

## 1 INTRODUÇÃO

O uso dos alimentos como veículo de promoção do bem-estar e saúde e, ao mesmo tempo, como redutor dos riscos de algumas doenças, tem incentivado pesquisas e desenvolvimento de novos produtos, além da criação de outros nichos de mercado.

Deste modo surgiu o conceito de alimentos funcionais, que são aqueles que proporcionam benefícios à saúde pelos mecanismos não previstos na nutrição convencional, sendo a prevenção de doenças uma de suas características. Desta forma, os fabricantes de alimentos possuem uma maior necessidade em elaborar produtos mais saudáveis e que atendam aos parâmetros de qualidade e segurança exigidos pelos consumidores e pela legislação.

Bactérias lácticas além de agregarem valor aos alimentos, promovem também a sua conservação, devido à competição e inibição da microbiota deteriorante e/ou agentes patogênicos. Como exemplo tem-se os probióticos, que são microrganismos vivos que exercem diversos efeitos benéficos à saúde do consumidor.

Os laticínios são considerados a maior fonte de probióticos, sendo que os seus atributos peculiares proporcionam a maior viabilidade das cepas. Destacam-se os leites fermentados e iogurtes, sendo os principais produtos comercializados neste tipo de mercado. Os queijos aparecem em menor frequência, apesar das características favoráveis como uma consistência mais sólida, maior teor de gordura e pH, que proporcionam um ambiente favorável para a viabilidade da cepa no trato gastrointestinal.

As sobremesas lácteas são consideradas como produtos alternativos fontes de probióticos, considerando o lançamento de marcas bem aceitas entre os consumidores. Os sistemas tecnológicos aplicados na indústria de laticínios e os ingredientes inovadores têm proporcionado a produção de sobremesas com novas características sensoriais e com maior valor nutritivo.

Mas além do aspecto tecnológico e comercial, deve-se atentar à necessidade de proporcionar um alimento inócuo, garantindo a segurança do consumidor. É amplamente reconhecido que alimentos de origem animal constituem a via mais importante de transmissão de inúmeros patógenos tais como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Grande preocupação tem-se com *E. coli* produtora de toxina shiga (STEC), já que

bovinos são o principal reservatório animal. Surtos de STEC O157:H7 foram relatados a partir do consumo de produtos lácteos, destacando-se iogurte e queijos como importantes veículos de transmissão desse patógeno.

Nas indústrias de alimentos a preocupação é constante com as Boas Práticas de Fabricação (BPF), no intuito de reduzir os perigos de contaminação e com isso garantir uma boa qualidade do produto final. Porém, é importante ressaltar que a adesão e formação de biofilme por microrganismos patogênicos em contato com as superfícies nas plantas de processamento de alimentos, é um problema de Saúde Coletiva.

Considera-se de grande importância o estudo do efeito de probióticos sobre a inibição de patógenos. Além disso, há maior necessidade de pesquisas relacionadas ao comportamento de probióticos sobre os microrganismos patogênicos veiculados por alimentos, cada patógeno possui um comportamento, de acordo com o tipo de alimento.

Com base nos fatos supracitados, no presente trabalho objetivou-se:

- Avaliar os efeitos antibacterianos *in vitro* de diferentes probióticos como *Bifidobacterium bifidum* e cultura mista (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) sobre patógenos alimentares;
- Avaliar a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* em sobremesa láctea (SL) sabor chocolate e a ação sobre patógenos alimentares;
- Avaliar a viabilidade de *Lactobacillus casei* durante o armazenamento do queijo Minas Frescal e a ação sobre *Escherichia coli* O157:H7;
- Avaliar a capacidade de formação de biofilme de *E. coli* O157:H7 produtora de toxina Shiga em superfície de aço inoxidável.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

O papel da dieta da população vem sendo um desafio para as indústrias alimentícias em atender o desejo dos consumidores em adquirirem produtos saborosos, visualmente atrativos e que promovam a saúde e o bem estar (SAAD, CRUZ, FARIA, 2011). É de grande relevância que o estado nutricional da população é afetado pelo elevado consumo de açúcares, sal, gorduras trans e saturadas, baixo consumo de fibras, vitaminas e minerais. Esses hábitos alimentares aliados ao sedentarismo são os principais causadores de doenças crônicas como câncer, obesidade, hipertensão arterial, hipercolesterolemia e doenças cardiovasculares (HU, 2011; JUSTFOOD, 2006;). Considera-se que tais doenças desencadeiam altas taxas de mortalidade, sendo que as cardiovasculares são responsáveis por 48% das mortes, seguidas pelo câncer (21%) e pelo diabetes (3%) (POHLENZ; GATLIN, 2014).

A fim de reduzir os riscos de doenças, o desenvolvimento de novos produtos alimentícios que contêm substâncias biologicamente ativas tem sido proposto (ROBERFROID, 2002). Os alimentos funcionais estão nessa categoria, por proporcionarem benefícios clínicos e efeitos nutricionais conhecidos (SAAD et al., 2011).

A definição legal de alimento funcional foi estipulada em 1991, quando da criação de uma legislação específica, caracterizada pela *Foods for Specified Health Use* (FOSHU), referente a alimentos para uso especial da saúde (SANDERS, 1998). São considerados alimentos funcionais aqueles que promovem a saúde pelos mecanismos não previstos na nutrição usual (BAGCHI, 2008; HENRY, 2010). Alguns critérios foram estabelecidos para determinação de um alimento funcional, tais como: exercer ação metabólica ou fisiológica que contribua para a saúde física e para a diminuição de morbidades crônicas; integrar a alimentação usual; os efeitos positivos devem ser obtidos em quantidades não tóxicas, perdurando mesmo após suspensão de sua ingestão; e, por fim, os alimentos funcionais não são destinados ao tratamento ou cura das doenças (BAGCHI, 2008; BORGES, 2000;).

Os alimentos funcionais fazem parte de uma nova concepção lançada pelo Japão na década de 80, por um programa de governo que objetivou desenvolver

alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e apresentava uma grande expectativa de vida (MARTINS; PINTO; FERREIRA, 2004) Sendo assim, as indústrias alimentícias, aliado ao retorno financeiro, passaram a investir na pesquisa, desenvolvimento e marketing de novos produtos (ANJO, 2004).

No Brasil a legislação sobre alimentos funcionais é regulamentada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (ANVISA), onde a Comissão de Assessoramento Técnico-Científica em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos tem a responsabilidade de avaliar os relatórios técnico científicos exigidos e as alegações de propriedades funcionais. Na Resolução número 18, de 30 de abril de 1999 foi aprovado o regulamento técnico onde constam as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas na rotulagem de alimentos (BRASIL, 1999a). E na Resolução número 19, de 30 de abril de 1999 estão regulamentados os procedimentos para o registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e de saúde na rotulagem (BRASIL, 1999b).

## 2.2 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL)

O grupo das bactérias ácido lácticas é composto por doze gêneros: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* e *Weissella* (JAY, 2005).

As BAL estão amplamente distribuídas na natureza, particularmente no leite, são também habitantes dos tratos gastrointestinal, respiratório superior e urogenital inferior dos animais (HOVE, NORGAARD, MORTENSEN, 1999). O grupo inclui bastonetes e cocos não esporulados, aeróbios, microaerófilos ou anaeróbios facultativos. A maioria é inativada a temperaturas superiores a 70°C. Bactérias lácticas que utilizam, preferencialmente, a lactose como fonte de carbono são homofermentativas ou heterofermentativas (SALMINEN; VON WRIGHT, 1993).

O gênero *Bifidobacterium* caracteriza-se como microrganismos Gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, catalase-negativos e anaeróbios, podendo apresentar formas variadas que incluem bacilos curtos e curvados a bacilos bifurcados (HOLT,WILLIAMS, WILLINS, 1994). O aumento do valor nutritivo e terapêutico trazido pelas bifidobactérias gerou interesse no sentido

de incorporação dessas bactérias em determinados alimentos, sendo os veículos mais usuais os alimentos infantis, os leites fermentados, outros produtos lácteos e algumas preparações farmacêuticas (MAZO et al., 2009).

O gênero *Lactobacillus* é descrito como um grupo heterogêneo de bastonetes regulares, Gram-positivos e não-esporulados. Com o desenvolvimento das análises filogenéticas nos anos 1980, houve muitas alterações nesse gênero. O gênero *Lactobacillus* inclui cerca de 80 espécies reconhecidas (AXELSSON, 2004), embora cinco espécies heterofermentativas do gênero *Lactobacillus* tenham sido transferidas para o gênero *Weissella*. Destacam-se nesse grupo os lactobacilos típicos do hospedeiro humano, os quais incluem as espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, além de *Lactobacillus zeae* (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002). As espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* 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 (FERRERO et al., 1996).

Os *Lactobacillus acidophilus* são bacilos em forma de bastão com as extremidades arredondadas, geralmente medindo de 0,6-0,9 X 1,5-6,0 µm (micrômetros), crescendo isoladamente, em pares ou formando curtas cadeias; tendo como temperatura ótima de crescimento, com raras exceções, 45°C (ibid.). É considerado um homofermentador obrigatório e um microrganismo microaerófilo, sendo que o desenvolvimento é geralmente favorecido pela anaerobiose (VIEGAS, 2008). Tem sido utilizado pela indústria de laticínios como probiótico na elaboração de vários produtos, os quais podem ter inúmeras aplicações na nutrição humana como suplementos alimentares, suspensões orais, comprimidos, iogurtes e leites fermentados (CHIODA et al., 2007).

Os *Lactobacillus delbrueckii* são homofermentativos e fazem parte de três subespécies: *delbrueckii*, *bulgaricus* e *lactis*. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* fermenta apenas frutose, glicose, lactose, manose e sorbitol (ibid.). Proveniente do leite, tem a capacidade de competir com os lactobacilos probióticos no processo de fermentação e, durante o armazenamento sob refrigeração, produz peróxido de hidrogênio e ácido láctico, que também afetam a sobrevivência de bactérias probióticas (LUCAS et al., 2004).

As bactérias do gênero *Streptococcus* são Gram positivas, células esféricas ou ovóides, medindo de 0,5-2,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro, ocorrendo aos pares ou em cadeias quando em meio de crescimento líquido. São catalase negativo e possuem metabolismo fermentativo, produzindo predominantemente ácido láctico, porém sem produção de gás. Podem produzir pequenas quantidades de ácidos acético e fórmico, etanol e dióxido de carbono. Todas as espécies fermentam a glicose, gerando principalmente em ácido láctico, imóveis e não formam esporos. São anaeróbias facultativas, requerem meio para crescimento rico em nutrientes e podem necessitar de 5% de dióxido de carbono. (HARDIE, 1986; HARDIE; WHILEY, 1997). O *Streptococcus thermophilus* é utilizado com predominância em associação com outras culturas “starter” na elaboração de queijos e iogurtes (TAMINE, 1990).

Bactérias ácido lácticas possuem capacidade de reduzir ou inibir a contaminação por microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos, devido a produção de bacteriocinas, ácido acético, láctico, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e de outras substâncias antimicrobianas (CLEVELAND et al., 2001; DEEGAN et al., 2006; LAU, LIONG, 2014).

A ação antagonista de espécies de BAL contra microrganismos indesejáveis em alimentos tem sido descrita em vários trabalhos. Muitas BAL isoladas de leite e queijos possuem capacidade de inibição frente a patógenos e deteriorantes, como *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e bactérias do grupo coliforme (ALEXANDRE et al., 2002; CARIDI, 2003). Na literatura é demonstrada a importância do uso desses microrganismos para a preservação de alimentos e para o controle de patógenos.

### 2.3 PROBIÓTICOS

O termo “probiótico” foi introduzido pela primeira vez em 1965. Define-se ao probiótico como “uma preparação ou um produto, contendo microrganismos viáveis e definidos em número suficiente, que alteram a microbiota (por implantação ou colonização) em uma parte do trato gastrointestinal do hospedeiro e, por esses meios, exercem efeitos benéficos na saúde do mesmo” (SCHREZENMEIR; DE VRESE, 2001).

Os microrganismos probióticos podem ser incluídos na preparação de uma ampla gama de produtos, incluindo alimentos, medicamentos e suplementos

dietéticos. As formas mais comuns para veicular os probióticos são os produtos lácteos e os alimentos fortificados com probióticos. No entanto, também existem no mercado comprimidos, cápsulas e sachês que contêm bactérias em forma liofilizada (WGO, 2008).

Ross et al. (2005) consideram que a inserção de culturas probióticas em produtos lácteos se deve pela contribuição para a sobrevivência das cepas ao suco gástrico, particularmente por seu efeito tamponante e protetor.

As espécies mais frequentemente empregadas na produção dos produtos probióticos do leite são de origem intestinal humana por serem mais toleradas, adaptadas as necessidades fisiológicas do hospedeiro, e pela facilidade de colonizar o intestino, comparando com culturas originárias do cólon de outros animais (PUUPPONEN-PIMIÄ et al, 2002). Destaca-se o gênero *Lactobacillus*, cujo habitat é o intestino delgado e *Bifidobacterium* encontrado no intestino grosso. *L. acidophilus* é o microrganismo probiótico muito utilizado pela indústria de alimentos (O'SULLIVAN, 2006).

São considerados probióticos os seguintes microrganismos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei variedade rhamnosus*, *Lactobacillus casei variedade defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium* (BRASIL, 2008).

Para que uma cultura seja considerada probiótica, algumas características devem estar presentes como: segurança para o uso; resistência a ácidos, enzimas pancreáticas e digestivas; adesão à mucosa epitelial do intestino; tolerância à bile; velocidade específica de crescimento elevada; imunomodulação sem efeito pró inflamatório; diminuição ou eliminação de microrganismos patogênicos do epitélio intestinal; ausência de patogenicidade e carcinogenicidade; ausência de genes determinantes de resistência; capacidade de colonização e persistência no trato gastrointestinal; capacidade para produção de substâncias que levem ao antagonismo do crescimento de patógenos beneficiando a microbiota intestinal (BRANDÃO, 2007; DANIEL, et al., 2006; HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002; OLIVEIRA et al., 2002).

Na tecnologia de fabricação de produtos probióticos, além da seleção das cepas que se enquadrem nos critérios mencionados anteriormente, as culturas devem possuir boa multiplicação no leite, promover propriedades sensoriais

adequadas no produto e serem estáveis e viáveis durante o armazenamento. Desta forma, podem ser manipuladas e incorporadas em produtos alimentícios sem perder a viabilidade e a funcionalidade, resultando em produtos com textura e aroma adequados (OLIVEIRA et al., 2002).

### **2.3.1 Ação e benefícios dos probióticos**

Dentre os benefícios atribuídos à ingestão de alimentos contendo probióticos, alguns já foram provados cientificamente e outros ainda requerem mais estudos em humanos (GRANATO et al., 2010).

A dose de probióticos necessária varia segundo a cepa e o produto. Embora muitos produtos de venda livre proporcionem entre 1–10 bilhões de UFC/dose, alguns produtos foram eficazes a níveis mais baixos, enquanto outros requerem quantidades muito maiores (WGO, 2008).

O consumo regular de alimentos fontes de probióticos proporciona benefícios à saúde (CRUZ et al, 2009), devido as ações sobre o sistema imune, aumentando a resistência à infecções e doenças gastrointestinais (De VRESE et al., 2006, WEST et al., 2011). Observou-se em pesquisas que os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, sendo indicativo da ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune (CROSS, 2002).

A dose mínima diária da cultura probiótica considerada terapêutica é de  $10^8$  a  $10^9$  UFC, realizada pela ingestão de 100 g de produto contendo  $10^6$  –  $10^7$  UFC/g ou mL. (BRASIL, 2008). Tais concentrações de microrganismos probióticos devem ser mantidas em todos os passos do processamento do alimento, desde a sua fabricação até a ingestão pelo consumidor, como também devem ser capazes de sobreviver ao sistema gastrointestinal (CRUZ et al., 2009).

Os efeitos benéficos à saúde do consumidor relacionados aos probióticos incluem o controle e estabilização da microbiota intestinal; redução da população de microrganismos patogênicos, relacionado a produção de compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose por indivíduos intolerantes à lactose; aumento da absorção de minerais; produção de vitaminas do complexo B, vitamina K e alguns aminoácidos e estimulação do sistema imune pelo aumento da

produção de IgA e IgM de mucosa, células de defesa e citocinas (BARRANTES et al, 2004; BRITO; FARO, 2004; COPPOLA; GIL-TURNES, 2004).

O uso dos probióticos no suporte terapêutico de certas patologias também tem sido reconhecido. Atribui-se o seu uso no tratamento das alergias alimentares, eczema atópico, intolerância à lactose, infecção urinária, candidíase vaginal, gastroenterites bacterianas e parasitoses intestinais (ISOLAURI et al., 2000; PÉREZ et al., 2014).

A capacidade de produzir fatores antimicrobianos é outra característica dos microrganismos probióticos (JACK, TAGG, RAY, 1995). Além disso, destaca-se a adesão das cepas probióticas à mucosa intestinal de maneira mais eficaz do que as cepas patogênicas, tendo desta forma vantagem competitiva por espaço (TORO, 2005).

### **2.3.2 Queijo como produto probiótico**

Os queijos são considerados como alternativas para a incorporação de cepas probióticas viáveis, conferindo, portanto, benefícios à saúde (BUTIRI; ROCHA; SAAD, 2005). Verificou-se em estudos relacionados à adição de cepas probióticas em queijos tem demonstrado a viabilidade desta prática, uma vez que as propriedades tecnológicas são alcançadas no produto final. Estes produtos são boas alternativas como veículos de cepas probióticas até o intestino, como resultado de algumas pesquisas (GARDINER et al., 1998; GOBBETTI et al., 1998; , KARIMI, MORTAZAVIAN, KARAMI, 2012; MADUREIRA et al., 2011).

Os queijos são produtos lácteos fonte de contaminação por *E. coli* O157:H7, uma vez que o leite cru pode ser utilizado como matéria-prima na elaboração desse produto (CANDORI et al., 2013). A presença deste patógeno em queijo é preocupante, por ser um produto muito consumido pela população brasileira, além de ser armazenado sob refrigeração por longos períodos, o que pode permitir a multiplicação bacteriana (MOREIRA et al., 2003)

Os queijos frescos, como o Minas Frescal, possuem características que conferem proteção às bactérias probióticas contra a ação do oxigênio, baixo pH e sais biliares, durante a sua passagem pelo trato gastrointestinal. As características destes produtos são a alta atividade de água, baixa concentração de sal, pH acima de 5.0, quantidade de gordura relativamente elevada e consistência mais sólida

(BURITI, DA ROCHA, SAAD, 2005; KARIMI, MORTAZAVIAN, KARAMI, 2012). Alguns autores comprovaram que os queijos são mais adequados como veículos para os probióticos do que os leites fermentados e iogurtes (BERGAMINI et al., 2005; HELLER et al., 2003), sendo apontadas evidências de que especificamente o queijo Minas Frescal seja um veículo apropriado para a incorporação de cepas probióticas. Buriti, Da Rocha, Saad (2005) estudaram a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus paracasei* em queijo Minas Frescal e observaram que as cepas probióticas estavam presentes durante 21 dias de armazenamento. Vinderola et al. (2000) concluíram que o queijo fresco argentino foi considerado como veículo de probióticos usando *B. bifidum*, *Bifidum* sp., *L. acidophilus* e *L. casei* em diferentes combinações.

