



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

STAEI MÁLAGA CARRILHO

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DA CEPA
LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM (L119) FRENTE A
CONTAMINAÇÃO POR *PENICILLIUM COMMUNE* (M35) EM
QUEIJOS DE CURTA MATURAÇÃO**

Londrina
2024

STAEL MÁLAGA CARRILHO

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DA CEPA
LACTIPLANTIBACILLUS PLANTARUM (L119) FRENTE A
CONTAMINAÇÃO POR *PENICILLIUM COMMUNE* (M35) EM
QUEIJOS DE CURTA MATURAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Vanerli Beloti

Londrina
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Carrilho, Stael Málaga.

Potencial antifúngico da cepa *Lactiplantibacillus plantarum* (L119) frente a contaminação por *Penicillium commune* (M35) em queijos de curta maturação / Stael Málaga Carrilho. - Londrina, 2024.

109 f. : il.

Orientador: Vanerli Beloti.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2024.

Inclui bibliografia.

1. Microbiologia de Alimentos - Tese. 2. Tecnologia de Alimentos - Tese. 3. Contaminantes em Alimentos - Tese. 4. Inspeção de Produtos de Origem Animal - Tese. I. Beloti, Vanerli. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

STAEL MÁLAGA CARRILHO

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DA CEPA *LACTIPLANTIBACILLUS*
PLANTARUM (L119) FRENTE A CONTAMINAÇÃO POR *PENICILLIUM*
COMMUNE (M35) EM QUEIJOS DE CURTA MATURAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Vanerli Beloti
Universidade Estadual de Londrina- UEL

Prof^a. Dr^a. Natalia Gonzaga
Universidade Estadual de Londrina- UEL

Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio
Universidade Estadual de Londrina- UEL

Londrina, 19 de março de 2024.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família, meu pai, meu irmão e meu companheiro de vida, Gabriel, e à minha mãe, que me acompanhou nessa jornada em vida e depois, espiritualmente. Obrigada por todo amor, apoio emocional e pela paciência, durante essa fase desafiadora e de muito aprendizado que passei. Agradeço demais por ter vocês em minha vida.

Gostaria de agradecer a minha orientadora Profa. Dra. Vanerli Beloti, pela paciência, pelo carinho, por dividir os conhecimentos, por me orientar nessa jornada e principalmente por topar este desafio, não permitindo que a distância física fosse limite para impedir essa nossa conquista.

Agradeço também ao técnico laboratorial Dr. Ronaldo Tamanini por me auxiliar tanto com sua criatividade, conhecimento e paciência na resolução dos pequenos desafios diários que apareciam durante o trajeto da pesquisa. Estendo meus agradecimentos a equipe do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (Profa. Natalia Gonzaga, residentes e colegas de pós graduação).

Sendo de imensa importância citar e agradecer aos parceiros de pesquisa: Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálises (Prof. Dr. Alexandre Urbano, Aline Merci Yamanishi e Daniel Andres Sanchez Lopez) e Laboratório de Micologia Médica e Microbiologia Bucal (Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio e equipe) que dividiram comigo os laboratórios, me ensinaram técnicas, me auxiliaram em análises e trouxeram conhecimentos e parcerias que possibilitaram a realização desta pesquisa, além de todos da comunidade científica da Universidade Estadual de Londrina que colaboraram para a realização desta pesquisa, com menção em especial a minha amiga e colega de trabalho, Larissa Chicoski, ao meu irmão Éder Málaga Carrilho e ao professor Pedro Henrique Ramos Cerqueira.

Agradeço a minha parceira de trabalho, Samanta Stinghen de Abreu. Amiga, você me auxiliou e dividiu comigo as dificuldades e as conquistas em diferentes fases desse início da minha vida profissional. Sua paciência, carinho e apoio foram essenciais para tornar as dificuldades mais leves e as conquistas mais saborosas.

À Prof. Dra. Natalia Gonzaga e ao Prof. Dr. Luciano Aparecido Panagio, por aceitaram o convite de serem minha banca avaliadora e pelas importantes pontuações que acresceram a este trabalho.

E por fim, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão das bolsas de mestrado e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Cadeia Produtiva do Leite (INCT/Leite) que financiaram o projeto.

CARRILHO, S. M. **Potencial antifúngico da cepa *Lactiplantibacillus plantarum* (L119) frente a contaminação por *Penicillium commune* (M35) em queijos de curta maturação.** 2024. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

RESUMO

O *Penicillium commune* é apontado como um fungo contaminante que comumente se desenvolve durante a maturação dos queijos, podendo promover alterações organolépticas e produzir micotoxinas. A contaminação dos alimentos por fungos gera perdas econômicas significativas ao produtor e estudos indicam que o *P. commune* apresenta resistência aos conservantes mais utilizados pela indústria para conter o crescimento de microrganismos. Verificada a importância do desenvolvimento de medidas naturais e alternativas para conter e reduzir o desenvolvimento fúngico nos alimentos, destaca-se o uso das bactérias ácido lácticas (BAL). As BAL auxiliam na conservação do produto, aumentam a vida útil, aprimoram as características sensoriais e fornecem diversos benefícios à saúde. Esse trabalho visou explorar a capacidade antifúngica da cepa *Lactiplantibacillus plantarum* (L119) frente a contaminação por *P. commune* (M35) sobre a superfície das peças de queijos durante o processo de maturação por 28 dias. Foram fabricados nove lotes de oito queijos produzidos com e sem a adição de *L. plantarum* (L119) e contaminados por três diferentes concentrações de *P. commune* (M35), maturados por 28 dias, com registro de imagens a cada 7 dias. Análises de Microscopia eletrônica de varredura foram realizadas para observação da possível interação entre os microrganismos. Verificou-se pela análise das imagens pelo software *ImageJ* uma redução da área de contaminação e retardo do crescimento do *P. commune* (M35) nos queijos com *L. plantarum*. (resultados do MEV) A cepa L119, demonstrou grande potencial para utilização como aditivo bioconservante antifúngico para queijos.

Palavras-chave: Biocontrole; BAL; Fungos; Alimentos; Contaminantes.

CARRILHO, S. M. **Antifungal potential of the *Lactiplantibacillus plantarum* (L119) against *Penicillium commune* (M35) contamination in short-ripened cheeses.** 2024. 109 f. Dissertation (Animal Science Master Degree) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

ABSTRACT

Penicillium commune has been identified as a contaminating fungus. It commonly develops during the ripening of cheeses, and it can cause organoleptic alterations and produce mycotoxins. The contamination of food by fungi generates significant economic losses for the producer. Studies indicate that *P. commune* is resistant to the preservatives most commonly used by the industry to contain the growth of microorganisms. Given the importance of developing natural and alternative measures to contain and reduce fungal growth in food, the use of lactic acid bacteria (LAB) stands out. LAB helps preserve the product, increases shelf life, improves sensory characteristics, and provides various health benefits. This work aimed to explore the antifungal capacity of the *Lactiplantibacillus plantarum* (L119) strain against contamination by *P. commune* (M35) on the surface of ripening cheese pieces for 28 days. Nine batches of eight cheeses produced with and without the addition of *L. plantarum* (L119) were manufactured and contaminated by three different concentrations of *P. commune* (M35), being matured for 28 days, with images taken every 7 days. Scanning electron microscopy analyses were carried out to observe the possible interaction between the microorganisms. Analysis of the images using ImageJ software showed a reduction in contamination and a delay in the growth of *P. commune* (M35) in the cheeses containing *L. plantarum* (SEM results here). The L119 strain demonstrated great potential for use as an antifungal preservative additive for cheeses.

Keywords: Biocontrol; BAL; Fungi; Food; Contaminants.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Fluxograma de Produção- Queijo Minas Padrão.....	23
Quadro 2	Técnica de avaliação dos halos formados no teste de atividade antagônica do <i>L. Plantarum</i> (L119) contra o <i>P. commune</i> (M35), com base na metodologia de Cheong <i>et al.</i> (2014), com modificações.....	70/102
Quadro 3	Características de Fabricação e Contaminação dos oito queijos, formadores do lote.....	71/107
Quadro 4	Avaliação da formação de zona de inibição de crescimento fúngico ao redor da cepa <i>L. plantarum</i> (L119).....	74
Quadro 5	Avaliação da formação de zona de inibição de crescimento fúngico ao redor da cepa <i>L. plantarum</i> (L119).....	74
Quadro 6	Análise da atividade antagônica dos Sobrenadantes Livres de Células (SLC) frente a presença do <i>P. commune</i>	76
Quadro 7	Análise visual do início das contaminações fúngicas nas peças de queijo fabricadas com concentração de 10^5 esporos/ ml de <i>P. commune</i>	79
Quadro 8	Análise visual do início das contaminações fúngicas nas peças de queijo fabricadas com concentração de 10^6 esporos/ ml de <i>P. commune</i>	81
Quadro 9	Análise visual do início das contaminações fúngicas nas peças de queijo fabricadas com concentração de 10^7 esporos/ ml de <i>P. commune</i>	83
Quadro 10	Avaliação do crescimento do <i>P. commune</i> (M35) e contagem de esporos produzidos em 20 dias.....	100
Quadro 11	Análise da viabilidade bacteriana nas diferentes etapas de preparo do liofilizado.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação entre a porcentagem da área superficial contaminada dos queijos, considerando a área total da face do queijo e a área de aplicação da contaminação com <i>P. commune</i> em uma concentração fúngica de 10^5 esporos/ml, obtida pela avaliação dos três lotes fabricados utilizando diferentes culturas.....	79
Tabela 2. Relação entre a porcentagem da área superficial contaminada dos queijos, considerando a área total da face do queijo e a área de aplicação da contaminação com <i>P. commune</i> em uma concentração fúngica de 10^6 esporos/ml, obtida pela avaliação dos três lotes fabricados utilizando diferentes culturas.....	81
Tabela 3. Relação entre a porcentagem da área superficial contaminada dos queijos, considerando a área total da face do queijo e a área de aplicação da contaminação com <i>P. commune</i> em uma concentração fúngica de 10^7 esporos/ml, obtida pela avaliação dos três lotes fabricados utilizando diferentes culturas.....	84
Tabela 4. Dados da diferença percentual de evolução do desenvolvimento fúngico entre os diferentes dias de observação, considerando a área total da face contaminada do queijo e a área de aplicação da contaminação fúngica das peças de queijo.....	87

LISTA DE IMAGENS

Imagem 1-	Resultados obtidos pela realização da técnica descrita por Schillinger e Villarreal (2010), com a formação de halos de inibição da cepa <i>L. plantarum</i> (L119) impedindo o crescimento fúngico da cepa de <i>P. commune</i> (M35) (10^7 esporos/ml).....	73
Imagem 2-	Resultados obtidos pela realização da técnica descrita por Magnusson e Schnürer (2001), com a formação de halos de inibição da cepa <i>L. plantarum</i> (L119) impedindo o crescimento fúngico da cepa de <i>P. commune</i> (M35) (10^7 esporos/ml).....	73
Imagem 3-	Resultados obtidos na investigação do composto microbiano presente na cepa L119 com atividade antifúngica, pela metodologia “ <i>Spot on Lawn</i> ” de Lewus, Kaiser e Montville (1991) e Cavicchioli <i>et. al.</i> , (2017), com modificações.....	76
Imagem 4-	Comparação entre as Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura, em magnitude 6kx, dos queijos elaborados com fermento mesofílico comercial (Mf) e cultura de <i>L. plantarum</i> (L119) (Bf), contaminados com <i>P. commune</i> (M35) em concentração de 10^7 esporos/ml com 28 dias de maturação.....	89
Imagem 5	Comparação entre as Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura, em magnitude 6kx, dos queijos elaborados sem adição de fermento (Of), com fermento mesofílico comercial (Mf) e com a cultura de <i>L. plantarum</i> (L119) (Bf), e contaminados com <i>P. commune</i> (M35) em concentração de 10^7 esporos/ml com 28 dias de maturação.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Produção, Abastecimento e Distribuição de Queijos no Brasil.....	19
Figura 2	Estimativa da mudança na estrutura do consumo de lácteos por grupo de produtos.....	20
Figura 3		20
Figura 4	Porcentual de consumo de queijos <i>per capita</i> por região brasileira, comparado com a média nacional, por Siqueira (2021).....	21
Figura 5	Gráfico do consumo <i>per capita</i> de queijos por região brasileira, por Siqueira (2021).....	22
Figura 6	Resultado das imagens digitais obtidas durante o processo de maturação dos queijos contaminados com 10^5 esporos/cm ²	80
Figura 7	Resultado das imagens digitais obtidas durante o processo de maturação dos queijos contaminados com 10^6 esporos/cm ²	82
Figura 8	Resultado das imagens digitais obtidas durante o processo de maturação dos queijos contaminados com 10^7 esporos/cm ²	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
IEPHAN	Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais
RTIQ	Regulamento Técnico de Qualidade e Identidade
BAL	Bactérias ácido lácticas
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
SILEMG	Sindicato da Indústria de Laticínios do Estado de Minas Gerais
%	Porcento
UNEP	<i>(The United Nations Environment Programme)</i> Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente
EMATER	Empresa Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural
IPHAN	Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional
Kg	Quilogramas
°C	Graus Celsius
Cm ³	Centímetros cúbicos
libras/pol ²	Libras por polegada ao quadrado
pH	Potencial hidrogeniônico
URA	Umidade relativa do ar
FAO	<i>(Food and Agriculture Organization)</i> Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
UFC/g	Unidades formadoras de colônias por grama
Mm	Milímetros
HEPA	<i>(High Efficiency Particulate Arrestance)</i> Alta eficiência na separação de partículas
Mg/Kg/dia	Miligramas por quilograma por dia
ECFA	<i>(European Food Safety Authority)</i> Autoridade Europeia de Segurança Alimentar

Mg	Miligrama
MRS	Man Rogosa & Sharpe
CLSI	(<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>) Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
SLC	Sobrenadante Livre de Células
Esporos/mL	Esporos por mililitro
µL	Microlitros
Cm ²	Centímetros quadrados
NIH	(National Institute of Health)- Instituto Nacional de Saúde
ml	Mililitros
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por ml
Rpm	Rotação por minuto
µm	Micrômetro
N	Normal
g/v	Gramas por volume
mM	Milimolar
mB	Milibars
M	Molar
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. QUEIJOS NO BRASIL.....	17
2.1.1. O Consumo e Comércio de Queijos no Brasil.....	18
2.1.2. Queijo Minas Padrão.....	21
2.1.3. Perdas de Produção.....	24
2.2. FUNGOS.....	25
2.2.1. Leveduras.....	25
2.2.2. Bolores.....	27
2.2.3. <i>Penicillium commune</i>	29
2.3. MEDIDAS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE PROBLEMAS FÚNGICOS NA PRODUÇÃO.....	32
2.4. CONSERVANTES QUÍMICOS: RISCOS DE INTOXICAÇÃO E RESISTÊNCIA.....	35
2.5. MICROBIOTA DOS QUEIJOS.....	38
2.5.1. Interações entre Microrganismos Presentes no Queijo.....	38
2.6. BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS.....	40
2.6.1. <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> e sua habilidade antimicrobiana.....	41
3. REFERÊNCIAS	43
4. HIPÓTESE.....	64
5. OBJETIVOS.....	65
5.1. OBJETIVO GERAL.....	65
5.2. OBJETIVO ESPECÍFICO.....	65
6. ARTIGO CIENTÍFICO:	66
Avaliação do Potencial Antifúngico da Cepa <i>Lactiplantibacillus Plantarum</i> (L119) frente a Contaminação por <i>Penicillium Commune</i> (M35) em Peças de Queijo de Curta Maturação.	
7. CONCLUSÃO.....	97
ANEXOS.....	98
ANEXO A- Descrição detalhada de Material e Método.....	99

1. INTRODUÇÃO

O consumo de queijos no Brasil, está em ascensão, conforme indicado por Siqueira *et al.* (2023), e o mercado queijeiro tem experimentado um crescimento significativo (Ferreira, 2021), com os queijos ocupando a posição de segundo produto lácteo mais exportado no Brasil (Rentero, 2023). Minas gerais é um estado em destaque, com a produção de diversos queijos, dentre eles o queijo Minas padrão, que tem seu registro de modo de fazer artesanal considerado patrimônio imaterial brasileiro (IEPHAN, 2018).

