebidas contaminados com patógenos e/ou toxinas por eles produzidas, em quantidades que afetam a saúde do consumidor. As DTAs são prevalentes no Brasil e no mundo, sendo responsáveis por grande impacto na economia mundial (SILVA et al., 2009).

Conforme mencionado por diversos autores (ARAÚJO et al., 2002; CAMPOS et al., 2006; CARRIQUE-MAS, et al., 2003; PICCOLI et al., 2005), o queijo Minas frescal é considerado excelente meio para o desenvolvimento de microrganismos como coliformes a 30°C e termotolerantes (45°C), *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*.

De acordo com os requisitos da Portaria 146 (Brasil, 2001), os limites máximos de tolerância para queijos Minas frescal são de 1×10^4 UFC de coliformes a 30°C/g, 5×10^3 UFC

de coliformes termotolerantes (45°C)/g, 1×10^3 UFC de estafilococos coagulase positiva/g e ausência de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em 25g.

Dentre as características intrínsecas que atuam de forma incisiva para a proliferação de microbiota indesejável, destacam-se o pH pouco ácido, atividade de água e umidade elevadas e reduzidas concentrações de cloreto de sódio (ADAMS; MOSS, 1997; JAY, 2005).

Apesar da proibição legal imposta à comercialização de queijos frescos elaborados a partir de leite cru no Brasil, a comercialização de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente ainda tem sido realizada, especialmente nos Estados de Minas Gerais e São Paulo (ALMEIDA FILHO, 1999).

Os principais bioindicadores de contaminação presentes nesses tipos de queijos, incluem microrganismos do grupo dos coliformes, bactérias como *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, e ainda leveduras e alguns bolores. Segundo Crandall et al. (1994) e Hugas (1998) há preocupação com a inocuidade dos queijos devido à possibilidade da veiculação de patógenos bacterianos psicrotróficos como cepas não proteolíticas de *Listeria monocytogenes*.

2.1.1 - Contaminação por coliformes a 30°C e termotolerantes (45°C):

Comumente empregados como indicadores de qualidade higiênico-sanitária, os microrganismos do grupo coliforme, totais e termotolerantes, são colonizadores do trato gastrointestinal (CALCI; BURKHARDT; WATKINS, 1998; LOGUERCIO; ALEIXO, 2001).

Os coliformes a 30°C, anteriormente denominados “totais”, incluem microrganismos do grupo das enterobactérias, sob a forma de bastonetes Gram negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de ácido e gás, em 24 e 48 horas a 35,0 °C (LISITA, 2005).

Os coliformes termotolerantes (45°C) são também bastonetes Gram negativos, não esporulados, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de ácido e gás, porém restringem-se aos membros que a fermentam em 24 horas a 44,5 - 45,0 °C (SILVA et al., 2007). Neste grupo prevalecem microrganismos originários do trato gastrintestinal ou de origem fecal como a *Escherichia coli*, mas também incluem membros de origem não fecal como microrganismos do gênero *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter* (LISITA, 2005).

Dentre os coliformes termotolerantes (45°C) um dos de maior importância em alimentos é a *Escherichia coli*, que quando presente indica condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, pois aponta contaminação de origem fecal (CALCI; BURKHARDT; WATKINS, 1998).

A *Escherichia coli* é uma enterobactéria Gram negativa, catalase positiva, oxidase negativa, não esporogênica, anaeróbia facultativa e capaz de desenvolver-se em temperaturas de 7,0 a 45,0 °C, com crescimento ótimo a 37,0 °C (SILVA et al., 2007).

Este patógeno pode causar graves doenças de origem alimentar e os sintomas variam conforme o sorotipo presente. Estes são definidos com base nos antígenos em somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (K) (FERNANDES; ANDREATTA; OLIVEIRA, 2006; PINTO; GERMANO; GERMANO, 2001).

2.1.2– Contaminação por *Staphylococcus* spp:

Os *Staphylococcus* spp. são importantes patógenos causadores de doenças de origem alimentar, sendo facilmente transmitidos ao alimento pelo homem devido a sua capacidade de multiplicação nos tecidos e produção de enterotoxinas (JAY, 2005). São microrganismos que se apresentam na forma de cocos Gram positivos, aos pares, pequenas cadeias ou em cachos

semelhantes aos de uva e possuem uma única camada de peptidoglicano (FORSYTHE, 2002). São anaeróbios facultativos, mantêm-se viáveis numa faixa de temperatura de 7,0 – 47,8 °C (JAY, 2005), suas enterotoxinas são produzidas entre 10,0 e 46 °C (FREIRAS et al., 2004). Magalhães et. al (2006) citam que os *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa estão associados a casos de mastite bovina e toxinfecções alimentares, e reafirmam a importância da identificação destes em derivados lácteos.

Na indústria de alimentos, a presença de estafilococos pode indicar deficiência de processamento ou condições higiênicas inadequadas do processo, sendo que, quando presentes nos alimentos, suas enterotoxinas, poderão causar intoxicação alimentar (GANDRA, 2006). Na intoxicação alimentar estafilocócica, os sintomas ocorrem entre duas e quatro horas após a ingestão da toxina pré-formada no alimento e os mais comuns são vômito, náuseas, dores abdominais e diarreia (HALPIN-DOHNALEK; MARTH, 1989).

Staphylococcus aureus são os mais comumente envolvidos em toxinfecções alimentares, principalmente em alimentos excessivamente manipulados ou elaborados em condições inadequadas (MATTOS, 2005). Apesar das diversas pesquisas apontarem para a participação direta dos manipuladores na contaminação dos alimentos, muitos surtos estão direcionados também a contaminação de superfícies e utensílios (FORSYTHE, 2002).

Os *S. aureus* tem sido envolvidos em diversos casos de intoxicação alimentar em todo o mundo, e os queijos são um dos principais alimentos relacionados a essa enfermidade (BANNERMAN, 2003).

2.1.3- Contaminação por *Listeria monocytogenes*:

A *Listeria monocytogenes* é considerada um patógeno emergente de grande interesse na área de alimentos por ser bastante patogênica e responsável por toxinfecções alimentares

que podem causar sérios danos ao sistema nervoso e também provocar aborto (CHIODA, et al., 2006; CARNICEL, 2004). Apresenta ampla distribuição no meio ambiente e capacidade de desenvolvimento em larga faixa de temperatura (0 - 44,0° C), pode tolerar valores de pH de 5,0 - 9,0, bem como baixa atividade de água e concentrações de NaCl acima de 10,0 % (BRANCO et al., 2003).

A presença de *L. monocytogenes* representa um perigo em potencial à saúde humana e sua presença em derivados lácteos indica pasteurização inadequada do leite ou contaminações pós-pasteurização, uma vez que essa é eliminada durante este processo (ARQUÉS et al., 2005; ESPER et al., 2007). As contaminações frequentes em queijos, além de causar altas taxas de mortalidade e grandes perdas econômicas, evidenciam a importância desse e de outros derivados lácteos na ocorrência de listeriose veiculada por alimentos (SILVA; HOFFER; TIBAMA, 1998). A listeriose apresenta alta letalidade, cerca de 25%, especialmente para indivíduos imunocomprometidos como idosos, mulheres grávidas e recém-nascidos (BARBALHO et al. 2005; DOGANAY, 2003).

Zottola (1994) e Costerton et al. (1995) afirmam que sob determinadas condições *L. monocytogenes* pode se aderir a superfícies abióticas e multiplicar-se dando origem a uma massa celular, que pode agregar nutrientes, resíduos e outros microrganismos. Tais estruturas são denominadas biofilmes. A formação de biofilmes na linha de produção da indústria de laticínios eleva a carga microbiana e, devido ao eventual desprendimento de porções aderidas, muitas vezes contamina os alimentos com patógenos. Dessa forma, podem constituir risco a saúde do consumidor e ocasionar prejuízos financeiros em virtude da diminuição da vida de prateleira dos produtos (FLACH et al., 2005).

Os queijos macios são conhecidos por ocasionarem surto de listeriose. Segundo Aragon-Alegro (2007) o queijo Minas Frescal é um representante deste grupo, podendo ser produzido por diferentes tecnologias. É possível que *L. monocytogenes* possa contaminar

alimentos processados por meio de equipamentos usados na produção, pois há relatos de persistência dessa bactéria na indústria de alimentos. A contaminação de produtos lácteos por *L. monocytogenes* é preocupante considerando-se os casos de listeriose humana ligada ao consumo desses produtos contaminados, a exemplo dos queijos. Produtos lácteos têm sido relacionados a surtos de listeriose ocorrentes na Europa (LUNDÉN; TOLVANEN; KORKEALA, 2004).

Os microrganismos psicotróficos apresentam crescimento visível a $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ no período de sete a dez dias, independentemente de sua temperatura ótima de crescimento, são portanto considerados importantes em produtos mantidos sob refrigeração por períodos entre 1 e 4 semanas (Perry, 2004). Como forma de controlar a multiplicação de *L. monocytogenes* em alimentos, destaca-se a utilização de bactérias lácticas como o intuito de avaliar seu efeito inibitório sobre *Listeria* spp (ALLENDE et al., 2007; ALVES et al., 2006)

2.2 – Alimentos Funcionais: Probióticos.

O consumo de alimentos saudáveis para a promoção do bem-estar e da saúde está incentivando o desenvolvimento de novos ingredientes e, assim, estimulando a inovação dos produtos alimentícios com importantes aplicações nutricionais e terapêuticas e formando novos nichos de mercado (MATSUBARA, 2001). O crescimento do setor de alimentos lácteos fermentados representa uma grande oportunidade para o aprimoramento de produtos com importantes aplicações nutricionais e terapêuticas, características altamente valorizadas pelas empresas do ramo alimentício.

A definição de probiótico está relacionada aos alimentos funcionais que contém microrganismos vivos como componentes essenciais e que, quando administrados em

quantidade mínima adequada, são efetivos para a manifestação de efeitos benéficos (FAO/WHO, 2001).

Segundo a Legislação Brasileira, probióticos são definidos como microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA, 2008). Os microrganismos probióticos podem ser inoculados a partir de uma preparação que deve conter estirpes definidas e viáveis em número suficiente para alterar a microbiota do consumidor, por implantação ou colonização, e exercer efeitos benéficos à saúde (SCHEREZENMEIR; DE VRESE, 2001).

Segundo Fukushima et al. (1998), e Foschino, Cafaro e Ottogalli (1997), a tolerância a acidez do estômago, resistência no trato gastrointestinal, aderência ao epitélio intestinal, estimulação imunológica, atividade antagonística contra patógenos como *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e *Clostridium difficile*, viabilidade e estabilidade durante a produção e estocagem do produto, bem como produção de boas características sensoriais ao produto, são requisitos para a seleção de uma estirpe. Ainda, a estirpe selecionada deve assegurar a manifestação dos efeitos probióticos durante o consumo, e o produto probiótico deve ter vida média variando de 15 a 30 dias.

Os probióticos são em grande parte administrados através dos alimentos funcionais, tais como produtos lácteos, em especial iogurtes, bebidas à base de soro de leite, leites fermentados e queijos. Além de benefícios em termos de nutrição e saúde as culturas probióticas podem contribuir também para melhorar o sabor do produto final ou diminuir a acidez que pode ocorrer durante o armazenamento e pós-processamento. A inclusão e sobrevivência de microrganismos probióticos nos alimentos, continuam a ser um desafio tecnológico, pois depende não só das características do produto alimentar como também da

maior ou menor sensibilidade do microrganismo ao ambiente que o rodeia (DOUGLAS et al., 2008).

De acordo com Shah (2000), o número de células viáveis de microrganismos probióticos deve situar-se acima de 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) por mL ou por g de produto durante o seu tempo de armazenamento. Cruz et al. (2009) afirmam que a viabilidade dos microrganismos probióticos pode ser afetada pela cepa utilizada e substâncias adicionadas ao longo do processo de fabricação do alimento, bem como o teor de oxigênio do produto e pela temperatura de armazenamento. Estes autores ressaltam também a importância de as concentrações recomendadas desses microrganismos serem mantidas durante o processo de fabricação do produto, e serem capazes de sobreviver ao trato gastrointestinal do consumidor.

Entre os mecanismos de atuação dos probióticos, a exclusão competitiva, em que esses competem por nutrientes e sítios de fixação com outros patógenos ou mesmo com outras bactérias da microbiota intestinal, é um dos processos mais considerados em diversos estudos (OUWEHAND et al, 1999). A exclusão competitiva demonstra, portanto, a necessidade da ingestão de doses elevadas de probióticos, assim como a realização de administração contínua para manifestação de suas propriedades funcionais. As bactérias lácticas podem produzir uma série de compostos com ação antimicrobiana como ácido lático e outros ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, etanol, diacetil e bacteriocinas. As bacteriocinas são peptídeos com capacidade de inibir a multiplicação de certos patógenos de origem alimentar como *Listeria monocytogenes* e *S. aureus* (DROSINOS; MATARAGAS; METAXOPOULOS, 2006; GALVEZ et al., 2008; SIT; VEDERAS, 2008).

Alguns dos benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos ao consumo de probióticos são: promover um equilíbrio benéfico da população residente no trato gastrointestinal (HOLZAPFEL et al., 2001); aumento da resistência gastrointestinal à colonização por

microrganismos patogénicos (SAULNIER et al., 2009) devido ao aumento da produção de mucina que reduz a permeabilidade intestinal e previne lesões de células epiteliais por parte de microrganismos patogénicos, obstruindo a sua adesão nessas superfícies; tem papel na promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose (CASIRAGHI et al., 2007); estimulam a imunidade do hospedeiro pelo aumento da produção de anticorpos nas mucosas (GUPTA; GARG, 2009), etc.