### **2.3.3 Sobremesa láctea como produto probiótico**

Sobremesas lácteas são produtos obtidos a partir do leite, que pela ação de agentes espessantes adquirem consistência semi-sólida (NUNES et al., 1998).

A utilização de bactérias probióticas na elaboração de sobremesas lácteas e o impacto nas características química, textural e sensorial têm sido avaliados. Entretanto, informações sobre os efeitos destas bactérias no crescimento de patógenos durante o armazenamento do alimento são limitadas (ARAGON-ALEGRO et al., 2007; CARDARELLI et al., 2008).

Este tipo de produto tem mostrado um grande potencial de mercado para consumidores interessados em alimentos alternativos funcionais (DYMINSKI et al., 2000; PINTO et al., 2003). Pesquisadores demonstraram que as sobremesas são consideradas ótimos veículos, como mousse, manjar e sobremesas a base de chocolate (ARAGON-ALEGRO et al., 2007; CARDARELLI et al., 2008).

As indústrias têm enfrentado desafios no que diz respeito à estabilidade e viabilidade dos microrganismos probióticos nos produtos. Acredita-se que o sinergismo entre prebióticos e probióticos resulte em um resultado satisfatório (MATILLA-SANDHOLM et al., 2002).

## 2.4 FATORES ANTIMICROBIANOS

Dentre as substâncias antimicrobianas, destacam-se as bacteriocinas, que são peptídeos sintetizados no ribossomo das células bacterianas e liberados no meio extracelular, que possuem ação bactericida ou bacteriostática sobre importantes patógenos, como as bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, protozoários, vírus e fungos (DEEGAN et al. 2006; DE VUYST; LEROY, 2007; REDDY; YEDERY; GUPTA, 2009).

A produção das bacteriocinas ocorre tanto na fase logarítmica quanto no início da fase estacionária (PIARD, DESMAZEAUD, 1992). Atuam na dissipação da força próton-motriz, como consequência da formação de poros na membrana citoplasmática que induz um desbalanço iônico e efluxo de íons fosfato, resultando na inativação ou morte celular (ROSA et al., 2002).

Condições ambientais como temperatura, pH, aeração, concentração de açúcar, capacidade tamponante do meio e o tempo de incubação afetam a produção das bacteriocinas (LEWUS, 1991). Alguns fatores podem contribuir para que as células bacterianas sejam resistentes às bacteriocinas, como a composição da parede e membrana celular e a presença de proteases juntos à célula alvo (EIJNSINK et al., 2002). A habilidade da inibição de bacteriocinas está associada ao nível de contaminação do microrganismo alvo, pois a contaminação inicial sendo elevada, a atividade da bacteriocina será baixa, portanto não haverá a inibição do desenvolvimento e contaminação do microrganismo (RILLA, MARTÍNEZ, RODRÍGUEZ, 2004)

As bacteriocinas são divididas em três classes (DRIDER et al., 2006):

- Classe I ou lantibióticos

Composta por pequenos peptídeos (19 a 38 resíduos de aminoácidos), termoestáveis e possuem lantionina ou  $\beta$ -lantionina. Exemplos: nisina, subtilina, epidermina

- Classe II

Composta por pequenos peptídeos (37 a 48 resíduos de aminoácidos), termoestáveis e são divididos em três subclasses: IIa (pediocina), (enterocina), IIb (lactocina G) e IIc (lactocina B).

- Classe III

Composta por peptídeos termolábeis de alta massa molar (>30 kDa). Exemplo: herveticina J.

As indústrias de alimentos possuem grande interesse em utilizar as bacteriocinas para aumentar a segurança e validade comercial dos alimentos (GARCIA et al., 2006; ROSA et al., 2002). Além disso, as bacteriocinas são consideradas um conservante natural, sendo sua utilização em alimentos muito promissora, levando em conta os riscos de intoxicação pela frequente ingestão de aditivos químicos. Com isso, torna-se importante o desenvolvimento de pesquisas relacionadas à identificação de culturas lácticas que possam produzir compostos antimicrobianos, levando à aplicação na preservação dos alimentos (GHARSALLAOUI et al., 2015; GOMEZ; 2007; PEREIRA).

Bactérias ácido lácticas e as respectivas bacteriocinas têm sido aplicadas com sucesso como antimicrobianos em carnes (McMULLEN, STILES, 1996; STILES, HASTINGS, 1991). DEEGAN et al., (2006) afirmaram que as bacteriocinas ou espécies produtoras de bacteriocinas podem ser usadas como conservantes naturais em derivados lácteos e da carne.

A nisina é naturalmente produzida em produtos fermentados, especialmente os derivados lácteos. Isolada de BAL, tem seu uso aprovado em mais de 50 países incluindo o Brasil, onde é aprovada para o uso em todos os tipos de queijos (BOWER et al., 2002). Considerada não tóxica para seres humanos, é rapidamente inativada pela  $\alpha$ -quimiotripsina, enzima produzida no pâncreas e liberada no intestino delgado (DELFINO, 2008).

Observa-se que duas bacteriocinas, bifidin e bifidocin B, são as únicas bacteriocinas produzidas por bifidobactéria e que estão relacionadas com a inibição do crescimento de importantes patógenos alimentares, como espécies de *Listeria*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus* e *Pediococcus* (YILDIRIM, JOHNSON; 1998; YILDIRIM, WINTERS, JOHNSON, 1999).

A principal função das BAL nos alimentos é promover a acidificação, impedindo o desenvolvimento de bactérias indesejáveis pela produção de ácidos orgânicos (SHAH, 2007). Assim como as bacteriocinas, os ácidos orgânicos são considerados substâncias antimicrobianas. Os mais conhecidos são o ácido acético e o lático, no qual possuem a capacidade de reduzir o pH, e inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e permitir o desenvolvimento de certas espécies de

*Lactobacillus* (AKSU, BAYTOK, BOLAT, 2004; GARCIA et al., 2006; SHAH, 2007). Pesquisadores revelam que estes ácidos possuem uma ação potencial contra bactérias patogênicas, especialmente as Gram-negativas. Alguns autores sugerem que a produção de ácidos orgânicos é considerada o principal fator antimicrobiano de bifidobacterias (MARTINEZ et al, 2013).

Devido a redução do pH, são evidenciadas modificações na permeabilidade e no potencial elétrico da membrana celular, onde ocorre a inibição do transporte ativo, permitindo que esses componentes orgânicos se difundam, reduzindo o pH intracelular e prejudicando as funções metabólicas. No interior da célula, as moléculas se dissociam liberando ânions e conseqüentemente alterando o equilíbrio osmótico. Por fim, devido ao rompimento da membrana celular, toxicidade por acúmulo de ânions e estresse osmótico e inibição das reações metabólicas principais, estas alterações intracelulares ocasionam prejuízos para a célula (BRUL; COOTE, 1999, SILVA, 2005).

O ácido acético costuma ser empregado em alimentos como conservante. Leny (2005) em seu estudo empregou o ácido acético na água de frangos submetidos à restrição alimentar, no período de oito horas que antecede ao abate. O principal objetivo foi reduzir a carga de salmonelas do ingluvío e conseqüentemente das carcaças.

O ácido láctico pode ser obtido em metabolismo fermentativo por muitas espécies de microrganismos entre os quais *Lactobacillus delbrueckii*, *Streptococcus faecalis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus amylophilus* e pelo fungo *Rhizopus oryzae*. (OHARA; YAHATA; 1996). Contribui ao desenvolvimento do sabor, aroma e textura nos alimentos e também com sua estabilidade pela inibição de microrganismos deteriorantes. O mecanismo de inibição está baseado na dissociação dos ácidos orgânicos no meio, provocando um gradiente de prótons que excede a capacidade tamponante do citoplasma desequilibrando a bomba de prótons, ocasionando como conseqüência a desnaturação dos componentes estruturais ou o esgotamento das reservas energéticas da célula interferindo com sua viabilidade (OUWEHAND, SALMINEN, 1998).

A substância antimicrobiana peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) é produzida como fator de proteção frente ao oxigênio, já que as BAL são anaeróbias facultativas ou microaeróbias, pela ação das oxidases ou NADH peroxidases (CONDON, 1987). Como os lactobacilos não possuem a enzima catalase, ocorre o acúmulo de

peróxido de hidrogênio nos produtos fermentados. Este composto possui ação antimicrobiana devido ao seu efeito oxidante, pela peroxidação dos lipídeos da membrana e a destruição da estrutura básica molecular das proteínas celulares (TORO, 2005).

Em estudo realizado com inibição *in vitro* de nove isolados de *L. acidophilus*, com a ação de bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, sobre cepas patogênicas *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Clostridium perfringens*, observou-se que a maioria dos isolados produziu forte halo de inibição contra as bactérias testadas (GARCIA et al., 2006).

A presença de cepas probióticas no intestino é de grande importância, visto que estas compõem um ecossistema, impedindo a colonização por *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp, *Escherichia coli* pelo efeito competitivo ou pela produção de compostos inibitórios (JACOBSEN et al, 1999). Há evidências de que algumas cepas de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. são capazes de inibir o crescimento de *Helicobacter pylori* devido à liberação de bacteriocinas e/ou ácidos orgânicos, além da redução da aderência destes patógenos no epitélio intestinal (GOTTELAND, BRUNSER, CRUCHETM, 2006).

Segundo Delfino (2008), algumas espécies de *Lactobacillus* são homofermentativas, transformam a lactose em ácido láctico, enquanto outras também originam etanol, acetato e dióxido de carbono, sendo consideradas heterofermentativas. Com o aumento do ácido láctico há a diminuição do pH intestinal, dificultando desta forma a sobrevivência de microrganismos patogênicos.

Além das substâncias antimicrobianas, a competição por nutrientes e por sítios de ligação, alteração do metabolismo microbiano, estimulação do sistema imunológico e exclusão competitiva são fatores importantes (CARLI, 2006).

## 2.5 AGENTES ETIOLÓGICOS VEICULADOS POR ALIMENTOS

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (1984) “a alimentação deve ser disponível em quantidade e qualidade nutricionalmente adequadas, além de ser livre de contaminações que possam levar ao desenvolvimento de doenças de origem alimentar” (BOULOS, 1999). Os agentes etiológicos veiculados por alimentos têm sido reconhecidos como o problema de Saúde Coletiva mais abrangente no mundo atual e causa importante de diminuição de produtividade e perdas econômicas que

afetam países, empresas e consumidores (TAUXE et al., 2009). Adicionalmente, Buzby; Roberts (2009) relataram que infecções do trato gastrointestinal, especificamente todas as de origem alimentar e teoricamente evitáveis, são consideradas despesas para a economia mundial.

Um alimento é considerado seguro quando não apresenta nenhum tipo de risco à saúde de quem o consome, ou seja, livre de contaminações físicas, químicas e microbiológicas (TOLEDO, 2001). A contaminação microbiológica pode ocorrer em qualquer etapa da cadeia produtiva pela falta de cuidados durante o preparo (PEREIRA, 2005; WELKER et al., 2010).

Segundo dados do Ministério da Saúde (MS) e Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), ocorreram 8.919 mil casos de surtos no Brasil entre os anos 2000 até 2012, com uma média de 740 surtos por ano. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, mais de um terço da população, incluindo países desenvolvidos, são acometidos por surtos alimentares. A maioria tem origem microbiológica, atribuindo-se este fato a manipulação e condições higiênicas inadequadas (SANTOS; JUNIOR; BORTOLOZO, 2011). As informações sobre agentes etiológicos, alimentos, fatores predisponentes e pessoas expostas ao risco são importantes à adoção de medidas de prevenção e controle por parte das autoridades sanitárias (NASCIMENTO, 2013).

O leite é um alimento consumido extensivamente pela população brasileira, sendo essencial na dieta de adultos e crianças e considerado o mais completo alimento natural (NERO et al. 2009). Admite-se que, a despeito do impedimento legal, parte significativa do leite cru chegaria a consumidores e seria empregado na fabricação de produtos lácteos, oferecendo riscos de transmissão de patógenos e zoonoses. Portanto, existe uma grande possibilidade de que o leite não processado possa veicular agentes infecciosos, inclusive STEC. Além disso, devido à sua composição química, o leite é um produto com grande facilidade de contaminação por microrganismos (DOYLE et al., 1997; CHYE et al., 2004).

Existe uma falta de padronização na produção de produtos lácteos devido, principalmente, à deficiência em fiscalização nas indústrias brasileiras. Portanto, os cuidados higiênicos sanitário devem começar desde a ordenha até a distribuição dos produtos (ROCHA et al., 2006). Dentre eles destacam-se os cuidados com o úbere, os hábitos higiênicos do ordenhador, do ambiente, além

de cuidados com o armazenamento do leite coletado, devendo estar sob refrigeração no local de ordenha (TRONCO, 2003).

## 2.6 PRINCIPAIS PATÓGENOS DE PRODUTOS LÁCTEOS

### 2.6.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é um bacilo Gram negativo, móvel ou imóvel, anaeróbio facultativo presente em grande número no intestino grosso de mamíferos e aves domésticas e selvagens, onde desempenha, como espécie comensal da microbiota, um importante papel na fisiologia digestiva (LEVINE et al., 1987).

O papel de *E. coli* como microrganismo indicador do grupo coliforme já é há muito tempo bem estabelecido. *E. coli*, por ser habitante exclusiva do trato gastrointestinal, uma vez detectada no alimento, é indicativa que o produto apresenta contaminação microbiana de origem fecal e, portanto, está em condições higiênicas insatisfatórias. Além do seu papel como microrganismo indicador, outro aspecto a ser considerado é que diversas linhagens de *E. coli* são comprovadamente patogênicas para os seres humanos e para os animais (FRANCO, 2002). Cepas patogênicas de *E. coli* conhecidas como causadoras de gastroenterite são classificadas com base na sua propriedade de virulência em: EPEC (*E. coli* enteropatogênica), EIEC (*E. coli* enteroinvasiva), ETEC (*E. coli* enterotoxigênica), STEC/EHEC (*E. coli* produtora de toxina Shiga/*E. coli* enterohemorrágica), EAEC (*E. coli* enteroagregativa) e DAEC (*E. coli* de aderência difusa) (ADAMS; MOSS, 2008; FARROKH et al., 2013). *E. coli* O157:H7 pertence a um grupo de cepas patogênicas de *E. coli*, conhecidas como entero-hemorrágicas (EHEC) ou produtoras de verotoxina (VTEC). Essas linhagens caracterizam-se pela produção de uma toxina chamada de verotoxina (VT) ou “shiga-like” toxina (ST), similar à produzida pela bactéria *Shigella dysenteriae* tipo I (WEAGANT; BRYANT; JINNEMAN, 1995).

Animais domésticos e selvagens, principalmente ruminantes como bovinos, ovinos e caprinos são considerados os principais reservatórios de STEC (BEUTIN et al., 1993), podendo ser contaminantes na produção de alimentos. Como

consequência, produtos de origem animal como carne, leite e derivados são fontes potenciais de contaminação por STEC (HUSSEIN; SAKUMA, 2005).

O principal meio de transmissão de STEC no leite é pelas fezes durante a ordenha (CHIUEH, LIUM SHIH, 2002). Padhye; Doyle (1991) detectaram *E. coli* O157:H7 em amostras de leite cru e queijo. Isolados de STEC também foram encontrados nesses produtos no Canadá, Bélgica, Alemanha, Reino Unido e nos Estados Unidos (WHO, 1998). Além disso, a presença de STEC no ambiente pode gerar uma elevada contaminação de produtos lácteos como queijos frescos produzidos com leite não pasteurizado (GERMANO; GERMANO, 1995; OMBUI et al., 1994).

### **2.6.2 *Listeria monocytogenes***

O gênero *Listeria* é constituído por bactérias em forma de bastonetes Gram positivos, não formador de esporos, anaeróbio facultativo, móvel com flagelos peritríquios, catalase positiva, oxidase negativa. Possui crescimento entre temperatura de 2,5 à 44°C sendo capaz de se desenvolver sob refrigeração, e podendo proliferar em alimentos mantidos nessas condições, a faixa de pH para seu desenvolvimento varia de 4,5 a 9,5 (FRANCO; LANDGRAF, 2002; ICMSF, 1998).

O gênero *Listeria* é constituído por sete espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. ivanovii subsp. ivanovii* e *L. ivanovii subsp. londoniensis*. A *L. innocua* e *L. grayi* são consideradas não patogênicas, enquanto a *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. welshimeri* raramente causam infecção em humanos (ICMSF, 1998).

*Listeria monocytogenes* é um dos microrganismos patogênicos de maior severidade à saúde humana, associada a vários surtos de origem alimentar, e tem como veículo, o ambiente e alimentos (vegetais, carnes, leite e derivados) destacando-se os queijos (LONCAREVIC et al., 1998). Quando a bactéria é isolada no alimento, geralmente é devido a contaminações pós-processamento ou falha no processo de pasteurização.

A porta de entrada de *L. monocytogenes* em uma indústria é muito diversificada, solo arrastado pelo calçado e vestuário, pelo transporte de materiais, através de animais que excretam o microrganismo, por matérias primas contaminadas por pessoas portadoras saudáveis (GUERRA; BERNARDO, 2004).

Devido à severidade das infecções de *L. monocytogenes*, em que a taxa de mortalidade pode alcançar cerca de 50% e por não ser conhecida ainda a dose mínima infectiva, o Food and Drug Administration dos E.U.A. estabeleceu o padrão de “tolerância zero” para o microrganismo em alimentos prontos para consumo. Os padrões microbiológicos da legislação brasileira estabelecem para alguns produtos ausência em 25g de alimento (ALMEIDA et al,1999; BRASIL, 2001;).

O desenvolvimento da listeriose depende de fatores como: número de organismos ingeridos, estado imunológico do indivíduo e virulência da cepa envolvida. Entre os neonatos, idosos, pessoas imunocomprometidas e gestantes, pode causar septicemia, encefalite, meningite, aborto espontâneo e morte. Em surtos e casos de listeriose há predominância dos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Kabuki (2004) analisou 246 amostras do ambiente de produção de queijo fresco (tipo latino) e 111 amostras do queijo, encontrando *L. monocytogenes* em 11,0% das amostras do ambiente e em 6,3% dos queijos. Todos os queijos foram fabricados com leite pasteurizado.

Silva et al. (1998) analisaram 103 amostras de queijos brasileiros obtidos no comércio do Rio de Janeiro e verificaram que, 10,68% estavam contaminadas com *L.monocytogenes*, 12,62% com *L. innocua*, 5,83% com *L. grayi* e 0,97% com *L.welshimeri*.

### **2.6.3 *Staphylococcus aureus***

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos, catalase positivos, imóveis e não formadores de esporos, quando visualizados em microscópio, aparecem em formas de cachos de uva.