Os queijos, em geral são alimentos de elevado valor nutricional, sendo constituídos por diversos microrganismos que contribuem para formação de aroma, sabor e textura. No entanto, microrganismos patogênicos e deteriorantes também que podem ser incorporados ao produto durante a fabricação (Boor *et al.*, 2017). Segundo Penna, Gigante e Todorov (2021), as principais fontes de contaminação dos queijos estão associadas à matéria prima e falhas no processo de higiene durante o processamento.

Destaca-se entre os microrganismos contaminantes, a presença e relevância dos fungos, responsáveis por consideráveis perdas nos queijos contaminados (Awast, Anand, 2020). Contaminações por leveduras e bolores ocasionam alterações organolépticas que levam à rejeição do produto pelo consumidor (Pitt, Hocking, 2022). Lanita e Silva (2008), destacam que queijos semiduros estão mais suscetíveis a problemas fúngicos, causados por bolores, principalmente durante a maturação. Os bolores podem produzir micotoxinas, metabolitos tóxicos capazes de causar danos à saúde humana e animal (Hymery *et al.*, 2014).

Entre os bolores, *Penicillium commune* é um dos gêneros mais identificados em queijos, capaz de alterar propriedades organolépticas do alimento (Jurado, Vicente, 2020) e produzir Ácido Ciclopiazônico (CPA), uma micotoxina associada a problemas de saúde humana e animal (Hymery *et al.*, 2014).

Diante da necessidade de controle dos níveis de contaminação durante a fabricação dos queijos, diversas estratégias foram desenvolvidas, incluindo processamento térmico, resfriamento, uso de desinfetantes e sanitizantes e de diferentes conservantes químicos (Garnier *et al.*, 2017; Awast, Anand, 2020). Contudo, esses

1 métodos, além de onerosos (Lanita, Silva, 2008), podem induzir alterações nutricionais e
2 organolépticas nos produtos (Awasti, Anand, 2020).

3 Alguns microrganismos, como o *P. commune* desenvolveram resistência às
4 principais medidas de controle e conservantes utilizados (Nielsen, De Boer 2001;
5 Gougouli *et al.*, 2011). Agravando os desafios enfrentados pelos produtores e pela
6 indústria.

7 Estes desafios aliados às mudanças no perfil do consumidor, que busca por
8 produtos mais naturais (Silva, Silva, Ribeiro, 2018), impulsiona a busca por agentes de
9 biocontrole. Dado que as bactérias ácido lácticas já estão presentes na microbiota dos
10 queijos, contribuindo para as características organolépticas, é crucial aprimorar
11 pesquisas que avaliem os metabólitos por elas produzidos, como ácidos orgânicos,
12 peróxido de hidrogênio e peptídeos bioativos. Esses microrganismos podem atuar não
13 apenas conferindo características de identidade aos queijos, como também na forma de
14 biopreservativos, reduzindo os custos de produção e as perdas enfrentadas pelos
15 produtores queijeiros e pela indústria.

16 Este estudo teve como objetivo explorar a capacidade antifúngica da cepa
17 *Lactiplantibacillus plantarum* (L119) isolada de queijo artesanal serrano catarinense,
18 frente a contaminação por *P. commune* (M35), na produção de queijos maturados por 28
19 dias.

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 QUEIJOS NO BRASIL

No Brasil, uma ampla gama de queijos é produzida, abrangendo desde receitas originárias de diferentes culturas até produções únicas, dotadas de características culturais e regionais exclusivas (Da Silva, Rocha, Gomes Da Cruz, 2022). Esses queijos são elaborados a partir de leite bovino, de cabra, de ovelha, de búfala e mesmo da combinação de leites de diferentes espécies (Penna, Gigante, Todorov, 2021).

Autores ressaltam que a produção de queijo no Brasil resulta da convergência de diferentes processos fermentativos provenientes da herança alimentar das culturas latino-americanas e indígenas, combinadas com a influência da imigração europeia, especialmente de regiões como Portugal, Espanha e Itália (Penna, Gigante, Todorov, 2021). Ainda assim, há divergências quanto à região geográfica e ao período de início da produção de queijos no Brasil (Araújo *et al.*, 2020; Borelli *et al.*, 2016; Dias, 2010; Meneses, 2006; Netto, 2011).

Segundo o Regulamento Técnico de Qualidade e Identidade (RTIQ) de 1996, os queijos são produtos derivados exclusivamente do leite, compostos por enzimas, bactérias ácido lácticas (BAL) e ácidos orgânicos, com qualidade alimentar resultante da coagulação obtida pela ação física do coalho. Podem incluir condimentos, especiarias, substâncias alimentícias, corantes, aromatizantes e aditivos. Os queijos frescos são produtos fabricados e prontos para consumo, enquanto os queijos maturados passam por transformações em suas características por meio de processos físicos e bioquímicos específicos (Brasil, 1996).

O mercado de produtos lácteos está em ascensão no Brasil, e a produção de queijos tem um papel de destaque na indústria de laticínios (Ferreira, 2021). Siqueira (2021), destaca que o mercado de queijos no Brasil está em expansão devido às mudanças no perfil dos consumidores. Conforme indicado por Cirne *et al.* (2019), a busca por produtos artesanais tem aumentado, em virtude do interesse dos consumidores por itens mais saudáveis e saborosos, elevando, assim, o consumo de queijo na rotina dos brasileiros (Siqueira, 2021).

1 Com ênfase na produção mineira, o Sindicato da Indústria de Laticínios do Estado
2 de Minas Gerais (SILEMG) aponta que cerca de 1,2 milhão de toneladas de queijos foram
3 produzidas no Brasil em 2020, sendo aproximadamente 40% desta produção proveniente
4 do estado de Minas Gerais (EMATER, 2022). O queijo Minas é reconhecido como um
5 dos queijos mais artesanais e tradicionais da cultura brasileira (Dores, Ferreira, 2008;
6 Meneses, 2006). O método artesanal de preparo do queijo Minas foi consagrado como
7 patrimônio cultural imaterial brasileiro pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico
8 Nacional (IPHAN, 2008; IEPHA, 2018).

9 10 2.1.1 O Consumo e o Comércio de Queijos no Brasil

11
12 Conforme destacado por Chaves *et al.* (2021), o consumo médio de queijos *per*
13 *capta* anual é de aproximadamente 5,5 kg. Entretanto, Siqueira *et al.* (2023), reportam
14 um crescimento notório nesse consumo, atingindo a marca de 6,21 kg por habitante ao
15 ano.

16 Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (2021), em termos de
17 produção, o Brasil se encontra entre os cinco maiores do mundo, se destacando pela
18 produção artesanal (Rentero, 2023), produzindo uma média anual de 780 mil toneladas
19 de queijos (USDA, 2023). Porém, o mercado do queijo sofreu grandes impactos negativos
20 com a pandemia Covid-19 (Figura 1), com aumento no preço dos produtos e redução da
21 acessibilidade (USDA, 2023), o que refletiu no comprometimento dos produtores em
22 manter a produção e o abastecimento (Siqueira, 2021).

23
24
25
26
27
28
29
30
31

1 **Figura 1. Produção, Abastecimento e Distribuição de Queijos no Brasil**

2 **Cheese**

3 *Production, Supply, and Distribution*

4

Dairy, Cheese Market Year Begins	2022		2023		2024	
	Jan 2022		Jan 2023		Jan 2024	
Brazil	USDA Official	New Post	USDA Official	New Post	USDA Official	New Post
Beginning Stocks (1000 MT)	0	0	0	0	0	0
Production (1000 MT)	745	745	770	770	0	780
Other Imports (1000 MT)	33	33	50	50	0	0
Total Imports (1000 MT)	33	33	50	50	0	53
Total Supply (1000 MT)	778	778	820	820	0	853
Other Exports (1000 MT)	4	4	4	2	0	2
Total Exports (1000 MT)	4	4	4	2	0	2
Human Dom. Consumption (1000 MT)	774	774	816	818	0	820
Other Use, Losses (1000 MT)	0	0	0	0	0	0
Total Dom. Consumption (1000 MT)	774	774	816	818	0	833
Total Use (1000 MT)	778	778	820	818	0	833
Ending Stocks (1000 MT)	0	0	0	0	0	0
Total Distribution (1000 MT)	778	778	820	820	0	833

5

6

7

8

9

Units in 1000 MT.

Note: cheese classification HTS: 0406.

Dairy and Products Annual - Brazil- USDA (2023)

10

11 Fonte: USDA (2023).

12

13 Destaca-se, mesmo perante a esse cenário, que os consumidores mais

14 expressivos são os idosos, com 60 anos ou mais (Figuras 2 e 3), como apontado por

15 Siqueira, Oliveira e Lana (2023). Estes consumidores, caracterizados por uma crescente

16 informação e criteriosidade em suas escolhas alimentares, estão cada vez mais

17 conscientes diante do cenário de oscilações econômicas (Siqueira *et al.*, 2023). Dessa

18 situação, surge a necessidade de uma abordagem estratégica por parte dos produtores

19 e da indústria, a fim de atender às demandas específicas desse segmento de

20 consumidores e adaptar-se ao panorama dinâmico do mercado de queijos.

21

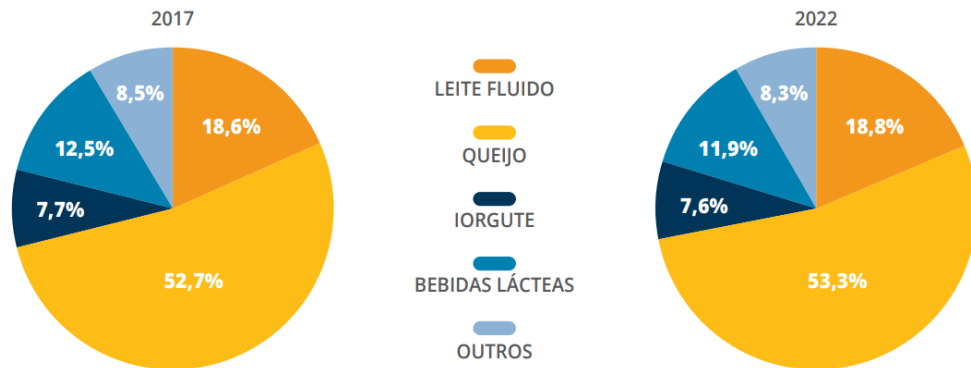
22

23

24

25

1 **Figura 2.** Estimativa da mudança na estrutura do consumo de lácteos por grupo
2 de produtos



Fonte: IBGE, adaptado por Embrapa Gado de Leite (2023)

5 Fonte: Siqueira, Oliveira, Lana (2023).

6

7 **Figura 3.** Estimativa da mudança da pirâmide etária no consumo de lácteos por
8 grupos de produção e faixa etária

9

	IDOSO		ADULTO		ADOLESCENTE		CRIANÇA	
	2017	2022	2017	2022	2017	2022	2017	2022
Leite fluido	24,9	28,4	53,4	52,2	16,4	14,7	5,3	4,6
Queijo	21,0	23,8	67,7	66,0	9,6	8,6	1,8	1,6
Iogurte	13,4	15,6	64,3	64,1	14,6	13,4	7,7	6,9
Bebidas lácteas	5,3	6,4	43,3	44,9	37,7	35,8	13,7	12,8
Outros	12,2	14,3	58,2	58,6	19,4	17,9	10,1	9,2
Total	18,4	21,2	60,9	60,2	15,6	14,1	5,1	4,5

Obs.: Idoso: acima de 60 anos; adulto: de 20 a 59 anos; adolescente: de 12 a 19 anos; criança: de 10 a 11 anos. Fonte: Resultado da pesquisa

10 Fonte: Siqueira, Oliveira, Lana (2023).

11

12

13

14

15

16

2.1.2 Queijo Minas Padrão

O queijo Minas padrão está entre os cinco queijos mais consumidos no Brasil (Figuras 4 e 5) (Siqueira, Schettino, 2021). De acordo com o RTIQ (Brasil, 2020), o queijo Minas padrão é classificado como um queijo de teor de gordura médio a alto, com teor médio de umidade. Sua forma é cilíndrica, apresentando sabor característico, consistência semidura, e textura compacta, com poucas olhaduras mecânicas, podendo ou não ter uma casca branca, lisa, uniforme e sem rachaduras.

Figura 4. Percentual de consumo de queijos *per capita* por região brasileira, comparado com a média nacional

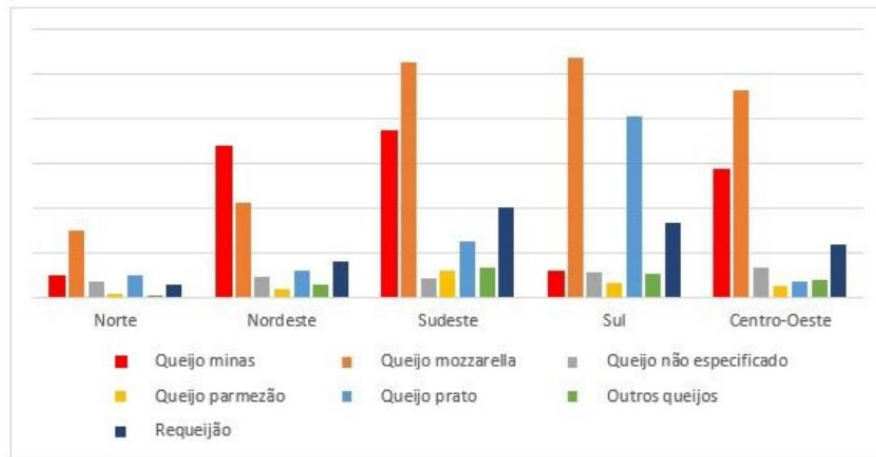
Percentual de consumo *per capita* por região brasileira comparado com a média nacional.

<u>Produto</u>	<u>NO</u>	<u>NE</u>	<u>SE</u>	<u>SU</u>	<u>CO</u>
Total de Queijos	29%	71%	128%	119%	94%
Queijo minas	16%	119%	131%	20%	102%
Queijo <i>mozzarella</i>	37%	52%	130%	133%	114%
Queijo <i>não especificado</i>	76%	96%	93%	120%	141%
Queijo <i>parmezão</i>	20%	47%	162%	82%	62%
Queijo <i>prato</i>	37%	44%	94%	303%	26%
Outros queijos	9%	61%	142%	115%	80%
Requeijão	20%	57%	141%	116%	83%

Fonte: Siqueira, Schettino (2021).

1 **Figura 5.** Gráfico do consumo *per capita* de queijos por região brasileira

Consumo *per capita* de queijos por região brasileira.



2 Fonte: Siqueira, Schettino (2021).

3

4

5

Este tipo de queijo é produzido por meio da coagulação do leite com bactérias ácido lácticas (BAL), acrescido de coalho ou enzima coagulante, cloreto de sódio e por maturação mínima de 20 dias, mantido em temperatura entre 10°C e 16°C, tendo como temperatura ideal 12°C (Quadro 1).

8

9

10

Os queijos de massa crua, como é o caso do queijo Minas padrão, possuem uma coagulação predominantemente enzimática, caracterizada por um curto tempo de floculação e uma dessoragem rápida, a fim de evitar grande desmineralização da massa, mantendo assim sua propriedade de consistência semidura (Lourenço Neto, 2013).