No que diz respeito ao aumento da modulação imunológica, os probióticos auxiliam na prevenção de certas doenças e/ou incômodos em humanos, como diarreia, devido à infecção com *Helicobacter pylori*, síndrome do intestino irritável, constipação, elevado crescimento bacteriano no intestino, câncer cervical, câncer de bexiga, colesterol, hipertensão, infecção do trato urinário e infecções relacionadas ao trato respiratório (GOLDIN, 1998; HOLPZAPFEL et al., 1998).

A presença de bactérias viáveis e em alto número no produto lácteo durante sua estocagem, é condição essencial para assegurar o efeito probiótico (OLIVEIRA et al., 2001). Os lactobacilos e as bifidobactérias são considerados agentes probióticos, pois são encontrados naturalmente no corpo humano, sobrevivendo à acidez do estômago, sendo assim capazes de colonizar o intestino. Produtos lácteos como iogurtes, leites fermentados, sorvetes e queijos, utilizam frequentemente culturas iniciadoras e bifidobactérias (ou lactobacilos) como aditivo ou suplemento (GOMES; MALCATA, 1999).

As espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* fazem parte do chamado “Grupo *Lactobacillus casei*” e possuem importante valor comercial para a indústria alimentícia, devido ao seu emprego na produção de leites fermentados e como culturas iniciadoras de fermentação na fabricação de queijos para a melhoria de sua qualidade (VASQUÉZ et al., 2005).

2.3- As Bactérias Lácticas e o Grupo *Lactobacillus casei*:

Segundo Holzapfel et al. (2001), bactérias lácticas são microrganismos Gram-positivos, não esporulados, catalase-negativos, desprovidos de citocromos, anaeróbios, mas aerotolerantes, ácido-tolerantes e estritamente fermentativos. O interesse pela presença dos lactobacilos na dieta humana aumentou desde o início do século XX, quando Elie Metchnikoff – Instituto Pasteur, Paris – promoveu o uso desses microrganismos para a bacterioprolifaxia e bacterioterapia (STILES; HOLZAPFEL, 1997). As BAL podem ser classificadas quanto à temperatura ótima de crescimento, em microrganismos mesofílicos quando, apresentam crescimento ótimo a 30°C ou termofílicos, quando apresentam crescimento ótimo a 42°C (FOX et al., 2000).

As bactérias ácido-lácticas atualmente utilizadas atualmente na produção de derivados lácteos pertencem principalmente aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* e *Propionibacterium*. As espécies de maior interesse são *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. murinus*, *L. intestinalis*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. brevis* e *B. lactis* (BARRETO, 2003).

Dentre as bactérias lácticas, o grupo *Lactobacillus casei* compreende aquelas fenotípica e geneticamente heterogêneas, capazes de manter o equilíbrio de vários ambientes. Destacam-se nesse grupo os lactobacilos típicos do hospedeiro humano, os quais incluem as espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*, além de *Lactobacillus zeae* (HOLZAPFEL et al. 2001).

As espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus zeae* e *Lactobacillus rhamnosus* apresentam comportamento fisiológico e necessidades nutricionais muito similares, multiplicando-se em condições ambientais bastante semelhantes.

Historicamente, a diferenciação entre cada uma das espécies pertencentes a esse grupo e a sua sistemática tem apresentado problemas e ajustes têm sido introduzidos baseados em novos métodos taxonômicos, como métodos moleculares de identificação e classificação, que foram se tornando disponíveis gradualmente (DESAI, SHAH e POWELL, 2006).

Lactobacillus rhamnosus é um dos organismos probióticos mais bem estudados e vários efeitos benéficos à saúde tem sido atribuídos a essa bactéria, tais como prevenção e tratamento de diarreia aguda em crianças, prevenção e tratamento de alergia, bem como efeitos benéficos para outras desordens (DORON; SNYDMAN; GORBACH, 2005).

Segundo Tuomola e Salminen (1998) a capacidade de aderência e de colonização de *L. rhamnosus* é considerada fator contribuinte para modulação imune, exclusão de patógeno e melhor contato com a mucosa pela bactéria probiótica. Assim, probióticos podem fortalecer a microbiota residente que forma parte integral da barreira nas mucosas e a resistência à colonização contra patógenos.

2.4- Utilização de Queijos como Veículo de Probióticos:

Na última década o queijo tem sido considerado por muitos autores como um veículo capaz de fornecer microrganismos probióticos ao trato gastrointestinal (GRATTEPANCHE et al., 2008; MADUREIRA et al., 2008; KALAVROUZIOTI et al., 2005), apresentando algumas vantagens sobre alguns leites fermentados e iogurtes (GRATTEPANCHE et al., 2008), devido às suas características como o seu teor em acidez, baixa concentração de oxigênio, e alto teor em lipídios.

O queijo é um alimento que protege os microrganismos durante a passagem pelo trato gastrointestinal (KILIÇ et al., 2009), como pode ser comprovado pelos estudos de viabilidade e sobrevivência de células viáveis de culturas probióticas (GRATTEPANCHE et al., 2008).

Buriti, Rocha e Saad (2005a) asseguram que, por apresentarem pH acima de 5,0, baixa concentração de sal, alta atividade de água e ausência de substâncias conservantes, os queijos frescos oferecem boas condições para a sobrevivência e multiplicação de cepas probióticas. Devido a essas características, o queijo Minas Frescal vem sendo utilizado em diversas pesquisas como um veículo apropriado para incorporação de bactérias probióticas (RIBEIRO, SIMÕES e JURKIEWICZ, 2009).

3 – OBJETIVOS:

3.1 - Objetivo Geral:

Avaliar o efeito inibitório de bactéria probiótica (*L. rhamnosus*) sobre as contagens de *S. aureus* e *L. monocytogenes*, aspergidos isoladamente ou em combinação sobre a superfície de queijo Minas Frescal, durante o armazenamento por 21 dias.

3.2 - Objetivos Específicos:

- a) Elaborar queijos Minas frescal experimentalmente adicionados das bactérias *L. rhamnosus*, *S. aureus* e/ou *L. monocytogenes*.
- b) Determinar as características físico-químicas (pH, atividade de água, umidade, extrato seco total, teor de gordura, proteína e perfil de textura) dos queijos Minas Frescal com ou sem adição da bactéria probiótica (*L. rhamnosus*) durante o armazenamento por 21 dias a 7°C.
- c) Verificar as contagens da bactéria probiótica (*L. rhamnosus*) e patogênicas (*S. aureus* e *L. monocytogenes*) nos queijos Minas frescal nos dias 1, 7, 14 e 21 de armazenamento a 7°C.
- d) Avaliar a sobrevivência da bactéria probiótica (*L. rhamnosus*) e das bactérias patogênicas (*S. aureus* e *L. monocytogenes*) nos queijos Minas Frescal, em condições de simulação do trato gastrointestinal utilizando ensaios *in vitro*.

4 – MATERIAL E MÉTODOS:

4.1- Delineamento Experimental:

O delineamento utilizado para verificação da ação inibitória de *L. rhamnosus* sobre *L. monocytogenes* e *S. aureus*, inoculados na massa dos queijos, consistiu em um esquema fatorial 2x2x2, sendo 8 tratamentos com 4 repetições, conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Tratamentos utilizados no experimento com queijo Minas Frescal adicionado de *Lactobacillus rhamnosus* e/ou *Listeria monocytogenes* e/ou *Staphylococcus aureus*.

Tratamentos ^a	Adição ao queijo (Log UFC/g)		
	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
Tratamento 1 (Controle)	0	0	0
Tratamento 2	9,0	0	0
Tratamento 3	9,0	5,0	0
Tratamento 4	9,0	0	7,0
Tratamento 5	9,0	5,0	7,0
Tratamento 6	0	0	7,0
Tratamento 7	0	5,0	0
Tratamento 8	0	5,0	7,0

^a n = 4 unidades de queijo Minas Frescal (aprox.. 250 g cada) / tratamento.

4.2- Elaboração do Queijo Minas Frescal:

O queijo Minas Frescal foi fabricado no Laticínio-Escola do *Campus* da USP em Pirassununga, São Paulo, a partir de 70 litros de leite bovino, de acordo com os procedimentos descritos por Silva; Junqueira; Silveira (1997), resumidos na Figura 1. Todas as etapas experimentais com os queijos prontos, incluindo a adição de *L. rhamnosus* e dos patógenos *S. aureus* e *L. monocytogenes* ocorreram no Laboratório de Microbiologia e Micotoxicologia de Alimentos (LMMA/FZEA/USP). Após o processamento, os queijos

foram enformados em formas de 250 g, sendo que 32 peças de queijo Minas Frescal foram utilizadas para adição das bactérias, conforme os tratamentos descritos no item 4.1. As amostras de queijo foram embaladas em sacos plásticos estéreis (Figura 2), pesadas e armazenadas em estufa B.O.D. sob refrigeração a 7°C por 21 dias.

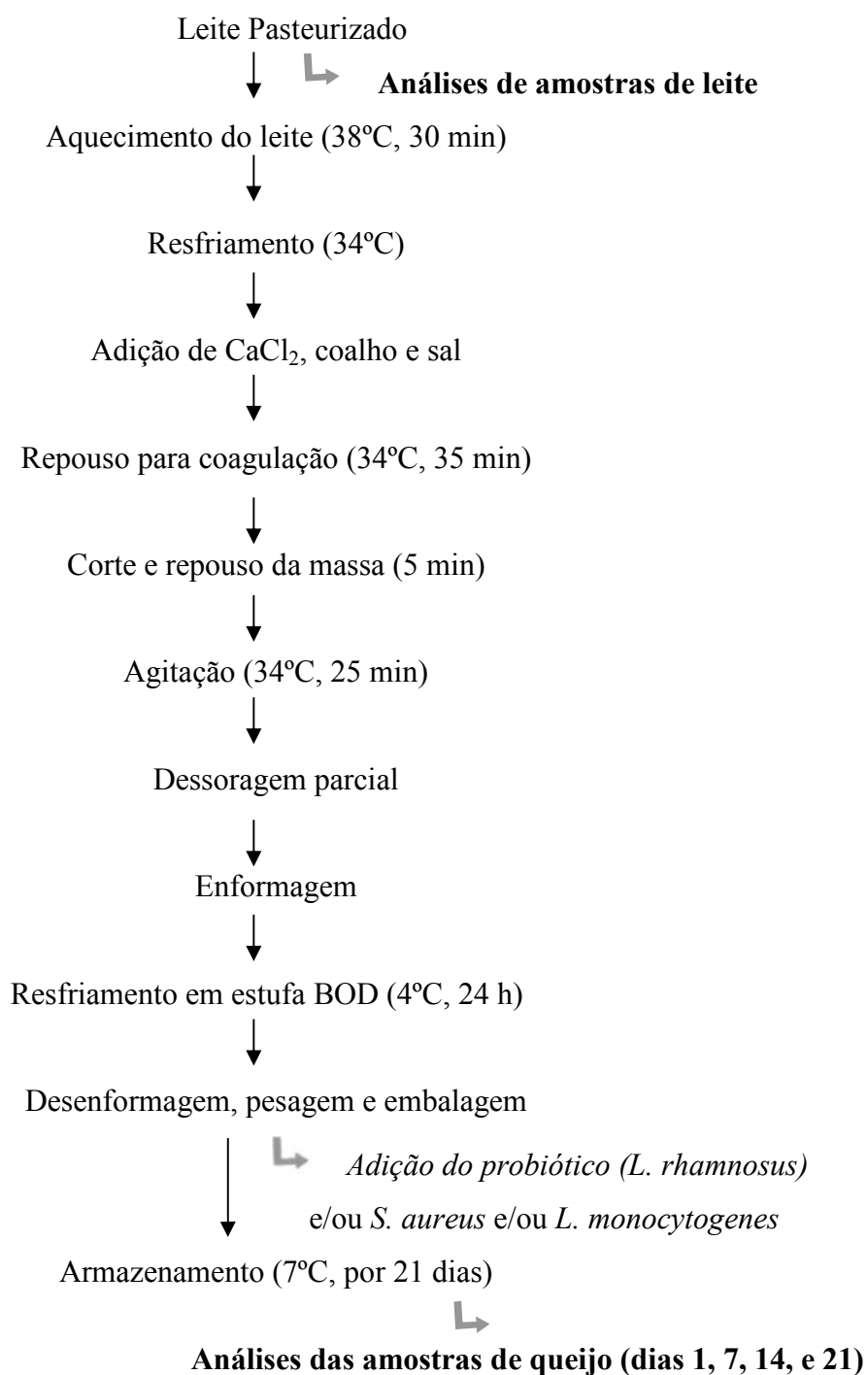


Figura 1. Fluxograma da fabricação do queijo Minas e amostragens.



Figura 2. Amostras de queijo Minas em processo de embalagem em sacos estéreis.

4.3- Análises Microbiológicas do Leite Pasteurizado:

O leite pasteurizado para a produção dos queijos foi analisado para coliformes a 35°C e termotolerantes (45°C), bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas mesófilas e psicotróficas, *L. monocytogenes* e *S. aureus*. As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos pela AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (2004). As amostras foram homogeneizadas antes e após cada diluição e as análises realizadas em duplicata. Para determinação de bactérias mesófilas e psicotróficas, alíquotas de 1 mL foram transferidas para tubos contendo 9 mL de água peptonada a 0,1% obtendo-se diluições decimais até 10^{-2} . Em seguida foi realizada a semeadura em meio de cultura Ágar Padrão para Contagem (PCA). As placas foram incubadas invertidas em estufa de cultura a 35°C por 48 horas (mesófilos) e a 7°C por 10 dias (psicotróficos).

Para determinação de coliformes a 30°C e coliformes termotolerantes (45°C), após homogeneização foram selecionadas 3 diluições adequadas da amostra e alíquotas de 1 mL

transferidas para tubos contendo caldo lauryl sulfato triptose (LST) contendo tubos de Duhran invertidos. Após incubação a 35°C por 48 horas, dos tubos que apresentaram turvação e produção de gás, foi realizado teste confirmativo para coliformes termotolerantes e confirmação de *E. coli*. A partir do número de tubos positivos, procedeu-se a leitura na tabela de MacGrady (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2004), sendo os resultados expressos em número mais provável por mL de amostra (NMP/mL).