A intoxicação estafilocócica é uma enfermidade transmitida por alimentos quando estes estão contaminados por espécies de estafilococos capazes de produzirem enterotoxinas. Relata-se ser necessária entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC de *S. aureus*/g de alimentos, para que a enterotoxina seja formada em níveis capazes de provocar intoxicação alimentar. Os principais sintomas da intoxicação são: náuseas, vômitos, diarréias, sudorese, câibras abdominais dolorosas, dores de cabeça e calafrios. O período de incubação varia de 30 minutos a 8 horas, após a ingestão do alimento contaminado (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Os alimentos mais comumente associados às intoxicações causadas pelos estafilococos são: carnes (vaca, porco e frango), produtos cárneos (presuntos, salames e cachorro quente), saladas (com presunto, frango, batatas, ovos e maionese) e produtos lácteos. Muitos destes produtos são contaminados depois do processamento ou cozimento, quando os microrganismos competidores são eliminados (BENNET; BELAY, 2001).

Segundo Silva e Gandra (2004) *S. aureus* é a espécie mais prevalente em surtos de intoxicação alimentar.

Em uma pesquisa realizada por Carmo et al. (2002) com amostras de queijos e leite cru, observou-se relação com dois surtos em Minas Gerais. No primeiro surto, 50 pessoas adoeceram após a ingestão de queijo Minas Frescal, e no segundo surto, 328 pessoas apresentaram os sintomas após ingestão de leite cru. As análises mostraram que *S. aureus* estava presente ( $2,4 \times 10^2$  à  $2,0 \times 10^8$  UFC/g).

#### **2.6.4 *Bacillus cereus***

*Bacillus cereus* é uma bactéria que pertence à família *Bacillaceae*, aeróbia, móvel por meio de flagelos peritríquios, produtora de esporos termorresistentes, com habitat natural no solo e vegetais. Suas cepas são catalase positiva e oxidase variável.

A esporulação aeróbia e a reação de catalase positiva as distinguem do gênero *Clostridium* (NOTERMANS; BATT, 1998).

Estes microrganismos sobrevivem a várias condições ambientais, devido à sua condição de formar endosporos resistentes ao calor, agentes químicos, desidratação e desinfetantes. São geralmente mesófilos, com temperatura ótima de crescimento variando de 25 a 37 °C, embora pesquisas tenham demonstrado que cepas de *B. cereus*, possuem a capacidade de crescer à temperatura abaixo de 7 °C, com algumas cepas psicrotróficas crescendo até a 4°C, e outras com características termofílicas, podendo crescer até a 75°C. Multiplicam-se na faixa de pH entre 4,3 a 9,3 (SCHOENI; WONG, 2005).

*Bacillus cereus* causa dois tipos de doenças de origem alimentar: a síndrome diarréica e a síndrome emética além de diversas infecções localizadas ou sistêmicas, como endocardites, meningites, periodontite, infecções oculares,

osteomielite e septicemia. Estas patologias são menos frequentes se comparadas às do trato gastrointestinal (SCHOENI; WONG, 2005; GRANUM, 1994).

Os alimentos associados aos surtos diarréicos por *B. cereus* normalmente são ricos em proteínas, como produtos cárneos, sopas, vegetais, leites e produtos lácteos, com contagens entre  $10^5$  e  $10^7$  células ou esporos /g ou mL. A outra doença de origem alimentar causada por cepas de *B. cereus*, é a síndrome emética que é caracterizada por náuseas e vômitos. Sua duração é de 6 a 24 h e o período de incubação varia de 0,5 a 5 h, provocando sintomas similares aos causados por *Staphylococcus aureus* (GRANUM, 1994; IDF, 1993).

### 2.6.5 *Salmonella* spp

*Salmonella*, um gênero da família *Enterobacteriaceae*, compreende bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, móveis por flagelos peritríquios, que fermentam glicose, mas não lactose e sacarose, geralmente produzindo gás e  $H_2S$ , são oxidase negativa e catalase positiva (ICMSF, 1998). A temperatura ótima para multiplicação de *Salmonella* é próxima à 35-37°C, devendo estar ausente em 25g do alimento analisado (BRASIL, 2001).

As doenças causadas por *Salmonella* são divididas em três grupos: febre tifoide (causadas por *Salmonella typhi*), febre entérica (causadas por *Salmonella paratyphi*) e as enterocolites ou salmoneloses, causadas pelas demais salmonelas. Atualmente, *Salmonella* é um dos microrganismos mais relatados em surtos de origem alimentar, principalmente envolvendo carnes bovinas, aves e ovos. Em relação aos laticínios a contaminação é quase sempre causada por leite cru ou inadequadamente pasteurizado (FRANCO; LANDGRAF, 2002).

Segundo De Buyser et al. (2001), nos 2.861 surtos de origem alimentar ocorridos na França, no período de 1988 a 1997, *Salmonella* foi o principal agente etiológico (49%) e a porcentagem dos derivados do leite (queijos) nestes surtos foi de 1,8%.

Segundo Eleftheriadou et al. (2002), na República de Chipre, entre 1991 à 2000, de 28.835 amostras de alimentos analisados, 1,8% apresentaram *Salmonella* spp. Destas, apenas uma amostra de queijo estava contaminada com *Salmonella* spp.

## 2.7 FORMAÇÃO DE BIOFILME

A formação de biofilmes é resultado de vários fenômenos de natureza física e biológica, constituindo-se em várias etapas. Zotolla; Sasahara (1994), descreveram o processo em duas etapas, sendo a primeira reversível e a segunda irreversível. Na etapa reversível, os microrganismos estariam fracamente ligados à superfície por forças de Van de Waals e atrações eletrostáticas, sendo facilmente removidos. Na segunda etapa, pelo tempo de aderência (tempo-dependente) e pela formação de substâncias exopoliméricas que funcionam como uma “cola” ligando a bactéria à superfície, o fenômeno torna-se irreversível. Quando as células estão livres, são designadas planctônicas e quando estão associadas a uma superfície em processo de adesão e formação de biofilmes são denominadas sésseis (ANDRADE et al., 1998).

As propriedades físico-químicas da superfície inerte e da superfície microbiana, estruturas celulares (pili, flagelos e fímbrias), capacidade de produção de matriz extracelular, sistemas de comunicação célula-célula (*quorum sensing*) e condições do processamento de alimentos (fluxo de líquidos e concentração de nutrientes) influenciam na adesão microbiana.

Outro fator extremamente importante na adesão e formação de biofilmes é a característica da superfície sólida a qual os microrganismos irão aderir. Chapas de aço inoxidável tipo AISI 304 acabamento nº4 (#4) são usualmente utilizadas na fabricação de equipamentos e utensílios na indústria de alimentos. Borracha, teflon e nylon são utilizados para gaxetas, utensílios e partes de equipamentos. Além destas superfícies, destacam-se também o vidro e as superfícies de polipropileno. Estas superfícies são submetidas a repetidas e diferentes ações mecânicas nas diversas etapas de processamento e higienização, aumentando o desgaste e a possibilidade de alojar microrganismos.

A produção de substâncias extracelulares também está relacionada com a fixação e a proteção dos microrganismos nas superfícies. Os exopolisacarídeos (EPS) determinam as condições de vida dos microrganismos no biofilme, afetando a porosidade, densidade, conteúdo de água, propriedades de absorção e estabilidade mecânica. Estes compostos são biopolímeros que envolvem os microrganismos no biofilme. Ao contrário do que normalmente se acredita, os EPS são mais do que

apenas polissacarídeos, os quais compreendem adicionalmente uma grande variedade de proteínas, glicoproteínas e glicolípídeos, sendo difícil purificar a matriz de EPS e separar seus componentes de células e outras macromoléculas associadas ao biofilme (FLEMMING; NEU; WOZNIAK, 2007). Os EPS também protegem as células contra estresses de ordem física como, ação mecânica, irradiações e variações de temperatura, além de sanitizantes e antimicrobianos (POULSEN, 1999). Microrganismos aderidos a superfícies de contato com alimentos podem constituir um perigo potencial pela possível contaminação cruzada no processamento desses alimentos (POULSEN, 1999; SHI; ZHU, 2009).

A habilidade dos microrganismos de origem alimentar em aderir e formar biofilmes em superfícies foi relatada em diversos estudos (GANDARA; OLIVEIRA, 2000; JAIN; CHEN, 2007; SHARMA; ANAND, 2002). O grande foco de contaminação é considerado quando as células do biofilme se desprendem, já que os microrganismos podem contaminar os alimentos e/ou serem disseminados para outros pontos da superfície, equipamentos e ambientes (POULSEN, 1999).

Na indústria de laticínios a contaminação do leite e produtos lácteos, após a pasteurização ocorre, principalmente, em função dos equipamentos de envase (WAAK et al., 2002; DOGAN; BOOR, 2003). Biofilmes podem se desenvolver na lateral das juntas dos equipamentos, sendo, também, fonte de contaminação dos alimentos após a pasteurização (AUSTIN; BERGERON, 1995). A contaminação do leite pasteurizado, também, pode ocorrer pela adesão de bactérias nas placas dos pasteurizadores de leite (FLINT et al., 1997). Estudo sobre biofilme em usina de pasteurização comercial de leite apontou que dentre os microrganismos isolados, predominaram os do gênero *Bacillus*. Também foram isolados *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Staphylococcus*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* e espécies de *Citrobacter*, *Flavobacterium* e *Proteus* (SHARMA, ANAND; 2002).

Em propriedades leiteiras e na indústria de laticínios, biofilmes podem consistir de bactérias patogênicas, como *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. e *B. cereus* (VLKOVÁ et al., 2008).

A capacidade de formação de biofilme por STEC sobre diferentes superfícies, como aço inoxidável, vidro, borracha e poliestireno tem sido demonstrada (RYU; BECHAUT, 2004; BISCOLA, 2009).

Há três estratégias para se tentar solucionar os problemas dos biofilmes: i) sanitização antes da sua formação, ii) sanitização após sua formação, ou iii) utilização de materiais que não favoreçam a formação dos mesmos (MEYER, 2003). A limitação de nutrientes, a ausência de água, o uso de equipamentos com configurações higiênicas, o controle da temperatura no processamento são condições importantes para o controle do biofilme na indústria de alimentos. Entretanto, nem sempre estas condições estão presentes, e, portanto, o controle dos biofilmes, muitas vezes, só ocorrerá pela aplicação de um programa de higienização eficaz (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003).

Para que ocorra a prevenção e o controle da formação de biofilmes na indústria de alimentos, é necessário que ocorram práticas de higienização, cuja eficácia dependerá de uma aplicação integrada às outras ferramentas de controle de qualidade como as Boas Práticas de Fabricação (BPF), o Sistema de Análise e Pontos Críticos de Controle (APPCC), ISO: 9000 (SHARMA; ANAND, 2002; SHI; ZHU, 2009) e Boas Práticas de Produção associadas à higiene de ordenha e qualidade do leite (SANTOS, 2007).

### 3 DESENVOLVIMENTO

Os trabalhos a seguir estão formatados conforme as normas das revistas às quais foram submetidos.

3.1 ARTIGO 1: EFEITOS ANTIBACTERIANOS IN VITRO DE *Bifidobacterium bifidum* E CULTURA MISTA (*Streptococcus thermophilus* E *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) EM PATÓGENOS ALIMENTARES (TRABALHO PUBLICADO NA REVISTA HIGIENE ALIMENTAR VOLUME 29 - NS. 242/243 - MARÇO/ABRIL DE 2015 – ENCARTE, ISSN 0101-9171).

IN VITRO ANTI-BACTERIAL EFFECTS OF *Bifidobacterium bifidum* AND MIXED CULTURE (*Streptococcus thermophilus* AND *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) ON FOODBORNE PATHOGENS

Luciana Justo Beserra Rosa<sup>1\*</sup>, Luciana Maria Ramires Esper<sup>2</sup>, Robson Maia Franco<sup>1</sup>, Marco Antonio Sloboda Cortez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal Fluminense – Faculdade de Medicina Veterinária

<sup>2</sup> Universidade Federal Fluminense – Faculdade de Farmácia

#### Resumo

Bactérias lácticas contribuem para agregar valor aos alimentos, já que favorecem características sensoriais e tecnológicas, e promovem a conservação destes, devido à competição e inibição da microbiota deteriorante e/ou agentes patogênicos. Neste presente trabalho extratos de cultura mista utilizada na produção de iogurtes (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) e do probiótico *Bifidobacterium bifidum* neutralizados a pH 6,0 e não neutralizados, foram avaliados em relação aos efeitos antibacterianos in vitro sobre importantes patógenos alimentares. O ensaio para detecção do efeito antagonista das bactérias ácido lácticas (BAL) foi realizado pela técnica de difusão em sobrecamada de Agar com modificações, utilizando patógenos Gram positivos e negativos: *Listeria innocua* ATCC 33090, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Salmonella* ATCC 14028 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata. A cultura mista (*Streptococcus*

*thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) e *Bifidobacterium bifidum* apresentaram halos de inibição em relação à todos os patógenos nos sobrenadantes que não sofreram neutralização. A cultura mista e *B. bifidum* apresentaram halos de inibição de 3,0 e 4,0 mm respectivamente sobre *Listeria innocua* ATCC 33090; 2,5 e 2,0 mm sobre *Escherichia coli* ATCC 25922; 3,2 e 2,4mm sobre *Bacillus cereus* ATCC 14579; 3,2 e 3,5mm sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 e 1,5 e 3,0mm sobre meio de cultura com *Salmonella* ATCC 14028. Os resultados apresentados evidenciaram que tanto o *Bifidobacterium bifidum*, conhecido probiótico, quanto a cultura mista utilizada na produção de iogurtes exerceram atividades antagonistas frente a patógenos *in vitro* e esta ação foi diretamente correlacionada à produção de ácidos orgânicos e consequente diminuição do pH do meio. Palavras-chave: Bactérias lácticas, Patógenos Alimentares, Inibição *in vitro*

## **Introdução**

As bactérias ácido lácticas (BAL) têm sido utilizadas pelas indústrias de lácteos nos mais variados produtos, como culturas iniciadoras ou adjuntas em leites fermentados, queijos e soro de queijo (MENÉNDEZ et al., 2004). Do mesmo modo, as características probióticas apresentadas por muitas destas BAL são cada vez mais valorizada, devido aos efeitos benéficos que estes microrganismos promovem na saúde do consumidor (PEREIRA; GÓMEZ, 2007). Bactérias lácticas contribuem para agregar valor aos alimentos, já que favorecem características sensoriais e tecnológicas, e promovem a conservação destes, devido à competição e inibição da microbiota deteriorante e/ou agentes patogênicos (NAIDU; CLEMENS, 2000; MADERA et al., 2003). Em estudos, autores relatam que bifidobactéria possui um importante papel na promoção da saúde e proteção contra doenças (BAYOUMI, GRIFFITHS; 2010). A variedade de mecanismos protetores têm sido relatados, como a produção de ácidos orgânicos (ácido láctico), que resulta na queda do pH, além da produção de compostos antimicrobianos como peróxido de hidrogênio, CO<sub>2</sub>, diacetil, acetaldeído, bacteriocinas, e outras substâncias (CINTAS et al. 2001). Apesar da cultura mista utilizada na elaboração do iogurte não ser considerada como agente probiótico, possui efeitos positivos como ação inibidora contra microrganismos patogênicos (SILVA, 2007). O estudo do efeito de probióticos sobre a inibição de patógenos é de grande relevância, uma vez que o leite e seus derivados têm sido relatados como alimentos carreadores de microrganismos. Neste contexto, o

presente trabalho teve como objetivo avaliar a propriedade antagônica in vitro de *Bifidobacterium bifidum* e cultura mista (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) em patógenos alimentares microrganismos patogênicos veiculados por alimentos.

### **Material e Métodos**

O ensaio para detecção do efeito antagonista das BAL foi realizado pela técnica de difusão em Agar conforme Tagg et al. (1976) e Casla et al. (1996) com modificações, utilizando patógenos Gram positivos e negativos: *Listeria innocua* ATCC 33090, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Salmonella* ATCC 14028 e *Escherichia coli* ATCC 25922. As cepas patogênicas foram ativadas por dois dias consecutivos em caldo BHI (“Brain Heart Infusion” – Himedia) e incubadas em aerobiose a 37°C por 24 horas. Ativaram-se as culturas mista e de *Bifidobacterium bifidum* em caldo MRS e sendo posteriormente incubadas em jarra de anaerobiose (Anaerobac- Probac) a 37°C por 24 horas. Após ativação, foram confeccionados esfregaços e realizada a coloração de Gram e a prova da catalase. Após ativação das culturas, os patógenos foram inoculados em ágar BHI semi-sólido, sendo posteriormente vertidos em placas de Petri. Foram confeccionados “spots” no Agar semi-sólido, com auxílio de ponteiras estéreis. As bactérias lácticas foram centrifugadas por 5 minutos a 3500 r.p.m a 4 °C . Os sobrenadantes foram filtrados em membrana estéril 0,22 µm (TPP). Os experimentos foram realizados nos sobrenadantes neutralizados à pH 6,0 com NaOH 0,1N e sobrenadantes não neutralizados. 10µL dos sobrenadantes foram inoculados nos spots das placas com os patógenos. As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C por 24h e após este período os halos de inibição formados foram medidos com paquímetro. Cada halo foi dividido em quatro partes e cada parte foi medida e depois a média foi calculada. O resultado obtido foi em milímetros. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

### **Resultados e discussão**

A cultura mista (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) e *Bifidobacterium bifidum* apresentaram halos de inibição em relação à todos os patógenos (Gram positivos e Gram negativos) nos sobrenadantes que não sofreram neutralização. A cultura mista e *B. bifidum* apresentaram halos de inibição

de 3,0 e 4,0 mm respectivamente sobre *Listeria innocua* ATCC 33090; 2,5 e 2,0 mm sobre *Escherichia coli* ATCC 25922; 3,2 e 2,4mm sobre *Bacillus cereus* ATCC 14579; 3,2 e 3,5 sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 e 1,5 e 3,0 sobre meio de cultura com *Salmonella* ATCC 14028. Os sobrenadantes que foram neutralizados para impedir a ação do baixo pH sobre os patógenos, devido à produção de ácidos por bactérias lácticas, não apresentaram halos de inibição. Estes resultados demonstram a importância da produção de ácidos não somente para a tecnologia de processamento dos alimentos, mas também na inibição de patógenos. A produção de outros compostos antibacterianos não pode ser excluída, porém a contribuição para inibição destes patógenos seria considerada ineficiente. Makras e Vuyst (2006) analisaram diversas cepas de Bifidobactérias contra patógenos Gram negativos e demonstraram que a atividade foi devida à ação de ácidos orgânicos, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho. Destaca-se também a importância de testes com sobrenadantes neutralizados e não neutralizados para sinalizar a ação de outros compostos inibitórios além dos ácidos produzidos por bactérias lácticas, como bacteriocinas, de grande interesse na pesquisa.

### **Conclusão**

Os resultados apresentados evidenciaram que tanto o *Bifidobacterium bifidum*, conhecido probiótico, quanto a cultura mista utilizada na produção de iogurtes exerceram atividades antagonistas frente à patógenos “in vitro” e esta ação foi diretamente correlacionada à produção de ácidos orgânicos e consequente diminuição do pH do meio.

### **Referências Bibliográficas**

- BAYOUMI, M.A., GRIFFITHS, M.W. Probiotics down-regulate genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity islands I and II. *Journal of Food Protection*, 73 (3), pp. 452–460, 2010.
- CINTAS LM, CASAUS MP, HERRANZ C, NES IF, HERNÁNDEZ PE. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Sci Tech Int* 7:281–305, 2001.
- CASLA, D., REQUENA, T., GO´ MEZ, R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat’s milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL 105. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 35–41, 1996.