12

13

14

15

16

17

18

19

20

1

Quadro 1- Fluxograma de produção- queijo Minas padrão

QUEIJO MINAS PADRÃO		
LEITE	Pasteurização =71°C a 73°C por 15 a 20 segundos Gordura= 3,2 a 3,4%	
CULTURA	Opção 1: Mesofílico homofermentativo=100%	Opção 2: Mesofílico homofermentativo= 85 a 90% + S. therophilus 10%
INGREDIENTES	Cloreto de Cálcio= 15 a 20g/100 litros	
PRÉ- MATURAÇÃO	Temperatura= 31 a 33°C Tempo= 30 a 40 minutos	
COAGULAÇÃO	Temperatura= 31 a 33°C Floculação= 15 a 20 minutos Endurecimento= 15 a 20 minutos	
CORTE	Grãos= 1 a 1,5 cm ³	
TRABALHO NO TANQUE	Repouso= 2 a 3 minutos Mexedura= 40 a 45 minutos	
PRÉ PRENSAGEM E ENFORMAGEM	Pressão= 20 a 30 libras/pol ² Tempo= 15 a 20 minutos Enformagem Manual ou Mecânica	
PRENSAGEM	1ª Prensagem: Pressão= 20 a 25 libras/pol ² Tempo= 25 a 30 minutos Viragem 2ª Prensagem: Pressão= 25 a 30 libras/pol ² Tempo= 80 a 90 minutos	
FERMENTAÇÃO	Temperatura= 20 a 25°C URA= 83 a 87% Tempo= 14 a 18 horas pH= 4,9 a 5,2	
SALGA	Sal= 20 a 22% Temperatura= 10 a 12°C Tempo 14 a 18 horas pH= 5 a 5,2	
SECAGEM	Temperatura= 8 a 10°C URA= 85% Tempo= 24 a 36 horas	
MATURAÇÃO	Opção 1: Fase 1: Temperatura= 10 a 12°C URA= 85 a 87% Tempo= 8 a 10 dias Viragens a cada 1 a 2 dias Lavagem= imersão em água a 53 a 40°C, escovar Secagem= 8 a 10°C por 20 horas Embalagem em plástico termo-encolhível. Fase 2: Temperatura= 10 a 12°C URA=85 a 87% Tempo= 15 a 20 dias.	Opção2: Embalagem plástica termo-encolhível após a salga Temperatura= 10 a 12°C URA= 85 a 87% Tempo= 25 a 30 dias

2

Fonte: Lourenço Neto (2013)

2.1.3 Perdas de Produção

A contaminação dos alimentos resulta de problemas na cadeia de produção, desde a obtenção da matéria prima até a venda ao consumidor (FAO, 2022). Elas representam uma ameaça significativa, podendo resultar na deterioração do produto, intoxicações alimentares, toxiinfecções e infecções alimentares, causadas por vírus, bactérias, parasitas e fungos (Switaj *et al.*, 2015).

De acordo Penna, Gigante e Todorov (2021), as principais fontes de contaminação em queijos estão relacionadas à baixa qualidade do leite, resultante de falhas nos procedimentos de higiene de ordenha e de higiene das áreas industriais, além de problemas relacionados à saúde dos animais e dos manipuladores.

Em escala industrial, todos os tipos de queijo seguem um fluxograma de produção que requer um rigoroso controle e verificação para garantir a segurança no consumo deste alimento. Falhas em qualquer etapa de produção, desde a matéria prima, processamento, maturação, estocagem até distribuição, podem ocasionar contaminações que resultam em grandes prejuízos econômicos e representam um sério risco à saúde do consumidor (Garcia *et al.*, 2016).

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (2022), aproximadamente 13% dos alimentos no mundo são perdidos desde a matéria prima até a comercialização, e cerca de 17% dos alimentos são descartados nas residências e estabelecimentos de alimentação (UNEP, 2021).

Uma das principais causas que resultam em descarte de produção e perdas econômicas industriais relevantes é a contaminação de alimentos por fungos (Cheong *et al.*, 2014; Quéro *et al.*, 2019). Estimam-se perdas de 5% a 10% da produção mundial de alimentos em decorrência de problemas fúngicos (Awasti, Anand, 2020), estando os queijos dentre os alimentos altamente suscetíveis ao crescimento desses microrganismos (Pitt, Hocking, 2009).

2.2. FUNGOS

O reino Fungi é composto por diferentes ordens, famílias e espécies e seus integrantes são altamente especializados (Pitt, Hocking, 2022). Eles se distribuem nos ambientes terrestre, aquático e aéreo, embora algumas espécies possam apresentar algumas limitações de crescimento e desenvolvimento (Ramos- Pereira *et al.*, 2019 b; Yiannikouris, Jouany, 2002). Os fungos relacionados à produção e à deterioração de alimentos estão presentes em apenas algumas ordens deste vasto reino (Pitt, Hocking, 2022).

O uso de fungos em processos fermentativos para produção de alimentos tem um histórico milenar. Evoluindo de acordo com as necessidades de aprimoramento e desenvolvimento de produtos por tentativa e erro (Mehla *et al.*, 2020). Atualmente as indústrias utilizam culturas prontas e isoladas para facilitar o controle do processo fermentativo no desenvolvimento de produtos (Awasti, Anand, 2020).

Os fungos se manifestam de três formas, na forma filamentosa, os denominados bolores; na forma unicelular, classificados como leveduras; ou podendo adquirir ambas as formas, de acordo com as condições ambientais, como são caracterizados os fungos dimórficos (Ferreira, Souza, 2000; Murray, Rosenthal, Pfealler, 2006).

2.1.4 Leveduras

As leveduras são fungos unicelulares, geralmente de forma esférica ou oval (Tortora, 2017). Elas se reproduzem rapidamente, devido a sua reprodução assexuada (por brotamento ou fissão binária), quando comparada a velocidade de reprodução de fungos filamentosos, porém não conseguem se multiplicar tão rapidamente quanto as bactérias, podendo ter sua concentração, no queijo, influenciada pela concentração de bactérias ácido lácticas (Pitt, Hocking, 2022).

A leveduras podem ser encontradas em várias etapas da produção de produtos lácteos, desde sua presença na matéria prima, no ar, nos utensílios e na salmoura, contribuindo para a inclusão deste microrganismo no queijo (Temelli *et al.*, 2006; Banjara *et al.*, 2015). Muitas leveduras integram a microbiota primária ou secundária dos queijos,

1 contribuindo com seus metabólitos na formação de compostos geradores de textura,
2 sabor e aroma aos queijos (Kesenka, Akbulut, 2008; Gori *et al.*, 2013; Ryssel *et al.*, 2015),
3 como nos casos dos queijos Reblochon, Gruyère, Tilsit e Munster (Awasti, Anand,
4 2020).

5 Considerando que queijos são alimentos fermentados, as condições nutricionais
6 e de acidez do alimento, favorecem o desenvolvimento das leveduras (Seiler, 2002). A
7 maioria das leveduras encontradas nos alimentos demonstram habilidade em sobreviver
8 em condições anaeróbicas e toleram ambientes com baixo pH (Pitt, Hocking, 2020).
9 Autores citam os gêneros: *Candida* spp, (Golic *et al.*, 2013; César, 2019), *Debaryomyces*,
10 *Kluyveromyces*, *Geotrichum*, *Saccharomyces*, *Trichosporon* (Golic *et al.*, 2013;
11 Geronikou *et al.*, 2020), *Yarrowia* (Golic *et al.*, 2013; Karasu-Yalcin, Senses-Ergul, Ozbas,
12 2017) e *Rhodotorula* (Geronikou *et al.*, 2020), como as principais encontradas nos
13 queijos.

14 Awast e Anad (2020), citam que mais de 60 espécies de leveduras já foram
15 identificadas como contaminantes em leite e derivados. Porém, poucas espécies de
16 leveduras podem causar danos substanciais aos queijos, a maioria dos casos de
17 contaminação é acidental (Pitt, Hocking, 2022). Estes microrganismos possuem vias
18 metabólicas limitadas, são sensíveis a reduções acentuadas nos níveis de umidade e
19 atividade de água (Viljoen *et al.*, 2003). Em sua maioria, requerem condições nutricionais
20 específicas e além de estarem em constante interação e competição por nutrientes com
21 as bactérias presentes no queijo, as leveduras não conseguem penetrar a casca dos
22 queijos (Pitt, Hocking, 2022). No entanto, a capacidade de resistir a diferentes condições
23 ambientais e de causar deterioração do alimento, depende da espécie e cepa da
24 levedura, bem como da concentração microbiológica presente no queijo (De Almeida, De
25 Gusmão, 2011, Geronikou *et al.*, 2020).

26 A contaminação de queijos por leveduras promove alterações organolépticas
27 consideráveis, devido ao metabolismo heterofermentativos deste microrganismo.
28 Segundo Ledenbach e Marshall (2009), alterações produzidas por leveduras
29 contaminantes nos alimentos se tornam visíveis, quando a concentração deste
30 microrganismo é igual ou superior a 10^5 - 10^6 UFC/g.

1 Algumas das alterações já relatadas são a produção de gás (Pitt, Hocking, 2022),
2 a acidificação do produto, promovendo um sabor rançoso ou fermentado (Zacarchenco
3 *et al.*, 2011), um odor sulfuroso e alterações na aparência do queijo, propiciando uma
4 redução da qualidade e do tempo de validade do produto (Walker, Ayres, 1970; Frölich-
5 Wyder, 2003; Salustiano *et al.*, 2003; Zacarchenco *et al.*, 2011; Radha, Nath, 2014;
6 Garnier *et al.* 2017).

7 Outro perigo relevante é a possibilidade de produção de metabolitos tóxicos.
8 Apesar de não se falar de produção de micotoxinas por leveduras (Pitt, Hocking, 2022),
9 as leveduras são capazes de produzir aminas biogênicas, compostos relatados com
10 essenciais e benéficos aos seres humanos, porém, que em altas dosagens, podem gerar
11 toxicidade (Awast, Anand, 2020). Estudos também reportam leveduras em queijos
12 produtoras de tiramina e histamina (Roing- Sagués *et al.*, 2002; Linares *et al.*, 2012).

13

14 2.1.5 Bolores

15

16 Bolores são fungos filamentosos e abrangem uma grande diversidade do reino
17 Fungi. Assim como as leveduras, eles podem ser responsáveis por diversas
18 características sensoriais desejadas nos queijos (Haasum, Nielsen, 1998), por meio da
19 produção de diversos metabólitos benéficos (Chalupová *et al.*, 2014). Em alguns casos,
20 a presença de bolores é responsável até mesmo pela identidade de queijos, podendo se
21 desenvolver na superfície e no interior de queijos como Roquefort, Gorgonzola e Danish-
22 Blue, Brie e Camembert (Metin, 2018).

23 Contudo, metabólitos produzidos por espécies indesejadas de bolores podem
24 prejudicar as propriedades organolépticas e alterar a aparência do produto. Estudos
25 relatam a existência de mais de 100 espécies de bolores contaminantes em produtos
26 lácteos (Awasti, Anand, 2020).

27 Essas alterações incluem o amolecimento e as perfurações nas cascas do
28 queijos, a presença de limosidade, sabor e odor desagradável e até mesmo a degradação
29 do produto (Da Silva e Rocha, Gomes Da Cruz, 2022; Huis In't Veld, 1996; Quéro *et al.*,
30 2019; Lanita, Silva, 2008) levando à rejeição pelo consumidor e gerando prejuízo para as
31 indústrias (Pitt, Hocking, 2022).

1 Ao contrário das leveduras, os bolores conseguem adentrar à massa do queijo,
2 a partir da superfície da casca, (Pitt, Hocking, 2022) continuando a produzir metabólitos
3 mesmo após a remoção aparente dos micélios da superficiais (Filtenborg, Frisvad,
4 Thrane, 1996). Adicionalmente, muitos bolores deteriorantes são psicotolerantes e
5 capazes de se desenvolver em condições de baixa oxigenação (Pitt, Hocking, 2022).

6 Entre os principais gêneros descritos em literatura, encontrados como bolores
7 contaminantes em queijos estão: *Aspegillus*, *Penicillium* spp., *Phoma*, *Scopulariopsis*,
8 *Fusarium* (Hocking, Faedo, 1992; Montana *et al.*, 2004), *Cladosporium* e *Mucor* (Garnier
9 *et al.*, 2017; Montagna *et al.*, 2004).

10 Lanita e Silva (2008), apontam que os queijos semiduros são os mais suscetíveis
11 a problemas fúngicos, com o desenvolvimento desses fungos ocorre principalmente
12 durante a fase de maturação, principalmente até os 60 dias (Baylis, 2009), enquanto as
13 condições ambientais de umidade ainda favorecem seu desenvolvimento na superfície
14 do alimento (Jay, 2005).

15 O desenvolvimento de fungos indesejados nos queijos pode ser um problema
16 muito além das alterações organolépticas. Algumas espécies de fungos são capazes de
17 produzir toxinas nocivas aos seres humanos e aos animais (Pitt, Hocking, 2009).

18 As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos produzidos pelos fungos
19 (Hymery *et al.*, 2014). A contaminação dos alimentos por micotoxinas pode ocorrer de
20 forma direta, quando o alimento apresenta o fungo toxigênico, ou de forma indireta, em
21 que mesmo após a inativação do fungo por processamento do alimento, a toxina se
22 mantém ativa (Freire *et al.*, 2007).

23 Os principais efeitos nocivos relatados do consumo de micotoxinas incluem a
24 indução de câncer de fígado, quadros de imunodeficiência, problemas cutâneos,
25 necroses (Pitt, Hocking, 2022). De acordo com a FAO (2021), as micotoxinas também
26 levam a problemas urogenitais, vasculares, renais e nervosos. Tais fatores evidenciam
27 que o consumo recorrente de alimentos contaminados por fungos pode representar um
28 risco grave à saúde, sendo inapropriado para consumo e venda (Pitt, Hocking, 2009).

29 Pitt *et al.* (2012), indicam que os principais gêneros, produtores de micotoxinas,
30 já estudados, presentes em alimentos são *Fusarium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus*
31 spp.

1 O estudo e compreensão das micotoxinas presentes em queijos ainda estão em
2 processo de construção, sendo relevante citar que as micotoxinas Citrina, Penitrem A,
3 Roquefortina C, Esterigmatocistina, aflatoxina A e Ocratoxina A são as mais relatadas
4 (Anelli *et al.*, 2019; Hymery *et al.*, 2014). A Aflatoxina M1 é única micotoxina controlada,
5 com limites estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)
6 (BRASIL, 2011).

7 A percepção de bolores na superfície dos queijos não indica a presença de
8 micotoxina neste alimento, mas também não descarta esta possibilidade (Hymery *et al.*,
9 2014; Pleadin *et al.*, 2019). É essencial considerar que queijos podem possuir fungos não
10 identificáveis na sua superfície que podem ou produzir micotoxina, assim como os queijos
11 podem apresentar fungos em sua superfície e não produzir micotoxinas. Portanto, o
12 investimento em estudos sobre contaminação fúngica em queijos e produção de
13 micotoxinas é uma necessidade evidente.

14

15 2.2.3. *Penicillium commune*

16

17 O gênero *Penicillium*, pertencente ao filo Ascomycota, compreende espécies
18 saprófitas, oportunistas, amplamente distribuídas em diversos ambientes, devido a sua
19 baixa exigência nutricional e habilidade de sobreviver em ambientes com diversidades
20 de oxigenação, pH, temperatura e umidade (Pitt, Hocking, 2009). Deste gênero, o
21 subgênero *Penicillium* se destaca com espécies importantes no contexto de
22 contaminação de alimentos (Pitt, Hocking, 2022). Dente as espécies deste grupo,
23 destaca-se o *P. commune*, identificado como espécie ancestral e precursora do
24 *Penicillium camemberti* (López-Villavicencio *et al.*, 2010), notável por seu papel na
25 produção de queijos finos. Diferentemente do *P. camemberti*, o *P. commune* é a espécie
26 contaminante mais frequentes em queijos, observada por diversos estudos (Bullerman,
27 Olivigni, 1974; Moubasher, Abdel-Kader, El-Kady, 1978; Aran, Eke, 1987; Hocking,
28 Faedo, 1992; Hassanin, 1993; Jodral *et al.*, 1993; Lund, Filtenborg, Frisvad, 1995;
29 Filtenborg, Frisvad, 1996; Kure, Skaar, 2000; Basílico *et al.*, 2001; Kure *et al.*, 2001;
30 Montagna *et al.*, 2004; Pitt, Hocking, 2009; Dailé, Deschamps, Richard-Forget, 2010;

1 Garnier *et al.*, 2017; Decontardi *et al.*, 2018), sendo também isolada em diferentes pontos
2 da indústria queijeira (Kure *et al.*, 2001).