A determinação da presença de *L. monocytogenes* e *S. aureus* no leite pasteurizado foi realizada semeando-se alíquotas de 0,1 mL da diluição 10⁻¹ na superfície de ágar Oxford e Bair-Parker, respectivamente, seguida da incubação a 35°C por 48 horas (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2004).

4.4- Preparo das Suspensões Bacterianas:

Para este estudo foram utilizadas cepas de *L. monocytogenes* (ATCC 7644), de *S. aureus* (ATCC 29213) e de *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 7469) liofilizadas, obtidas comercialmente. A ativação das cepas puras de *L. rhamnosus* (casei) foi realizada em caldo BHI com posterior incubação a 37 °C por 48 horas, obtendo-se a estimativa de concentração bacteriana do probiótico a ser inoculado sobre a massa dos queijos de 10⁹ pela escala de Mac Farland. As cepas puras de *L. monocytogenes* foram ativadas mediante incubação a 35 °C durante 24 a 48 horas em caldo BHI enriquecido com extrato de levedura a 0,6% até a concentração de 10⁵ pela escala de Mac Farland, e as cepas de *S. aureus* foram ativadas através de incubação em caldo BHI a 35 °C por 48 horas sendo a concentração final pela escala de Mac Farland de 10⁷. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) por mL de meio.

4.5- Adição das Suspensões Bacterianas nas Amostras de Queijos:

Com o intuito de evitar a contaminação dos tanques na linha de fabricação dos queijos, optou-se pelo processo tradicional de fabricação dos queijos Minas frescal, onde alíquotas de 1,0 mL de cada cultura foram inoculadas sobre as massas dos mesmos em capela de fluxo laminar no LMMA, durante a etapa de dessoragem de seu processamento (Figura 3). A suspensão de *L. rhamnosus* utilizada para a adição sobre a massa dos queijos conteve cerca de $1,0 \times 10^9$ UFC/g de queijo, e as contagens aproximadas de *L. monocytogenes* e *S. aureus* respectivamente de $1,0 \times 10^5$ UFC/g de queijo e $1,0 \times 10^7$ UFC/g de queijo.

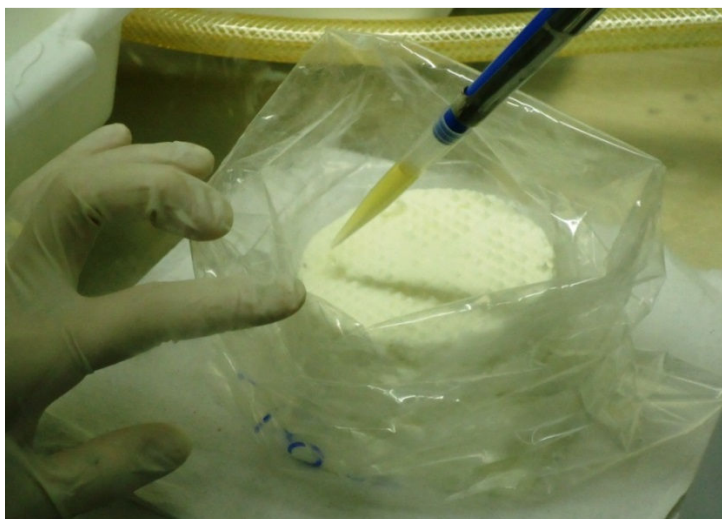


Figura 3: Inoculação das suspensões bacterianas sobre os queijos após sua dessoragem.

4.6- Análises Físico-Químicas dos Queijos:

As características físico-químicas das amostras em duplicata do grupo controle (T1) e do tratamento onde foi inoculado o probiótico (T2) foram determinadas nos dias 1, 7, 15 e 21 de armazenamento. Os queijos inoculados com *L. monocytogenes* e/ou *S. aureus* (tratamentos T3 a T8) não foram submetidos à análise físico-química, para evitar possível contaminação dos utensílios e equipamentos utilizados nessas análises.

Os queijos dos tratamentos T1 e T2 foram submetidos à determinação do pH, atividade de água a 25°C, da composição (umidade, matéria seca, teor de gordura e proteína) e perfil de textura.

Os valores de pH das amostras de queijo foram medidos utilizando-se medidor de pH de bancada seguindo a técnica descrita por LANARA (1981).

As medidas de atividade de água (A_w) foram realizadas em higrômetro (Acqua Lab Decagon Devices Series 3TE, Pullman, EUA).

A umidade foi determinada segundo a técnica descrita pelo Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA, 1981) utilizando estufa a 105°C até obtenção do peso constante, enquanto que o extrato seco total (EST) foi calculado com base na diferença da umidade por 100.

O teor de gordura das amostras de queijo Minas Frescal foi realizado através do método butirométrico para queijo, utilizando-se butirômetro de leite (LANARA, 1981).

Os conteúdos de proteína bruta foram determinados pelo método de Micro- Kjeldahl, segundo as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (2005).

Foram realizadas as análises de textura nos queijos Minas frescal do tratamento 1, sem adição de *L. rhamnosus* e no tratamento 2, elaborado com adição de *L. rhamnosus*, nos dias 1, 7, 14 e 21 de armazenamento. O perfil da textura dos queijos foi determinado com analisador de textura TAX- T2 (Texture Profile Analysis). A coleta de dados foi realizada por meio da utilização do software Texture Expert for Windows 1.20 (Stable Micro Systems) através de teste de dupla compressão de amostras cilíndricas onde cada peça de queijo foi cortada em cilindros de 2,5 cm de diâmetro por 3,0 cm de altura. Os parâmetros determinados foram elasticidade, adesividade, coesividade, mastigabilidade e dureza com taxa de deformação de 2 mm/s para velocidade, tempo de espera entre compressão de 5s e força de contato 0, 2 N. Para a determinação dos parâmetros citados, seguiram-se os procedimentos de MacFIE (1990).

4.7- Análises Microbiológicas dos Queijos:

Os queijos foram analisados nos dias 1, 7, 14 e 21 após a fabricação. As amostras foram inicialmente pesadas, sendo uma alíquota de 25 g transferida para um saco plástico estéril, e então homogeneizadas em 225 mL de água peptonada 0,1% e em Stomacher antes das diluições seriadas.

Para as etapas de isolamento e detecção dos microrganismos, a diferenciação de *L. monocytogenes* de outras espécies foi realizada utilizando-se diluições de 10^{-1} a 10^{-5} . Após a incubação a 35°C por 24 a 48 horas em meio Ágar Oxford para *Listeria* foi verificada a presença de colônias típicas de *L. monocytogenes* e estas foram submetidas à coloração de Gram, teste de catalase e motilidade em ágar Sulfito Indol Motilidade (SIM).

A Figura 4 mostra a realização das diluições seriadas para o isolamento de *L. monocytogenes* em caldo para enriquecimento de *Listeria*.



Figura 4: Diluições seriadas para o isolamento de *L. monocytogenes*.

A contagem de *S. aureus* foi realizada em ágar Baird Parker (BP) (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997) utilizando-se diluições de 10^{-1} a 10^{-5} , contando-se, posteriormente, colônias típicas e atípicas. Para a confirmação de *S. aureus* foram

selecionadas cinco colônias típicas de cada placa para teste da coagulase em tubo e, quando menos do que cinco, todas foram testadas. Foi também realizada a coloração de Gram.

L. rhamnosus foram cultivados em meio Ágar de Man, Rogosa Sharpe (MRS) sob condições estáticas por plaqueamento em profundidade. As culturas foram incubadas a 37°C por 48h em jarra de anaerobiose. Foi realizado teste da catalase e também coloração de Gram.

Adicionalmente, foram realizadas análises de microrganismos indicadores nos queijos, com a finalidade de avaliar as condições de higiene geral durante os procedimentos de elaboração do produto. Deste modo, foram utilizadas quatro amostras de cada tratamento, totalizando 32 amostras, e as análises ocorreram nos dias 1 e 21 de armazenamento para verificar a evolução da população bacteriana nos queijos no primeiro dia de armazenamento e no final de sua vida de prateleira. Foi realizada a contagem de bactérias mesófilas, psicotróficas e determinação do NMP de coliformes a 30°C, coliformes termotolerantes (45°C), bem como o teste de confirmação para *E. coli*, utilizando-se as mesmas metodologias (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2004) descritas para as análises do leite pasteurizado.

4.8- Análise da Sobrevivência das Bactérias em Condições Simuladas do Trato Gastrointestinal:

A sobrevivência de *L. rhamnosus* e dos patógenos foi testada através da simulação do trato gastrointestinal *in vitro*. Nos dias 1, 7, 14 e 21 de armazenamento 25g de cada amostra foi homogeneizada e realizou-se a diluição seriada até 10^{-3} . Procedeu-se o plaqueamento e contagem de cada microrganismo. Para comparar a taxa de sobrevivência do probiótico e dos patógenos, 1mL de cada tudo das diluições foi adicionado a tubos contendo 9mL de solução gástrica com pH 2,0 e 0,2% de NaCl. Esses tubos foram incubados a 37°C

por um período de 30 minutos. Em seguida 1mL de cada tubo foi transferido para tubos contendo solução intestinal com pH 7,0 e 0,6% de sais biliares e a incubação foi feita por 60 minutos a 37°C. Essas condições reproduzem as condições encontradas no trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis (MORTAZAVIAN et al.,2008).

As taxas de sobrevivência dos microrganismos foram calculadas como descrito na equação (1) (Wang et al.,2009):

$$\% \text{ de sobrevivência} = \frac{\text{Log } N_1}{\text{Log } N_0} \times 100 \quad (1)$$

Onde Log N_1 é a contagem viável do microrganismo após a simulação ao teste de sobrevivência aos conteúdos do trato gastrointestinal e, Log N_0 representa a contagem do microrganismo antes do tratamento com os conteúdos do trato gastrointestinal.

4.9- Análise dos Resultados:

O delineamento experimental utilizado (esquema fatorial 2 x 2 x 2) contemplou 8 tratamentos constituídos pela presença ou ausência de *L. rhamnosus*, *L. monocytogenes* ou *S. aureus*, analisados em 4 tempos de armazenagem (1, 7, 14 e 21 dias). As contagens de bactérias foram convertidas para log. Os resultados obtidos nas análises microbiológicas e físico-químicas foram submetidos à ANOVA de acordo com os procedimentos descritos por Gacula e Singh (1984), para a verificação de diferenças estatisticamente significativas nas variáveis estudadas nos queijos produzidos no experimento. Para a comparação entre as médias, quando aplicável, empregou-se o teste de Tukey, adotando-se, como nível de rejeição, $\alpha = 0,05$ (GACULA; SINGH, 1984).

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Avaliação Microbiológica do Leite Pasteurizado:

Os resultados das análises do leite pasteurizado mostraram que não foi observada a presença de microrganismos psicrótrópicos, de *S. aureus* nem de *L. monocytogenes*. A contagem de microrganismos mesófilos totais foi de $1,4 \times 10^2$ UFC/mL, indicando estar dentro dos limites de tolerância para mesófilos em leite pasteurizado (3×10^5 UFC/mL) segundo a instrução Normativa nº51 (BRASIL, 2002). Embora não tenha sido detectada a presença de coliformes termotolerantes (45°C), a enumeração de coliformes a 30°C foi de 3,0 NMP/mL, excedendo o limite de tolerância ($<0,3$ NMP/mL) proposto pela legislação.

5.2- Avaliação Físico-Química dos Queijos:

A Tabela 2 apresenta as médias obtidas nas análises físico-químicas realizadas nos queijos Minas Frescal dos tratamentos 1 e 2 avaliados nos dias 1, 7, 14 e 21 após a fabricação. Não houve efeito significativo ($P>0,05$) dos tratamentos sobre nenhum dos parâmetros físico-químicos analisados, indicando que a adição de *L. rhamnosus* ao queijo Minas não interferiu com as características do produto, em comparação ao controle.

Com relação ao comportamento das variáveis ao longo do período de armazenagem, observou-se diminuição gradativa das médias de pH do 1º ao 21º dia de armazenamento no tratamento 1, de 6,83 a 6,08 com redução de 0,75, conforme a Figura 5. No tratamento 2, a diminuição foi de 6,41 a 5,78 sendo a redução de 0,63.

Buriti, Rocha e Saad (2005a) encontraram variação do pH de 6,16 a 5,38 entre o 1º e o 21º dia de armazenamento, tendo uma redução de 0,78. Silva et.al (2003) encontraram valores de pH de 6,2 a 5,0 em queijo Minas frescal.

A acidez do queijo tende a aumentar de acordo com o crescimento de microrganismos, ao longo do período de armazenamento, o que beneficia o produto por inibir a microbiota patogênica (WOLFSCHOON-POMBO; LIMA,1989).

Tabela 2- Resultados das análises de pH, Aw, umidade, proteína e teor de gordura dos queijos Minas frescal nos tratamentos com ou sem adição de *L.rhamnosus*¹.

Tratamento	pH	Aw	Umidade (%)	Proteína	Gordura (%)
T1	6,61±0.28	0,99±0.005	70,30±4.91	15,21±2,87	11,66±2.36
T2	6,70±0.29	0,99±0.005	70,76±1.78	15,38±1.78	11,17±1.47

¹ Resultados expressos em médias ± desvio padrão de 4 amostras analisadas em duplicata nos dias 1, 7, 14 e 21 de armazenamento.

Não houve diferença significativa entre as médias de uma mesma coluna pelo teste de Tukey (P > 0,05).

T1: queijos sem adição de *L. rhamnosus*; T2: queijos com adição de *L. rhamnosus*.

Os valores de atividade de água variaram pouco, de 0,98 a 0,99. Esses resultados mostram que não houve diferença deste parâmetro entre os queijos Minas frescal sem a adição da cultura probiótica (T1) e com a adição de *L. rhamnosus* (T2).