MADERA, C.; GARCÍA, P.; JANZEN, T.; RODRÍGUEZ, A.; SUÁREZ, J. E. Characterization of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. *International Journal of Food Microbiology*, Torino, v. 86, n. 3, p. 213-222, 2003.

MENÉNDEZ, S.; GODÍNEZ, R.; HERMIDA, M.; CENTENO, J. A.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Characteristics of "Tetilla" pasteurized milk cheese manufactured with the addition of autochthonous cultures. *Food Microbiology*, v. 21, n. 1 p. 97-104, 2004.

MAKRAS, E.; DE VUYST, L. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *International Dairy Journal*, 16, 1049-1057, 2006.

NAIDU, A. S.; CLEMENS, R. A. Probiotics. In: NAIDU, A. S. *Natural food antimicrobial systems*. Boca Raton: CRC Press. Cap. 17, p. 431-462, 2000.

PEREIRA, V. G.; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 28, n. 2, p. 229 - 240, 2007.

SILVA, S.V. Desenvolvimento de logurte Probiótico com Prebiótico. Santa Maria, 2007, 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, RS, 2007.

TAGG, J.R., A.S. ADJOIN AND L.W. WATCHMAKER. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiology Review*, 40:722-756, 1976.

Autor(a) a ser contactado (a): Luciana Justo Beserra Rosa, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brazil, nº 64, Santa Rosa, Niterói, RJ, CEP: 24023-340, e-mail: [lucijusto@globo.com](mailto:lucijusto@globo.com)

3.2 ARTIGO 2: VIABILITY OF PROBIOTIC MICRO-ORGANISM *Lactobacillus acidophilus* IN DAIRY CHOCOLATE DESSERT AND ITS ACTION AGAINST FOODBORNE PATHOGENS (TRABALHO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA CIÊNCIA RURAL,. VOL. 46, Nº 2 FEVEREIRO, 2016. ISSN 0103-8478).

Viability of probiotic micro-organism *Lactobacillus acidophilus* in dairy chocolate dessert and its action against foodborne pathogens

Viabilidade de microrganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* em sobremesa láctea de chocolate e ação sobre patógenos alimentares

**Luciana Justo Beserra Rosa<sup>I</sup> Julia do Prado Lima Guimarães Cabral<sup>II</sup> Robson Maia Franco<sup>I</sup> Marco Antônio Sloboda Cortez<sup>I</sup> Luciana Maria Ramires Esper<sup>II</sup>**

## **ABSTRACT**

The ability to produce antimicrobial factors is considered an important feature of probiotic microorganisms. Bacteriocins, hydrogen peroxide, acetic acid and lactic acid are examples of these substances. The present research aimed to develop probiotic dairy desserts (DD) with *Lactobacillus acidophilus* and evaluate the viability of this strain, as well as its action on food pathogens. Treatments with and without interactions between *L. acidophilus* and pathogenic Gram-negative bacteria (*Salmonella sp.* and *Escherichia coli* O157:H7) and Gram positive (*Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*) were produced. The products were stored at a temperature of 8°C and analyzed at the times 24, 48, 72 hours, 7 days and 28 days (at 28 days, only T1 was analyzed because the other products were deteriorated). In an analysis of the potential for development of new products, the dairy dessert with *L. acidophilus* was considered a probiotic product. Assessment of the counts of pathogens in dairy desserts with or without *L. acidophilus* showed different behaviors of these products in response to pathogens, which could be

justified by a possible action of bacteriocins or microbial competition, but there has been no overall reduction or reduction up to a safe level. It is concluded that the probiotic products developed reduced significant food pathogens, but not up to safe levels. Thus, we emphasize the importance of the use of quality tools in the development and monitoring of dairy desserts.

**Key words:** probiotics, dairy dessert, *Lactobacillus acidophilus*

<sup>I</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, 24220-900, Niterói, RJ, Brasil.

<sup>II</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, 24241000, Niterói, RJ, Brasil.

## RESUMO

A capacidade de produzir fatores antimicrobianos é considerada uma importante característica dos microrganismos probióticos. Bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, ácido acético e ácido lático, são exemplos destas substâncias. Com o presente trabalho, objetivou-se desenvolver sobremesas lácteas (SL) probióticas, acrescidas de *Lactobacillus acidophilus* e avaliar a viabilidade desta cepa, além da ação frente a patógenos alimentares. Foram produzidos tratamentos com e sem interações entre o *L. acidophilus* e bactérias patogênicas Gram negativas (*Salmonella sp* e *Escherichia coli*) e Gram positivas (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*). Os produtos foram armazenados em temperatura de 8°C e analisados nos tempos 24, 48, 72 horas, 7 dias e 28 dias (apenas T1 por deterioração dos demais produtos neste tempo). A sobremesa láctea com *L. acidophilus* foi considerada produto probiótico, verificando o potencial de desenvolvimento de um novo produto. Analisando as contagens dos patógenos nas sobremesas lácteas com e sem adição de *L. acidophilus*, observaram-se diferentes comportamentos diante dos patógenos, o que poderia ser justificado por uma possível ação de bacteriocinas ou competição microbiana, porém não houve uma redução total ou até um nível considerado seguro. Conclui-se que os produtos

probióticos desenvolvidos reduziram os patógenos alimentares de importância, porém não a níveis considerados seguros. Dessa forma, ressalta-se a importância de ferramentas de qualidade no desenvolvimento e monitoramento de sobremesas lácteas.

**Palavras-chave:** probióticos, sobremesa láctea, *Lactobacillus acidophilus*

## INTRODUCTION

According to FAO's/WHO's (2002) reports, probiotics are defined as living microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer benefits to host health, through a positive action on the intestinal microbiota. Additionally, the probiotics are associated to reduction of lactose intolerance, cancer, allergies, hepatic disease, *Helicobacter pylori* infections, urinary tract infections, hyperlipidemia and increased immunity (EJTAHED et al., 2011; LOLLO et al., 2013; NABAVI et al., 2014).

Moreover, probiotics have possible mechanisms of action that produce a response to pathogens. This is justified by the competition for binding sites, forming a physical barrier to pathogens, competition with pathogens for nutrients, inactivation of toxins and receptors through the stimulation of phagocytosis and of specific and nonspecific immune responses against pathogens (WENDLING & WESCHENFELDER, 2013). The capacity to produce antimicrobial factors is another possible characteristic of probiotic microorganisms. Bacteriocins, hydrogen peroxide, acetic acid and lactic acid are examples of these substances (RASTALL et al., 2005). PUUPPONEN-PIMIÄ et al. (2002) suggest that the use of probiotics in the diet reduces the proliferation of potentially harmful bacteria, enhancing natural defense mechanisms of the host.

The main probiotic foods are dairy products, especially yogurts and fermented milks (EJTAHED et al., 2011; LOLLO et al., 2013; KANMANI et al., 2013; NABAVI et al., 2014; MAGANHA et al., 2014). CRUZ et al., (2012) developed yogurts with glucose oxidase enzyme, as a potential alternative to increase the survival of probiotic bacteria in fermented milks, minimizing oxidative stress in probiotic yogurts. Cheeses are less frequently used as sources of probiotic products, e.g. Minas Frescal, Feta and curd cheeses, despite their advantages such as higher pH and fat, as well as firmness, providing a favorable environment for the survival of probiotic bacteria in the gastrointestinal tract (GOMES et al., 2011; KARIMI et al., 2012). In studies on alternative products such as dairy desserts, many researchers have stressed that they are a vehicle for the incorporation of probiotic strains and other functional ingredients (ARAGON-ALEGRO et al., 2007; CARDARELLI et al., 2008; FERNANDES et al., 2013). Consumer preferences regarding texture and flavor are essential in the elaboration of a dairy product and, consequently, impact the acceptability of a given product (TARREGA & COSTELL, 2006). The technologies used in the dairy industry and the innovative ingredients have stimulated the production of desserts with new sensory characteristics and higher nutritional value (NIKAEDO et al., 2004). The influence of probiotic microorganisms on the behavior of foodborne pathogens has been little studied, given that each pathogen may act differently depending on the type of food. (MADUREIRA et al., 2011). Besides, more in-depth studies are needed on the viability of probiotic microorganisms (CARDARELLI et al., 2008). Therefore, the present study aimed to develop probiotic dairy desserts with addition of *Lactobacillus acidophilus*, and assess the viability of this strain at the times 24, 48, 72 hours, 7 days and 28 days after preparation, as well as the competition in response to important foodborne pathogens.

## MATERIAL AND METHODS

The lyophilized probiotic culture used in the preparation of the dairy dessert was *Lactobacillus acidophilus* (LA-05, direct vat set –DVS, CHR HANSEN, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil). The pre-activation was performed according to a methodology described by BURITI et al. (2007) with adaptations. It was done as follows: 0.02g of LA-05 DVS probiotic culture were added to 40mL of reconstituted skimmed milk (m/v). Then the culture was incubated at 37°C for 150 minutes.

The following ingredients were used in the preparation of the probiotic dairy dessert: 81.5% UHT whole milk, 8.5% sucrose, 4% cocoa powder, 4% Global Food<sup>®</sup> formulation and 2% skimmed milk powder. After weighing, the dry ingredients were mixed and UHT milk was added. The product was homogenized during 30 minutes in mix (Pérola Plus Britânia) and heated to 80°C for 3 minutes. Subsequently, the temperature was reduced to 40°C to incorporate the milk enriched with the probiotic strain *L. acidophilus* (SILVA et al., 2012 with modifications).

The Gram positive and Gram negative pathogens used were *Escherichia coli* O 157:H7 (CDC EDL-933), *Salmonella sp* (ATCC 00150), *Staphylococcus aureus* (ATCC 00358) and *Bacillus cereus* (ATCC 14579). The identification of these microorganisms was confirmed by biochemical, morphological tests and growing on selective and differential media. The microorganisms were maintained at -80°C, in Eppendorf tube containing *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco) broth with addition of glycerol (80:20). In each experiment, the cultures were activated and subcultured twice in succession in 10mL of TSB broth and incubated at 35±1°C for 18 hours. Decimal dilutions were performed so that the final concentration of pathogens in each dessert was 6log C/g. The concentrations were confirmed in all the experiments by plating in specific media. The study was composed of nine treatments: Treatment

(T)1: Dairy dessert (DD) with addition of *L. acidophilus*, T2: DD with *E. coli* O157:H7, T3: DD with *Salmonella* sp., T4 DD with *S. aureus*, T5: DD with *B. cereus*, T6: DD with *L. acidophilus* and *E. coli* O157:H7, T7: DD with *L. acidophilus* and *Salmonella* sp, T8: DD with *L. acidophilus* and *S. aureus*, T9: DD with *L. acidophilus* and *B. cereus*. The products were transferred to plastic containers with lids, then stored at a temperature of 8°C, analyzed at the times 24, 48, 72 hours, 7 days and 28 days (at 28 days, only T1 was analyzed because the other products were deteriorated).

pH determination was performed with digital pH meter (Micronal, B-375) by direct insertion of the electrode in the sample (MARSHALL, 1993). Titratable acidity was determined by the method described by BRASIL (2006) and expressed in lactic acid in g 100g<sup>-1</sup> of the product. Viability of the probiotic *L. acidophilus* was determined according to a methodology recommended with the use of Agar medium De Man Rogosa and Sharpe (MRS) with addition of 0.15% of bile (VINDEROLA; REINHEIMER, 1999) and pathogen count was performed according to the recommendations: *E. coli* O157:H7 (ZADIK et al., 1993), *S. aureus* (LANCETTE; BENNETT, 2001), *Salmonella* spp (ANDREWS et al., 2001), *B. cereus* (BENNETT; BELAY, 2001). The results were expressed in log CFU g<sup>-1</sup>.

### **Statistical analyzes**

Base 10 logarithms were used for normal distribution of the data obtained with the counts. Three independent experiments were performed in duplicate, and statistical treatment was obtained by analysis of variance (ANOVA) in entirely randomized design, with significance level of 5% (P<0.05). Tukey's multiple comparison tests were used for mean comparison, through the software Prism 5.01 GraphPad (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

## RESULTS AND DISCUSSION

Regarding the dessert with addition of *L. acidophilus* (T1), on the first day of storage, the count was  $8.25 \log \text{CFU } 25\text{g}^{-1}$  and at the subsequent times they ranged from  $8 \log \text{CFU } 25\text{g}^{-1}$  (24 hours) to  $8.70 \text{CFU } 25\text{g}^{-1}$  (28 days). Thus, the final count of the probiotic strain, considering the daily dose of the product of 120 grams, (BRASIL, 2003), is in accordance with the Brazilian legislation. Probiotic products or products claimed to be probiotic can be considered those that have microorganisms, e.g. *L. acidophilus*, at minimum concentrations of  $10^8$  to  $10^9 \text{CFU}$  (8 to  $9 \log \text{CFU}$ ) of probiotic microorganisms per portion of the product (BRASIL, 2008). In their experiment of production of a dairy dessert with addition of *L. acidophilus*, FERNANDES et al. (2013) and VASCONCELOS et al. (2013), reported similar results for microbial counts.

For desserts T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8 and T9, the analyzes were performed until the time 7 days, because at the time 28 days the products showed markedly altered sensory characteristics such as color, smell and general aspect, being considered deteriorated, and, so, it was not possible to carry out the analyzes (Figure 1).

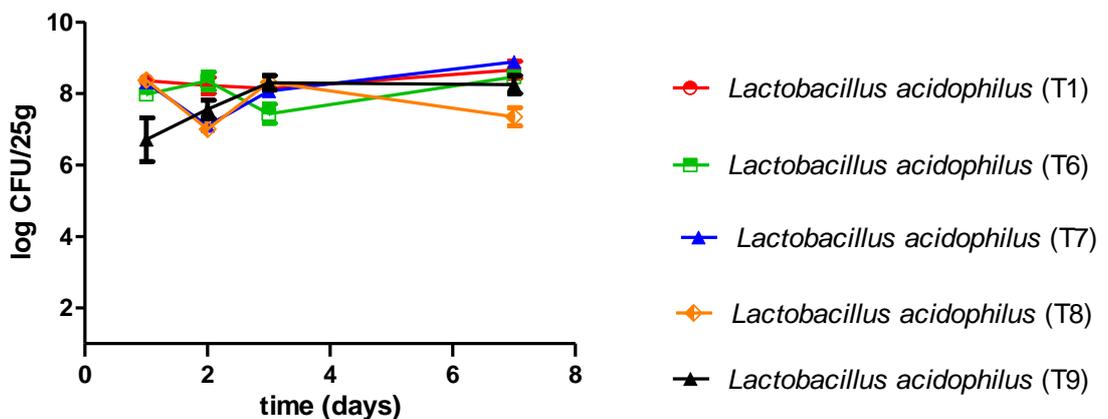


Figure 1: Changes in pH values of dairy desserts up to day 7.

In their study with probiotic dairy dessert (LA-05) with coconut flavor and assessment of the behavior of this strain in response to *Listeria monocytogenes*, FERNANDEZ et al. (2013) did not observe deterioration after 28 days of storage. However, it should be noted that the ingredients and pathogen used in the referred study are different from those in the present study. The pH values of the desserts ranged from 6.3 to 6.81 conferring low acidity to the culture (Figure 2). The pH values of the desserts are not characterized as a factor associated to the inhibition of pathogens, as demonstrated by several authors (PEREIRA & GÓMES, 2007; WENDLING & WESCHENFELDER, 2013) in studies with fermented milks.

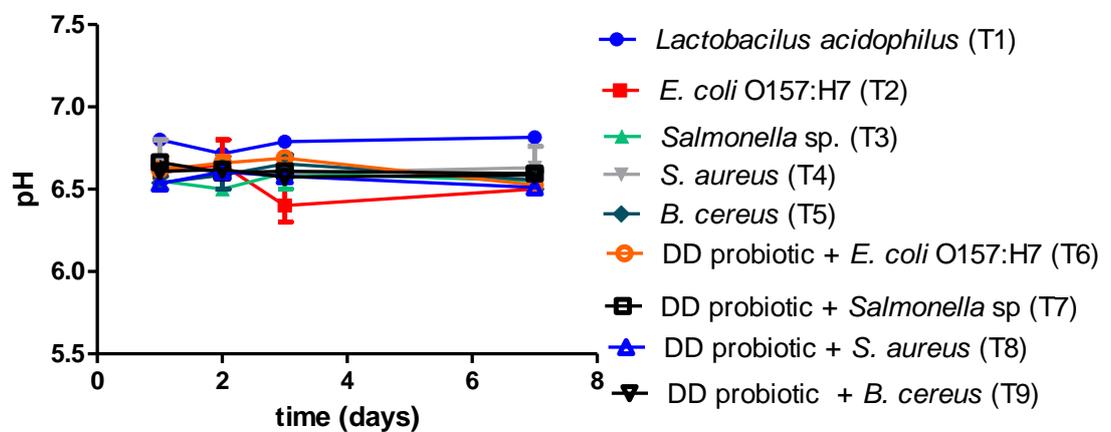


Figure 2: Changes in pH values of dairy desserts up to day 7

According to the counts of pathogens in dairy desserts with and without the addition of *L. acidophilus*, it can be seen that for all Gram negative pathogens, there was no significant difference at 24 hours of storage (Figures 3 and 4). Except for *E. coli* that showed no significant difference at the time 48 hours, there were significant differences ( $P < 0.05$ ) at all the other times between the pathogens in the presence or absence of the probiotic. Also, the difference in the behavior of *E. coli* at the last time assessed compared to *Salmonella spp* deserves mention: both showed reduction, but it was more significant for *E. coli* (Figure 3). This can be due to the differences between genera and other factors that deserve more in-depth studies.

In Gram positive pathogens, *Bacillus cereus* showed a significant difference at all the analyzed times. As for *S. aureus* only the time 48 hours showed a significant difference ( $P < 0.05$ ) between the pathogens in the presence of absence of the probiotic. Also, bacteriocins, active proteins produced by some microorganisms, can have antimicrobial action, as well as some lactic bacteria with bactericidal action (ZACHAROF & LOVITTB, 2012; YANG et al., 2012; PEREZ et al., 2014), and that also compete for nutrients. Some bacteriocins have already shown to be active against several microorganisms such as *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* and *S. aureus* (CLEVELAND et al., 2001).

In their experiment with a dessert with *L. acidophilus* La-05 and *Listeria innocua*, FERNANDES et al. (2008) demonstrated that the count of both strains increased at the end of the storage of the product. This can be caused by the mutual benefit between these microorganisms. It should be stressed that the probiotic strain may have benefited from metabolites released by *L. innocua*, such as peptides and aminoacids.

Brazilian legislation RDC 12/2001 (BRASIL 2001) that establishes the Microbiological Standards for Food Health, has the following parameters: *B. cereus*, Coliforms at 45°C, coagulase-positive staphylococci and *Salmonella sp.* for dairy desserts, which justifies the selection and importance of these microorganisms used in the present study. Of all the pathogens analyzed, only *E. coli* O157:H7, both in the non-probiotic and probiotic products, was reduced at the 7<sup>th</sup> day, though without significant differences between the treatments.