3 *P. commune* exibe características distintivas em suas colônias, apresentando
4 crescimento médio de 18 a 30 mm de diâmetro. A coloração das colônias varia entre
5 branco, verde turquesa, verde opaco a verde acinzentado, com um reverso de tonalidade
6 esbranquiçada, sendo a coloração e o tamanho variável de acordo com o substrato
7 utilizado. As colônias apresentam uma morfologia plana, com relevo discreto, sulcadas
8 radialmente e aveludadas. Os micélios exibem tonalidade branca a amarelados e a
9 produção de conídios é moderada. (Pitt, Hocking, 2022). O crescimento do *P. commune*
10 ocorre idealmente na faixa de temperatura entre 25°C e 35°C. O diferencial dessa
11 espécie está na adaptabilidade em se desenvolver em temperaturas de refrigeração,
12 suportar ambientes com baixa umidade, baixa concentração de oxigênio e altas
13 concentrações de dióxido de carbono (Taniwaki *et al.*, 2001).

14 A contaminação com *P. commune* pode provocar alterações na textura dos
15 queijos (Jurado, Vicente, 2020). Além disso, devido a produção de metabólitos
16 secundários, essa espécie apresenta capacidade de inibir o desenvolvimento de diversas
17 bactérias patogênicas, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas*
18 *aeruginosa*, *Escherichia coli* (Shang *et al.*, 2012; Malhadas *et al.*, 2017). Adicionalmente,
19 há evidências de que o *P. commune* também pode exercer um efeito inibitório, embora
20 em menor intensidade, sobre o desenvolvimento de algumas leveduras, como *Candida*
21 *glabrata* e *Candida albicans* (Malhadas *et al.*, 2017).

22 Diblasi *et al.* (2015), relata que dentre os metabólitos produzidos pelo *P.*
23 *commune*, tem-se a produção de Lovastatina, uma estatina, com potencial no tratamento
24 de hipercolesterolemia e doenças cardiovasculares. Destaca-se que a Lovastatina
25 influencia no desenvolvimento de biofilmes produzidos por *S. aureus*. A produção de
26 estatinas representa um mecanismo defensivo do *P. commune* contra outros
27 microrganismos (Endo, 2004).

28 Outro mecanismo de defesa documentado por diversos autores é a produção de
29 microtoxinas (Hymery *et al.*, 2014). Estudos indicam que o *P. commune* é capaz de
30 produzir micotoxinas como Ácido Ciclopiazônico (CPA) (Frisvad, Filtenborg, Thrane,

1 1989, Ramos- Pereira *et al.*, 2019 a; Mareze, 2021) bem como uma variedade de
2 compostos tóxicos derivados (Larsen *et al.*, 2002).

3 A micotoxina CPA é reconhecida por sua potente toxicidade em concentrações
4 elevadas, sendo capaz de causar sérios danos renais e intestinais em mamíferos
5 (Hymery *et al.*, 2014). Sinais evidentes de intoxicação causadas por CPA incluem
6 diarreia, anorexia, pirexia, ataxia e, em casos extremos, mortalidade, como relatado por
7 Bryden (1991).

8 Pitt and Hocking (2022), afirma que a maioria das espécies de *Penicillium* possui
9 potencial micotoxigênico. No entanto, evidências provenientes da análise de diferentes
10 trabalhos, indicam que muitas dessas toxinas podem não ser produzidas nos alimentos,
11 ou são geradas em quantidades insignificantes, devido as condições ambientais
12 específicas. Contrastando essa tendência, estudos conduzidos por Ramos-Pereira *et al.*
13 (2019 a), em amostras de queijos espanhóis destacam a notável produção de CPA pelo
14 *P. commune*. Spahr *et al.* (2000), consideram que a CPA é uma das poucas micotoxinas
15 com capacidade de ser transferida pelo leite.

16 Em humanos, os relatos de intoxicação por CPA indicam indução de distúrbios
17 neurológicos (Hymery *et al.*, 2014). Essas constatações destacam a importância do
18 monitoramento da presença de CPA, principalmente em produtos lácteos, devido as
19 possíveis implicações à saúde humana e animal.

20 Além dos possíveis problemas mencionados que são relacionados à
21 contaminação por *P. commune* em queijos, estudos reportam que este fungo manifesta
22 uma notável resistência contra certas cepas de *Lactobacillus* (Kure *et al.*, 2001; Kure *et*
23 *al.*, 2004; Ramos-Pereira *et al.*, 2019 b). Essa resistência dificulta o controle efetivo desse
24 contaminantes por meio da competição com os microrganismos presentes na microbiota
25 do queijo, que como relatado anteriormente e predominantemente constituída por
26 bactérias ácido lácticas (BAL).

27

28

29

30

2.3. MEDIDAS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE PROBLEMAS FÚNGICOS NA PRODUÇÃO

Os processos para prevenir a contaminação dos produtos lácteos devem começar na obtenção da matéria prima. A microbiota presente no solo, na água, na pele do rebanho leiteiro e nos tanques de refrigeração do leite podem interferir na qualidade da matéria prima (Gontijo *et al.*, 2020), sendo de extrema importância os cuidados higiênico- sanitários, tanto no ambiente de ordenha, quanto no transporte do leite para a indústria (Lu, Wang, 2017).

A aplicação de tratamentos térmicos, como a pasteurização, representa uma estratégia eficaz de controle, visando a inativação da microbiota deteriorante e patogênica. Apesar de a pasteurização ser capaz de inativar a maioria dos fungos, observa-se que algumas espécies fúngicas adquiriram resistência aos processos térmicos, permitindo sua sobrevivência e subsequente proliferando em derivados lácteos pasteurizados (Awasti, Anand, 2020).

O queijo, devido à sua composição rica em nutrientes, é um alimento propício ao desenvolvimento de microrganismos (Huis In't Veld, 1996). A ocorrência de fungos em queijos e outros produtos lácteos, está correlacionada como a ausência de pasteurização do leite, a pasteurização inadequada, a existência de fungos resistentes ao tratamento térmico ou contaminações decorrentes de procedimentos pós-pasteurização (Jodral *et al.*, 1993).

O ambiente industrial de produção de queijos, pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos. A umidade presente nos equipamentos, paredes, pisos e na câmara de maturação podem propiciar o desenvolvimento de determinadas espécies fúngicas, representando uma ameaça potencial para a produção de alimentos (Awasti, Anand, 2020). Essa situação destaca a imperatividade dos cuidados com a higiene e sanitização na indústria de alimentos, visando mitigar o risco de contaminação e preservar a qualidade e segurança dos produtos lácteos.

Nas indústrias de alimentos, diferentes detergentes e sanitizantes são utilizados com intuito de prevenir e reduzir a contaminação fúngica. Dentre os produtos, destacam-se detergentes alcalinos e ácidos, amônia quaternária, álcoois, iodóforos, aldeídos,

1 agentes clorados, compostos a base de ácido peracético e peróxido de hidrogênio
2 (Awasti, Anand, 2020). A eficiência desses compostos varia de acordo com a natureza
3 do agente microbiológico, o material do equipamento, o pH, a dureza da água, a presença
4 de inibidores químicos, bem como com a concentração e o tempo de ação dos produtos
5 (Silva, Dutra, Cadima, 2010).

6 É crucial salientar que a utilização inadequada e a exposição contínua, podem
7 resultar em relatos de fungos tolerantes e no desenvolvimento de resistência aos
8 compostos (Korukluoglu, Sahan, Yigit, 2006; Levinskaitė, 2012). De acordo com
9 Bundgaard-Nielsen e Nielsen (1996), algumas espécies apresentam, em diferentes
10 níveis, tolerância ao quaternário de amônio, especialmente o *P. commune*. Essas
11 constatações reforçam a importância de uma gestão cuidadosa dos procedimentos de
12 higienização, visando a eficácia contínua e a prevenção do desenvolvimento de
13 resistência por parte dos microrganismos.

14 A fase de preparação e manipulação dos queijos, são reconhecidas como pontos
15 críticos de controle essenciais para evitar a contaminação do produto final (Awast,
16 Anand,2020). Embora o uso do cloreto de sódio seja uma medida eficaz no controle do
17 desenvolvimento de microrganismos, por reduzir a atividade de água e a produção de
18 micotoxinas (Sengun, Yaman, Gonul, 2008), existem relatos de que a salmoura e a água
19 empregada nas diversas etapas dos processos são pontos importantes de
20 recontaminação (Carlos, *et al.*, 2017).

21 A implementação e o monitoramento de boas práticas de fabricação e
22 procedimentos de higiene operacional são fundamentais para mitigar o risco de
23 contaminação do produto final (Loureiro, Querol, 1999). Essas práticas desempenham
24 um papel crucial na garantia da segurança e qualidade dos queijos, contribuindo para a
25 prevenção de potenciais riscos microbiológicos ao longo do processo de produção.

26 Estudos apontam que a contaminação fúngica presente nos produtos lácteos e
27 nas plantas industriais podem, também, provir do ar (Kure, Skaar, Brendehaug, 2004;
28 Beletsiotis, Ghikas, Kalantzi, 2011; Radha, Nath, 2014). Os fungos deteriorantes podem
29 produzir esporos, partículas leves que adentram a planta industrial pelos ductos de ar
30 (Garnier *et al.*, 2017). Dentre as medidas adotadas, para abordar esse problema tem-se

1 a instalação de filtro HEPA (filtros de ar com alta eficiência na separação de partículas)
2 (Beletsiotis, Ghikas, Kalantzi, 2011) e a aplicação de gás ozônio (Varga, Szigeti, 2016).

3 As câmaras de maturação dos queijos, mesmo sendo ambientes
4 refrigerados, constituem um ponto importante de controle, pois a falta de higiene,
5 associada ao grau de umidade e a temperatura, podem propiciar o desenvolvimento de
6 microrganismos indesejáveis (Pinto *et al.*, 2007). As estratégias mais comuns para
7 controlar contaminantes em queijos em câmaras frias de maturação incluem o uso de
8 fumigadores, aplicação de fungistáticos e lavagem dos queijos (Lanita, Silva, 2008).

9 Os cuidados na manipulação e lavagem dos queijos contaminados é essencial,
10 pois tais procedimentos também podem interferir na presença de fungos no ar, sendo
11 imprescindível estabelecer um fluxo de produção e manipular os alimentos
12 cautelosamente para que um mínimo de esporos fúngicos se disperse, evitando a
13 contaminação de outras peças e de outros ambientes (Kure, Skaar, 2004; Temelli *et al.*,
14 2006).

15 Além disso, os cuidados com a embalagem e estocagem do produto
16 desempenham um papel significativo e podem influenciar o desenvolvimento de
17 microrganismos contaminantes em queijos. Estratégias como embalagens a vácuo e com
18 atmosfera modificada, além de coberturas de cera, são desenvolvidas para reduzir a
19 possibilidade do crescimento de microrganismos indesejados no produto final (Costa *et al.*,
20 2008). No entanto, é importante observar que a maioria das embalagens são
21 confeccionadas a partir de materiais derivados de petróleo, acarretando problemas
22 ambientais (Costa *et al.*, 2008).

23 A refrigeração de produtos lácteos é uma prática imperativa que visa o controle
24 da proliferação de microrganismos, a extensão da vida útil dos produtos (Janzen *et al.*,
25 1981) e a prevenção da formação de micotoxinas (Sengun *et al.*, 2008). No entanto, o
26 desenvolvimento de fungos do gênero *Penicillium*, como o *P. commune*, não é
27 efetivamente controlado por temperaturas de refrigeração, uma vez que muitas espécies
28 desse gênero adaptaram seu ciclo de vida a essas condições. Gougouli *et al.* (2011),
29 relatam o desenvolvimento do *P. commune* em produtos lácteos na faixa de – 6,7°C a
30 9,6°C.

1 É importante salientar que abordagens como tratamentos térmicos, filtração,
2 purificação (Westall, Filtenborg, 1998) e refrigeração (Stratford *et al.*, 2014), embora
3 efetivos no controle e inibição do desenvolvimento de microrganismos, são onerosos
4 (Lanita, Silva, 2008) e podem ocasionar perdas nutricionais e alterações organolépticas
5 nos produtos (Awasti, Anand, 2020).

6 A análise das diversas estratégias de controle e dos desafios encontrados
7 destaca a magnitude dos problemas que produtores e as indústrias enfrentam ao
8 gerenciar, controlar e prevenir contaminações fúngicas, especialmente no contexto do
9 gênero *Penicillium*. A este desafio, soma-se a crescente demanda do consumidor por
10 produtos naturais (Garnier *et al.*, 2017) e com prazos de validade estendidos,
11 impulsionando o desenvolvimento de diferentes formas de conservação, notadamente
12 por meio de bioconservantes.

13

14 2.4. CONSERVANTES QUÍMICOS: RISCOS DE INTOXICAÇÃO E

15 RESISTÊNCIA

16

17 Dentre as medidas de controle químico da contaminação fúngica, destaca-se o
18 emprego da Natamicina, um composto antimicrobiano, produzido durante o processo
19 fermentativo, pela bactéria *Streptomyces natalenses* (Furtado, 1991). Este composto
20 atua bloqueando o crescimento fúngico ao modificar a permeabilidade da membrana
21 fúngica (Welscher *et al.*, 2007).

22 Oliveira (2006), observou que o uso da Natamicina em queijos azuis, não
23 interfere no desenvolvimento de fungos desejados no interior da massa do
24 queijo, afetando apenas o crescimento de fungos oportunistas que possam surgir
25 na superfície. Entretanto, é imperativo salientar a necessidade de cuidado
26 rigoroso com relação à dosagem aplicada deste composto.

27 Estudos evidenciam a identificação de níveis de Natamicina superiores
28 aos limites estabelecidos pela legislação, bem como a detecção do composto no
29 interior dos queijos (Paseiro-Cerrato *et al.*, 2013; Vierikova, Hrniciarikova,
30 lehotay, 2013). Esta constatação suscita preocupações substanciais, uma vez
31 que, apesar de ser um composto naturalmente produzido, o consumo da

1 Natamicina é considerado seguro em dosagens até 0,3 mg/Kg/dia, conforme
2 estabelecido pela *European Food Safety Authority* (JECFA, 2017). Contudo
3 Suloff *et al.* (2003), relatam que a ingestão de 300 a 400 mg de Natamicina pode
4 resultar na manifestação de intoxicação. Para além da capacidade de
5 intoxicação, Streekstra *et al.*, (2016) reportam a observação do desenvolvimento
6 de tolerância de alguns fungos específicos após uso contínuo e prolongado de
7 Natamicina.

8 A análise desses achados ressalta a importância de um monitoramento
9 rigoroso dos níveis de Natamicina em produtos lácteos, considerando não só os
10 limites legais, mas também a segurança e potenciais efeitos adversos
11 associados ao seu consumo. Essa preocupação ganha relevância diante da
12 possibilidade de desenvolvimento de resistência por parte de certos fungos,
13 considerando que a Natamicina também é utilizada para tratamento de afecções
14 em humanos (Soares *et al.*, 2021).

15 Para além da Natamicina, a legislação brasileira (Brasil, 1996; ANVISA, 2023)
16 permite o uso de outros compostos químicos com propriedades conservantes em queijos,
17 tais como o ácido sórbico e seus sais de sódio, cálcio e potássio, além da Nisina e da
18 Lisozima. Essas substâncias são empregadas nos queijos com o propósito de controlar
19 microrganismos contaminantes (Garnier *et al.*, 2017; Ledenbach, Marshall, 2009).
20 Importante ressaltar que as concentrações inibitórias dos sorbatos são superiores às da
21 Natamicina, conforme relatado por Repts *et al.* (2002).