Para os teores de umidade, os queijos Minas frescal do tratamento 1, nos dias 1, 7, 14 e 21 de armazenamento, apresentaram valores médios de respectivamente 67,19%, 65,12%, 71,90% e 77,14%. Os queijos do tratamento 2 apresentaram valores médios nos dias 1, 7, 14 e 21 de armazenamento de respectivamente 70,93%, 68,54%, 71,04% e 72,53%. A legislação

brasileira (BRASIL, 1996) caracteriza os queijos Minas frescal como queijos de muito alta umidade (>55,0%). Os teores de umidade encontrados nos queijos neste estudo estavam em conformidade com a legislação em vigor.

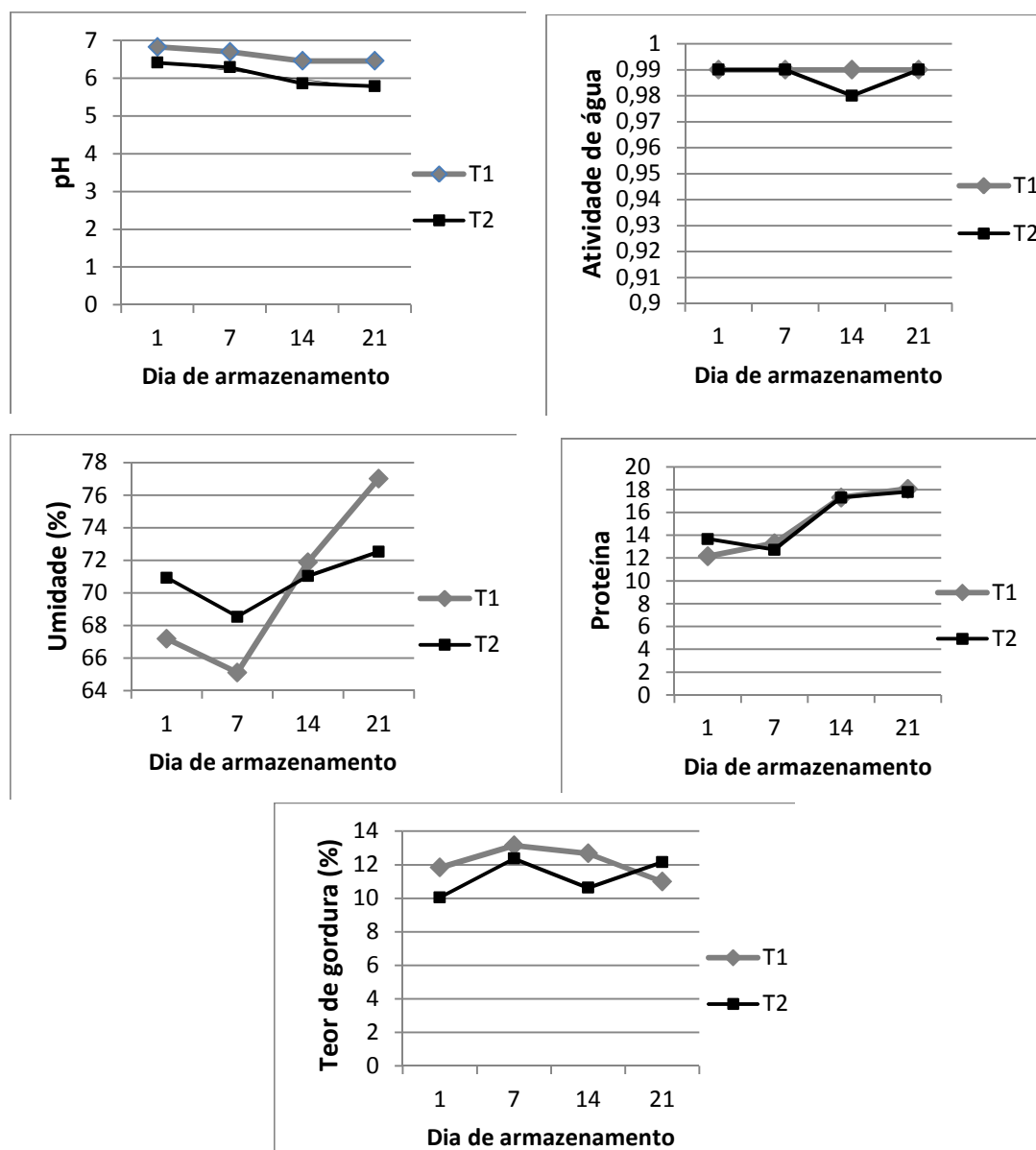


Figura 5. Evolução dos valores médios ($n = 2$) de pH, atividade de água, umidade, proteína e teor de gordura nos queijos Minas frescal durante os 21 dias de armazenamento. T1: Tratamento sem adição de *L. rhamnosus*; T2: tratamento com adição de *L. rhamnosus*.

Diversos estudos demonstraram oscilações para valores de teor de umidade em queijos Minas frescal. Para os teores de umidade, em estudo realizado por Santos (2009), os queijos Minas frescal apresentaram valores médios de 66,04 %. Machado et al. (2004) a partir da avaliação de vinte amostras de queijo Minas artesanal da região do Serro - MG, obtiveram valores médios de umidade de 50,84 %, sendo estes inferiores aos deste estudo. Em trabalho realizado por Silva (2007) obteve-se teor médio de umidade para queijo Minas de 43,63 %. A variação em seus resultados é verificada pela falta de padronização do produto.

Foi verificado o aumento da concentração de proteína bruta ao longo dos 21 dias de armazenamento dos queijos. A média do valor de proteína bruta encontrada para o tratamento controle variou de 12,15% no 1º dia para 18,07% no 21º dia de armazenamento. Para o tratamento com probiótico, a média variou de 13,68% a 17,80% do 1º ao 21º dia de armazenamento. Spadoti, Dornellas e Roig (2005) encontraram 18,02% de proteína, e Machado et al. (2004) encontraram 17,06% de proteína em queijo Minas frescal. A diferença entre as concentrações de proteína verificadas entre este trabalho e dos autores citados pode ser devido a não padronização do produto, do teor de umidade ou da qualidade da matéria prima.

O queijo Minas frescal apresenta de 12% a 18% de proteína segundo Machado et al.(2004) e Marques e Oliveira (2004). Dependendo da variedade, a concentração de proteína do queijo varia até aproximadamente 40%. O processo de maturação no queijo envolve a degradação da proteína, principalmente caseína, por enzimas naturais do leite e enzimas microbianas (FOX et al.,2000).

O teor de gordura dos queijos não teve variação estatística significativa no decorrer de 21 dias de armazenamento, apresentando média de 12,25% e de 10,33% no tratamento 1 e tratamento 2 respectivamente. Rosa (2004) encontrou valores de 20,5% em queijo Minas frescal. Os valores variam pela não padronização do produto.

A composição nas amostras dos queijos com adição de *L. rhamnosus* foi semelhante à dos queijos do grupo controle, em todos os parâmetros estudados, o que indica que o probiótico usado não alterou a composição do queijo. Resultados semelhantes foram encontrados por Buriti, Rocha e Saad (2005b) ao constatarem que não ocorreram diferenças significativas na umidade, gordura e proteína nos queijos com adição de *L. acidophilus*, quando comparados ao tradicional.

A Tabela 3 apresenta os valores obtidos nas análises de perfil de textura (TPA) nos queijos Minas frescal. As médias obtidas para os perfis de dureza, adesividade, elasticidade, coesividade e mastigabilidade ao longo dos 21 dias de estocagem, e entre os queijos Minas frescal do tratamento sem adição de *L. rhamnosus* e do tratamento com adição de *L. rhamnosus* não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$).

Tabela 3. Valores obtidos das curvas de análise de perfil de textura (TPA) dos queijos dos tratamentos com ou sem adição de *L. rhamnosus*.

Tratamentos	Adesividade		Elasticidade	Coesividade	Mastigabilidade
	Dureza (N)	(N.s)	(adimensional)	(adimensional)	(N)
T1	81,7±15.6	-1,82±-0.9	0,91±0.05	0,74±0.02	55,8±12.7
T2	93,1±25.9	-1,79±-0.7	0,92±0.04	0,74±0.04	63,8±19.1

¹ Resultados expressos em médias ± desvio padrão de 4 amostras analisadas em duplicata nos dias 1, 7, 14 e 21 de armazenamento.

Não houve diferença significativa entre as médias de uma mesma coluna pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

T1: queijos sem adição de *L. rhamnosus*; T2: queijos com adição de *L. rhamnosus*.

N – newton; N.s – newton/segundo.

A evolução dos valores médios dos parâmetros de textura dos queijos Minas frescal dos tratamentos 1 (controle) e 2 (*L. rhamnosus*) encontra-se apresentada na Figura 6.

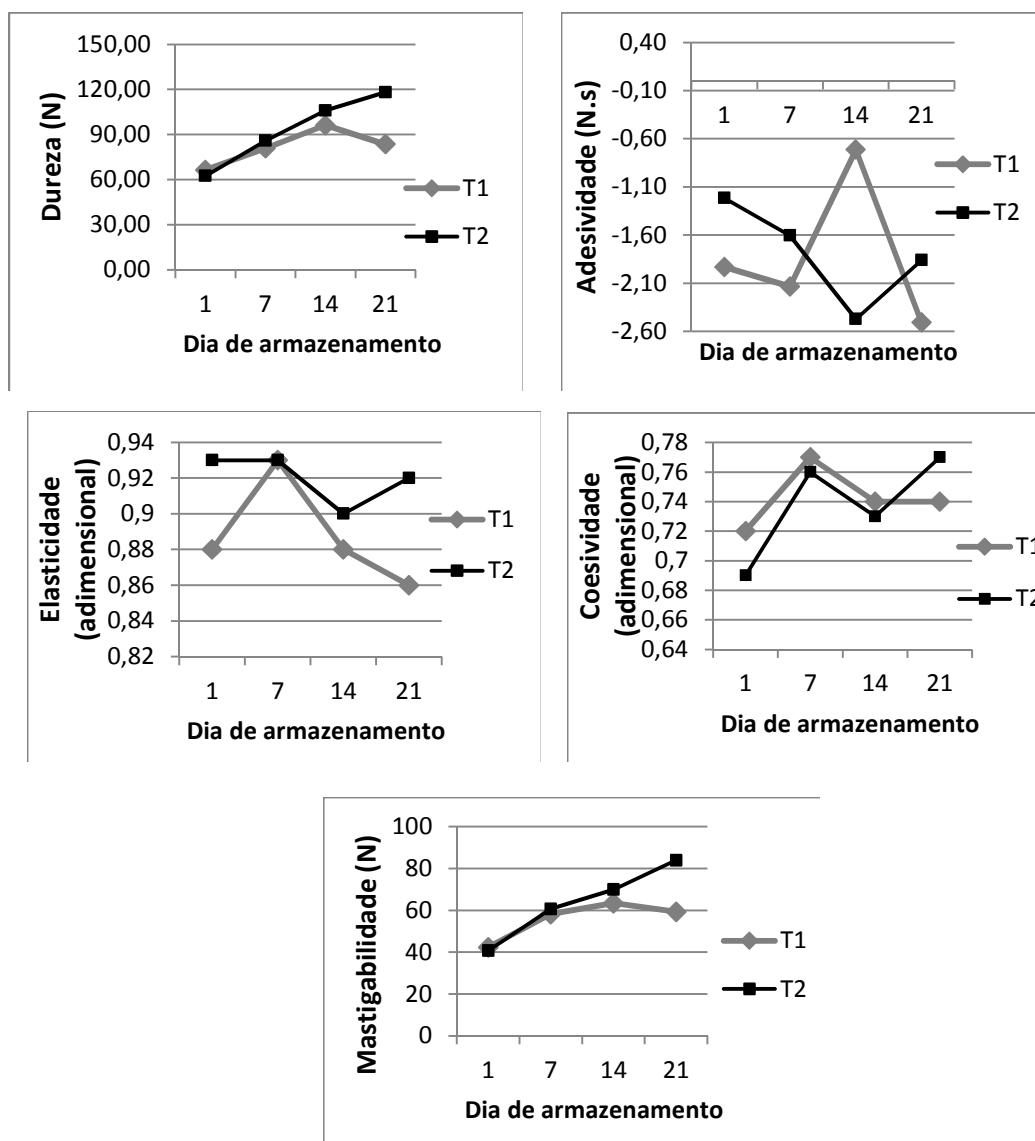


Figura 6. Evolução dos valores médios ($n = 2$) dos parâmetros de textura (dureza, adesividade, elasticidade, coesividade e mastigabilidade) nos queijos Minas frescal durante os 21 dias de armazenamento. T1: tratamento sem adição de *L. rhamnosus*; T2: tratamento com adição de *L. rhamnosus*.

Os valores obtidos para os parâmetros como dureza e mastigabilidade diferem de resultados encontrados em outros estudos (MARCATTI et al., 2009; BURITI; ROCHA e SAAD, 2005b), uma vez que diferentes métodos, com diferentes valores de penetração

máxima e taxa de deformação são utilizados para avaliar perfis de textura nos queijos. Além disso, os queijos Minas frescal apresentam muita heterogeneidade em suas características sensoriais e qualitativas devido a diferentes métodos de fabricação, ocasionando diferentes padrões de durabilidade, sabor e textura.

Muitos autores tem avaliado a *performance* de várias culturas probióticas na produção de diferentes tipos de queijos, porém poucos estudos tem sido realizado em queijos frescos. A dureza e outros parâmetros de textura como mastigabilidade e gomosidade são fortemente influenciados pelo pH e umidade nos queijos (FOX; McSWEENEY, 1998).

Da mesma forma que não foi verificada diferença significativa ($P>0,05$) nos outros parâmetros físico-químicos avaliados neste estudo, não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre as médias nos parâmetros de textura analisados entre os tratamentos 1 (controle) e 2 (*L. rhamnosus*). Visto que o processo de fabricação dos queijos Minas frescal nos dois tratamentos foi o mesmo, e a cultura de *L. rhamnosus* não alterou essas características.