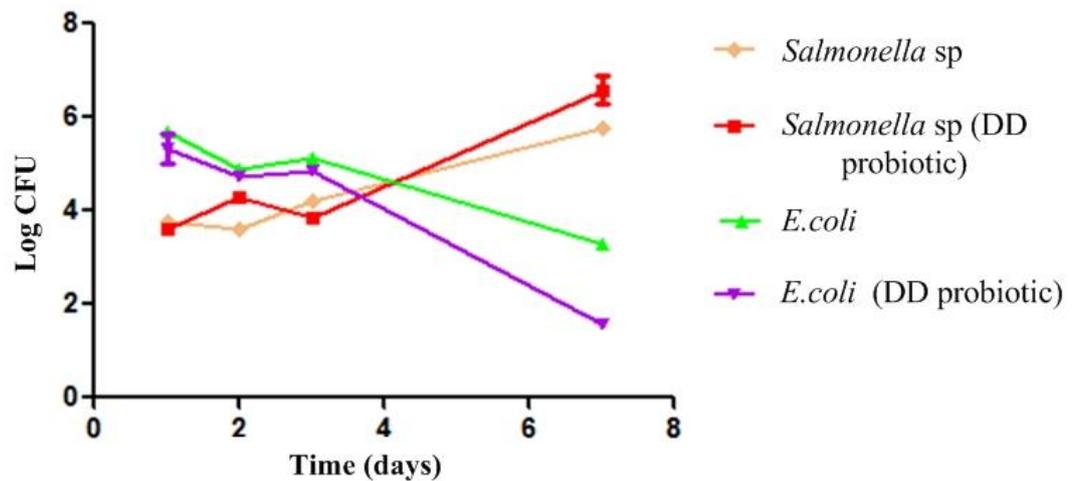


Figure 3. Microbial counts of Gram negative pathogens in dairy dessert (DD) and probiotic dairy dessert (probiotic DD)

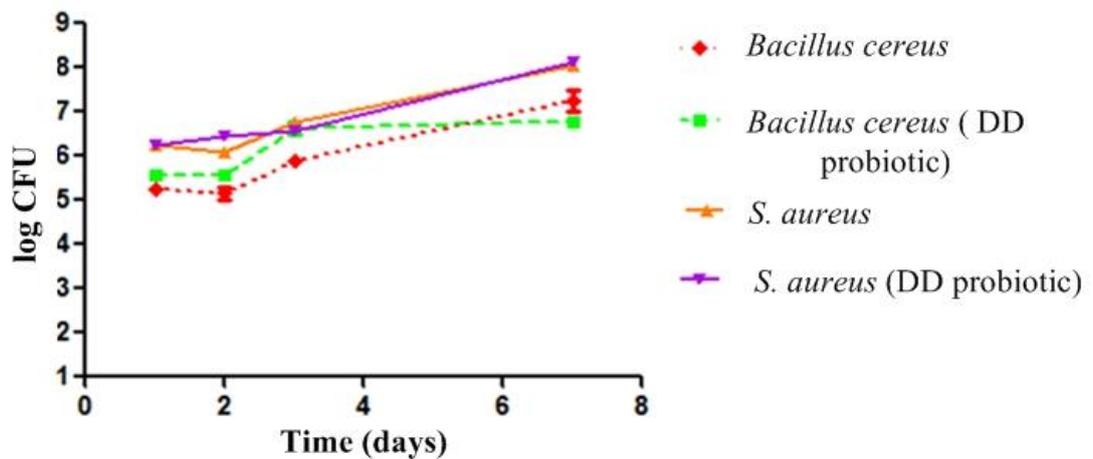


Figure 4. Microbial counts of Gram positive pathogens in dairy dessert (DD) and probiotic dairy dessert (probiotic DD)

## CONCLUSION

It is concluded that dairy chocolate dessert allows the development of probiotics and has great economic potential. However, it also allows the development of pathogens, with or without the presence of probiotics. Probiotic products developed reduced important foodborne pathogens but not up to safe levels. Therefore, we emphasize the importance of the use of quality tools in the development and monitoring of dairy desserts.

## REFERENCES

- ARAGON-ALEGRO, L.C. et al. Potentially probiotic and symbiotic chocolate mousse. **LWT-Food Science and Technology**, São Paulo, v.40, n.4, p.669-675, 2007. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364380600051X>. Accessed: Dec. 10, 2014. doi: 10.1016/j.lwt.2006.02.020.
- ANDREWS, H.W. et al. *Salmonella*. In: APHA (American Public Health Association). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: APHA, 2001. Cap.37, p.357-380.
- BENNETT, R.W.; BELAY, N. *Bacillus cereus*. In: APHA (American Public Health Association). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: APHA, 2001. Cap.32, p.311-316.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC, n.12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1. Available from: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC\\_12\\_2001.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES). Accessed: Apr. 05, 2015.
- BRASIL. Resolução RDC n.359, de 23 de dezembro de 2003. A Diretoria Colegiada da ANVISA/MS aprova o regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 dezembro de 2003. (251):28; Seção 1. Available from: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Publicacao+Alimentos/Rotulagem+de+Alimentos+2>. Accessed: Apr. 08, 2015.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.68, de 14 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial da União Brasília**, 14 de dezembro 2006, Seção 1, p.8. Available from: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17472>. Accessed: Apr. 05, 2015.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Alimentos. Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/ Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Atualizado em: julho de 2008. IX- Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Available from: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Accessed: Dec. 10, 2015.

BUTIRI, F.C.A. et al. Activity of passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*) pulps on *Lactobacillus acidophilus* in refrigerated mousses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.350-317, 2007. Available from: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822007000200025](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822007000200025)>. Accessed: Apr. 02, 2015. doi: 10.1590/S1517-83822007000200025.

CARDARELLI, H.R. et al. Effect of inulin and *Lactobacillus paracasei* on sensory and instrumental texture properties of functional chocolate mousse. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, p.1318-1324, 2008. Available from: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.3208>>. Accessed: Apr.15, 2015. doi: 10.1002/jsfa.3208.

CLEVELAND, J. et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food and Microbiology**, v.71, p.1-20, 2001. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160501005608>>. Accessed: Dec. 10, 2014. doi:10.1016/S0168-1605(01)00560-8.

CRUZ, A.G. et al. Probiotic yogurts manufactured with increased glucose oxidase levels: postacidification, proteolytic patterns, survival of probiotic microorganisms, production of organic acid and aroma compounds. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.5, p.2261-2269, 2012. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22541455>>. Acesso em: Apr. 10, 2015. doi:10.3168/jds.2011-4582.

EJTAHED, H.S. et al. Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.7, p.3288-3294, 2011.

Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21700013>>. Accessed: Apr. 01, 2015. doi: 10.3168/jds.2010-4128. 2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2002. 34p.

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**, v.34, p.331-335, 2013. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513002247>>. Accessed: Dec. 10, 2014. doi:10.1016/j.foodcont.2013.04.040.

GOMES, A.A. et al. Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.10, p.4777-4786, 2011. Available from: [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(11\)00499-1/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(11)00499-1/pdf). Accessed: Mar. 20, 2015. doi: 10.3168/jds.2011-4175.

KANMANI, P. et al. Probiotics and its functionally valuable products: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.53, n.6, p.641-658, 2013. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23627505>>. Accessed: Mar. 10, 2015. doi:0.1080/10408398.2011. 553752.

KARIMI, R. et al. Incorporation of *Lactobacillus casei* in Iranian ultrafiltered Feta cheese made by partial replacement of NaCl with KCl. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.8, p.4209-4222, 2012. Available from: <[http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(12\)00409-2/pdf](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(12)00409-2/pdf)>.

Accessed: Mar. 22, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2011-4872>

LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: APHA (American Public Health Association). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: APHA, 2001. V.4, p.387-403.

LOLLO, P.C.B. et al. Probiotic yogurt offers higher immune-protection than probiotic whey beverage. **Food Research International**, v.54, n.1, p.118-124, 2013. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399691300330X>>. Accessed: Apr. 06, 2015. doi:10.1016/j.foodres.2013.06.003.

MADUREIRA, A.R. et al. Incorporation of probiotic bacteria in whey cheese: decreasing the risk of microbial contamination. **Journal of Food Protection**, v.74, n.4, p.1194-1199, 2011. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21740724>>. Accessed: Apr. 16, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-217>.

MAGANHA, L.C. et al. Viability of probiotic bacteria in fermented skim milk produced with different levels of milk powder and sugar. **International Journal of Dairy Technology**, v.67, n.1, p.89-94, 2014. Available from: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1471-0307.12087>>. Accessed: Mar. 15, 2015. doi: 10.1111/1471-0307.12087.

MARSHALL, R.T. **Standard methods for examination of dairy products**. Washington: American Public Health Association, 1993. 546p.

NABAVI, S. et al. Effects of probiotic yogurt consumption on metabolic factors in individuals with nonalcoholic fatty liver disease. **Journal Dairy Science**, v.97, p.7386-7393, 2014.

NIKAEDO, P.H.L. et al. Caracterização tecnológica de sobremesas lácteas achocolatadas cremosas elaboradas com concentrado protéico de soro e misturas de gomas carragena e guar. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40, n.3, p.397-404, 2004. Available from: <<http://www.revistas.usp.br/rbcf/article/view/43991>>. Accessed: Dec. 10, 2014. doi: [10.1590/S1516-93322004000300016](http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322004000300016).

PEREZ, R.H. ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. **Microbial Cell Factories**, v.13, n.1, p.2-13, 2014. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4155820/>>. Accessed: Apr. 02, 2015. doi:10.1186/1475-2859-13-S1-S3.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R. et al. Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science and Technology**, v.13, n.1, p.3-11, 2002. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224402000201?np=y>>. Accessed: Dec. 15, 2014. doi: [10.1016/S0924-2244\(02\)00020-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00020-1).

RASTALL, R.A. et al. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. **FEMS Microbiology Ecology**, v.52, n.2, p.145-152, 2005. Available from:

- <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/j.femsec.2005.01.003/full>>. Accessed: Dec. 12, 2014. doi: 10.1016/j.femsec.2005.01.003.
- SILVA, A.S. et al. Viabilidade de *Lactobacillus casei* em flan de chocolate e sua sobrevivência em condições gastrintestinais simuladas. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.2, p.3163-3170, 2012. Available from: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/13672>>. Accessed: Dec. 21, 2014. doi: 10.5433/1679-0359.2012v33Supl2p3163.
- TÁRREGA, A.; COSTELL, E. Effect of inulin addition on rheological and sensory properties of fat-free starch-based dairy desserts. **International Dairy Journal**, v.16, n.9, p.1104-1112, 2006. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694605001810>. Accessed: Jan. 24, 2013. doi: 10.1016/j.idairyj.2005.09.002.
- VASCONCELOS, C.M. et al. Desenvolvimento e avaliação sensorial de sobremesa láctea potencialmente simbiótica. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.68, n.391, p.11-17, 2013. Available from: <<http://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/download/16/16>>. Accessed: Dec. 10, 2014. doi: [10.5935/2238-6416.20130015](http://dx.doi.org/10.5935/2238-6416.20130015).
- VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**, v.9, n.8, p.497,505, 1999. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095869469900120X>>. Accessed: Dec. 10, 2014. doi:[10.1016/S0958-6946\(99\)00120-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0958-6946(99)00120-X).
- WENDLING, L.K.; WESCHENFELDER, S. Probiotics and fermented dairy foods - a review. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.68, p.49-57, 2013. Available from: <<http://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/viewFile/50/56>>. Accessed: Dec. 15, 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.5935/2238-6416.20130048>.
- YANG, E. et al. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. **AMB Express**, v.2, p.48, 2012. Available from: <<http://www.amb-express.com/content/2/1/48>>. Accessed: Apr. 10, 2015. doi: 10.1186/2191-0855-2-48.
- ZACHAROF, M.P.; LOVITTB, R.W. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **APCBEE Procedia**, v.2, p.50-56, 2012. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212670812000814>. Accessed: Apr. 02, 2015. doi:[10.1016/j.apcbee.2012.06.010](http://dx.doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.010).

ZADIK P.M. et al. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. **Journal of Medical Microbiology**, v.39, n.2, p.155-158, 1993. Available from:

<[http://jmm.sgmjournals.org/content/39/2/155.abstract?ijkey=dc61d48776cdaab7734a4c11d33f260f007da8a7&keytype2=tf\\_ipsecsha](http://jmm.sgmjournals.org/content/39/2/155.abstract?ijkey=dc61d48776cdaab7734a4c11d33f260f007da8a7&keytype2=tf_ipsecsha)>. Accessed: Mar. 02, 2015.  
doi: 10.1099/00222615-39-2-155.

3.3 ARTIGO 3: *Lactobacillus casei*: PROBIOTIC MINAS FRESCAL CHEESE PRODUCTION, ACTION AGAINST *E. COLI* O157:H7 AND IN BIOFILM FORMATION (TRABALHO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA FOOD CONTROL EM 06/12/2015)

**Luciana Justo Beserra Rosa<sup>a</sup> Leticia de Paula Ferreira<sup>a</sup> Luciana Maria Ramires  
Esper<sup>b</sup> Robson Maia Franco<sup>a</sup> Marco Antonio Sloboda Cortez<sup>a,\*</sup>**

<sup>a</sup> Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Medicina Veterinária, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Rua Vital Brazil Filho 64, 24230340, Niterói, RJ, Brazil

<sup>b</sup> Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Farmácia, Departamento de Bromatologia, Rua Dr. Mário Viana 523, 24241-000, Niterói, RJ, Brazil

### **Abstract**

The present study reports the development of Minas cheese probiotic with addition of *Lactobacillus casei*, and the assessment of the viability of this strain, as well as its action against *Escherichia coli* O157: H7 during the storage period. Treatments were produced with and without interactions between *L. casei* and pathogenic bacteria. The products were stored at 8° C temperature and analyzed on 0, 1, 3, 5, 7, 15 and 20 days. The milk used in the preparation of the cheese was inoculated with 10<sup>9</sup> CFU.mL<sup>-1</sup> *L. casei*. The inoculated amount of *E. coli* O157:H7 in cheeses was 10<sup>3</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>. The samples inoculated with the pathogen only showed counting that ranged from 6.49 to 7.74 log (3.1x10<sup>6</sup> to 5.5x10<sup>4</sup> the CFU/g) increasing over time. In the samples with *L. casei*, pathogen count was 7.43 to 6.36 log (2.7x10<sup>7</sup> to 2.3 x 10<sup>6</sup> CFU/g) with a reduction of 1 log at the end of the storage time. Despite the referred reduction, the final concentration of the pathogen was not considered safe. The viability of *L. casei* remained to all treatments within the concentration required by Brazilian legislation for the product classified as functional food regarding probiotic characteristics. *L. casei* was able to grow and form biofilm on stainless steel surface, but regarding the interaction of *L. casei* supernatants, there was a reduction of pathogens, though caused by pH action. Therefore, it is concluded that *L. casei* used alone at the levels inoculated is not effective, but only as a complementary tool in food safety.

**Key words:** functional food, probiotics, cheese, *Lactobacillus casei*, biofilm, *E. coli*

\* Corresponding author. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Rua Vital Brazil Filho 64, 24230340, Niterói, RJ, Brazil  
E-mail address: macortez@vm.uff.br (M.A.S. Cortez).

## 1. Introduction

According to FAO's/WHO's (2002) reports, probiotics are defined as living microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer benefits to host health, through a positive action on the intestinal microbiota. (Ejtahed et al., 2011; Lollo et al., 2013; Nabavi et al., 2014).

Moreover, probiotics have possible mechanisms of action that produce a response to pathogens. This is justified by the competition for binding sites, forming a physical barrier to pathogens, competition with pathogens for nutrients, inactivation of toxins and receptors through the stimulation of phagocytosis and of specific and nonspecific immune responses against pathogens (Wendling & Weschenfelder, 2013). The capacity to produce antimicrobial factors is another possible characteristic of probiotic microorganisms. Bacteriocins, hydrogen peroxide, acetic acid and lactic acid are examples of these substances (Rastall et al., 2005). Puupponen-Pimiä et al. (2002) suggest that the use of probiotics in the diet reduces the proliferation of potentially harmful bacteria, enhancing natural defense mechanisms of the host.

The main probiotic foods are dairy products, especially yogurts and fermented milks (Ejtahed et al., 2011; Lollo et al., 2013; Kanmani et al., 2013; Nabavi et al., 2014). Cheeses are less frequently used as sources of probiotic products, e.g. Minas Frescal, Feta and curd cheeses, despite their advantages such as higher pH and fat, as well as firmness, providing a favorable environment for the survival of probiotic bacteria in the gastrointestinal tract (Gomes et al., 2011; Karimi et al., 2012; Buriti et al., 2005; Gomes et al., 2011; Karimi et al., 2012). Butiri et al., (2005) assessed the viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus paracasei* in Minas Frescal cheese and noticed that the probiotic strains maintained adequate concentrations during the 21 days of storage. Vinderola et al. (2000) prepared Argentinian probiotic fresh cheese using *B. bifidum*, *Bifidum* sp., *L. acidophilus* and *L. casei* in different combinations.

Minas Frescal is the third most widely produced cheese in Brazil. It is a fresh cheese with humidity over 55% (Simeão et al., 2013). Due to its very high moisture and prolonged storage, this cheese is susceptible to contamination by important food pathogens, which was detected in studies with samples of Minas Frescal cheese (Araújo et al., 2002; Gonzalez et al., 2000).

One concern in products of animal origin is Shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) O157:H7, which is associated to a wide spectrum of manifestations such as unapparent infection, mild diarrhea, hemorrhagic colitis (HC) and hemolytic uremic syndrome (HUS) (Griffin, 1998; Keusch et al., 1998). In addition to HUS, more common in children, STEC was also associated to thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), common in adults, as well as hemolysis, thrombocytopenia, kidney failure, neurological problems and fluctuating fever (Keusch et al., 1998).

According to Frozi et al. (2015), the processing of Minas Frescal Cheese does not eliminate STEC O157:H7, and detection of viable cells at all stages of processing and at final product is possible. Some researchers detected *E. coli* O157:H7 in samples of raw milk and cheeses (Padhye, Doyle, 1991; WHO, 1998). It has been observed that several STEC serotypes can adhere, colonize, form biofilm in many different contact surfaces of abiotic materials used in food processing plants (Wang et al., 2012), and, thus, constitute a major source of environmental contamination.

The present study aimed to develop probiotic Minas Frescal Cheese with addition of *Lactobacillus casei*, and assess the viability of this strain as well as competition in response to *Escherichia coli* O157:H7 and on their biofilm.

## **2. Material and methods**

### *2.1 Lactobacillus casei viability during Minas Frescal cheese storage and action against E. coli O157:H7*

Activation of lactic culture (*Lactobacillus casei*, BGP93, SACCO®) was performed according to the methodology described by Gaino et al. (2012), with adaptations. The culture was aseptically diluted at the concentration recommended by the manufacturer: 1 envelope with 5 doses diluted in 1L of reconstituted skimmed milk (Molico®), 10 % (m/v) and sterilized at 115°C/10 minutes. Subsequently, 50 mL of milk with the culture was incubated at 37°C for 4 hours. Agar MRS + 0.15% bile (m/v) count using the pour plate technique (incubation at 37°C for 72 horas) was

performed before inoculation in pasteurized milk for the production of the cheeses, in order to make sure the desired concentration was obtained (Vinderola; Reinheimer, 1999). An inoculum count of  $1.3 \times 10^{11}$  UFC.mL<sup>-1</sup> was obtained. After confirmation of the concentration of the strain of *L. casei* in MRS medium with 0.15% of bile, the milk samples were inoculated. Then, 50 mL of reconstituted skimmed milk (RSM) was mixed with *L. casei* in 2 L of pasteurized milk, resulting in a concentration of  $10^9$  UFC/mL. The remaining RSM with probiotic was frozen.