22 É de conhecimento que os fungos desenvolvem distintos mecanismos de
23 resistência aos conservantes (Garnier *et al.*, 2017). Estudos evidenciam a capacidade
24 do gênero *Penicillium* em crescer na presença de diferentes concentrações de
25 sorbatos (Davidson, 2001), ou mesmo sua habilidade de degradar o ácido
26 sórbico, resultando na inibição de sua ação como agente conservante (Marth *et al.*,
27 1966; Finol, Marth, Lindsay, 1982; Nielsen, De Boer, 2001; Ledenbach,
28 Marshall, 2009). A degradação de sorbatos pode ser acompanhada pela formação de
29 compostos voláteis com odores desagradáveis (Sensidone *et al.*, 1994), como o odor de
30 querosene e outros hidrocarbonetos que podem impregnar nos queijos (Davidson *et al.*,
31 2002).

1 Adicionalmente, pesquisas destacam que o emprego de conservantes
2 químicos pode estimular a produção de micotoxinas (Kogkaki *et al.*, 2016; Fodil *et*
3 *al.*, 2018). Esse fenômeno enfatiza a complexa interação entre a presença de
4 conservantes e a potencial formação de metabólitos tóxicos por microrganismos
5 presentes, aumentando a necessidade de avaliação cuidadosa das estratégias de
6 conservação utilizadas na indústria de laticínios.

7 Além dos desafios já mencionados, o emprego de antimicrobianos e
8 conservantes químicos pode resultar em perdas nutricionais e modificações das
9 características organolépticas dos queijos (Awasti, Anand, 2020). Lanita e Silva (2008),
10 complementam que algumas medidas adotadas para evitar a contaminação e o
11 desenvolvimento fúngico, podem ser economicamente inviáveis, podendo gerar resíduos
12 no alimento e até mesmo causar danos ambientais. Deve-se considerar a dificuldade de
13 realizar a remoção seletiva apenas da microbiota contaminante, sem prejudicar a
14 microbiota residente essencial para a maturação dos queijos.

15 As complicações associadas ao uso de conservantes químicos, a incerteza do
16 retorno do investimento do desempenho do produto, e as possíveis alterações
17 organolépticas induzidas pelos conservantes, tem impulsionado a busca por tecnologias,
18 como culturas bioprotetoras (Delavanne *et al.*, 2015). Essas abordagens inovadoras
19 buscam não apenas preservar a qualidade e a segurança dos queijos, mas também
20 mitigar os impactos negativos sobre as propriedades nutricionais e sensoriais, atendendo
21 assim às expectativas dos consumidores por produtos lácteos mais naturais e
22 sustentáveis.

23
24
25
26
27
28
29
30
31

2.5. MICROBIOTA DOS QUEIJOS

Os queijos representam alimentos de elevado valor nutricional, notavelmente ricos em vitaminas, lipídeos e proteínas de alta qualidade (Feeney *et al.*, 2016). Estes elementos são compostos secundários derivados da metabolização dos nutrientes presentes no leite, provida pela microbiota do queijo que é predominantemente constituída por BAL (Tilocca *et al.*, 2020). Os compostos secundários podem servir de substrato para o desenvolvimento de outros microrganismos, tanto desejáveis para a qualidade do queijo, quanto indesejáveis.

A microbiota do queijo pode compreender tanto microrganismos que contribuem para as características desejáveis do produto, como microrganismos oportunistas, deteriorantes e patogênicos. Estes podem advir da matéria prima ou serem incorporados à microbiota durante os estágios de fabricação, maturação e estocagem (Boor *et al.*, 2017; Mayo, Ammor, Alegria, 2010; Wouters *et al.*, 2002).

Devido a intensa manipulação dos queijos, desde a fase de produção até a distribuição, os riscos de contaminação microbiológica nesses produtos são significativamente ampliados (Giannoglou *et al.*, 2020, Mayo *et al.*, 2021, Tilocca *et al.*, 2020).

2.5.1 Interações entre os Microrganismos Presentes no Queijo

O queijo é considerado um ecossistema devido à grande variedade de microrganismos que habitam este alimento e às complexas interações existentes entre eles.

Na complexa microbiota deste alimento, encontramos uma diversidade de bactérias (Yeluri *et al.*, 2018), fungos (Garnier *et al.*, 2017, Pitt, Hocking, 2022) e partículas virais, comumente bacteriófagos (Mahony *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2018). É crucial considerar que, além dos microrganismos essenciais para o desenvolvimento das características tecnológicas e organolépticas dos queijos, tem-se também a presença de agentes contaminantes oportunistas, deteriorantes e patogênicos (Mayo *et al.*, 2021).

1 Características intrínsecas ao produto, como os nutrientes, compostos
2 metabólicos inibidores e estimuladores, pH e umidade, bem como fatores extrínsecos
3 como temperatura, umidade relativa e disponibilidade de oxigênio (De Pasquale *et al.*,
4 2016), quando combinados, determinam o crescimento e a função do microrganismo
5 presente na microbiota do queijo. Essas condições influenciam processos bioquímicos e
6 metabólicos que culminam na definição de características organolépticas específicas,
7 podendo enaltecer as qualidades do produto ou até comprometer a segurança de seu
8 consumo (Fox *et al.* 2017).

9 As interações tróficas, como competição, amensalismo, comensalismo e
10 mutualismo (Mayo *et al.*, 2021), presentes entre os diferentes microrganismos nos
11 queijos, são mediadas por diversos mecanismos bioquímicos, que limitam ou estimulam
12 o desenvolvimento de algumas espécies de acordo com os recursos metabólicos e
13 condições ambientais disponíveis (Embree *et al.*, 2015; Thommes *et al.*, 2019). Tais
14 interações impactam na composição, diversidade e funcionalidade da microbiota do
15 queijo (Koropatkin, Cameron, Martens, 2012; Baran *et al.*, 2015; O'Connor *et al.*, 2020).

16 Alguns microrganismos podem ser controlados e ter seu desenvolvimento
17 comprometido pela interação com metabólitos e substâncias antimicrobianas produzidas
18 por outros integrantes da microbiota. (O' Connor *et al.*, 2020). Com relação aos fungos,
19 Afshari *et al.* (2020) e Geugniez *et al.* (2017), relatam que a presença de fungos benéficos
20 em queijos artesanais proporciona a inibição de alguns fungos contaminantes, Wang *et al.*
21 (2019), descreve o potencial antimicrobiano de polissacarídeos fúngicos contra
22 patógenos como *E. coli* e *S. aureus* e, Araújo (2021), relata que polissacarídeos de
23 parede de leveduras apresentam atividade antimicrobiana contra algumas bactérias
24 patogênicas. Destaca-se que a competição entre os microrganismos pode ser um
25 mecanismo estimulador da produção de micotoxinas (Fox, Howlett, 2008) que podem
26 interferir no processo de respiração bacteriana (Kopp-Holtwiesche, Rehm, 1990).

27 Com relação as bactérias, tem-se diversos estudos com bactérias isoladas de
28 leite (Ramos-Pereira *et al.*, 2021), produtos lácteos como Kefir (Zani, Carriero, 2021) e
29 queijos (De Antônio, Borelli, 2020; Mareze *et al.*, 2021; De Souza Lima, Carbonera,
30 Helbig, 2022) com potencial de inibição das principais bactérias patogênicas (De Antônio,
31 Borelli, 2020, Zani, Carriero, 2021; De Souza Lima, Carbonera, Helbig, 2022), e alguns

1 fungos contaminantes de alimentos, incluindo *P. commune* (Dailé, Deschamps, Richard-
2 Forget, 2010; Ramos-Pereira *et al.*, 2021).

3

4 2.6. BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL)

5

6 A diversidade de bactérias potencialmente presentes nos queijos é ampla, sendo
7 notável a presença predominante das BAL (Mayo *et al.*, 2021). A elevada concentração
8 de BAL nos queijos está relacionada à introdução de culturas lácticas para fermentação
9 do queijo, assim como à diversidade das BAL presente no leite utilizado como matéria
10 prima (Boor *et al.*, 2017). Nos queijos, essas bactérias são responsáveis pelo processo
11 de acidificação, contribuem para a coagulação e conferem características de sabor e de
12 textura durante a maturação dos queijos (Sudhakaran, Minj, 2020).

13 As BAL compreendem um grande grupo de bactérias, produtoras de ácido lático
14 a partir da fermentação de carboidratos (Holzapfel, Wood, 2014). Este grupo é constituído
15 por microrganismos gram-positivos, catalase- negativos, classificados como
16 homofermentativos ou heterofermentativos, e podem ser mesofílicos ou termofílicos (Von
17 Wright, Axelsson, 2019), tendo como principais representantes, os *Lactobacillus* (Ibrahim,
18 Ouwehand, 2019).

19 Dentre os metabólitos produzidos pelas bactérias ácido lácticas, destaca-se os
20 ácidos orgânicos, capazes de inibir o desenvolvimento de alguns microrganismos (Salas
21 *et al.*, 2019) pela redução o pH do meio e acidificação do citoplasma celular (Schnürer,
22 Mangusson, 2005). A produção de peróxido de hidrogênio, também advém de atividades
23 metabólicas das BAL, representa uma ameaça a microrganismos como os fungos
24 (Schnurer, Magnusson, 2005). Em resposta ao contato com o peróxido de hidrogênio, os
25 fungos podem, em uma tentativa de detoxificação, produzir micotoxinas (Hymery *et al.*,
26 2014). Além disso, o metabolismo bacteriano inclui peptídeos bioativos, como as
27 bacteriocinas, capazes de inativar diversos microrganismos patogênicos (Sharma *et al.*,
28 2018; Ng *et al.*, 2020).

29 Diversos estudos avaliaram a capacidade das BAL em inibir o desenvolvimento
30 de patógenos como *Listeria monocytogenes* (Martines *et al.*, 2015), *S. aureus* (Delbès-

1 Paus *et al.*, 2010), *Salmonella* spp. (Ferrari *et al.*, 2016), *Clostridium* sp. (Garde *et al.*,
2 2016), dentre outros microrganismos.

3 Considerando que o mercado consumidor está em busca de alimentos menos
4 processados e livres de conservantes químicos (Silva, Silva, Ribeiro, 2018), além dos
5 desafios enfrentados pelas indústrias para o controle de diferentes microrganismos,
6 especialmente a dificuldade no controle dos fungos e a ineficácia dos compostos
7 conservantes e os custos associados, aprimorar o uso de microrganismos com atividade
8 antagônica aos principais patógenos e deteriorantes tem se tornado uma abordagem
9 importante, com as BAL assumindo destaque como agentes de biocontrole de fungos,
10 reduzindo e controlando a produção de micotoxinas.

11

12 4.6.1 *Lactiplantibacillus plantarum* e sua Habilidade Antimicrobiana

13

14 A *L. plantarum* é umas das espécies utilizadas pela indústria como alternativa
15 eficaz de biocontrole. Ela tem a Presunção Qualificada de Segurança (PQS) pelas
16 Autoridades Europeias de Segurança Alimentar (EFSA, 2005), e está listada como
17 “Geralmente Reconhecida como Segura” (GRAS) pela *Food Drugs and Administration*
18 (FDA) (Hazards *et al.*, 2017; Echegaray *et al.*, 2023).

19 Esta espécie se destaca pela promoção de características organolépticas em
20 produtos lácteos (Chen, Hang, 2019) e por sua notável capacidade em controlar o
21 desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos (Jeong *et al.*, 2021;
22 Surve, Shinde, Kulkarni, 2022), além de produzir metabólitos com propriedades benéficas
23 à saúde (Ibrahim, Ouwehand, 2019; Echegaray *et al.*, 2023).

24 Pesquisas avaliaram a eficácia do *L. plantarum* em combater diferentes fungos
25 (Zhang *et al.*, 2016; Russo *et al.*, 2017), incluindo o *P. commune*, considerado um dos
26 fungos contaminantes mais comumente encontrado em queijos maturado e cujo controle
27 é desafiador (Cabo *et al.*, 2002; Cheong *et al.*, 2014; Salas *et al.*, 2018). Estudos
28 conduzidos por Mareze *et al.* (2021), destacam que o *L. plantarum* (L119) apresenta
29 habilidade de inibir o desenvolvimento de patógenos alimentares, como *E. coli*,
30 *Salmonella entérica*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Além disso, demonstra eficácia em
31 reduzir o desenvolvimento do *P. commune* e a produção de CPA, tanto *in vitro*, quanto

1 em fatias de queijos. Entretanto, ressaltando a necessidade de estudos adicionais para
2 elucidar como esse processo ocorreria em peças de queijo produzidas em escala.

3 Assim, a utilização das interações microbianas no controle de microrganismos
4 indesejáveis tem se mostrado uma via bastante promissora em alimentos, sobretudo nos
5 queijos.

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

3. REFERÊNCIAS

ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. **Consumo per capita de queijos no Brasil**. Disponível em: https://www.abiq.com.br/home_queijos.asp.

Araújo, J. P. A.; Camargo, A. C.; Carvalho, A. F.; Nero, L. A. Uma análise histórico-crítica sobre o desenvolvimento das normas brasileiras relacionadas a queijos artesanais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 5, p. 1845-1860, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1678-4162-11766_

ABLV. Associação Brasileira da Indústria de Láceos Longa Vida. **Relatório Anual 2022**. 2022. 44p. Disponível em: <https://ablv.org.br/wp-content/uploads/2023/08/ABLV-Relatorio-Anual-2022s.pdf>.

Afshari, R.; Pillidge, C. J.; Dias, D. A.; Osborn, A. M.; Gill, H. Cheesomics: the future pathway to understanding cheese flavour and quality. *Critical Reviews. Food Science and Nutrition*. v. 60, n. 1, p. 33-47, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1512471>.

Anelli, P.; Haidukowski, M.; Epifani, F.; Cimmarusti, M. T.; Moretti, A.; Logrieco, A.; Susca A. Fungal mycobiota and mycotoxin risk for traditional artisan Italian cave cheese. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 78, sn, p. 62-72, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.014>.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa nº 211, de 1 de março de 2023**. Estabelece as funções tecnológicas, os limites máximos e as condições de uso para os aditivos alimentares e os coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em alimentos. Diário Oficial da União, nº 46, 2003.

Aran, N.; EKE, D. Mould mycoflora of Ka₂ cheese at the stage of consumption. **Food Microbiology**, v. 4, sn, p. 101–104, 1987. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(87\)90024-4](https://doi.org/10.1016/0740-0020(87)90024-4).

Araújo, I. M. F. **Prospecção da atividade antimicrobiana de polissacarídeos extraídos das paredes celulares das leveduras *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces cerevisiae***. 2021. 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) Departamento de Biologia. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2021. Disponível em: <https://repository.ufrpe.br/handle/123456789/3786>.