5.3- Avaliação Microbiológica dos Queijos:

5.3.1- Contagem de Microrganismos Indicadores:

Não foram encontrados microrganismos psicrotróficos nas amostras analisadas. Os resultados para as contagens de bactérias mesófilas nos queijos do tratamento 1, onde não houve adição de *L. rhamnosus*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, mostram que ocorreu aumento nas contagens durante o armazenamento, variando de 3,54 log UFC/g ($3,5 \times 10^2$ UFC/g) no dia 1 para 6,76 log UFC/g ($5,8 \times 10^6$ UFC/g) no 21º dia. Estes dados são coerentes com os valores obtidos por Rosa (2004), o qual analisou amostras de queijo fresco disponíveis no comércio e encontrou população de mesófilos de 6,48 log UFC/g. Manolopoulou et al. (2003) ao estudar

um queijo fresco de origem grega (queijo Feta), verificou uma evolução de bactérias mesófilas de 5,18 log UFC/g a 9,35 log UFC/g durante 16 dias de armazenamento. O aumento da população desses microrganismos durante o período de estocagem sob refrigeração mostra a possibilidade de deterioração do produto, ocasionando a redução da sua vida de prateleira.

Observou-se no dia 1 de armazenamento, que das 32 amostras de queijo Minas frescal, analisadas, 90,62% demonstraram a presença de coliformes a 30°C (Tabela 4). Dessas 32 amostras, cinco apresentaram contagens de 3,38 log NMP/g ($\geq 2,4 \times 10^3$ NMP/g), sendo que as médias das contagens das demais amostras ficaram entre 1,59 log NMP/g e 2,96 log NMP/g. Todas as amostras apresentaram valores de contagem para coliformes a 30°C aceitáveis, de acordo com a legislação para este tipo de queijo (1×10^4 NMP/g) (4 log NMP/g) (BRASIL, 1996). Para a enumeração de coliformes termotolerantes (45°C) no dia 1 de armazenamento, verificou-se que as 32 amostras analisadas apresentaram contagens que se adequavam ao valor permitido pela legislação vigente de 2,7 log NMP/g ($< 5 \times 10^2$ NMP/g) (BRASIL, 2001).

No dia 21 de armazenamento, todas as amostras apresentaram populações de coliformes a 30°C acima de $2,4 \times 10^3$ NMP/g (3,38 log NMP/g), encontrando-se, ainda, abaixo do limite aceitável de 1×10^4 NMP/g (BRASIL, 1996). A Figura 7 mostra uma série de tubos de caldo Lauryl Sulfato Triptose com tubos de Durhan invertidos, em incubação a 35°C, com crescimento e produção de gás demonstrando o teste presuntivo da presença de coliformes a 30°C nas amostras de queijo Minas frescal.

Os resultados obtidos para a enumeração de coliformes a 45°C mostram que após 21 dias de armazenamento todas as amostras apresentaram contagens de queijo Minas frescal enquadraram-se como impróprias para consumo conforme a Resolução Colegiada (RDC) nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2001).

Tabela 4. Evolução das populações de coliformes a 30°C e coliformes a 45°C nos queijos nos dias 1 e 21 de armazenamento¹.

Tratamento	Dia 01 de armazenamento		Dia 21 de armazenamento	
	Coliformes a 30° C	Coliformes a 45° C	Coliformes a 30° C	Coliformes a 45° C
	(log NMP/g)	(log NMP/g)	(log NMP/g)	(log NMP/g)
T 1	1,59 ±1,31	0,62 ±0,22	>3,38	3,13 ±0,50
T 2	1,95±1,28	1,33±0,28	>3,38	>3,38
T 3	2,51±0,45	0,75±0,19	>3,38	3,29 ±0,16
T 4	2,64±1,03	0,95±0,15	>3,38	>3,38
T 5	1,96±1,44	1,02±0,32	>3,38	>3,38
T 6	2,64±0,52	0,83±0,38	>3,38	>3,38
T 7	2,20±0,60	0,86±0,17	>3,38	>3,38
T 8	2,96±0,41	1,80±0,71	>3,38	>3,38

¹ Resultados relativos à média ± desvio padrão de 4 amostras analisadas em duplicata nos dias 1 e 21 após o dia de fabricação.



Figura 7: Tubos com caldo Lauryl Sulfato Tryptose incubados a 35°C com crescimento e produção de gás no dia 21 de armazenamento.

Diversos trabalhos indicam que queijos do tipo Minas frescal são amplamente contaminados com populações de microrganismos acima do estabelecido pela legislação vigente (BRASIL, 2001).

No Brasil, já foram realizados vários estudos com finalidade de avaliar a qualidade microbiológica de amostras de queijo Minas Frescal. Ferreira et al. (2011) avaliaram a qualidade microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados em feiras livres da cidade de Uberlândia-MG e encontraram populações de coliformes termotolerantes acima de $1,0 \times 10^3$ NMP/g em 65% das 20 amostras avaliadas. Ao investigarem a qualidade de 30 amostras de queijo Minas Frescal, Peresi et al. (2001) constataram que 43,3% das amostras artesanais também continham elevadas populações de coliformes termotolerantes.

Rocha, Buriti e Saad (2006) encontraram uma população acima de 5×10^3 NMP/g de *E. coli* em 61% dos queijos analisados. Paiva (2005), ao analisar 30 amostras de queijo comercializado em supermercado, verificou que 47% estavam contaminadas por *E. coli*.

A vida de prateleira do queijo Minas frescal está relacionada com a matéria-prima, o processo de produção e a quantidade inicial de microrganismos presentes, que reflete diretamente a higiene na fabricação do queijo.

A contagem elevada de coliformes a 45°C no 21º dia de armazenamento pode representar proliferação do microrganismo durante a estocagem, mesmo que sob refrigeração. Foi confirmada a presença *E. coli* em todas as amostras de queijo (Figura 8). Rosa (2004) verificou presença de *E. coli* em queijos sob refrigeração. Assim, o produto pode tornar-se impróprio para consumo conforme seu tempo de armazenamento.

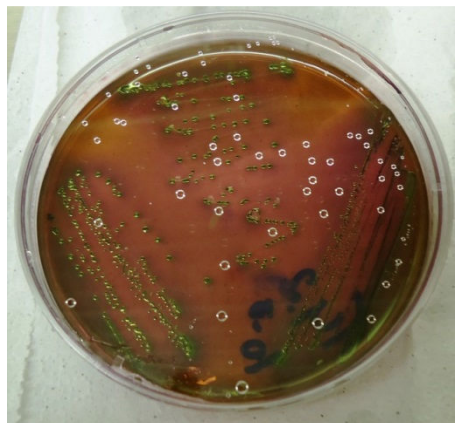


Figura 8. Placa de Petri com colônias de *E. coli* em ágar Eosina-Azul de Metileno.

5.3.2- Contagem das Bactérias Probiótica e Patogênicas:

A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos nas contagens de *L. rhamnosus* no tratamento onde apenas este microrganismo foi inoculado nos queijos, e nos tratamentos em que foi inoculado em associação com *L. monocytogenes* e/ou *S. aureus*. Observa-se que, no dia 1, as contagens de *L. rhamnosus* foram baixas em todos os tratamentos, sendo maior ($P < 0,05$) no queijo adicionado das 3 bactérias (T5). No dia 7 de armazenamento, as contagens de *L. rhamnosus* foram maiores ($P < 0,05$) nos tratamentos com as 3 bactérias (T5) ou com *S. aureus* (T4), sendo que a partir do dia 14 não houve diferenças ($P > 0,05$) nas contagens de *L. rhamnosus* nos tratamentos que continham esta bactéria. Considerando os valores obtidos ao longo do período de armazenagem, observou-se um aumento progressivo ($P < 0,05$) nas contagens de *L. rhamnosus* em todos os tratamentos a partir do dia 7 de armazenamento, estabilizando ao redor de 10^6 UFC/g. Estes dados indicam que a presença concomitante de *L. monocytogenes* e/ou *S. aureus* nos queijos Minas frescal não influenciou a contagem de *L. rhamnosus* nos produtos durante o armazenamento por 21 dias a 7°C .

Shah (2000) afirma que o número de células viáveis de microrganismos probióticos deve situar-se acima de 10^6 UFC por mL ou por g de produto durante o seu tempo de

armazenamento. As contagens de *L. rhamnosus* foram baixas em todos os tratamentos no dia 1 de armazenamento e este fato pode ser decorrente da perda de células probióticas viáveis durante a drenagem do soro. Outros fatores que influenciam a manutenção das atividades funcionais das bactérias probióticas em queijos são o momento da adição do inóculo, o empacotamento, a maturação e condições de armazenamento (CRUZ et al., 2009). No tratamento 2 (somente *L. rhamnosus*), a adição inicial de 10^9 UFC/g, foi eficiente para manter a contagem de *L. rhamnosus* acima desta quantidade, caracterizando os queijos como alimento probiótico, após o dia 7 de armazenamento.

Tabela 5. Contagens de *L. rhamnosus*, expressos em Log UFC/g, nos queijos Minas frescal durante 21 dias de armazenamento¹.

Adição ao queijo (Log UFC/g)				Dia de armazenamento			
T	Lr	Lm	Sa	1	7	14	21
T2	9,0	0	0	4,89±0,17 ^{bC}	6,11±0,06 ^{bB}	8,26±0,01 ^{aA}	8,25±0,12 ^{aA}
T3	9,0	5,0	0	4,82±0,32 ^{bC}	6,27±0,07 ^{bB}	8,44±0,16 ^{aA}	8,36±0,03 ^{aA}
T4	9,0	0	7,0	4,84±0,15 ^{bC}	7,23±0,15 ^{aB}	8,32±0,07 ^{aA}	8,35±0,04 ^{aA}
T5	9,0	5,0	7,0	5,66±0,21 ^{aC}	7,19±0,16 ^{aB}	8,40±0,15 ^{aA}	8,33±0,08 ^{aA}

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão de 4 amostras analisadas em duplicata.

^{a,b} Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas colunas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

^{A-C} Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas nas linhas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

T: Tratamento. Lr: *Lactobacillus rhamnosus*; Lm: *Listeria monocytogenes*; Sa: *Staphylococcus aureus*.

A Figura 9 apresenta as médias globais obtidas para as contagens de *L. rhamnosus*, permitindo observar mais claramente o seu comportamento nos diferentes tratamentos onde esse microrganismo foi inoculado nos queijos Minas frescal, durante os 21 dias de armazenamento.

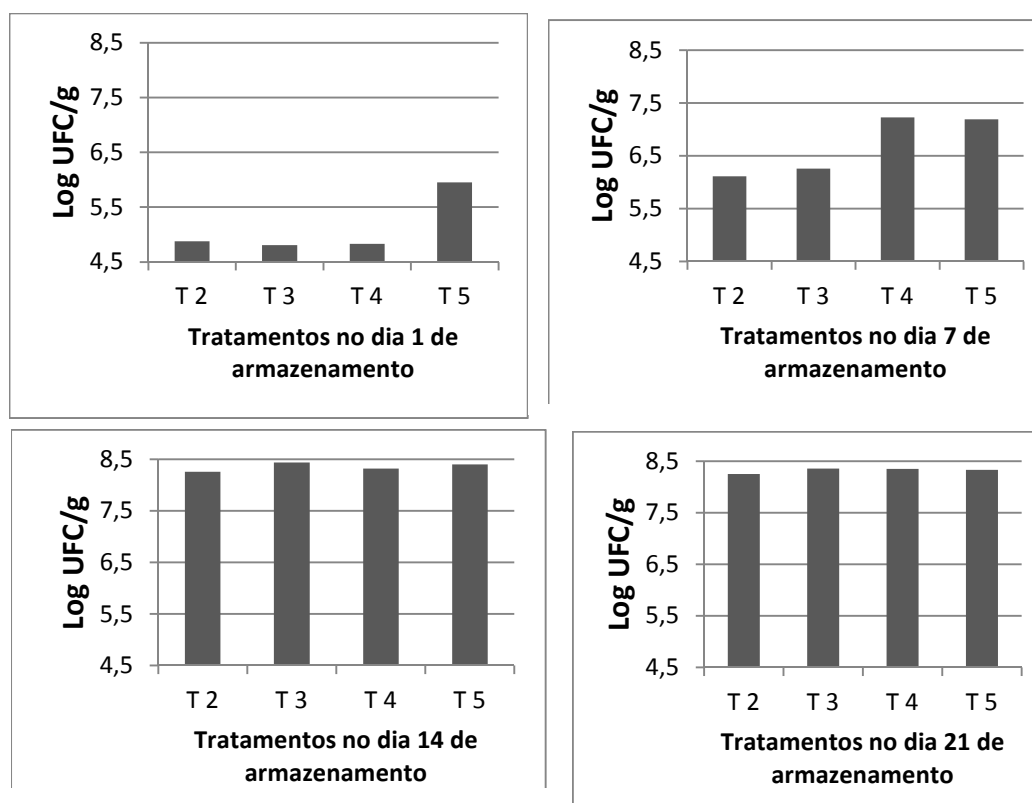


Figura 9: Contagens de *L. rhamnosus* nos dias 1, 7, 14 e 21 de armazenamento. T2: *L. rhamnosus*; T3: *L. rhamnosus* + *L. monocytogenes*; T4: *L. rhamnosus* + *S. aureus*; T5: *L. rhamnosus* + *S. aureus* + *L. monocytogenes*.