The pathogenic strain used in this study was *E. coli* O157:H7, isolated from bovine in the state of Rio de Janeiro, which belonged to the collection of pathogenic *E. coli* of *laboratório de Higiene e Controle Microbiológico da Alimentos* (Gonzalez, 2003). The identification of this microorganism was confirmed by morphological and molecular tests (Gonzales, 2003). The pathogenic strain was added to the pasteurized milk used as raw material of the cheese, and a final concentration of  $10^3$  UFC/mL was obtained in the total volume of 2 liters. For the preparation of the cheese, the milk was heated to 30-35°C and then, *L. casei* and *E. coli* O157:H7 were added. Then, 200 ppm of CaCl<sub>2</sub> and 0.0625 g.L<sup>-1</sup> of rennet Halamix were added (Chr. Hansen A/S, Horsholm, Denmark). The temperature was maintained at 35°C, and the coagulation process lasted for approximately 40 min. The curd was cut and stirred for 15 minutes and then placed into Minas cheese form. The cheeses are immersed in brine with a concentration of 20% during 30 minutes (Furtado, 2005). Then, the cheeses were stored at 8°C for up to 20 days.

The raw material was subjected to analyzes for assessment of the physical and chemical properties and the presence of adulteration (Brasil, 2011) and the non-inoculated cheeses were analyzed for pH, acidity and dried extracts (GES) (Brasil, 1996).

Pathogen count in the milk was performed according to the recommendations: Aerobic Mesophilic Heterotrophic Bacteria, *Salmonella* sp, Coagulase-positive staphylococci, total and thermotolerant coliforms and *Listeria* spp (Brasil, 2001; Brasil, 2011). *L. casei* count in milk was also performed (Vinderola; Reinheimer, 1999), as well as *E. coli* O157:H7 count (Zadik et al., 1997), in order to ensure the nonexistence of the pathogen in the raw material.

Treatments with and without interactions between *L. casei* and pathogenic bacteria were produced. The cheeses were kept at 8°C and analyzed for recovery of viable cells of *E. coli* O157:H7 (Zadik et al., 1997), *L. casei* (Vinderola; Reinheimer,

1999), and count of Aerobic Mesophilic Heterotrophic Bacteria (Cousin et al., 2001) at times 0, 1, 3, 5, 7, 15 and 20 days after processing was also performed. After count and isolation of *E. coli* of the inoculated cheeses, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) of Shiga-toxin producing genes was performed (*stx1* e *stx2*) (Gonzalez, 2003).

## 2.2 Biofilm formation

Biofilm formation ability was tested on AIS 304 stainless steel coupons (#4). For this, 1.0 cm x 1.0 cm coupons were used (Esper, 2010). *L. casei* and *E. coli* O157:H7 strains were activated for two consecutive days in MRS (Main Rogosa Sharpe) and *BHI* broth, respectively, and incubated aerobically at 37°C for 24 hours. *L. casei* was centrifuged for 5 minutes at 3500 r.p.m. at 4°C in Eppendorf® centrifuge, model no 5403. The supernatants were filtered in 0.22 µm (TPP) for sterile Falcon tube. Subsequently, the pH of the filtrate was adjusted to 6.0 with NaOH 1N for treatment with adjusted pH (Ennahar et al., 1998). The following treatments were conducted in the present study: T1) 4.5mL *BHI* (*Brain Heart Infusion*) + 4.5 mL supernatant *L. casei* + coupon + 1 mL inoculum O157:H7; T2) 9 mL *BHI* + coupon + 1 mL inoculum O157:H7; T3) 4,5mL *BHI* + 4.5 mL supernatant *L. casei* pH adjusted + coupon + 1 mL inoculum O157:H7.

Each sterile stainless steel coupon was immersed in a tube containing 10 mL of *BHI* broth with cell suspension STEC ( $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>). In all the experiments, the plates were checked for cell growth. The coupons were incubated at a temperature of 37 °C for 24 hours. The coupons were removed through the *BHI* culture medium using sterile pincers and were immersed in 10 mL of *Phosphate Buffer Salt* (PBS), for 1 minute, for the removal of planktonic cells. Then, they were introduced in tubes containing 5 mL of PBS and stirred in vortex, during 2 minutes, for removal of sessile cells (Parizzi et al., 2004). Appropriate serial dilutions were transferred to be plated on the surface of Petri dishes containing EMB (Difco®) and incubated at 37 °C for 24 hours to determine the number of UFC/cm<sup>2</sup> adhered to each coupon.

## 2.3 Statistical analyzes

For all the experiments, base 10 logarithms were used for normal distribution of the data obtained with the counts. Three independent experiments were performed in duplicate, and statistical treatment was obtained by analysis of variance (ANOVA) in entirely randomized design, with significance level of 5% (P<0.05). Tukey's

multiple comparison tests were used for mean comparison, through the software Prism 5.01 GraphPad (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

### 3. Results and discussion

#### 3.1 Microbiological and physical and chemical characteristics

Based on the microbiological, physical and chemical results of the milk, the raw material was considered in accordance to the current legislation, being suitable for the making of cheeses (Brasil, 2011). There was no presence of *E. coli* O157:H7 in the milk samples, indicating that the numbering used in the experiment was not related to the raw material used. During the assessed times (0, 1, 3, 5, 7, 15 and 20 days) the count of Aerobic Mesophilic Heterotrophic Bacteria in the cheeses ranged from  $3.4 \times 10^4$  to  $5.3 \times 10^7$  UFC.g<sup>-1</sup>.

The control milk and cheeses met the standards of the current legislation (Brasil, 1996; Brasil, 2001), and were assessed as semi-fat cheeses with very high humidity. The physical and chemical characteristics of the cheeses were 60% humidity, dried extract 31.6%, pH 6.7 and acidity 0.11g/100g, results similar to those obtained by Lima et al., (2015).

#### 3.2 Viability of *Lactobacillus casei* during the storage of Minas Frescal cheese and action against *E. coli* O157:H7

At the end of the production, the counts of *E. coli* of cheeses without this strain ranged from  $5 \times 10^8$  UFC/g to  $6.8 \times 10^7$  UFC/g (Figure 1). In Brazil, the legislation recommends a minimum viable amount of probiotics is  $10^8$  to  $10^9$  UFC per daily portion of the product, and the cells must be viable during the entire period of product storage (Brasil, 2008).

According to Brasil (2003), the daily recommendation of this product is 50 grams. Thus, the cheeses produced were considered probiotic, demonstrating that it is possible to prepare probiotic Minas Frescal cheese with *L. casei*, adding value to a highly consumed product.

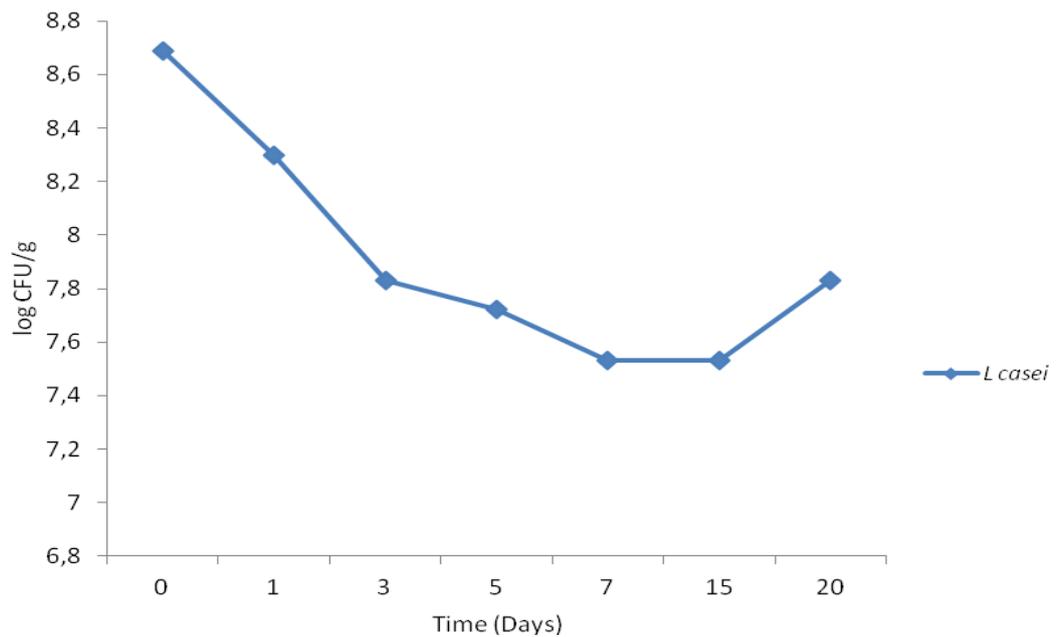


Figure 1. Count of *L. casei* in Minas Frescal cheese without *E. coli* during the storage period.

Studies on the viability of probiotic bacteria such as *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *B. bifidum* and *Bifidum* sp. in Minas Frescal cheese show evidence of the importance of this product in this market segment (Butiri et al., (2005). In the present study, decrease of 1 log unit in the count of *L. casei* is noticed, although the product is considered probiotic. The joint addition of BAL favors the viability of these microorganisms, and in this study there was only the addition of *L. casei*. Vinderola et al. (2000) reported that combinations of bifidobacteria and *L. casei* cultures showed a satisfactory survival rate of strains in Argentinean fresh cheese, without decrease in the count of *L. casei* during the period of 0, 30 and 60 days of storage.

The activity of the probiotic on the pathogen led to decrease of 1 log unit compared to the activity of the same product without probiotic addition (Figures 2 and 3).

Peng, Reichmann, Biswas (2015), observed in culture medium that mixed culture of *L. casei* with the pathogens EHEC EDL933, *S. Typhimurium* LT2, and *L. monocytogenes* LM2, showed that *L. casei* could competitively exclude or inhibit the growth of these pathogens within 48h. We stress that different results can be obtained with this food matrix, as it was the case of our experiments that also showed reduction but not elimination of the pathogens.

Alves (2010) observed that the addition of microorganism *Lactobacillus acidophilus* to Minas Frescal cheese (MFC) increased food safety by inhibiting the growth of *E. coli* with reduction of 3 log units. Some authors noticed the inhibition of O157:H7 in MFC where *Lactobacillus acidophilus* were able to produce antimicrobial compounds (Chioda et al., 2007). A study with oral administration of *L. casei* shiyuowed the antagonism of this strain in the presence of f O157:H7 (Ogawa et al., 2001).

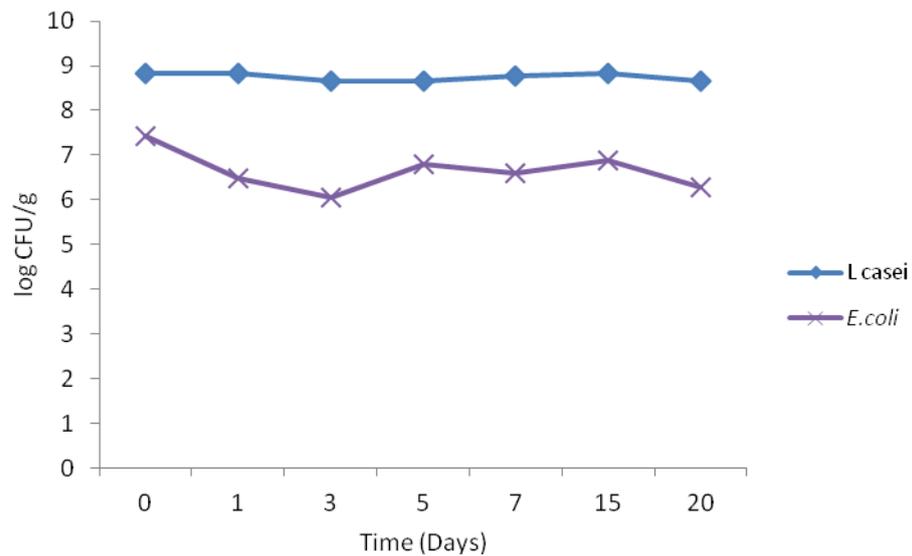


Figure 2. Counts of *L. casei* and *E. coli* O157:H7 in Minas Frescal cheese during the storage period.

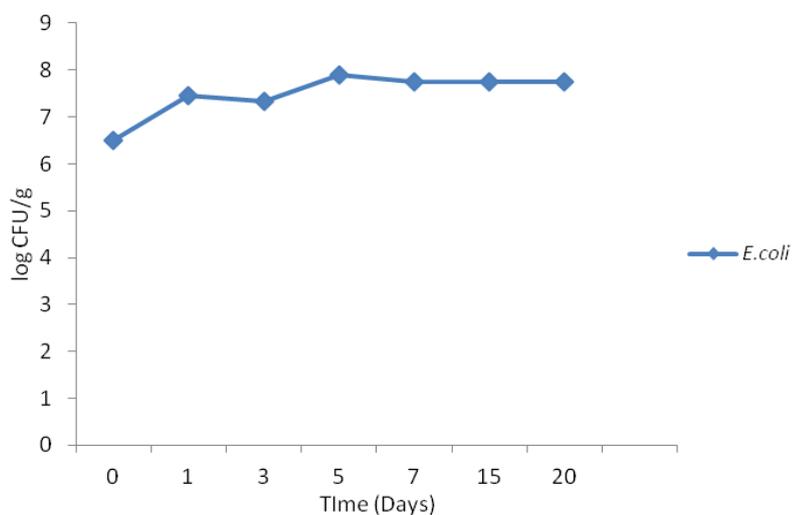


Figure 3. Count of *E. coli* o157:H7 in Minas Frescal cheese during the storage period.

The production of bacteriocins by the BAL is another relevant factor regarding the inhibition of pathogenic microorganisms. Research with bacteriocin food-grade pediocin-producing lactococcal strains, used as adjuncts to the starter culture, reduced *L. innocua* counts in a cheese model system and *L. monocytogenes*, *S. aureus*, and *E. coli* O157:H7 in cheese (Rodriguez et al., 2005).

In the assessment of antimicrobial and technological characteristics of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, *Lactobacillus plantarum* ALC 01 or *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in the presence of *Listeria monocytogenes* Scott A, *Staphylococcus aureus* ATCC 27154 and *Bacillus cereus* K1-B041 in Minas Frescal cheese during 21 days, Nascimento (2007) concluded that there was no significant difference between the three bacteriocinogenic cultures and lactic yeast regarding the antimicrobial activity on *L. monocytogenes* Scott A and *S. aureus* ATCC 27154. However, *B. cereus* K1-B041 showed susceptibility to *Lb. plantarum* ALC 01 and *E. faecium* FAIR-E 198, from the 7<sup>th</sup> day of storage. Besides, no bacteriocin activity was detected in the cheeses during 21 days.

In addition to the possible bacteriocin activity, pH changes affect the cheeses, with a significant difference between probiotic cheese with and without *E. coli*. The minimum pH value of the probiotic cheese occurred on day 20 (6.38), and the pH value of probiotic cheese with *E. coli* on day 20 was 5.02.

### 3.3 Biofilm formation by *E. coli* O 157:H7

In order to assess the possible influence of pH and/or bacteriocin, experiments with supernatants of *L. casei* and formation of microbial biofilms, important source of chronic contamination in the dairy industry, were conducted. Figure 1 shows the behavior of biofilm of *E. coli* O 157:H7 with the addition of *L. casei* under different conditions. The results demonstrate that decrease in *E. coli* occurred only in supernatant of non-adjusted *L. casei*, i.e. under the influence of low pH, which provides a barrier to the growth of the microorganism. In the supernatant with ideal pH value for the development of the microorganism there was no microbial reduction, suggesting that there was no production of bacteriocins. According to Zacharof, Lovitt (2012), Müller, Radler (1993); Rammelsberg, Müller, Radler (1990). *L. casei* can produce bacteriocins Caseicin 80 and Lactocin 705, but tests with biofilms in the present study (Figure 4) showed that reduction of O157:H7 occurred only when the supernatant of *L. casei* had a pH level of 4.0, that is, not neutralized to a pH of 6.0,

indicating that the decrease was caused by the lower pH value and not by the action of possible bacteriocins. Conner, Kotrola (1995) demonstrated that *E. coli* O157:H7 did not grow at 37°C in media at pH 4.0 using lactic acid, only with tartaric acid, which would be enough to justify the non-growth observed in this study.

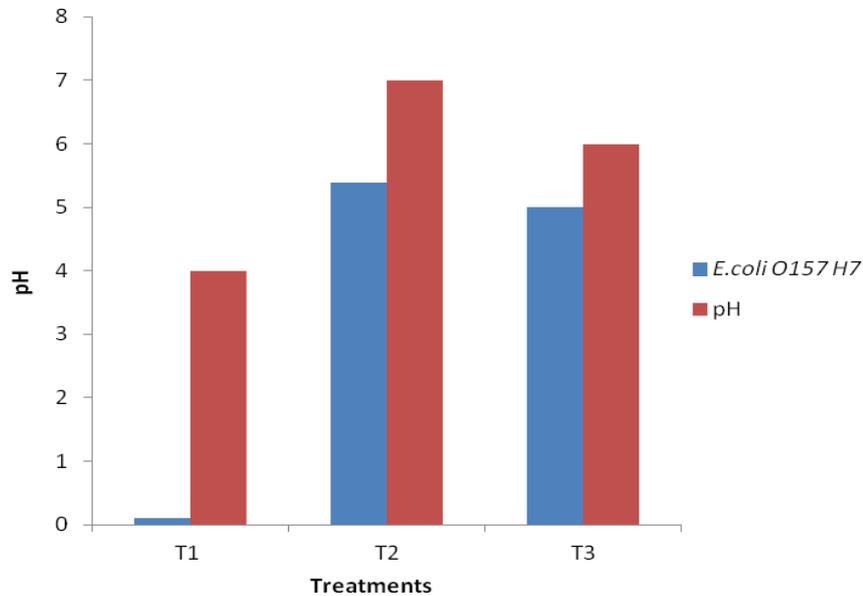


Figure 4. biofilm formation by *E. coli* O157:H7 with the addition of *L. casei* under different conditions: T1) 4.5mL *BHI* + 4.5 mL supernatant *L. casei* + coupon + 1 mL inoculum O157:H7; T2) 9 mL *BHI* + coupon + 1 mL inoculum O157:H7; T3) 4.5mL *BHI* + 4.5 mL supernatant *L. casei* adjusted pH + coupon + 1 mL inoculum O157:H7.

#### 4. Conclusion

It is concluded that preparation of probiotic Minas Frescal cheese is possible with the addition of *L. casei*.

Regarding food safety, there was no significant reduction of *E. coli* O157:H7 in the product prepared. Also, it has been demonstrated that this microorganism is able to grow and form biofilm on stainless steel surface. However, reduction of pathogens was observed after interaction of *L. casei* supernatants, though this was caused by reduction in pH value.