- 1 Awast, N.; Anand, S. The Role of Yeast and Molds in Dairy Industry: An update. In: Minj,
2 J.; Kumari, A.; Sudhakaran V, A. **Dairy Processing: Advanced Research to**
3 **Applications**. Springer, 2020. p. 243- 262. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-](https://doi.org/10.1007/978-981-15-2608-4)
4 981-15-2608-4.
- 5 Banjara, N.; Suhr, M. J.; Hallen-Adams, H. E. Diversity of yeast and mold species from a
6 variety of cheese types. **Current Microbiology**, v. 70, sn, p. 792-800, 2015. Disponível
7 em: <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0790-1>.
- 8 Baran, R.; Brodie, E. L.; Mayberry-Lewis, J.; Hummel, E.; Da Rocha, U. N.; Chakraborty,
9 R.; Bowen, B. P.; Karaoz, U.; Cadillo-Quiroz, H.; Garcia-Pichel, F. Exometabolite niche
10 partitioning among sympatric soil bacteria. **Nature Communications**, v. 6, sn, p. 8289,
11 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncomms9289>.
- 12 Basílico, J. C.; Debasílico, M. Z.; Chiericatti, C.; Vinderola, C. G. Characterizaion and
13 control of thread mould in cheese. **Letters in Applied Microbiology International**, v. 32,
14 sn, p. 419–423, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2001.00934.x>.
- 15 Baylis, C. L. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin-
16 producing *Escherichia coli*. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 3, p.
17 293-307, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00504.x>.
- 18 Beletsiotis, E.; Ghikas, D.; Kalantzi, K. Incorporation of microbiological and molecular
19 methods in HACCP monitoring scheme of molds and yeasts in a Greek dairy plant: A case
20 study. **Procedia Food Science**, v. 1, sn, p. 1051–1059, 2011. Disponível em:
21 <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.157>.
- 22 Boor, K. J.; Wiedmann, M.; Murphy, S.; Alcaine, S. A 100-Year Review: Microbiology and
23 safety of milk handling. **Journal of Dairy Science**, v. 100, sn, p. 9933–9951, 2017.
24 Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12969>.
- 25 Borelli, B. M.; Lacerda, I. C. A.; Penido, F. C. L.; Rosa A. C. Traditional Cheeses Produced
26 in Brazil: Characterization, Production Technologies, and Health Implications. In:
27 PERKINS, E. (Ed.). **Food microbiology fundamentals, challenges, and health**
28 **implications**. New York: Nova Science Publisher, Inc., 2016. cap.7, p.161-189.
- 29 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.
30 **Resolução RDC, nº 7, de 18 de fevereiro de 2011**. Dispõe sobre limites máximos
31 tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 2011.

- 1 Bryden, W. L. Occurrence and biological effects of cyclopiazonic acid. In: Mise K.;
2 Richard, J. L. (Ed.). **Emerging food safety problems resulting from microbiological**
3 **contamination**. Toxic Microorganisms Panel of the UJNR, 1991.
- 4 Bullerman, L. B.; Olivigni, L. B. Mycotoxin producing-potential of molds isolated from
5 cheddar cheese. **Journal of Food Science**, v. 39, n. 6, p. 1166–1168. Disponível em:
6 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1974.tb07345.x>.
- 7 Bundgaard-Nielsen, K.; Nielsen, Per V. Fungicidal effect of 15 disinfectants against 25
8 fungal contaminants commonly found in bread and cheese manufacturing. **Journal of**
9 **food protection**, v. 59, n. 3, p. 268-275, 1996. Disponível em:
10 <https://doi.org/10.4315/0362-028x-59.3.268>.
- 11 Cabo, M. L.; Braber, A. F.; Koenraad, P. M. F. J. Apparent antifungal activity of several
12 lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium.
13 **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 8, p. 1309-1316, 2002. Disponível em:
14 <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.8.1309>.
- 15 Carlos F. G.; Benevenuto, W. C. A. N.; Benevenuto Júnior, A. A.; Silva, J. G. Avaliação
16 da qualidade da salmoura durante seu período de utilização em indústrias de laticínios.
17 **Higiene Alimentar**, v. 31, n. 270/271, p. 119-123, 2017. Disponível em:
18 <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2017/08/848955/270-271-jul-ago-2017-119-123.pdf>.
- 19 César, I. C. R. **Caracterização de fungos filamentosos do Queijo Minas Artesanal da**
20 **região da Canastra**. 2019. 61 f. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola,
21 Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2019.
- 22 Chalupová, J.; Raus, M.; Sedlarova, M.; Sebel, M. Identification of fungal
23 microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. **Biotechnology advances**, v. 32, n.
24 1, p. 230-241, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.002>.
- 25 Chen, W. Hang, F. Lactic Acid Bacteria Starter. In: Chen, W. (Ed.). **Lactic Acid Bacteria**.
26 Springer, 2020. p. 93-143. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-13-7283-4_5.
- 27 Chaves, A. C. S. D.; Stehling, C. A. V.; Souza, G. N. De; Santos, L. C. R. Dos; Gomes,
28 P. B.; Castro, R. A. B. De; Monteiro, R. P. **Queijos artesanais brasileiros**.
29 Sebrae/Embrapa, 2021. 16p.
- 30 Cheong, E. Y. L.; Sandhu, A.; Jayabalan, J.; Kieu Le, T. T.; Nhiep, N. T.; My Ho, H. T.;
31 Zwielehner, J.; Bansal, N.; Turner, M. S. Isolation of lactic acid bacteria with antifungal

- 1 activity against the common cheese spoilage mold *Penicillium commune* and their
2 potential as biopreservatives in cheese. **Frontier in Microbiology**, v. 46, sn., p. 91–97,
3 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.011>.
- 4 Cirne, C.T.; Tunick, M.H.; Trout, R.E. The chemical and attitudinal differences between
5 commercial and artisanal products. **NPJ Science of Food**, v. 3, n. 19, p. 19, 2019.
6 Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41538-019-0053-9>.
- 7 Costa, R. G. B.; Martins, M. F.; Mendonça, J. F. M. De; Borges, M. De F. **Controle de**
8 **qualidade em queijo minas padrão: métodos físico-químicos, microbiológicos e**
9 **moleculares**. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 83p.
- 10 CLSI. Norma M38-A-Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a
11 **Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos:**
12 **Norma Aprovada**, v. 22, n. 16, 2002.
- 13 Dalié, D. K. D.; Deschamps, A. M.; Richard-Forget, F. Lactic acid bacteria – Potential for
14 control of mould growth and mycotoxins: A review. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 370–380,
15 2010. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.07.011>.
- 16 Da Silva e Rocha, L.; Gomes da Cruz, A. Queijos Artesanais Brasileiros: História Do
17 Consumo E Aspectos Regulatórios. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**,
18 v. 3, n. 1, p. 26–39, 2022. Disponível em:
19 <https://revistascientificas.ifrj.edu.br/index.php/alimentos/article/view/2223>
- 20 Davidson, P. M. Chemical preservatives, and natural antimicrobial compounds. In: Doyle,
21 M. P.; Beuchat, L. R.; Montville, T. J. (Eds.). **Food Microbiology: Fundamentals and**
22 **Frontiers**, 2 ed. ASM Press, 2001. pp. 593-627.
- 23 Davidson P. M., Juneja V. K., Branen J. K., Antimicrobial Agents. In: Branen A. L.,
24 Davidson P. M., Salminen S., Thorngate III J. H. (Eds.). **Food Additives**, 2 ed. Marcel
25 Dekker, Inc., 2002. 934p.
- 26 De Almeida, A. C.; De Gusmão, N. B. **Caracterização de leveduras isoladas de queijos**
27 **de coalho**. 2011. 66f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia
28 de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011. Disponível em:
29 https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/976/1/arquivo6497_1.pdf.
- 30 De Antônio, M. B.; Borelli, B. A importância das bactérias lácticas na segurança e
31 qualidade dos queijos Minas artesanais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido**

- 1 **Tostes**, v. 75, n. 3, p. 204-221, 2020. Disponível em: [http://doi.org/10.14295/2238-](http://doi.org/10.14295/2238-6416.v75i3.799)
2 6416.v75i3.799.
- 3 Decontardi, S.; Soares, C.; Lima, N.; Battilani, P. Polyphasic identification of *Penicillia* and
4 *Aspergilli* isolated from Italian grana cheese. **Food microbiology**, v. 73, sn., p. 137-149,
5 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.01.012>.
- 6 Delavenne, E., Cliquet, S., Trunet, C., Barbier, G., Mounier, J.; Le Blay, G. (2015).
7 Characterization of the antifungal activity of *Lactobacillus harbinensis* K. V9.3.1Np and
8 *Lactobacillus rhamnosus* K.C8.3.1l in yogurt. **Food Microbiology**, v.45, sn., p. 10–17.
9 Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.017>.
- 10 Delbès-Paus, C.; Dorchies, G.; Chaabna, Z.; Callon, C.; Montel, M.C. Contribution of
11 hydrogen peroxide to the inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Lactococcus garvieae* in
12 interaction with raw milk microbial community. **Food Microbiology**. v. 27, n. 7, p. 924–
13 932, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.031>.
- 14 De Pasquale, I.; Di Cagno, R.; Buchin, S.; De Angelis, M.; Gobbetti, M. Spatial distribution
15 of the metabolically active microbiota within Italian PDO ewes' milk cheeses. **PLoS ONE**,
16 v.11, n. 4, e0153213. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153213>.
- 17 De Sousa Lima, C. H. G.; Carbonera, N.; Helbig, E. Propriedades antimicrobianas e
18 tecnológicas de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos tradicionais do tipo Colonial
19 do Sul do Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 77, n. 1, p. 21-
20 31, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v77i1.885>.
- 21 Dias, J. C. **Uma longa e deliciosa viagem: o primeiro livro da história do queijo no**
22 **Brasil**. Barleus, 2010. 4p.
- 23 Diblasi, L.; Arrighi, F.; Silva, J.; Bardón, A.; Cartagena, E. *Penicillium commune* metabolic
24 profile as a promising source of antipathogenic natural products. **Natural Product**
25 **Research**, v. 29, n. 23, p. 2181–2187, 2015. Disponível em:
26 <http://doi.org/10.1080/14786419.2015.1007457>].
- 27 DORES, M.; FERREIRA, L. F. Queijo Minas Artesanal , Tradição Centenária : Ameaças
28 E Minas Artesanal Cheese , Centennial Tradition : Threats and Challenges. **Revista**
29 **Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 2, n. 2, p. 26–34, 2008. Disponível
30 em: <https://doi.org/10.21206/rbas.v2i2.163>.

- 1 Echegaray, N.; Yilmaz, B.; Sharma, H.; Kumar, M.; Pateiro, M.; Ozogul, F.; Lorenzo, J. M.
2 A novel approach to *Lactiplantibacillus plantarum* from probiotic Properties to the omic
3 insights. **Microbiological Research**, v. 268, sn., p. 127-289, 2023. Disponível em:
4 <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127289>.
- 5 EMATER. Instituto de Inovação para o Desenvolvimento Rural Sustentável. **Dia Mundial**
6 **do Queijo**. Publicação virtual. dia 20/01/2022. Disponível em:
7 [https://www.emater.mg.gov.br/portal.do/site-noticias/dia-mundial-do-](https://www.emater.mg.gov.br/portal.do/site-noticias/dia-mundial-do-queijo/?flagweb=novosite_pagina_interna_noticia&id=26194)
8 [queijo/?flagweb=novosite_pagina_interna_noticia&id=26194](https://www.emater.mg.gov.br/portal.do/site-noticias/dia-mundial-do-queijo/?flagweb=novosite_pagina_interna_noticia&id=26194).
- 9 Embree, M.; Liu, J.K.; Al-Bassam, M.M.; Zengler, K. Networks of energetic and metabolic
10 interactions define dynamics in microbial communities. **The Proceedings of the National**
11 **Academy of Sciences**, v. 112, n. 50, p. 15450–15455. 2015. Disponível em:
12 <https://doi.org/10.1073/pnas.1506034112>.
- 13 Endo A. The origin of the statins. **International Congress Series**, v.1262, sn., p. 3– 8,
14 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ics.2003.12.099>.
- 15 EFSA. Autoridade Europeia para Segurança Alimentar. Opinion of the scientific panel on
16 food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food, on a
17 request from the commission related to the use of polyvinyl alcohol as a coating agent for
18 food supplements (question number EFSA-Q-2005-017). **The EFSA Journal**, v. 4, n. 2,
19 p. 294, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2006.294>.
- 20 FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nation. **Micotoxins**. 2021.
21 <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins>.
- 22 FAO. Food and Agriculture Organization of The United Nation. **Sustainable**
23 **Development Goal 12**. Responsible Consumption and Production Patterns. 2022.
24 Disponível em: <https://www.fao.org/3/cc1403en/online/cc1403en.html#/12>.
- 25 Feeney, E. L.; Nugent, A. P.; Nulty, B. Mc.; Walton, J.; Flynn, A.; Gibney, E. R. An
26 overview of the contribution of dairy and cheese intakes to nutrient intakes in the Irish diet:
27 results from the National Adult Nutrition Survey. **British Journal of Nutrition**, v. 115, n.
28 4, p. 709-717, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S000711451500495X>.
- 29 Ferrari Ida, S.; de Souza, J. V.; Ramos, C. L.; da Costa, M. M.; Schwan, R. F.; Dias, F. S.
30 Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to

- 1 evaluate the inhibition of *Salmonella typhi* in artisanal cheese. **Food Microbiology**, v. 60,
2 sn., p. 29–38, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.06.014>.
- 3 Ferreira, V. R. **Queijos artesanais brasileiros**. Projeto de Inteligência Estratégica:
4 agregação de valor para os pequenos negócios rurais. Brasília, DF: Embrapa: SEBRAE,
5 2021. 15 p. Disponível em:
6 [https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/226359/1/Queijos-](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/226359/1/Queijos-ARTESANAISBRASILEIROS.PDF)
7 [ARTESANAISBRASILEIROS.PDF](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/226359/1/Queijos-ARTESANAISBRASILEIROS.PDF).
- 8 Ferreira, W.; Sousa, J., **Microbiologia**, Volume 2, LIDEL, 2000.333p.
- 9 Finol, M. L.; Marth, E. H.; Lindsay, R. C. Depletion of Sorbate from Different Media During
10 Growth of *Penicillium* Species. **Journal of Food Protection**, v.45, n.5, p. 398–404, 1982.
11 Disponível em: <http://doi.org/10.4315/0362-028x-45.5.398>.
- 12 Fox, E. M.; Howlett, B.J. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology.
13 **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 6, p.481–7, 2008. Disponível em:
14 <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.10.007>
- 15 Fox, P. F.; Guinee, T. P.; Cogan, T. M.; McSweeney, P. L. H. Microbiology of cheese
16 ripening. In: Fox, P. F.; Guinee, T. P.; Cogan, T. M.; McSweeney, P. L. H. **Fundamentals**
17 **of Cheese Science**. Springer, 2017; p. 333–390.
- 18 Frisvad, J. C.; Filtenborg, O.; Thrane, U. Analysis and screening for mycotoxins and other
19 secondary metabolites in fungal cultures by thin-layer chromatography and high-
20 performance liquid chromatography. **Archives of Environmental Contamination and**
21 **Toxicology**, v.18, n. 3, p. 331–335, 1989. Disponível em:
22 <http://doi.org/10.1007/bf01062357>.
- 23 Filtenborg, O.; Frisvad, J. C.; Thrane, U. Moulds in food spoilage. **International Journal**
24 **of Food Microbiology**, v. 33, n.1, p. 85–102, 1996. Disponível em:
25 [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01153-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01153-1).
- 26 Fodil, S.; Delgado, J.; Varvaro, L.; Yaseen, T.; Rodríguez, A. Effect of potassium sorbate
27 (E-202) and the antifungal PgAFP protein on *Aspergillus carbonarius* growth and
28 ochratoxin A production in raisin simulating media. **Journal of the Science of Food and**
29 **Agriculture**, v. 98, n. 15, p. 5785-5794, 2018. Disponível em:
30 <https://doi.org/10.1002/jsfa.9128>.