As contagens de *L. monocytogenes* nos queijos Minas frescal dos tratamentos que receberam a adição deste microrganismo, isoladamente ou em associação com *L. rhamnosus* e/ou *S. aureus*, encontram-se na Tabela 6. Considerando-se o comportamento de *L. monocytogenes*, no 1º dia de armazenamento, suas contagens se mantiveram acima de 10^7 UFC/g em todos os tratamentos. Este resultado é coerente com os dados reportados na literatura indicando que a *L. monocytogenes* é psicrotrófica, com rápida capacidade de

adaptação em ambientes refrigerados (BRANCO et al., 2003). No dia 7 de armazenamento, as contagens de *L. monocytogenes* foram altas em todos os tratamentos, com menor valor ($P < 0,05$) no queijo em que este microrganismo foi adicionado em associação com *L. rhamnosus* (T3). Do dia 14 em diante não houve diferenças ($P > 0,05$) nas contagens de *L. monocytogenes* nos tratamentos (T3), (T5), (T7) e (T8). No 21º dias de armazenamento, as contagens de *L. monocytogenes* estabilizaram-se ao redor de 10^6 UFC/g nos tratamentos em que esse patógeno foi adicionado aos queijos isoladamente (T7), em associação com *S. aureus* (T8), e com *L. rhamnosus* e *S. aureus* (T5). Não houve diferença entre as médias ($P > 0,05$). As contagens de *L. monocytogenes* foram de 10^6 UFC/g, nos queijos preparados com a adição de *L. monocytogenes* e *L. rhamnosus* (T3) ao final do período de estocagem ($P < 0,05$).

Tabela 6. Contagens de *L. monocytogenes*, expressos em Log UFC/g, nos queijos Minas frescal durante 21 dias de armazenamento¹.

Adição ao queijo (Log UFC/g)				Dia de armazenamento			
T	Lr	Lm	Sa	1	7	14	21
T3	9,0	5,0	0	7,50±0,24 ^{aA}	7,30±0,19 ^{bAB}	6,64±0,44 ^{aB}	5,86±0,40 ^{bC}
T5	9,0	5,0	7,0	7,50±0,14 ^{aB}	8,22±0,15 ^{aA}	6,99±0,15 ^{aBC}	6,76±0,51 ^{aC}
T7	0	5,0	0	7,37±0,05 ^{aB}	8,23±0,13 ^{aA}	6,90±0,14 ^{aC}	6,90±0,15 ^{aC}
T8	0	5,0	7,0	7,31±0,08 ^{aB}	8,31±0,09 ^{aA}	6,93±0,43 ^{aB}	6,96±0,64 ^{aB}

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão de 4 amostras analisadas em duplicata.

^{a,b} Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas colunas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

^{A-C} Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas nas linhas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

T: Tratamento. Lr: *Lactobacillus rhamnosus*; Lm: *Listeria monocytogenes*; Sa: *Staphylococcus aureus*.

A Figura 10 apresenta as médias globais obtidas para as contagens de *Listeria monocytogenes*, permitindo observar mais claramente o seu comportamento nos diferentes tratamentos onde esse microrganismo foi inoculado nos queijos Minas frescal, durante os 21 dias de armazenamento.

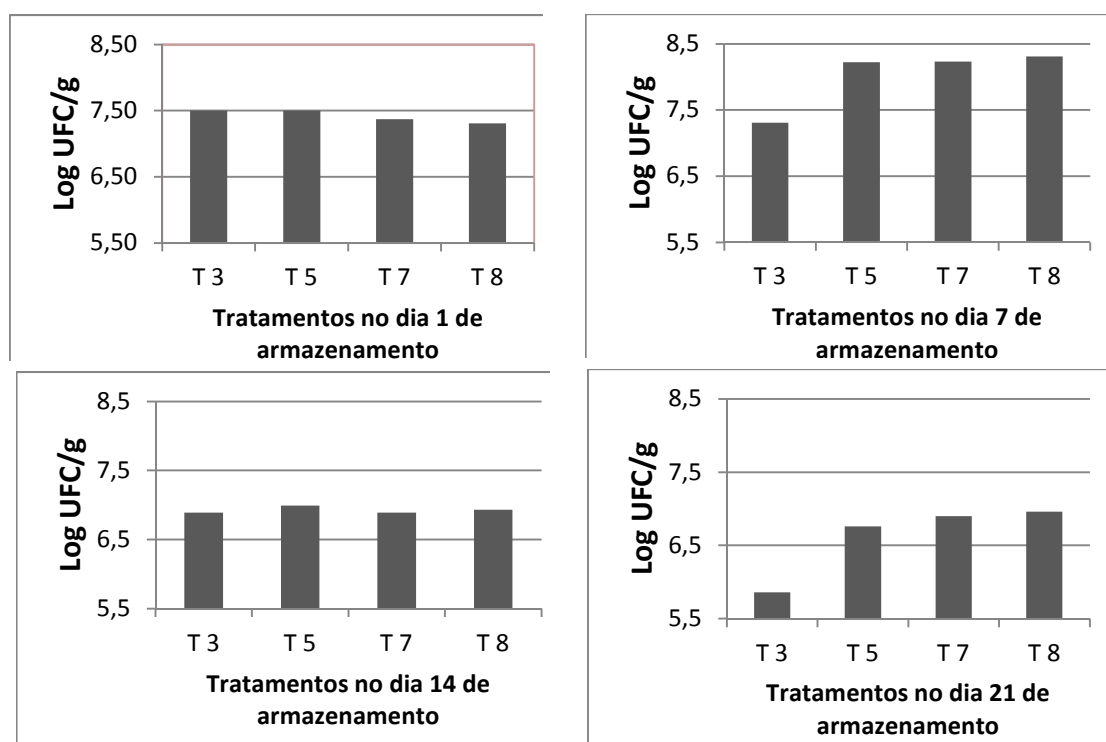


Figura 10: Contagens de *L. monocytogenes* nos dias 1, 7, 14 e 21 de armazenamento. T3: *L. rhamnosus* + *L. monocytogenes*; T5: *L. rhamnosus* + *S. aureus* + *L. monocytogenes*; T7: *L. monocytogenes*; T8: *S. aureus* + *L. monocytogenes*.

A ação inibitória à evolução de contagens de *L. Monocytogenes* por cultura láctica comercial foi estudada por Chioda et al., (2006). O uso de culturas lácticas industriais demonstrou não ser 100% efetivo na eliminação completa de *L. monocytogenes*, atuando apenas na redução de sua multiplicação. Entretanto, no mesmo estudo, *Lactobacillus acidophilus* mostrou-se eficiente na eliminação de *L. monocytogenes*, inoculada em queijos Minas frescal.

Calderón et al. (2007) avaliaram o efeito de culturas de *L. rhamnosus* adicionadas a iogurte sobre *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. enteridis* e *E. coli* O157:H7, e verificaram que os iogurtes adicionados de culturas de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus* apresentaram ação antagônica sobre as bactérias patogênicas, entretanto os iogurtes adicionados de *L. rhamnosus* não mostraram efeito inibitório sobre as bactérias testadas.

A Tabela 7 apresenta os resultados das contagens obtidas para *S. aureus*. No dia 1 de armazenamento, as contagens de *S. aureus* foram baixas, não sendo superior a 10^4 UFC/g em nenhum tratamento. As contagens de *S. aureus* decresceram e estabilizaram ao redor de 10^2 UFC/g a partir do dia 7 até o dia 21 de armazenamento, em todos os tratamentos. As diferenças entre as médias nesses tratamentos não foram significativas ($P>0,05$).

Tabela 7. Contagens de *S. aureus*, expressos em Log UFC/g, nos queijos Minas frescal durante 21 dias de armazenamento.

Adição ao queijo (Log UFC/g)				Dia de armazenamento			
T	Lr	Lm	Sa	1	7	14	21
T3	9,0	0	7,0	3,92±0,06 ^{aA}	2,20±0,15 ^{aB}	2,34±0,19 ^{aB}	2,03±0,19 ^{aB}
T5	9,0	5,0	7,0	3,66±0,25 ^{aA}	2,43±0,16 ^{aB}	2,28±0,06 ^{aB}	2,25±0,04 ^{aB}
T7	0	0	7,0	3,49±0,39 ^{aA}	2,42±0,34 ^{aB}	2,29±0,25 ^{aB}	1,79±0,44 ^{aB}
T8	0	5,0	7,0	3,51±0,17 ^{aA}	2,32±0,10 ^{aB}	2,29±0,22 ^{aB}	2,28±0,23 ^{aB}

¹ Resultados expressos em média ± desvio padrão de 4 amostras analisadas em duplicata.

^{a,b} Médias seguidas de diferentes letras minúsculas nas colunas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

^{A,B} Médias seguidas de diferentes letras maiúsculas nas linhas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

T: Tratamento.

Lr: *Lactobacillus rhamnosus*; Lm : *Listeria monocytogenes*; Sa: *Staphylococcus aureus*.

L. rhamnosus e *L. lactis* apresentaram inibição do crescimento de *S. aureus* em testes *in vitro* (Guedes Neto *et al.*, 2005). Considerando-se que neste estudo não houve inibição, esse fato chama atenção para a diferença entre os efeitos observados *in vitro* e no alimento. *L. rhamnosus* não foi capaz de antagonizar o crescimento de *S. aureus*.

Seridan *et al.* (2012), ao analisarem o comportamento do crescimento de *S. aureus* em queijo elaborado com a adição de *L. rhamnosus*, verificaram que *L. rhamnosus* não impediu o crescimento de *S. aureus*.

A Figura 11 apresenta as médias globais obtidas para as contagens de *S. aureus*, permitindo observar mais claramente o seu comportamento nos diferentes tratamentos onde esse microrganismo foi inoculado nos queijos Minas frescal, durante os 21 dias de armazenamento.

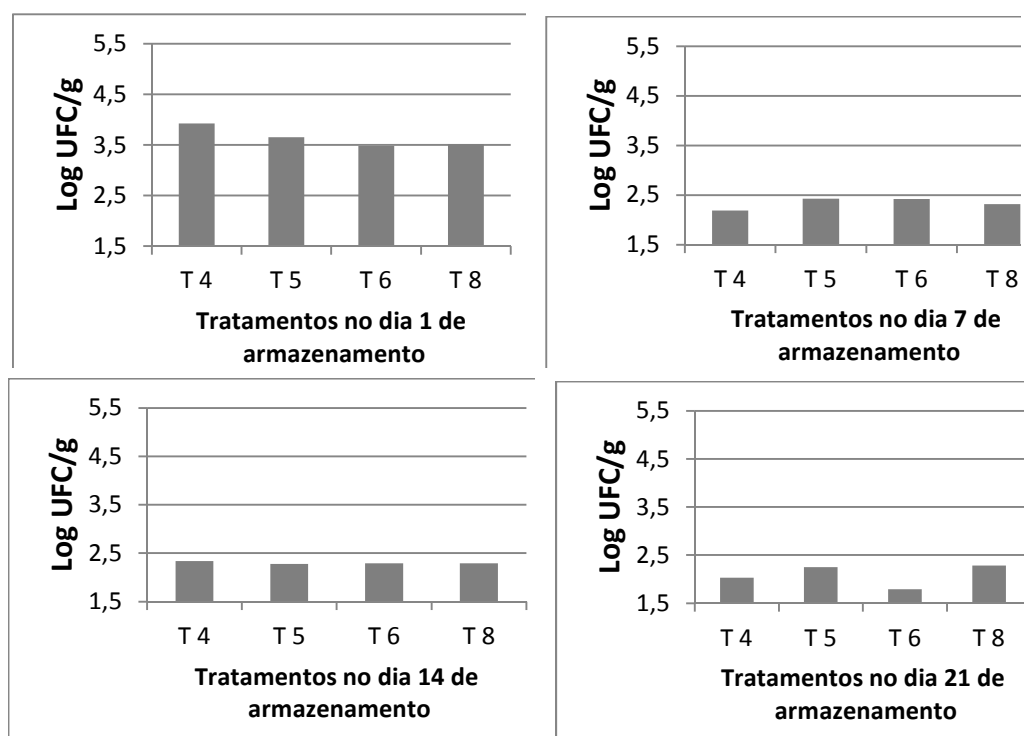


Figura 11: T4: *L. rhamnosus* + *S. aureus*; T5: *L. rhamnosus* + *S. aureus* + *L. monocytogenes*; T6: *S. aureus*; T8: *S. aureus* + *L. monocytogenes*.

Botelho (2005) observou que na avaliação do antagonismo contra algumas espécies de bactérias patogênicas Gram negativas e Gram positivas, utilizando-se culturas probióticas isoladas de culturas lácticas, uma cepa de *L. rhamnosus* promoveu a inibição de *L. monocytogenes* e outra cepa de *L. rhamnosus* promoveu a inibição de *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Essa atividade inibitória observada em seu estudo pode ser devida à presença de bacteriocinas e os ácidos orgânicos produzidos pelas culturas lácticas, mas também pode ser decorrente de competição pelo substrato pelas bactérias patogênicas e as bactérias probióticas.

Bernardeau et al. (2001) verificou que a susceptibilidade das bactérias patogênicas varia em relação a espécie produtora da bacteriocina avaliada. Resultados apresentados por Guerra e Bernardo (2001) mostraram que o fator competição ocorreu numa maior frequência entre as culturas lácticas do que a produção de substâncias antimicrobianas. A atividade antagonista deve ser restrita aos microrganismos patogênicos, dessa maneira a inibição dessas bactérias atribuída à competição por substrato é interessante.

Em produtos probióticos é desejável que as culturas probióticas apresentem características de proteção ao produto, bem como a adaptação ao trato intestinal. Dessa maneira, a vantagem conferida pela competição por substrato por bactérias probióticas deve ser mais bem estudada para fins de aplicação na indústria de laticínios.

5.3.3- Sobrevivência das Bactérias Probiótica e Patogênicas em Condições Simuladas do Trato Gastrointestinal:

Observam-se na Tabela 8 as médias dos percentuais de sobrevivência de *L. rhamnosus*, *L. monocytogenes* e de *S. aureus* à simulação do trato gastrointestinal durante os 21 dias de armazenamento dos queijos Minas frescal. Nesta tabela, não foram incluídos os resultados para as contagens de *S. aureus*, pois este microrganismo não sobreviveu ao teste de

simulação ao trato gastrointestinal, não sendo detectado nas análises após a execução dos ensaios *in vitro*.