The use of probiotic alone in the preparation of the product is not entirely effective. It is a complementary tool in food safety.

**Acknowledgments**

The authors acknowledge the financial support from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília, Brazil).

## References

- Alves, C.C.C. (2010). Comportamento de *Escherichia coli* em queijo Minas Frescal elaborado com utilização de *Lactobacillus acidophilus* e acidificação direta com ácido láctico. Dissertação de Mestrado. UFF.
- Araujo, V. S., Pagliares, V. A., Queiroz, M. L., & Freitas-Almeida, A.C. (2002). Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese comercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 1172-77.
- Brasil. Portaria n° 146, de 07 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Queijos. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 11 mar. 1996.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC, n.12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, Seção 1.
- Brasil. Resolução RDC n.359, de 23 de dezembro de 2003. A Diretoria Colegiada da ANVISA/MS aprova o regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. *Diário Oficial da União*, Brasília, 26 dezembro de 2003. (251):28; Seção 1.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos. Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/ Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Atualizado em: julho de 2008. IX- Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n°. 62, de 29 de Dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 dez. 2011. Seção 1.
- Butiri, F.C.A.; Rocha, J.S.; Assis, E.G.; & Saad, S.M.I. (2005a). Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the adidditon of *Lactobacillus paracasei*. *Lebensmittel Wissenschaft and Technologie*, 38(2),173-180.
- Butiri, F.C.A.; Rocha, J.S.; & Saad, S.M.I. (2005b). Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensotial properties during storage. *International Dairy Journal*, 15, 1279-1288.
- Chioda, Tammy Priscilla et al. (2007). Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo "Minas Frescal" por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciência Rural*, Santa Maria , 37 (2), 583-585.

Conner, D., E.; Kotrola, J., S. (1995). Growth and Survival of *Escherichia coli* O157:H7 under Acidic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1), 382–385.

Cousin, M.A. et al. (2001). Psychrotrophic microorganisms. In: APHA (American Public Health Association). *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (pp.159-166). 4.ed. Washington, 13.

Ennahar, S., Aoude-werner, D., Assobhei, O., & Hasselmann, C. (1998). Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 521 – 526.

Esper, L. M. R. (2010). *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) e *Bacillus cereus*: Quorum Sensing, Formação de Biofilme e Ação de Sanitizantes. 125 f. Tese (Doutorado em tecnologia de alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

Ejtahed et al. (2011). Effect of probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* on lipid profile in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Dairy Science*, 94(7), 3288-3294.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. (2001). Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 34p.

Furtado, M.M. (2005). Principais problemas dos queijos: causas e prevenção. São Paulo. Fonte Comunicações e Editora. 200 p.

Frozi, J.B. et al (2015). Survival of Shiga toxin-producing *Escherichiacoli* O157:H7 in Minas frescal cheese. *Food Science and Technology*, 35(1), 108-114.

Gomes, A. A., et al. (2011). Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses. *Journal of Dairy Science*, 94(10), 4777-4786.

Gaino, V.O. et al. (2012). Requeijão cremoso probiótico: avaliação da viabilidade de *Lactobacillus casei*, da composição físico-química e aceitação sensorial. *Semina: Ciências Agrárias*, 22 (2), 3133-3142.

Gonzalez, A. G. M., Rosa, A. C. P., Andrade, J. R. C.; & Tibana A. (2000). Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* strains isolated from soft white cheese and poultry in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Food Microbiology*, 17, 321-28.

Gonzalez, A.G.M. (2003). Características fenotípicas e genotípicas de cepas de *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) isoladas de bovinos no Estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado, Pós-Graduação em Microbiologia, IMPPG-UFRJ, Rio de Janeiro.

Griffin, P. M. (1998). Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in humans in the United States. In KAPER, J.B. & O'BRIEN, A.D. (Eds.),

*Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. p.15-22., ASM Press, Washington D.C.

Kanmani, P. et al. (2013). Probiotics and its functionally valuable products: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(6),641-658.

Karimi, R.; Mortazavian, A.M.; & Cruz, A.G. (2011). Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. *Dairy Science and Technology*, 91, 283-308.

Keusch, G. T.; Acheson, D. W. K.; Marchant, C. & Mciver, J. (1998). Toxoidbased active and passive immunization to prevent and/or modulate hemolytic uremic syndrome due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. In Kaper, J. B. & O'brien, A. D. (Eds.), *Escherichia coli* O157-H7 and other Shiga Toxin-Producing *E. coli* strains, ASM Press, (pp. 409-418). Washington, D.C.

Lima, P. G. de; et al. (2015). Viabilidade de *Escherichia coli* O153:H25, O113:H21 e O111:H8 (STEC não-O157) produtoras de toxina *Shiga* em queijo Minas Frescal. *Ciencia Rural*, 45 (1),52-57.

Lollo, P.C.B. et al. (2013). Probiotic yogurt offers higher immune-protection than probiotic whey beverage. *Food Research International*. 54 (1),118–124.

Müller, E.; & Radler, F. Caseicin, a Bacteriocin from *Lactobacillus casei*. (1993). *Folia Microbiol.* 38 (6), 441-446.

Nabavi et al. (2014). Effects of probiotic yogurt consumption on metabolic factors in individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Dairy Science*, 97,7386–7393.

Nascimento, M.S. (2007). Caracterização da atividade antimicrobiana e tecnológica de três culturas bacteriocinogênicas e avaliação de sua eficiência no controle de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* em queijo Minas frescal. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Unicamp.

Rammelsberg, M; Müller, E.; & Radler, F. (1990). Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Archives of Microbiology*, 154 (3), 249-252.

Rastall, R. A. et al. (2005). Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiology Ecology*, 52 (2),145-152.

Padhye, N.V.; & Doyle, M.P. (1991). Rapid procedure of detection enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Applied and Environmental Microbiology*, 57:2693-2698.

- Parizzi, S. Q. F. et al. (2004). Bacterial Adherence to Different Inert Surfaces Evaluated by Epifluorescence Microscopy and Plate Count Method. *Journal Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47,77-83.
- Peng, M.; Reichmann, G.; & Biswas, D. (2015). *Lactobacillus casei* and its byproducts alter the virulence factors of foodborne bacterial pathogens *Journal of Functional Foods*, 15. 418–428.
- Rodriguez, E., et al. (2005). Antimicrobial activity of pediocin- producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *International Dairy Journal*, 15 (1),51–57.
- Simeão, M. et al. (2013). Aplicação de ferramentas de qualidade e de controle de processo em pequenas indústrias de queijo Minas Frescal da região de Viçosa. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
- Vinderola, C.G.; & Reinheimer, J.A. (1999). Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. *International Dairy Journal*, 9 (8),497-505.
- Vinderola, C.G., Prosello, W., Ghiberto, D., & Reinheimer, J.A. (2000). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. *Journal of Dairy Science*,83,1905-1911.
- Wendling, L. K.; Weschenfelder, S. (2013). Probiotics and fermented dairy foods - a review. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 68, 49-57.
- Puupponen-pimiä, R. et al. (2002). Development of functional ingredients for gut health. *Trends in Food Science and Technology*,13 (1),3-11.
- Wang, R. et al. (2012). Biofilm Formation by Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* O157:H7 and Non-O157 Strains and Their Tolerance to Sanitizers Commonly Used in the Food Processing Environment. *Journal of Food Protection*, 75(8),1418-28.
- WHO Scientific Working Group Meeting. (1998). World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Zacharof, M. P. Lovitt, R., W. Bacteriocins. (2012). Produced by Lactic Acid Bacteria A Review Article *APCBEE Procedia*, 2, 50 – 56.
- Zadik, P.M., Chapman, P.A., Siddons, C.A. (1993). Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Journal of Medical Microbiology*, 39 (2), 155-158.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conformidade com os resultados obtidos e os objetivos estabelecidos para esta investigação, pode-se concluir que:

- Tanto o *Bifidobacterium bifidum*, quanto a cultura mista utilizada na produção de iogurtes, exerceram atividades antagonistas frente a patógenos *in vitro* e esta ação foi diretamente correlacionada à produção de ácidos orgânicos e consequente diminuição do pH do meio;
- A sobremesa láctea com *L. acidophilus* manteve-se como produto probiótico segundo a Legislação Brasileira, por todo o período analisado;
- O desenvolvimento de patógenos na sobremesa láctea com ou sem a presença de probiótico não foi significativamente afetado, portanto não conferiu inocuidade ao produto;
- O queijo Minas Frescal foi considerado um produto probiótico, com a utilização de *L. casei*;
- Em relação à inocuidade, não houve redução significativa de *E. coli* O157:H7 no queijo elaborado, havendo a necessidade de aplicação de ferramentas de qualidade em todo o processo produtivo;
- Demonstrou-se que *E. coli* O157:H7 é capaz de crescer e formar biofilme na superfície de aço inox. Ao testar o sobrenadante de *L. casei* em biofilmes de *E. coli* O157:H7, verificou-se que a ação sobre o patógeno foi devido ao baixo pH e não pela produção de possíveis metabólitos antimicrobianos;
- O uso de microrganismos probióticos propicia o desenvolvimento de novos produtos, agregando valor comercial e benefícios à saúde do consumidor. Porém, para garantir a inocuidade dos produtos, é essencial a utilização de ferramentas de qualidade em todo processo produtivo, desde a obtenção da matéria prima.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. *Food Microbiology*. 3 ed. Cambridge: Royal Society Chemistry, 477 p. 2008.

AKSU, T; BAYTOK, E; BOLAT, D. Effects of a bacterial silage inoculant on corn silage fermentation and nutrient digestibility. *Small Ruminant Research*, v. 55, p. 249-252, 2004.

ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microorganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 54, n.4, jul/ago. 2002.

ALMEIDA, P.F.; ALMEIDA, R.C.C.; RODRICK, G.E. *Listeria monocytogenes*: Importância e distribuição nos alimentos. *Revista Higiene Alimentar*, v.13,n.61,p.23,1999.

ANDRADE, N.J.; BRIDEGMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. *Journal of Food Protection*, v. 61, p.833-838, 1998.

ANJO, D.F.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *Jornal Vascular Brasileiro*, v.3, n.2, p.145-54, 2004.

ARAGON-ALEGRO, L.C.; ALEGRO, H.R.; CHIU, M.C.; SAAD, S.M.I. Potentially probiotic and symbiotic chocolate mousse. *LWT-Food Science and Technology*, São Paulo, v.40, n.4, p.669-675, 2007.

AUSTIN, J.W., BERGERSON, G. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. *Journal Dairy Research* , v.62, p.509-519, 1995.

AXELSSON, L. *Lactic acid bacteria*: classification and physiology. In: S. Salminen von Wright A, Ouwehand A, editors. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Third Edition, Revised and Expanded ed. New York: Marcel Dekker, Inc./CRC Press. pp. 1–66, 2004.

BAGCHI D (ed). (2008). *Neutraceutical and Functional Food Regulations*. Elsevier: New York.

BARRANTES, X.; RAILEY, D.; ARIAS, M.L.; CHAVES, C. Evaluación del efecto de cultivos probióticos adicionados a yogurt comercial, sobre poblaciones conocidas de *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, Caracas, v.54, n.3, 2004.

BENNETT, R.W.; BELAY, N. *Bacillus cereus*. In: APHA (American Public Health Association). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4.ed. Washington: APHA, 2001. Cap.32, p.311-316.

BERGAMINI, C. V., HYNES, E.R.; QUIBERONI, A.; SUÉREZ, V.B.; ZALAZA, C.A. Probiotic bacterias as adjunct starters: influence of the addition methodology on their survival in a semi-hard Argentinean cheese. *Food Research International*, Amsterdam, v. 38, p. 597-604, 2005.

BEUTIN, L.; GEIER, D.; STEINRUCK, H.; ZIMMERMANN, S.; SCHEURTZ, F. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of health domestical animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 31:2483-2488, 1993.

BISCOLA, F. T. Pesquisa da formação de biofilme em amostras de *Escherichia coli* produtoras de toxina shiga. 2009. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 2009.

BORGES, V.C. Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos. In: WAITZBERG D.L. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. 3.ed. São Paulo: Atheneu, p.1495-509, 2000.

BOULOS, M.E.M.S. Segurança alimentar: uma preocupação – questão de atualizar e viabilizar informação. *Nutrição em Pauta*. 1999, 23p.

BOWER, C.K.; PARKER, J.E.; HIGGINS, A.Z.; OEST, M.E.; WILSON, J.T.; VALENTINE, B.A.; BOTHWELL, M.K.; McGUIRE, J. Proteion antimicrobial barriers to bacterial adhesion: in vitro and in vivo evaluation of nisin-treated implantable materials. *Colloids and Surfaces*, v.25, p.81-90, 2002.

BRANDÃO, W.A.P.L.N.T.M. *Elaboração de Bebida Fermentada Simbiótica de Soro Lácteo*. Florianópolis. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis - SC. 2007.

BRASIL. Ministério da saúde. *Guia Alimentar para a População Brasileira*. Secretaria de Atenção à Saúde, Brasília, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. IX – Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Brasília, 2008. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista.htm). Acesso em 03 dez. 2015.

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*, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de

Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 1999a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Portaria nº19, de 30 de abril de 1999. Regulamento técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 03 de maio de 1999b.

BRITO, I. P.; FARO, Z. P. Bifidobactérias: uma forte tendência de uso como probióticos. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v.18, n.120, maio, 2004.

BRUL, S; COOTE, P. Review: Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, v. 50, p. 1 –17, 1999.

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

BUZBY, J.C.; ROBERTS, T. The economic costs of enteric infections: human foodborne disease costs. *Gastroenterology*, v.136, n.6, p.1851-62, 2009.

CANDORI, M.; ALMEIRA, I,A,Z,C,; PERESI, T.M.; ALVES, E.C. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. *BEPA*, v.10, n.110, p.4-20, 2013.

CARIDI, A. Identification and first characterization of lactic acid bacteria isolated from de artisanal ovine cheese Pecorino del Poro. *International Journal of Dairy Technology*,v. 56, 105-110, 2003.

CARDARELLI, H.R., ARAGON-ALEGRO, L.C., ALEGRO, J.H.A., DE CASTRO, I.A., SAAD, S.M.I. Effect of inulin and *Lactobacillus paracasei* on sensory and instrumental texture properties of functional chocolate mousse. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 88, p.1318-1324, 2008.

CARLI, E.M. Utilização de *Lactobacillus paracasei* como probiotico para o controle de *Salmonella* spp em frangos de corte. Dissertação de mestrado, Santa Maria, RS, 2006.

CARMO, S. L.; DIAS, R. S.; LINARDI, R. V.; SENA, M.J.; SANTOS, A.D.; FARIA, M. E. ;PENA, E. C.; JETT, M. HENEINE, G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas Cheese and raw milk in Brasil. *Food microbiology*. n.19, p.9-14, 2002.

CHIUEH, L.F.; LIU, F.; SHIH, D.Y. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in feed and raw milk of domestic cattle and sheep. *Journal of Food Drug Analysis*, 10:39-46. 2002.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Institute of Food Technologists*, v.2, p.22-32, 2003.

CHYE, F.Y. et al. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. *Food Microbiology*, v.21, n.5, p.535-541, 2004.

CHIODA, T.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; GARCIA, G.R.; PIGATTO, C.P.; RIBEIRO, C.A.M.; RAGAZZANI, A.V.F.. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciência Rural*, Universidade Federal de Santa Maria, v.37, n.2, p.583-585, mar-abr. 2007.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier, v.71, p.1-20, dec. 2001.

CONDON, S. Responses of Lactic Acid Bacteria to Oxygen. *FEMS Microbiol.* v. 46 p. 269-280, 1987.

COPPOLA, M.M.; GIL-TURNES, C. Probióticos e Resposta Imune. *Ciência Rural*, Universidade Federal de Santa Maria, v.34, n.4, july/aug. 2004.

CROSS, M.L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, Amsterdam, v.34, n.4, p.245-253, 2002.

CRUZ, A.G.; BURITI, F.C.A.; DE SOUZA, C.H.B.; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science & Technology*, v. 20, n. 8, p. 344-354, 2009.

DANIEL, C.; POIRET,S.; GOUDERCOURT,D.; DENNIN, V.; LEYER,G.; POT,B. Selecting lactic acid bacteria for their safety and functionality by use of a mouse colitis model. *Applied and Environmental Microbiology*. Washington, v.72, n.9, p. 5799–5805, set. 2006.

DE BUYSER M. L.; DUFOUR, B.; MARIE, M.; LAFARGE, V. Implication of Milk and milk products in food-borne disease in France and in difference industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.67, p.1-17, jan.2001.

DEEGAN, L. H., COTTER, P.D., HILL, C., ROSS, P. Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf life extension. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 1058-1071, 2006.

DELFINO, T. P.C. *Sinergismo entre substâncias antimicrobianas e Lactobacillus acidophilus na inibição de Salmonella enteritidis e Salmonella gallinarum*. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, 65p. , 2008.

DE VRESE, M., WINKLER, P., RAUTENBERG, P., HARDER, T., NOAH, C., LAUE, C. (2006). Probiotic bacteria reduced duration and severity but not the incidence of common cold episodes in a double blind, randomized, controlled trial. *Vaccine*, 24, 6670–6674.

DE VUYST, L.; LEROY, F. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, Hethersett, v. 13, n. 4, p. 194-199, 2007.

DOGAN, B.; BOOR, K. J. Genetic diversity and spoilage potential among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 69, n. 1, p. 130-138, 2003.

DOYLE, M., P. et al. *E. Coli* O157 :H7. In : DOYLE, M., P. et al. (Eds) *Food Microbiology – Fundamentals and frontiers*. Washington, DC : ASM, 171-179, 1997.

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HÉCHARD, Y.; MCMULLEN, L.M.; PRÉVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.7, n. 2, p. 564-582.

DYMINSKI DS, WASZCZYNSKYJ N, RIBANI RH, MASSON ML. Características físico-químicas de musse de maracujá (*Passiflora*) elaborado com substitutos de gorduras. *Bol Cent Pesqui Process Aliment*, v.18, n.2, p.267-274, 2000.

EIJSINK, V.G.H., AXELSSON, L., DIEP, D.B., HAVARSTEIN, L.S., HOLO, H. AND NES, I.F. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. *Antonie von Leeuwenhoek*, v. 81, p. 639–654, 2002.

ELEFThERIADOU, M.; TELLO, A. V.; LOIZIDOU, M. M.; NIKOLAOU, A. S.; AKKELIDOU, D. The microbiological profile of food in the republic of Cyprus: 1991-2000. *Food microbiology*. v.19, p.463-471, 2002.

FARROKH ,C. et al. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology*, v.162, p190-212, 2013.

FERRERO M, CESENA C, MORELLI L, SCOLARI G, VESCOVO M. Molecular characterization of *Lactobacillus casei* strains. *FEMS Microbiology Letter*, v.140, p. 215-219, 1996.

FLEMMING, H.C.; NEU, T.R.; WOZNIAK, D. The EPS matrix: The House of Biofilm cells". *Journal of Bacteriology*, v. 180, p.7945-7947., 2007.