- 1 Freire, F. C. O.; Vieira I. G. P.; Guedes M. I. F.; Mendes, F. N. P. **Micotoxinas:**
2 Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal. Empresa Brasileira de
3 Pesquisa Agropecuária. Embrapa Agroindústria Tropical. Ministério da Agricultura,
4 Pecuária e Abastecimento, 2007. p. 09-38. ISSN 1677- 1915.
- 5 FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do queijo**. 2. ed. São Paulo: Globo, 1991. 297p.
- 6 Garde, S.; Ávila, M.; Arias, R.; Gaya, P.; Núñez, M. Outgrowth inhibition of *Clostridium*
7 *beijerinckii* spores by a bacteriocin producing lactic culture in ovine milk cheese.
8 **International Journal of Food Microbiology**, v. 150, n. 1, p. 59–65, 2011. Disponível
9 em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.018>.
- 10 Garcia, J. K. S.; Prates, R. P.; Farias, P. K. S.; Gonçalves, S. F.; Souza, C. N. Qualidade
11 microbiológica de queijos frescos artesanais comercializados na região norte de Minas
12 Gerais. **Caderno de Ciências Agrárias**, v.8, n. 2. P. 58-65, 2016. Disponível em:
13 <https://periodicos.ufmg.br/index.php/ccaufmg/article/view/2924/1768>. ISSN 2447-6218.
- 14 Garnier, L.; Valence, F.; Pawtowski, A.; Auhustsinava-Galerie, L.; Frotté, N.; Baroncelli,
15 R.; Deniel, F.; Cotton, E.; Mounier, J. Diversity of spoilage fungi associated with French
16 dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, sn., p.191–197,
17 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026>.
- 18 Geronikou, A.; Srimahaeak, T.; Rantsiou, K.; Triantafillidis, G.; Larsen, N.; Jespersen, L.
19 Occurrence of yeasts in white-brined cheeses: Methodologies for identification, spoilage
20 potential and good manufacturing practices. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 582778,
21 p.1-21, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582778>.
- 22 Geugniez, A.; Taminiau, B.; Coucheney, F.; Jacques, P.; Delcenserie, V.; Daub, G.; Drid,
23 R, D. -Fungal diversity of “Tomme d’Orchies” cheese during the ripening process as
24 revealed by a metagenomic study. **International Journal of Food Microbiology**. v. 258,
25 sn., p. 89-932017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.015>.
- 26 Giannoglou, M.; Stergiou, P.; Dimitrakellis, P.; Gogolides, E.; Stoforos, N. G.; Katsaros,
27 G. Effect of Cold Atmospheric Plasma Processing on Quality and Shelf-Life of Ready-to-
28 Eat Rocket Leafy Salad. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 66,
29 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102502>.
- 30 Golic, N.; Cadež, N.; Terzic-Vidojevic, A.; Šuranská, H.; Beganovic, J.; Lozo, J.; Kos, B.;
31 Suskovic, J.; Raspor, P.; Topisirovic, L. Evaluation of lactic acid bacteria and yeast

- 1 diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of
2 Serbia and lowland regions of Croatia. **International Journal of Food Microbiology**, v.
3 166, n. 2, p. 294–300, 2013. Disponível em:
4 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.032>.
- 5 Gontijo, M. T. P.; Silva, J. S.; Vidigal, P. M. P.; Martin, J. G. P. Phylogenetic distribution
6 of the bacteriocin repertoire of lactic acid bacteria species associated with artisanal
7 cheese. **Food Research International**, v. 128, sn., p. 1-38, 2020. Disponível em:
8 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108783>.
- 9 Gori, K.; Ryssel, M.; Arneborg, N.; Jespersen, L. Isolation and Identification of the
10 Microbiota of Danish Farmhouse and Industrially Produced Surface-ripened Cheeses.
11 **Microbial Ecology**, v. 65, n. 3, p. 602–615, 2012. Disponível em:
12 <https://doi.org/10.1007%2Fs00248-012-0138-3>.
- 13 Gougouli, M.; Kalantzi, K.; Beletsiotis, E.; Koutsoumanis, K.P. Development and
14 application of predictive models for fungal growth as tools to improve quality control in
15 yogurt production. **Food Microbiology**, v. 28, n. 8 p.1453–1462, 2011. Disponível em:
16 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.07.006>.
- 17 Haasum, I.; Nielsen, P.V. Physiological characterization of common fungi associated with
18 cheese. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 1, p. 157–161. 1998.
19 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15699.x>.
- 20 Hassanin, I. N. Detection of mycotoxigenic fungi and bacteria in processed cheese in
21 Egypt. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 31, n. 1, p. 15-23, 1993.
22 Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(93\)90011-P](https://doi.org/10.1016/0964-8305(93)90011-P).
- 23 Hazards, E.; Panel, O. B.; Ricci, A.; Allende, A.; Bolton, D.; Chemaly, M.; Davies, R.;
24 Fernández Escámez P. S. Update of the list of QPS-recommended biological agents
25 intentionally added to food or feed as notified to EFSA 5: suitability of taxonomic units
26 notified to EFSA until September 2016. **EFSA Journal**, v. 15, n. 3, e07045, 2017.
27 Disponível em: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7045>.
- 28 Hocking, A. D.; Faedo, M. Fungi causing thread mould spoilage of vacuum packaged
29 Cheddar cheese during maturation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 16,
30 n.2, p. 123-130, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(92\)90005-N](https://doi.org/10.1016/0168-1605(92)90005-N).
- 31 Holzapfel, W.H.; WOOD, B.J.B. **Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy.**

- 1 Wiley-Blackwell, 2014. 593p. ISBN: 978-1-444-33383-1.
- 2 HUIS IN'T VELD, J. H. J. H. I. Microbial and biochemical spoilage of foods: An overview.
- 3 **International Journal of Food Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 1–18, 1996. Disponível em:
- 4 [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01139-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01139-7).
- 5 Hymery, N.; Vasseur, V.; Coton, M.; Mounier, J.; Jany, J-L.; Barbier, G.; Coton, E.
- 6 Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review. **Comprehensive Reviews in**
- 7 **Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 437–456, 2014. Disponível em:
- 8 <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12069>.
- 9 Ibrahim, F.; Ouwehand, A.C. The genus *Lactobacillus*. In: Viderola, G.; Ouwehand, A.C.;
- 10 Salminen, S.; Wright, A.V. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**
- 11 5ed. CRC Press, 2019. p. 23. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/9780429057465>.
- 12 IEPHAN - Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais. **O modo**
- 13 **de fazer o queijo artesanal da região do Serro**. Belo Horizonte: Instituto Estadual do
- 14 Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais, 2018. 64 p.
- 15 IPHAN - Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. Ministério da Cultura.
- 16 Serviço Público Federal. **Certidão de Registro do modo artesanal de fazer queijo de**
- 17 **Minas, nas Regiões do Serro e nas Serras da Canastra e do Salitre**. Data do registro:
- 18 13 de junho de 2008. Brasília: Departamento do Patrimônio Imaterial do Instituto do
- 19 Patrimônio Histórico e Artístico Nacional, 2008. 2 p.
- 20 JECFA. 67th Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Safety**
- 21 **Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants**. JEFCA. Toxicological
- 22 recommendations and information on specifications, v. 67, n.7, p.1-11, 2007. Disponível
- 23 em: http://www.fao.org/ag/agn/jecfa/index_en.stm.
- 24 JANZEN, J. J.; BODINE, A. B.; BISHOP, J. R. Effects of Package Temperature and Days
- 25 of Storage on the Flavor Score of Processed Milk. **Journal of Food Protection**. v. 44, n.
- 26 6, p. 455-458, 1981. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/0362-028x-44.6.455>.
- 27 JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos** 6 ed. ArtMed, 2005. 712p.
- 28 Jeong, C. H.; Sohn, H.; Hwang, H.; Lee, H. J.; Kim, T. W.; Kim, D. S.; Han, S. G.; Hong
- 29 C. S. Comparison of the probiotic potential between *Lactiplantibacillus plantarum* isolated
- 30 from kimchi and standard probiotic strains isolated from different sources. **Foods**, v. 10,
- 31 n. 9, p. 2125, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods10092125>.

- 1 Jodral, M.; Liñan, E.; Acosta, I.; Gallego, C.; Roja, F.; Bentabol, A. Mycoflora and toxigenic
2 *Aspergillus flavus* in Spanish milks. **International Journal of Food Microbiology**. v. 18,
3 n. 2, p. 171-174, 1993. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(93\)90222-3](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)90222-3).
- 4 Jurado, M.; Vicente, C. *Penicillium commune* affects textural properties and waste
5 distribution of hard and extra-hard cheeses. **Journal of Dairy Research**, v. 8, n. 1, p.
6 117-122, 2020. Disponível em: <http://doi.org/10.1017/S0022029919000906>.
- 7 Kesenkas, H., and Akbulut, N. Yeasts as ripening adjunct cultures in Turkish white brined
8 cheese production. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, v. 32, n. 5, p.
9 327–333, 2008. Disponível em: <https://journals.tubitak.gov.tr/veterinary/vol32/iss5/2/>
- 10 Kogkaki, E. A.; Natskoulis, P. I.; Panagou, E. Z. Modeling the effect of natamycin, pine-
11 resin and environmental factors on the growth and OTA production by *Aspergillus*
12 *carbonarius* using response surface methodology. **Food Research International**, v. 79,
13 sn., p. 19-28, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.11.023>.
- 14 Kopp-Holtwiesche, B.; Rehm H.J. Antimicrobial action of roquefortine. **Journal of**
15 **Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 10, n. 1-2, p. 41–44, 1990.
16 PMID: 2231314.
- 17 Koropatkin, N. M.; Cameron, E. A.; Martens, E. C. How glycan metabolism shapes the
18 human gut microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 323–335, 2012.
19 Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2746>.
- 20 Korukluoglu, M.; Sahan, Y.; Yigit, A. The fungicidal efficacy of various commercial
21 disinfectants used in the food industry. **Annals of Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 325–330,
22 2006. Disponível em: <http://doi.org/10.1007/bf03175025>.
- 23 Kure, C. F.; Skaar, I. Mould growth on Norwegian semi-hard cheeses Norvegia and
24 Jarlsberg. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 1-2, p. 133-137, 2000.
25 Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00384-6](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00384-6).
- 26 Kure, C. F.; Skaar, I.; Brendehaug, J. Mould contamination in production of semi-hard
27 cheese. **International journal of food microbiology**, v. 93, n. 1, p. 41-49, 2004.
28 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.10.005>.
- 29 Kure, C. F.; Wasteson, Y.; Brendehaug, J.; Skaar, I. Mould contaminants on Jarlsberg
30 and Norvegia cheese blocks from four factories. **International Journal of Food**

- 1 **Microbiology**, v. 70, n. 1-2, p. 21–27, 2001. Disponível em:
2 [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00520-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00520-7).
- 3 Lanita, C. S.; Silva, S. B. Uso de ozônio em câmara industrial para controle de bolores e
4 leveduras durante a maturação de queijo tipo parmesão. **Brazilian Journal of Food**
5 **Technology**, v. 11, n. 3, p. 182–189, 2008. ISSN - 1981 – 6723.
- 6 Larsen, T. O.; Gareis, M.; Frisvad; J. C. Cell cytotoxicity and mycotoxin and secondary
7 metabolite production by common *Penicillia* on cheese. **Journal of Agricultural and**
8 **Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 6148-6152, 2002. Disponível em:
9 <https://doi.org/10.1021/jf020453i>.
- 10 Ledenbach, L. H.; Marshall, R. T. Microbiological Spoilage of Dairy Products. In: Sperber,
11 W., Doyle, M. (Eds.). **Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and**
12 **Beverages**, Springer, 2009. p. 41-67. Disponível em: [http://doi.org/10.1007/978-1-4419-](http://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1_2)
13 [0826-1_2](http://doi.org/10.1007/978-1-4419-0826-1_2).
- 14 Levinskaité, L. Susceptibility of food- contaminating *Penicillium* genus fungi to some
15 preservatives and disinfectants. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**,
16 v. 19, n. 1, p. 85-89, 2012. Disponível em: [https://www.aaem.pl/Susceptibility-of-food-](https://www.aaem.pl/Susceptibility-of-food-contaminating-Penicillium-genus-fungi-to-some-preservatives,71746,0,2.html)
17 [contaminating-Penicillium-genus-fungi-to-some-preservatives,71746,0,2.html](https://www.aaem.pl/Susceptibility-of-food-contaminating-Penicillium-genus-fungi-to-some-preservatives,71746,0,2.html).
- 18 Linares, D. M.; Del Rio, B.; Ladeiro, V.; Martínez, N.; Fernández, M.; Martín, Álvarez, M.
19 A. Factors influencing biogenic amines accumulation in dairy products. **Frontiers in**
20 **microbiology**, v. 3, sn., p. 180, 2012. Disponível em:
21 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00180>.
- 22 López-Villavicencio, M.; Auileta, G.; Giraud, T.; Vienne, D.M.; Lacoste, S.; Couloux, A.;
23 Dupont, J. Sex in *Penicillium*: Combined phylogenetic and experimental approaches.
24 **Fungal genetics and biology**, v. 47, n. 8, p. 693-706, 2010. Disponível em:
25 <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.05.002>.
- 26 Loureiro, V.; Querol, A. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and
27 beverages. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 11, p. 356-365, 1999.
28 Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)00021-2](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)00021-2).
- 29 Lourenço Neto, J. P. M. **Queijos: aspectos tecnológicos**. 1ed. Instituto Candido Tostes.
30 Master Graf, 2013.170-198p.

- 1 Lu, M.; Wang, N. S. Spoilage of Milk and Dairy Products. In: Bevilaqua, A.; Corbo, M. R.;
2 Sinigaglia, M. The microbiological Quality of Food. Foodborne Spoilers. **Food Science,**
3 **Technology and Nutrition**, Woodhead Publishing 2017. Chapter 7, p. 151-178.
4 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100502-6.00010-8>.
- 5 Lund, F.; Filtenborg, O.; Frisvad, J. C. Associated mycoflora of cheese. **Food**
6 **Microbiology**, v. 12, sn., p.173–180, 1995. Disponível em:
7 [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(95\)80094-8](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(95)80094-8).
- 8 Mahony, J.; Moscarelli, A.; Kelleher, P.; Lugli, G.A.; Ventura, M.; Settanni, L.; van
9 Sinderen, D. Phage biodiversity in artisanal cheese wheys reflects the complexity of the
10 fermentation process. **Viruses**, v. 9, n.3, p. 45, 2017. Disponível em:
11 <https://doi.org/10.3390/v9030045>.
- 12 Malhadas, C.; Malheiro, R. Pereira, J. A.; de Pinho, P. G.; Baptista, P. Antimicrobial
13 activity of endophytic fungi from olive tree leaves. **World Journal of Microbiology and**
14 **Biotechnology**, v. 33, n.3, p. 46 (1-12), 2017. Disponível em:
15 <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2216-7>.
- 16 MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa. **DAS**
17 **nº 66, de 21 de julho de 2020.**- Regulamento Técnico de que fixa a identidade e os
18 requisitos de qualidade que deve apresentar o queijo minas padrão. Diário Oficial da
19 União, ed. 140, seção 1, 2020.
- 20 MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 146, de 07 de**
21 **março de 1996** -Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos
22 Lácteos. Diário Oficial da União, ed.48, seção1, 1996.
- 23 MAREZE, P. **Inhibitory Potential of *Lactiplantibacillus Plantarum* as Biocontrol of**
24 **Spoilage and Mycotoxygenic *Penicillium* in Cheese.** 2021. 98 f. Tese (Doutorado em
25 Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias,
26 Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Londrina, 2021.
- 27 Marth, E. H.; Capp, C. M.; Hasenzahl, L.; Jackson, H. W.; Hussong, R. V. Degradation of
28 potassium sorbate by *Penicillium* species. **Journal of Dairy Science**, v. 49, n. 10, p.
29 1197–1205, 1966. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(66\)88053-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(66)88053-0).
- 30 Martinez, R. C.; Staliano, C. D.; Vieira, A. D.; Villarreal, M. L.; Todorov, S. D.; Saad, S.
31 M.; Franco, B. D. Bacteriocin production and inhibition of *Listeria monocytogenes* by

- 1 *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in a potentially synbiotic cheese spread. **Food**
2 **Microbiology**. v. 48, sn., p. 143–152, 2015. Disponível em:
3 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.12.010>.
- 4 Mayo, B.; Ammor, M. S.; Delgado, S.; Alegría, A. Fermented milk products. In: Tmang,
5 J.P., Kilasapathy, K. **Fermented Food and Beverages of the World**. Taylor & Francis,
6 2010; pp. 263–288. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/EBK1420094954>.
- 7 Mehla, R. Bioactive peptides in fermented milk products and their functionality. **Journal**
8 **of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 9, n. 1, p. 2123-2126, 2020. E-ISSN 2278-
9 4136.
- 10 Meneses, J. N. C. **Queijo Artesanal De Minas: Patrimônio Cultural do Brasil**. IPHAN,
11 2006. 156p.
- 12 Metin, B. Filamentous Fungi in Cheese Production. In: Budak, S. O.; Akal, H. C. **Microbial**
13 **Cultures and Enzymes in Dairy Technology**, 1ed, IGI Global, 2018. Cap. 14, p. 257-
14 275. Disponível em: <http://doi.org/10.4018/978-1-5225-5363-2.ch014>.
- 15 Montagna, M. T.; Santacroce, M. P.; Spilotros, G.; Napoli, C.; Minervini, F.; Papa, A.;
16 Dragoni, I. Investigation of fungal contamination in sheep and goat cheeses in southern
17 Italy. **Mycopathologia**, v. 158, n. 2, p. 245–249, 2004. Disponível em:
18 <https://doi.org/10.1023/b:myco.0000041897.17673.2c>.
- 19 Moubasher, A.H.; Abdel-Kader, M.I.A.; El-Kady, I.A. Toxigenic fungi isolated from
20 Roquefort cheese. **Mycopathologia**, v. 66, n. 3, p. 187–190, 1979. Disponível em:
21 <https://doi.org/10.1007/bf00683970>.
- 22 Murray, P., Rosenthal, K. Pfealler, M., **Microbiologia Médica**, 5ª Ed, Elsevier, 2006. 888
23 p.
- 24 Ng, Z. J.; Abu Zarin, M.; Lee, C. K.; Tan, J. S. Application of bacteriocins in food
25 preservation and infectious disease treatment for humans and livestock: A review. **RSC**
26 **Advances**, v. 10, n. 64, p.38937–38964, 2020. Disponível em:
27 <https://doi.org/10.1039/D0RA06161A>.
- 28 Netto, M. **A geografia do queijo minas artesanal**. 2011. 420f. Tese (Doutorado) -
29 Universidade Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro,
30 SP.