Tabela 8. Percentuais de sobrevivências de *L. rhamnosus* e *L. monocytogenes* nos queijos Minas frescal submetidos à simulação dos conteúdos do trato gastrointestinal ¹.

T	Adição ao queijo (Log UFC/g)			Sobrevivência (%)	
	Lr	Lm	Sa	<i>L. rhamnosus</i> (%)	<i>L. monocytogenes</i> (%)
T2	9,0	0	0	78,4 ^a	-
T3	9,0	5,0	0	78,7 ^a	75,8 ^b
T4	9,0	0	7,0	74,6 ^a	-
T5	9,0	5,0	7,0	86,4 ^a	89,8 ^a
T7	0	0	7,0	-	94,1 ^a
T8	0	5,0	7,0	-	88,1 ^a

¹ Resultados expressos em média \pm desvio padrão de 4 amostras analisadas em duplicata.

^{a,b} Médias seguidas de diferentes letras nas colunas diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

T: Tratamento.

Lr: *Lactobacillus rhamnosus*; Lm : *Listeria monocytogenes*; Sa: *Staphylococcus aureus*.

As Figuras 12 e 13 apresentam as médias dos percentuais de sobrevivência de *L. rhamnosus* e *L. monocytogenes*, respectivamente, nos tratamentos em que essas bactérias foram adicionadas isoladamente e em associação com as outras durante os 21 dias de armazenamento. Ao observar as taxas de sobrevivência e viabilidade de *L. rhamnosus* submetidos ao teste de simulação às condições do trato gastrointestinal ao longo dos 21 dias de estocagem sob refrigeração, considerando-se o tratamento 2, pode-se inferir que houve crescimento em suas contagens de $2,9 \times 10^5$ UFC/g a $7,8 \times 10^5$ UFC/g do dia 1 ao dia 21 de armazenamento, e a taxa de sobrevivência também foi crescente (59,43% a 86,63%).

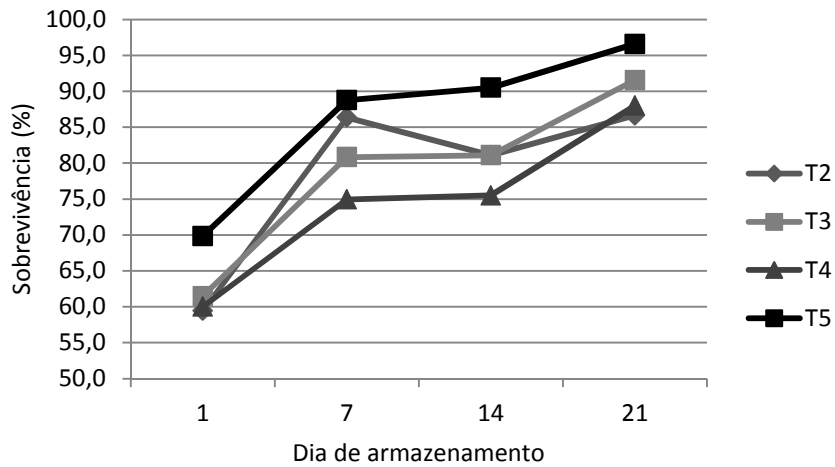


Figura 12. Percentuais de sobrevivência de *L. rhamnosus* nos dias 1, 7, 14 e 21 de armazenamento nos tratamentos T2 (*L. rhamnosus*); T3 (*L. rhamnosus* + *L. monocytogenes*); T4 (*L. rhamnosus* + *S. aureus*) e T5 (*L. rhamnosus* + *S. aureus* + *L. monocytogenes*).

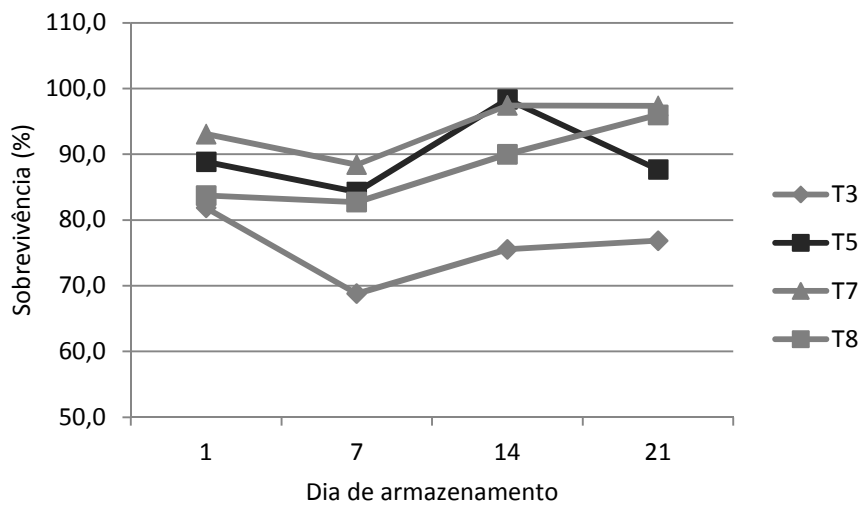


Figura 13. Percentuais de sobrevivência de *L. monocytogenes* nos dias 1, 7, 14 e 21 de armazenamento, nos tratamentos T3 (*L. rhamnosus* + *L. monocytogenes*); T5 (*L. rhamnosus* + *S. aureus* + *L. monocytogenes*); T7 (*L. monocytogenes*) e T8 (*S. aureus* + *L. monocytogenes*).

Os percentuais médios de sobrevivência do probiótico nos diferentes tratamentos mostram que a viabilidade de *L. rhamnosus* não foi afetada quando este microrganismo foi adicionado aos queijos Minas frescal isoladamente ou em associação com as bactérias

patogênicas. Em se tratando do comportamento de *L. monocytogenes*, nota-se que não ocorreu efeito nos percentuais de sua sobrevivência ao longo dos 21 dias de armazenamento no tratamento em que este patógeno foi inoculado isoladamente ou em associação com *S. aureus*. No entanto, o percentual de sobrevivência de *L. monocytogenes* foi menor ($P < 0,05$) no tratamento em que foi inoculado em associação com *L. rhamnosus*.

Não há estudos anteriores sobre os percentuais de sobrevivência às condições simuladas do TGI *in vitro*, para os microrganismos avaliados no presente trabalho em queijos Minas frescal. Entretanto, Alegre et al. (2011) avaliaram a sobrevivência de *Salmonella spp*, *L. monocytogenes* e *L. rhamnosus* inoculados em maçãs, observando que *L. rhamnosus* GG além de poder ser uma cultura probiótica adequada a ser inoculada nesta fruta, apresentou ação antagônica contra as populações de *L. monocytogenes* durante 28 dias de estocagem sob refrigeração. Entretanto, avaliando-se a sobrevivência à exposição ao trato gastrointestinal simulado, *Salmonella spp*, *L. monocytogenes* e *L. rhamnosus* não apresentaram adaptação, com subsequentes perdas em sua viabilidade.

Outros trabalhos avaliaram a capacidade de diferentes tipos de bactérias às condições do TGI em outros produtos lácteos. Mortazavian et al. (2008) avaliaram a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* encapsulados em iogurte após exposição à simulação das condições do trato gastrointestinal. Em condições semelhantes às conduzidas neste estudo (pH 2.0-30 min/0.6% bile-60 min), observaram sobrevivência de *L. acidophilus* de 16%, embora substancialmente sensíveis às concentrações de sais biliares, e também concluíram que a sobrevivência das bactérias probióticas, quando encapsuladas, era significativamente maior que em células livres.

Fernandes et al. (2013), ao avaliarem o comportamento de *Listeria innocua* em sobremesa de laticínio preparada em presença e ausência de *Lactobacillus acidophilus*, observaram que as contagens de *L. acidophilus* decresceram durante o tempo de vida de

prateleira de 28 dias, e as populações de *L. innocua* cresceram a 10^8 UFC/g ao final do período de estocagem. Após submetido ao teste de simulação às condições do trato gastrointestinal, as taxas de sobrevivência nas contagens de *L. acidophilus*, na formulação preparada com este microrganismo apenas, decresceram de 89,3% a 58,8%. Em contrapartida, na formulação preparada com os dois microrganismos mencionados, houve aumento na porcentagem de sobrevivência de *L. acidophilus* (94.0% a 99.1%).

Não foram encontrados, na literatura, informações sobre a capacidade de sobrevivência de *S. aureus* às condições simuladas do TGI. Deste modo, pode-se considerar que esta bactéria não resiste às condições dos ensaios *in vitro* utilizadas no presente estudo.

Em síntese, os resultados do presente trabalho são coerentes com os dados reportados na literatura sobre os percentuais de sobrevivência às condições simuladas do TGI *in vitro*, para *L. rhamnosus* e *L. monocytogenes*. É possível que a menor porcentagem de sobrevivência de *L. monocytogenes*, quando associada ao *L. rhamnosus*, seja consequência do efeito inibitório da bactéria probiótica, considerando que estas bactérias podem produzir uma série de compostos com ação antimicrobiana como ácido lático e outros ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, etanol, diacetil e bacteriocinas. (DROSINOS; MATARAGAS; METAXOPOULOS, 2006; GALVEZ et al., 2008; SIT; VEDERAS, 2008). São necessários estudos para esclarecer os mecanismos envolvidos no efeito do *L. rhamnosus* sobre o percentual de sobrevivência de *L. monocytogenes* no queijo Minas frescal.

6 - CONCLUSÕES:

Face aos resultados obtidos no presente estudo, e considerando os objetivos propostos, pode-se concluir com relação aos queijos Minas armazenados por 21 dias a 7°C os seguintes itens:

- 1) As variáveis físico-químicas dos queijos Minas frescal experimentais que tiveram a adição de *L. rhamnosus* mantiveram-se semelhantes aos queijos sem adição da bactéria probiótica durante o armazenamento;
- 2) As contagens de *L. rhamnosus* aumentaram no queijo Minas frescal durante 14 dias após a fabricação, sendo que contagens acima de 10^6 UFC/g foram obtidas após o dia 7 de armazenamento;
- 3) A presença concomitante de *L. monocytogenes* e/ou *S. aureus* nos queijos Minas frescal não influenciou a contagem de *L. rhamnosus* nos produtos durante o armazenamento;
- 4) A presença de *L. rhamnosus* não apresentou efeito sobre as contagens de *S. aureus* nos queijos Minas frescal durante o armazenamento;
- 5) A presença de *L. rhamnosus* diminuiu, em cerca de 1 ciclo log, as contagens de *L. monocytogenes* nos queijos Minas frescal após 21 dias de armazenamento;
- 6) Quando submetidos ao teste de simulação às condições do trato gastrointestinal, *L. rhamnosus* e *L. monocytogenes* apresentaram elevados percentuais de sobrevivência em todos os tratamentos, do dia 1 ao dia 21 de armazenamento.
- 7) *S. aureus* não sobreviveu às condições da solução gástrica e intestinal do teste de simulação ao trato gastrointestinal.
- 8) A utilização de *L. rhamnosus* como probiótico apresenta um potencial para inibição de *L. monocytogenes* na fabricação de queijos Minas frescal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Microbiología de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1997. p. 23- 27.

ALEGRE, I. et al. Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Food Microbiology**, London, v. 28, p. 59-66, 2011.

ALLENDE, A. et al. Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.24, n. 7-8, p.759-766. 2007.

ALMEIDA FILHO, E. S. **Características microbiológicas do queijo Minas “frescal”, produzido artesanalmente e comercializado no município de Poços de Caldas/MG**. 1999. 60f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.

ALVES, V.F. et al. Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham. **Meat Science**, Barking, v. 74, p. 623- 627, 2006.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the examination of dairy products**. 17th ed. Washington, DC: American Public Health Association, 2004.

ARAGON-ALEGRO, L. C. **Influência dos coliformes no comportamento de *Listeria monocytogenes* em queijo minas frescal**. 2007. 93 f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ARAÚJO, V. S. et al. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 92, n. 6, p. 1172-1177, 2002.

ARQUÉS, J. L. et al. Effect of combinations of high-pressure treatment and bacteriocin-production lactic acid bacteria on survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 15, n. 6, p. 893-900, 2005.

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P. R. et al. **Manual of clinical microbiology**. Washington: 8th ed, 2003. v. 1, p. 384-404.

BARBALHO, T. C. F. et al. Prevalence of *Listeria* spp. at a poultry processing plant in Brazil and a phage test for rapid confirmation of suspect colonies. **Food Control**, Kidlington, v. 16, p. 211-216, 2005.

BARRETO, G.P.M.; Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias lácticas totais em produtos probióticos comercializados no Brasil; **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, p.119-126, 2003.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J. P.; GUEGUEN, M. Probiotic properties of two *Lactobacillus* strains in vitro. **Milchwissenschaft**, Kempten, v. 56, n. 12, p. 663-667, 2001.

BOTELHO, L. **Isolamento e identificação de lactobacilos e bifidobacterias em alimentos probióticos disponíveis no mercado brasileiro**. 2005. 244 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2005.

BRANCO, M. A. A. C. et al. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 393-408, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº. 146, de 07 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 11 de mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamentos Técnicos de**

Identidade e Qualidade do leite e produtos lácteos. Portaria nº 352 de 04 de setembro de 1997. Diário Oficial da União de 08/09/1997, seção 01, p.19684. Brasília, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RDC no 12 de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Diário Oficial da União, Brasília: 02 jan. 2001.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; SAAD, S. M. I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 38, n. 2, p. 173-180, 2005a.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; SAAD, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implication for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 15, n. 12, p. 1279-1288, 2005b.

CALCI, K. R.; BURKHARDT, W.; WATKINS, W. D. Occurrence of male specific bacteriophage in fecal and domestic animal wastes, human feces and human associated wastewaters. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 5027-5029, 1998.