FLINT, S. H.; BREMER, P. J.; BROOKS, J. D. Biofilms in dairy manufacturing plant: description, current concerns and methods of control. *Biofouling*, Oxford, v. 11, n. 1, p. 81-97, 1997.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia de Alimentos*. São Paulo, Editora Atheneu, 2002. 182p.

FRANCO, R. M. *Escherichia coli: ocorrência em suínos abatidos na Grande Rio e sua viabilidade experimental em lingüiça frechal tipo toscana. Tese (Doutorado) – Faculdade de Veterinária. Universidade Federal Fluminense. Niterói, RJ. 2002.*

GANDARA, A. L. N.; OLIVEIRA, J. S. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. *Ciência Tecnologia Alimentos*, Campinas, v. 20, n. 1, 2000.

GARCIA, G.R.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; MEDEIROS, A.A.; POIATTI, M.L.; RAGAZANI, A.V.F.; HATAYDE, M.C.; CHIODA, T.P.; COAN, R.M.; PIGATTO, C.P.; TROVÓ, K.V. Inibição do crescimento de bactérias patogênicas por *Lactobacillus acidophilus*. *Revista portuguesa de ciências veterinárias*, n.101, 2006.

GARDINER, G.; ROSS, R.P.; COLLINS, J.K.; FITZGERALDO, G.; STANTON, C. Development of a probiotic cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, n.6, p.2192-9, 1998.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Higiene do leite: aspectos gerais das mastites. *Higiene Alimentar*, v. 9, n.36, , p. 12-16, 1995.

GHARSALLAOUI, A.; JOLY, C.; OULAHAL, N.; DEGRAEVE, P. Nisin as a Food Preservative:Part 2: Antimicrobial Polymer Materials Containing Nisin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015.

GOBBETT, I M.; CORSETTI, A.; SMACCHI, E.; ZOCCHETTI, A.; DE ANGELIS, M. Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p.37–47, 1998.

GOTTELAND, M.; BRUNSER, O.; CRUCHETM S. Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v.2 p.1077-1086, 2006.

GRANATO, D; MASSON, M. L.; FREITAS, R. J. S.. Stability studies and shelf life estimation of a soybased dessert. *Ciência e Campinas*, 2010.

GRANUM, P.E. *Bacillus cereus* and its toxins. *Journal of Applied Bacteriology*,v.76,p.61S-66S,Syposium Supplement 1994.

GUERRA, M.M.; BERNARDO, F.A. Fontes de contaminação dos alimentos por *Listeria monocytogenes*. *Revista Higiene Alimentar*, v.18, p.12-17, 2004.

HARDIE, J.M. Genus *Streptococcus*. In: SNEATH, P.H.A, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: William & Wilkins. USA. v. 2, p. 1043-1070. 1986.

HARDIE, J.M.; WHILEY, R.A. Classification an overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. n.83, p.1-11. 1997.

HELLER, K.J.; BOCKELMANN, W.; SCHREZENMEIR, J.; deVRESE, M. Cheese and its potential as a probiotic food. In: FARNWORTH, E.R., Ed. *Handbook of fermented functional foods*. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.203-225.

HENRY, C.J. Functional foods. *European Journal of Clinical Nutrition*. v. 64, p. 657–659, 2010.

HOLT, J.G. , WILLIAMS, L.; WILLINS. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore: William e Wilkins, 1994.

HOLZAPFEL W., H, SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. *Food Research International*, v. , n.2-3, p.109-116, 2002.

HOVE, H.; NORGAARD, H.; MORTENSEN, P. B. Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract. *European Journal of Clinical Nutrition*, n.53, p.339-350, 1999.

HU, F. Do functional foods have a role in the prevention of cardiovascular disease? *Circulation*, v.124, n.5, 538-40, 2011.

HUSSEIN, H. S.; SAKUMA, T. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *Journal of Dairy Science*, 88:450–465, 2005.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF). *Bacillus cereus in milk and milk products*. Chapter.6, n.287, p.30-37, 1993.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS- ICMSF. *Microorganisms in food : Characteristics of microbial pathogens*. London: Blackie Academic & Professional, v.5.1998. 513p.

ISOLAURI, E.; ARVOLA, T.; SUTAS, Y.; MOILANEN, E.; SALMINEN, S. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clinical & Experimental Allergy*, v. 30, n.11, p. 1604-10, 2000.

JACOBSEN, C. N.; NIELSEN, V. R.; HAYFORD, A. E.; MØLLER<sup>1</sup>, P. L.; MICHAELSEN, K. F.; PÆRREGAARD, A.; SANDSTRÖM, B.; TVEDE, M.;

JAKOBSEN, M. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 65, n. 11, p. 4949-4956, 1999.

JACK, R.W., TAGG, J.R., RAY, B. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiology Review*, Washington, v.59, n.2, p.171-200, 1995.

JAIN, S; CHEN, J. Attachment and Biofilm Formation by Various Serotypes of *Salmonella* as Influenced by Cellulose Production and Thin Aggregative Fimbriae Biosynthesis. *Journal of Food Protection*, n. 11 v. 70, p.2473–9, 2007.

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

JUSTFOOD. Global market review of functional foods – forecasts to 2012. Worcestershire: Aroq,2006.p.84.

KABUKI, D.Y. Rastreamento de *Listeria monocytogenes* em indústrias processadoras de queijo Minas frescal tipo latino, nos Estados Unidos da América, empregando a subtipagem molecular. Campinas. Tese (Doutorado em alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 2004.143p.

KARIMI, R., MORTAZAVIAN, A.M.; KARAMI, M. Incorporation of *Lactobacillus casei* in Iranian ultrafiltered Feta cheese made by partial replacement of NaCl with KCl. *Journal of Dairy Science*, v.95, n.8, p.4209-4222, 2012.

LEVINE, M.M.; XU, J.; KAPPER, J.B.; LIOR, H.; PRADO, V.; TALL, B.; NATARO, J.; KARCH, H.; WACHSMUTH, K. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *Journal of Infection and Disease*, v. 156, p.175-182,1987.

LAU, A.S.; LIONG, M.T. Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria-Inhibited *Staphylococcus epidermidis*. *Wounds*, v. 26, n.5, p.121-131, 2014.

LENY, P. Use of organic acids in poultry production. Mode of action and applications. In: FORUM INTERNACIONAL DE AVICULTURA. Foz do Iguaçu. Anais. Foz do Iguaçu: Editora Animal World, p.158-165, 2005.

LEWUS, C.B. Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from meat. *New Brunswick*, p.153, 1991.

LONCAREVIC, S.; BILLE, E. B. J.; THAM, M. L. D.; THAM, W. Characterization of *Listeria* strains isolated from soft and semi-soft cheeses. *Food microbiology*. v.15, p. 521-525, 1998.

LUCAS, A.; SODINI, I.; MONNET, C.; JOLIVET, P.; CORRIEU, G. Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. *International Dairy Journal*. Elsevier, v.14, n.1, p. 47-53, jan. 2004.

MADUREIRA, A.R.; PINTADO, M.E.; GOMES, A.M.; MALCATA, F.X. Incorporation of probiotic bacteria in whey cheese: decreasing the risk of microbial contamination. *Journal of Food Protection*, v.74, n.4, p.1194-1199, 2011.

MARTINS, F., PINHO, O., FERREIRA, I. Alimentos funcionais: conceitos, definições, aplicações e legislação. *Alimentação Humana*. Volume 10, nº 2, 2004.

MAZO, Z.Z.; ILHA, E.C.; ARISI, A.C.M.; SANT`ANNA, E. S. Bifidobactérias: isolamento, identificação e aplicação em alimentos probióticos. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, Curitiba v. 27, n. 1, p. 119-134 jan./jun. 2009.

MARTINEZ, F.A.C.; BALCIUNAS, E.M.; CONVERTI, A.; COTTER, P.D. OLIVEIRA, R.P.S. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnology Advances*, v,31. N.4, p.482-488, 2013.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G., FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, Amsterdam, v.12, p.173-182, 2002.

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *International Biodeterioration Biodegradation*, Barking, v.51, p.249-53, 2003.

McMULLEN, L. M.; STILES, M. E. Potential Use of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria in the Preservation of Meats. *Journal of Food Protection*, Supplement, p. 64-71, 1996.

MOREIRA, C.N., PEREIRA, M.A., BROD, C.S., RODRIGUES, D.P., CARVALHA, L.J.B., ALEIXO J..AG. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from healthy dairy cattle in southern Brazil. *Veterinary Microbiology*, v.93, n.3, p.179-83, 2003.

NASCIMENTO, C.B. *Surtos de toxinfecção alimentar notificados e investigados no município de Porto Alegre no período de 2003 a 2011*. Porto Alegre: UFRGS, 2013. Monografia (Grau de Especialista em Produção, Higiene e Tecnologia de produtos de origem animal) Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

NERO, L.A.; VIÇOSA, G.N.; PEREIRA, F.E.V. Qualidade microbiológica do leite determinada por características de produção. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.29, n.2, p. 386-390, 2009.

NOTERMANS,S.;BATT,C.A. A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. *Journal of Applied Microbiology*, Readin, v.84, p.51S-61S, 1998.

NUNES, M.C.; MURATA, L.T.F.; ALCANTARA, M.R.S. GERMANO, M.I.S.; GERMANO, P.M.L. Avaliação das sobremesas lácteas; características que podem comprometer a garantia de qualidade. *Revista Higiene Alimentar*, v.12, n.58, p. 41-18. 1998.

OHARA, H.; YAKATA, M. L- lactic acid production by *Bacillus* sp in anaerobic and aerobic culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 81, n. 3, p. 272-274, 1996.

OLIVEIRA, M.N., SIVIERI, K., ALEGRO, J.H.A., SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. Publicado em 17/05/2011. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 1, jan./mar., 2002.

OMBUI, J.N.; DABURIA, H.F.A. MACHARIA, J.K. NDUHIA, G. Coliform counts and *Escherichia coli* in raw commercial Milk from dairy farmers in Kaimbu District, Kenya. *East African Medicine Journal*, v.71, p.635-639, 1994.

O'SULLIVAN, D. J. *Primary Sources of Probiotic Cultures*. In: Probiotics in food safety and human health. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006.

OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.J. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal*, v. 8, p. 749-758, 1998.

PADHYE, N.V.; DOYLE, M.P. Rapid procedure of detection enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, p.2693-2698, 1991.

PEREIRA, V. G; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 28, n. 2, p. 229 - 240, 2007.

PEREZ, R.H. ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, v.13, n.1, p.2-13, 2014.

PEREIRA, A. *Qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado na cidade de Uberlândia – MG. Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Uberlândia, 2005.

PIARD, J. C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substance. *Lait*, v.72, p.113-42, 1992.

PINTO EP, TEIXEIRA, AM, SOPENA, LL, ROSA, VP, LUVIELMO, MM. Sucralose no desenvolvimento de sobremesas lácteas *light*. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 21, n.1, p. 49-60, 2003.

POHLENZ, C.; GATLIN, D.M. Interrelationships between fish nutrition and health. *Aquaculture*. v.431, p.111–117, 2014.

POULSEN, L.V. Microbial biofilm in food processing. *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologie Food Science*, v. 32, p. 321-6, 1999.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R., AURA, A.M.; OKSMAN-CALDENTY, K.M.; MYLLARINEM, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. *Trends in Food Science and Technology*, v.13, n.1, p.3-11, 2002.

REDDY, K.V.R.; YEDERY, R.D.; GUPTA, S.M. Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 24, p. 536-547, 2009.

RILLA, N. MARTÍNEZ, B.; RODRÍGUEZ, A. Inhibition of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in Afuega'l Pitu cheese by the nisin Z producing strain *Lactococcus lactis lactis* IPLA 729. *Journal of Food Protection, Dês Mones*, v. 67, n. 5, p. 928-933, 2004.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*. v. 34, Suppl. 2, p. 105-10, 2002.

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*, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.

ROSS, R.P.; DESMOND, C.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*, v.98, n.6, 2005.

ROSA, C. M.; FRANCO, B.D.G.M.; MONTVILLE, T.J.; CHIKINDAS, M.L. Purification and mechanistic action of a bacteriocin produced by a Brazilian sausage isolate, *Lactobacillus sakei* 2a. *Journal of Food Safety*, v.22, p.39-54, 2002.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal, Barking*, v. 17, n. 11, p. 1262-1277, 2007.

SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. *Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas*. São Paulo: Editora Varela, 2011. Cap.1, p.23 -451.

SALMINEN, S.; VON-WRIGHT, A. Lactic acid bactéria: microbiology and functional aspects. *Food Science and Techonology*, v.58,n.2. New York: Marcel Dekker, 1998. 617p.

SANDERS, M. E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. Elsevier, v. 8, n.5/6, p. 341-347, mai/jun. 1998.

SANTOS, M.H.R; JUNIOR, G.S; BORTOLOZO, E.A.F.Q. Avaliação higiênico-sanitária da manipulação de alimentos, a nível residencial, a partir da ocupação do responsável pelo processamento. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v.5, n.1, p.346-355, 2011.

SANTOS, M. V. *Boas Práticas de produção associadas à higiene de ordenha e qualidade do leite* in: O Brasil e a nova era do mercado do leite – compreender para competir. Piracicaba-SP: *Agripoint Ltda*, 2007, v. 1, p. 135-54, 2007.

SCHOENI, J.L.; WONG, A.C.L. *Bacillus cereus* Food Poisoning and its Toxins. *Journal of Food Protection*, v.68, n.3, p.636-648, 2005.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.73, n.2, p.361-364, 2001.

SHARMA, M.; ANAND, S. K. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry: a case. *Food Control*, Oxford, v. 13, n. 6/7, p. 469-477, 2002.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology*, n. 2, v.10, p.1016, 2009.

SILVA, L.C.C. Avaliação de um ácido orgânico como agente inibidor do crescimento de *Salmonella* sp em rações de aves. *Brazilian Journal of Poultry Science*, Supl.7, p.219, 2005.

STILES, M. E.; HASTINGS, J. W.; Bacteriocin Production by Lactic Acid Bacteria: Potential for Use in Meat Preservation. *Trends in Food Science & Technology*, p. 247-251, 1991

TAMINE, A.Y. *Microbiology of "Starter Cultures"*. In: ROBINSON, R.K. *Dairy Microbiology. The Microbiology of Milk Products*. 2 ed. USA: Elsevier Science Publishing, v.2, p.131-201, 1990. 409p.

TAUXE, R.V.; DOYLE, M.P.; KUCHENMULLER, T.; SCHLUNDT, J; STEIN, C.E. Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology*, v.10, n.14, 2009.

TOLEDO, J.C. *Gestão de qualidade na agroindústria*. In: *Gestão Agroindustrial*. 2.ed. São Paulo. Atlas, 2001, v.1, p. 465-517.

TORO, C.R. *Uso de Bactérias Lácticas Probióticas na Alimentação de Camarões *Litopenaeus vannamei* como Inibidoras de Microrganismos Patogênicos e*

*Estimulantes do Sistema Imune*. Curitiba, 2005, 153 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

TRONCO, V. M. *Manual para a inspeção da qualidade do leite*. 2ª ed. Santa Maria: UFSM, 166 p., 2003.

VASQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; BERNALDOMINGUEZ, G.; GOEBEL, W.; ZORN, B.G.; WHLAND, J.; KREFT, J. Listerial pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Review*, vol14, p.535-640, 2001.

VIEGAS, R.P. *Leites Fermentados Probióticos Produzidos a Partir de Bactérias Ácido Lácticas e Adicionados de Concentrado Protéico de Soro Lácteo: Características Físico-Químicas, Microbiológicas e Sensoriais*. Belo Horizonte, 2008, 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG. Belo Horizonte, 2008.

VINDEROLA, C.G., PROSELLO, W., GIBERTO, D., REINHEIMER, J.A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. *Journal of Dairy Science*, 83,1905-1911, 2000.

VLKOVÁ, H. et al. Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and their effectiveness on biofilms: a review. *Czech Journal of Food Sciences*, v. 26, n. 5, p. 309-323, 2008.

WAAK, E.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M. Prevalence and Fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole Milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p.3366-3370, 2002.

WEAGANT, S.D.; BRYANT, J.L.; JINNEMAN, K.G. An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods. *Journal of Food Protection*, v.58, n.1, p.7-12, 1995.

WELKER, C.A.D.; BOTH, J.M.C.; LONGARAY, S.M.; HAAS, S.; SOEIRO, M.L.T.; RAMOS, R.C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Brazilian Journal of Biociences*, v.8, n.1, 2010.

WEST, N. P., PYNE, D. B., CRIPPS, A. W., HOPKINS, W. G., ESKESEN, D. C., JAIRATH, A. *Lactobacillus fermentum* (PCC(R)) supplementation and gastrointestinal and respiratory-tract illness symptoms: A randomised control trial in athletes. *Nutrition Journal*, v.10, n.30, 2011.

WGO. *World Gastroenterology Organisation Practice Guideline*. Probiotics and prebiotics; 2008. p.22.

WHO Scientific Working Group Meeting. (1998). World Health Organization, Geneva, Switzerland.

YILDIRIM, Z.; JOHNSON, M. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *Journal of Food Protection* 6, 47–51, 1998.

YILDIRIM, Z., WINTERS; JOHNSON, M. Purification, aminoacid sequence and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *Journal of Applied Microbiology*, v. 86, 45–54, 1999.

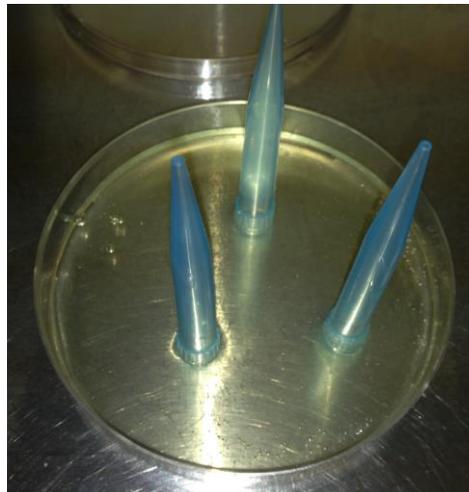
ZOTTOLA, E. A.; SASAHARA, K.C. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? *International Journal of Food Microbiology*, v. 23, p. 125-48, 1994.

## 6 APÊNDICE

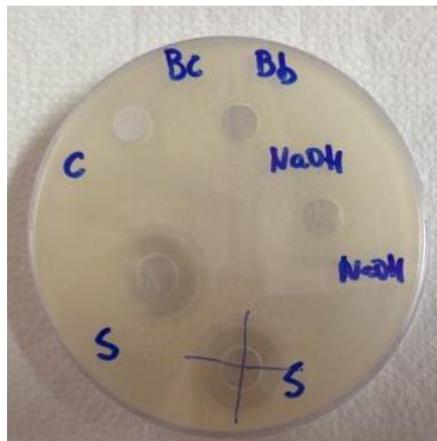
6.1 Ativação de *B. bifidum* e da cultura mista e em jarra de anaerobiose.



6.2 Elaboração dos poços em Agar semi sólido BHI.



6.3 Halo de inibição com sobrenadante sem NaOH, com NaOH e controle.



#### 6.4 Leitura do halo de inibição em mm com o uso do paquímetro.



#### 6.5 Elaboração da sobremesa láctea probiótica e com patógenos.



#### 6.6 Elaboração do queijo Minas Frescal probiótico e com patógenos.