CALDERON, O. et al. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*, **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**. Caracas, v. 57, n. 1, mar. 2007.

CAMPOS, M. R. H. et al. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1221-1227, 2006.

CARNICEL, F. A. **Qualidade microbiológica de ricota e estudos de resistência de leveduras do gênero *Debaryomyces* isoladas deste produto lácteo.** 2004. 131 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2004.

CARNICEL, F. A. Ricota: contaminação microbiológica em amostras comercializadas no município de São José do Rio Preto - SP no período de abril a setembro de 2002. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 335, n. 58, p. 7-11, 2003.

CARRIQUE-MAS, J. J. et al. Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese-an outbreak of listeriosis? **Epidemiology Infection**, Cambridge, v. 130, n. 1, p. 79-86, 2003.

CASIRAGHI, M. C. et al. Effects of a synbiotic milk product on human intestinal ecosystem. **Journal of Applied microbiology**, Chichester, v. 103, p. 499-506, 2007.

CHIODA, T. P. et al. Inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal elaborado com cultura de *Lactobacillus acidophilus*. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 101, n. 557-558, p. 121-124, 2006.

COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 8, p. 487- 490, 1998.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annual Reviews Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 711-745, 1995.

CRANDALL, A. D.; WINKOWISK, K.; MONTVILLE, T. J. Inability of *Pediococcus pentosaceus* to inhibit *Clostridium botulinum* in sous vide beef gravy at 4 and 10 °C. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 57, p. 104-107, 1994.

CRUZ, A.G. et al. Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science & Technology** , v.20, n. 8, p. 344-354, 2009.

DESAI, A. R.; SHAH, N. P.; POWELL, I. B. Discrimination of dairy industry isolates of the *Lactobacillus casei* group. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 89, n. 9, p. 3345-3351, 2006.

DOGANAY, M. Listeriosis: clinical presentation. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Oxford, v. 35, p. 173-175, 2003.

- DORON, S.; SNYDMAN, D. R.; GORBACH, S. L. Lactobacillus GG: bacteriology and clinical applications. **Gastroenterology Clinics of North America**, Maryland Heights, v. 34 p. 483– 498, 2005.
- DOUGLAS, L. C.; SANDERS, M. E. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 108, p. 510-521, 2008.
- DROSINOS, E. H.; MATARAGAS, M.; METAXOPOULOS, J. Modeling of growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131. **Meat Science**, Amsterdam, v. 74, p. 690-696, 2006.
- ESPER, L. M. R. et al. Efeito da adição de culturas protetoras (Holdbac TM Listeria) sobre *Listeria monocytogenes* inoculadas na superfície de ricota. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 156, p. 109-114, 2007.
- FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênicosanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, supl., p. 162-165, 2003.
- FERNANDES, A. M.; ANDREATTA, E.; OLIVEIRA, C. A. F. Ocorrência de bactérias patogênicos em queijos no Brasil: questão de saúde pública. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 20, n. 144, p. 49-56, 2006.
- FERNANDES, M. S. et al. On the behavior of *Listeria innocua* and *Lactobacillus acidophilus* co-inoculated in a dairy dessert and the potential impacts on food safety and product's functionality. **Food Control**, Kidlington, v. 34, p. 331-335, 2013.
- FERRERO, M. et al. Molecular characterization of *Lactobacillus casei* strains. **FEMS Microbiology Letters**, Chichester, v. 140, n. 2-3, p. 215-219, 1996.
- FERREIRA, R. M. et al. Quantificação de coliformes totais e termotolerantes em queijo Minas Frescal artesanal. **PUBVET**, [São Paulo], v. 5, n. 5, ed. 152, art. 1022, 2011.

- FERRERO, M. et al. Molecular characterization of *Lactobacillus casei* strains. **FEMS Microbiology Letters**, Chichester, v. 140, n. 2-3, p. 215-219, 1996.
- FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinarie**, Porto Alegre, v. 33, n. 3 p. 291-296, 2005.
- FOCHINO, R.; CAFARO, I.; OTTOGALLI, G.; Studio sulla vitalità di batteri probiotici presenti in campioni di latti fermentati del commercio, **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, v.47, p.151-164, 1997
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk in with live latic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em : < http://www.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf> Acesso em Nov.2014.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.
- FOX, P. F. et al. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: AN Aspen Publication, 2000. 587 p.
- FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. 3th ed. London, Academic Press, 2004. 640 p. v. 1.
- FREIRAS, M. F. L. et al. Exotoxinas estafilocócicas. **Revista Ciência Veterinária Tropical**, Uberaba, v. 7, n. 2-3, p. 63-74, 2004.
- FUKUSHIMA, Y. et al. Effect of probiotic formula on intestinal immunoglobulin, A production in healthy children, **International Journal of Food and Microbiology**, v.42, p.39-44, 1998.

FULLER, R. Probiotics in man and animal. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 66, p. 365-378, 1989.

FURTADO, M. M.; SOUZA, H. M.; MUNCH, A. V. A fabricação de queijo Minas Frescal sem o emprego de culturas lácticas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 35, p. 15-21, 1980.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. São Paulo: Fonte Comunicação e Editora, 2005. 200 p.

GACULA, J. R.; SINGH, J. **Statistical methods in food and consumer research**. Orlando: Academic Press, 1984.

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

GANDRA, A. E. **Multiplex PCR para detecção de S. aureus, S. intermedius e S. hyicus em leite UHT artificialmente contaminado**. 2006. 66 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Qualidade da ordenha. In: _____. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. (4ª ed.). São Paulo: Livraria Varela, 2011. p. 105-119.

GRANATO, D. et al. Dairy products as functional foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 9, p. 455-470, 2012.

GRATTEPANCHE, F. et al. Recent developments in cheese cultures with protective and probiotic functionalities. **Dairy Science and Technology**, Paris, v. 88, p. 421-444, 2008.

GOLDIN, B.R.; Health benefits of probiotics, **British Journal of Nutrition**, v.80, p.S203-S207, 1998.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X., Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas, **Bol. Biotecnol. Al.**, São Paulo, n.64, p.12-22, 1999.

GUEDES NETO, L. G. et al. Atividade antagonista de bactérias isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, supl. 2, p. 245-250, 2005.

GUERRA, M.M.M.; BERNARDO, F.M.A. Characterization of the inhibitors effects of *L. monocytogenes* Scott a produced by ripening microflora of Alentejo's traditional cheeses. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. Lisboa, v. 96, n. 538, p. 65-69, 2001.

GUPTA, V.; GARG, R. Probiotics. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Mumbai, n. 27, p. 202-209, 2009.

HALPIN-DOHNALEK, M. I.; MARTH, E. H. *Staphylococcus aureus*: production of extracellular compounds and behavior in foods – a review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 52, n. 4, p. 267-282, 1989.

HOLZAPFEL, W.H. et al. Overview of gut flora and probiotics, **International Journal of Food Microbiology**, v.41, n.2, p.85-101, 1998.

HOLZAPFEL, W. H. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, Suppl, p. 365S-373S, 2001.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, Amsterdam, v. 49, p. S139-S150, 1998.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas de Instituto Adolfo Lutz**. 4. ed. Sao Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1018 p.

ITSARANUWAT, P.; AL-HADDAD, K. S. H.; ROBINSOSN, R. K. The potential therapeutic benefits of consuming “health-promoting” fermented dairy products: a brief update. **International Journal Dairy Technology**, Chichester, v. 56, n. 4, p. 203-210, 2003.

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

KALAVROUZIOTI, I. et al. Production of hard cheese from caprine milk by the use of two types of probiotic cultures as adjuncts. **International Journal of Dairy Technology**, Chichester, v. 58, p. 31-38, 2005.

KILIÇ, G. B. et al. Manufacture of Turkish Beyaz cheese added with probiotic strains. **LWT – Food Science and Technology**, London. v. 42, p. 1003-1008, 2009.

KURMANN, J. A. Starters with selected intestinal bacteria. **Bulletin IDF/FIL**, Brussels, n. 227, p. 41-55, 1988.

LABORATÓRIO NACIONAL DE REFERENCIA ANIMAL (LANARA). **Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes; II - Métodos físicos e químicos**. Brasília, 1981. v. 2.

LEE, Y.K. et al. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 1999. 211p.

LISITA, M. O. **Evolução da população bacteriana na linha de produção do queijo Minas Frescal em uma indústria de laticínios**. Piracicaba, SP. 2005. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 6, p. 1063-1067, 2001.

LUNDÉN, J.; TOLVANEN, R.; KORKEALA, H. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 87, Suppl. E, p. E6 - E11, 2004.

MacFIE, H. J. H. Assessment of the sensory properties of food. **Nutrition Reviews**, Washington, v. 48, n. 2, p. 87-93, 1990.

MACHADO, E. C. et al. Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 516-521, out./dez. 2004.

MADUREIRA, A. R. et al. Sweet whey cheese matrices inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* LAFTI_ L26. **Dairy Science and Technology**, Paris, v. 88, p. 649-665, 2008.

MAGALHÃES, H. R. et al. Effects of environmental factors on somatic cell count and reduction of milk yield on Holstein cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 2, p. 415-421, 2006.

MANOLOPOULOU, E. et al. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, Apr. 2003.

MARCATTI, B. et al. Minas-type fresh cheese developed from buffalo milk with addition of *L. acidophilus*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, p. 481-485, 2009.

MARQUES, M. C.; OLIVEIRA, C. A. F. **Avaliação das características físico-químicas do queijo Minas frescal produzido com leite contendo diferentes níveis de células somáticas**. Pirassununga: FZEA/USP, 2004. 15 p. (Iniciação Científica)

MATSUBARA, S.; Alimentos Funcionais: uma tendência que abre novas perspectivas aos laticíneos, **Industria de Laticíneos**, n.34, p.10-18, 2001.

MATTOS, E. C. **Caracterização genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* recuperadas de alimentos, mãos de manipuladores de alimentos e veiculadas por formigas**. 2005. 74 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MORTAZAVIAN, A. M. et al. Survival of encapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) after the product exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Milchwissenschaft**, Kempten, v. 63, p. 427-429, 2008.

OLIVEIRA, C. A. et al. Características físico-químicas e microbiológica de queijos minas frescal e mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do estado de São Paulo. **Revista Higiene Alimentar**, Mirandópolis, v. 12, n. 55, p. 31-35, 1998.

OLIVEIRA, M.N. et al. Effect of Milk supplementation and cultura composition on acidification textural properties and microbiological stability of fermented milks containing probiotic bacteria, **International Dairy Journal**, v.11, p.935-942, 2001.

OUWEHAND, A. C. et al. Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 43-52, 1999.

OUWEHAND, A.C.; VESTERLUND, S.; Health aspects of probiotics, **Drugs**, v.6, p.573-580, 2003.

PAIVA, M. B. **Comparação da qualidade microbiológica e físico-química entre queijos Minas frescal disponíveis no mercado produzidos pelos métodos de ultrafiltração e tradicional**. Piracicaba: ESALQ/USP. 2005. 36 p. (Iniciação Científica)

PERESI, J. T. M. et al. Queijo Minas tipo Frescal artesanal e industrial. Qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 83, p. 63-70, 2001.

PICOLI, S. U. et al. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo frescal de leite de cabra em laticínios. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 1, n. 26, p. 64-69, jan./mar. 2006.

PINTO, P. S. A. et al. **Higiene e vigilância sanitária dos alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 114 p.

RIBEIRO, E. P.; SIMÕES, L. G.; JURKIEWICZ, C. H. Desenvolvimento do queijo Minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzidos a partir de retentados de ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 19-23, 2009.

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

ROSA, V. P. da. **Efeitos da atmosfera modificada e da irradiação sobre as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais do queijo Minas frescal**. 2004. 141 f.

Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

SAULNIER, D. M. A. et al. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. **Current Opinion in Biotechnology**, Kidlington, v. 20, p. 135-141, 2009.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, supl., p. 361S-364S, 2001.

SERIDAN, B. et al. Viabilidade de *Staphylococcus aureus* FRI S-6 e produção de SEB em queijo elaborado com adição de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis* **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.64, n.2, p.465-470, 2012.

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

SILVA, I. M. M. et al. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 3, p. 241–248, 2003.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. 544 p.

SILVA, M. C. D.; HOFFER, E.; TIBAMA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 16, n. 3, p. 354-356, 1998.

SIT, C. S.; VEDERAS, J. C. Approaches to the discovery of new antibacterial agents based on bacteriocins. **Biochemistry and Cell Biology**, Ottawa, v. 86, p. 116-123, 2008.

SPADOTI, L. M.; DORNELLAS, J. R. F.; ROIG, S. M. Avaliação sensorial de queijo prato obtido por modificações do processo tradicional de fabricação. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 705-712, 2005

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 36, n. 1, p. 1-29, 1997.

TUOMOLA, E. M.; SALMINEN, S. J. Adhesion of some probiotic and dairy 21 Lactobacillus strains to Caco-2 cell cultures. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 41, p. 45-51, 1998.

TUNICK, M. H. Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 83, n. 8, p. 1892-1989, 2000.

VÁSQUEZ, A.; MOLIN, G.; PETTERSSON, B.; ANTONSSON, M.; AHRNE, S. DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 28, n. 5, p. 430-441, 2005.

WANG, J. et al. Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in soymilk and bovine milk during storage. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 92, p. 2468-2476, 2009.

WOLFSCHOON-POMBO, A.L.; LIMA, A. Extensão e profundidade da proteólise em queijo Minas Frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 44, n. 261-266, p. 50-52, 1989.

ZIEMER, C.J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 8, p. 473-479, 1998.

ZINK, D. L. The impact of consumer demands and trends on food processing. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 3, p. 467-469, 1997.

ZOTTOLA, E. A. Microbial attachment and biofilm formation: a new problem for the food industry? **Food Technology**, Chicago, v. 48, n. 7, p. 107-114, 1994.