- 1 Nielsen, P. V.; De Boer, E. Food preservatives against fungi. In: Samson, R. A.; Hoekstra,
2 E. S.; Frisvad, J. C.; Filtenborg O. **Introduction to food-and airborne fungi**. 6 ed. Amer
3 Society for Microbiology, 2001. pp. 357–363.
- 4 O'Connor, P. M.; Kuniyoshi, T. M.; Oliveira, R. P.; Hill, C.; Ross, R. P.; Cotter, P. D.
5 Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. **Current Opinion in**
6 **Biotechnology**, v. 61, sn., p. 160–167, 2020. Disponível em:
7 <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.023>.
- 8 Oliveira, J.; Mahony, J.; Hanemaaijer, L.; Kouwen, T. R. H. M.; Van Sinderen, D.
9 Biodiversity of bacteriophages infecting *Lactococcus lactis* starter cultures. **Journal of**
10 **Dairy Science**, v. 101, n.1, p. 96–105, 2018. Disponível em:
11 <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13403>.
- 12 Oliveira, T. M. Avaliação do teor de natamicina em queijos Gorgonzola através de
13 quantificação espectrofotométrica. **Revista Instituto Laticínio Cândido Tostes**, v. 61, n.
14 349, p. 48-50, 2006. Disponível em: <http://arvoredoleite.org/pdf/349.pdf>.
- 15 Panelli, S.; Buffoni, J. N.; Bonacina, C.; Feligini, M. Identification of moulds from the
16 Taleggio cheese environment by the use of DNA barcodes. **Food Control**, v. 28, n. 2, p.
17 385–391, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.022>.
- 18 Paseiro-Cerrato, R.; Otero-Pazo, P.; Queiroz A. R-B.; Sendón, R.; Angulo, I.; Paseiro-
19 Losada, P. Rapid method to determine natamycin by HPLC-DAD in food samples for
20 compliance with EU food legislation. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 262-267, 2013.
21 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.03.006>.
- 22 Penna, A. L. B.; Gigante, M. L.; Todorov, S. D. Artisanal Brazilian Cheeses- History,
23 Marketing, Technological and Microbiological Aspects. **Foods**, v. 10, n. 7, p. 1562, 2021.
24 Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods10071562>.
- 25 Pinto, A. T.; Schmidt, V.; Raimundo, S. A.; Raihmer, F. Uso de ozônio no controle de
26 fungos em sala de maturação de queijos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 3, p.
27 333, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.22456/1679-9216.16125>.
- 28 Pitt, J. I.; Hocking, A. D. **Fungi and Food Spoilage**, 3 ed.; Springer Science & Business
29 Media, 2009.536p. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2_1.
- 30 Pitt, J. I.; Hocking, A. D. **Fungi and Food Spoilage**. 4ed. Springer, 2022, 645 p.
31 Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-030-85640-3>.

- 1 Pitt, J. I.; Wild, C. P.; Baan, R. A.; Gelderblom, W. C. A.; Miller, J. D. Riley; R. T.; Wu, F.
2 Improving Public Health through Mycotoxin Management. IARC. **International Agency**
3 **for Research on Cancer**. Scientific Publication, sv., n. 158, sp., 2012. ISBN13:978-92-
4 8322158-6.
- 5 Pleadin, J.; Frece, J.; Markov, K. Mycotoxins in food and feed. **Advances in food and**
6 **nutrition research**, v. 89, sn., p. 297-345, 2019. Disponível em:
7 <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.007>.
- 8 Quéro, L.; Girard, V.; Pawtowski, A.; Tréguer, S.; Weil, A.; Arend, S.; Cellière, B.;
9 Polsinelli, S.; Monnin, V.; Van Belkum, A.; Vasseur, V.; Nodet, P.; Mounier, J.
10 Development and application of MALDI-TOF MS for identification of food spoilage fungi.
11 **Food Microbiology**, v. 81, sn., p. 76–88, 2019. Disponível em:
12 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.05.001>.
- 13 Radha, K.; Nath, L. S. Studies on the air quality in a dairy processing plant. **Indian Journal**
14 **of Veterinary and Animal Science Research**, v. 43, n. 5, p. 346–353. Disponível em:
15 https://www.academia.edu/10156699/STUDIES_ON_THE_AIR_QUALITY_IN_A_DAIRY
16 [_PROCESSING_PLANT](https://www.academia.edu/10156699/STUDIES_ON_THE_AIR_QUALITY_IN_A_DAIRY).
- 17 Ramos-Pereira, J., Mareze, J., Fernández, D., Rios, E. A., Santos, J. A.; López-Díaz, T.-
18 M. Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from milk against *Penicillium*
19 *commune*, *P. nordicum*, and *P. verrucosum*. **International Journal of Food**
20 **Microbiology**, v. 355, e109331, 2021. Disponível em:
21 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109331>
- 22 Ramos-Pereira, J.; Mareze, J.; Patrinoú, E.; Santos, J.A.; Lopéz- Dias, M.T. Polyphasic
23 identification of *Penicillium* spp. Isolated from Spanish semi-hard ripened cheeses. **Food**
24 **Microbiology**, v. 84, sn., p. 103253, 2019. Disponível em:
25 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103253>.
- 26 Ramos- Pereira, J. **Biocontrol de *Penicillium* alterantes y micotoxigénicos em queso**
27 **madurado (tipo Castellano) mediante el uso de bacterias ácido- lácticas como**
28 **cultivos proctetores**. 2019. 192 f. Tese (Doctorado em Ciências Veterinaria e de los
29 Alimentos) – Universidad de León, Facultad de Veterinaria, León, Espanha.

- 1 Rentero, N. Projeção de tendências para o leite aqui e lá fora. **Anuário do Leite**,
2 EMBRAPA, 2023. P. 22-25. Disponível em: [https://www.embrapa.br/busca-de-](https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1154264/anuario-leite-2023-leite-baixo-carbono)
3 [publicacoes/-/publicacao/1154264/anuario-leite-2023-leite-baixo-carbono](https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1154264/anuario-leite-2023-leite-baixo-carbono).
- 4 Reys, A.; Jedrychowski, L.; Tomasik, J.; Wisniewska, K. Natamycin in ripening cheese.
5 **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 1, n. 5, p.243-247, 2002.
- 6 Roig-Sagués, A. X.; Molina, A. P.; Hernández-Herrero, M. Histamine and tyramine-
7 forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. **European Food Research and**
8 **Technology**, v. 215, n. 2, p. 96-100, 2002. Disponível em:
9 <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-002-0521-2>.
- 10 Russo, P.; Arena, M.P.; Fioco, D.; Capozzi, V.; Drider, D.; Spano, G. Lactobacillus
11 plantarum with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and
12 shelf-life of cereal-based products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 247,
13 sn., p. 48-54, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.027>.
- 14 Ryssel, M.; Johansen, P.; Al-Soud, W. A.; Sørensen, S.; Arneborg, N.; Jespersen, L.
15 Microbial diversity and dynamics throughout manufacturing and ripening of surface
16 ripened semi-hard Danish Danbo cheeses investigated by culture-independent
17 techniques. **International Journal of Food Microbiology**. v. 215, sn., p. 124–130, 2015.
18 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.012>.
- 19 Salas, M. L.; Mounier, J.; Maillard, M.B.; Valence, F.; Coton, E.; Thierry, A. Identification
20 and quantification of natural compounds produced by antifungal bioprotective cultures in
21 dairy products. **Food Chemistry**. v. 301, sn., e125260, 2019. Disponível em:
22 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125260>.
- 23 Salas, M. L.; Thierry, A.; Lemaître, M.; Garric, G.; Harel-Oger, M.; Chatel, M.; Lê, S.;
24 mounier, J.; Valence, F.; Coton, E. Antifungal activity of lactic acid bacteria combinations
25 in dairy mimicking models and their potential as bioprotective cultures in pilot scale
26 applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, sn., p. 1787, 2018. Disponível em:
27 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01787>.
- 28 Schnürer, J.; Magnusson, J. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. **Trends**
29 **in Food Science and Technology**, v. 16, n. 1-3, p. 70–78, 2005. Disponível em:
30 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.014>.

- 1 Seiler, H. Yeasts in Milk and Dairy Products. In: Furquay, J. W.; Fox, P. F.; Roginski, H.
2 (Eds.). **Encyclopedia of Dairy Sciences**, 2002. p. 2761–2769. Disponível em:
3 <http://doi.org/10.1016/B0-12-227235-8/00517-4>.
- 4 Sengun, I.; Yaman, D. B.; Gonul, S. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a
5 review. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, n. 3, p. 291-298, 2008. Disponível em:
6 <http://dx.doi.org/10.3920/WMJ2008.x041>.
- 7 Sensidoni, A.; Rondinini, G.; Peressini, D.; Maifreni, M.; Bortolomeazzi, R. Presence of
8 an off- flavour associated with the use of sorbates in cheese and margarine. **Italian**
9 **Journal of Food Science**. v. 6, n. 2, p. 237–242, 1994.
- 10 Sharma, G.; Dang, S.; Gupta, S.; Gabrani, R. Antibacterial activity, cytotoxicity, and the
11 mechanism of action of bacteriocin from *Bacillus subtilis* GAS101. **Medical Principles**
12 **and Practice**, v. 27, n. 2, p. 186–192, 2018. Disponível em:
13 <https://doi.org/10.1159/000487306>.
- 14 Silva, G.; Dutra, P. R. S.; Cadima, I. M. **Higiene na Indústria de Alimentos**. EDUFRPE,
15 2010.131p.
- 16 Silva, C. C. G.; Silva, S.P. M.; Ribeiro, S. C. Application of bacteriocins and protective
17 cultures in dairy food preservation. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, sn., p. 594, 2018.
18 Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>.
- 19 SIQUEIRA, K. B. **Um retrato do consumo de lácteos no Brasil**. Setembro Editora,
20 2021. p. 58–59.
- 21 Siqueira, K. B.; Schettino, J. P. J. **O consumo de queijos pelo brasil**. Milkpoint, 2021.
22 3p. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/colunas/kennya-siqueira/o-consumo-de-queijos-pelos-brasileiros-225212/>.
- 24 Siqueira, K. B.; Oliveira, S. J. M.; Lana M. S. O consumo de lácteos e a nova dinâmica
25 demográfica do país. **Anuário do Leite**, EMBRAPA, 2023. p 42-3. Disponível em:
26 <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1154264/anuario-leite-2023-leite-baixo-carbono>.
- 28 Siqueira, K. B.; Schettino, J. P. J.; Vieira, M.T.; Guimarães Y.M. Quem são os maiores
29 consumidores de lácteos? **Anuário do Leite**, EMBRAPA, 2023. p. 20-21. Disponível em:
30 <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1154264/anuario-leite-2023-leite-baixo-carbono>.
- 31

- 1 Shang, Z.; Li, X.; Meng, L.; Li, C.; Gao, S.; Huang, C.; Wang, B. Chemical profile of the
2 secondary metabolites produced by a deep-sea sediments derived fungus *Penicillium*
3 *commune* SD-118. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 30, sn., p. 305-
4 314, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00343-012-1075-1>.
- 5 Soares, C. V. D.; Duarte, A. B. S.; Andrade Júnior, F. P.; Firmino, L. A.; Soares, G. V. D.;
6 Bezerra, A. S. Uso irracional de antifúngicos: resistência e toxicidade. **Journal of Biology**
7 **& Pharmacy and Agricultural Management**, v. 17, n. 2, 2021. Disponível em:
8 revista.uepb.edu.br/index.php/biofarm.
- 9 Spahr, U.; Walther, B.; Sieber, R. Transfert des mycotoxines dans le lait: vue d'ensemble.
10 **Revue Suisse d'Agriculture**, v. 32, sn.; p. 75–8, 2000.
- 11 Stratford, M.; Steels, H.; Nebe-von-Caron, G.; Avery, S. V.; Novodvorska, M.; Archer, D.
12 B. Population heterogeneity and dynamics in starter culture and lag phase adaptation of
13 the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* to weak acid preservatives. **International**
14 **Journal of Food Microbiology**, v. 181, sn., p. 40–47, 2014. Disponível em:
15 <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.017>.
- 16 Streekstra, H.; Verkennis, A. E. E.; Jacobs, R.; Dekker, A.; Stark, J.; Dijksterhuis, J.
17 Fungal strain and the development of tolerance against natamycin. **International Journal**
18 **of Food and Microbiology**, v. 238, sn., p. 15–22, 2016. Disponível em:
19 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.006>.
- 20 Sudhakaran, V. A.; Minj, J. Basic Facts About Dairy Processing and Technologies. In:
21 Minj, J.; Sudhakaran, V. A.; Kumari, A. **Dairy Processing: Advanced Research to**
22 **Applications**. Springer, 2020, p.1-24. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-981-](https://doi.org/10.1007/978-981-15-2608-4_1)
23 [15-2608-4_1](https://doi.org/10.1007/978-981-15-2608-4_1).
- 24 Suloff, E. C.; Marcy, J. E.; Hackney, C. R.; Sumner, S. S.; Bishop, J. R. Comparative study
25 of semisynthetic derivative of natamycin and the parent antibiotic on the spoilage of
26 shredded cheddar cheese. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 8, p. 1499- 150, 2003.
27 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028X-66.8.1499>.
- 28 Surve, S.; Shinde, D.B.; Kulkarni, R. Isolation, Characterization and Comparative
29 Genomics of Potentially Probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* strains from Indian foods
30 **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p.1940, 2022. Disponível em:
31 <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05850-3>.

- 1 Switaj, T. L.; Winter, K. J.; Christensen, S. R. Diagnosis and management of foodborne
2 illness. **American family physician**, v. 92, n. 5, p. 358-365, 2015. PMID: **26371569**.
- 3 Taniwaki, M. H.; Hocking, A. D.; Pitt, J. I.; Fleet, G. H. Growth of fungi and mycotoxin
4 production on cheese under modified atmospheres. **International Journal of Food**
5 **Microbiology**, v. 68, n. 1-2, p. 125-133, 2001. Disponível em:
6 [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00487-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00487-1).
- 7 Temelli, S.; Anar, S.; Sen, C.; Akyuva, P. Determination of microbiological contamination
8 sources during Turkish white cheese production. **Food Control**, v. 17, n.11, p. 856-861,
9 2006. Disponível em: <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.05.012>.
- 10 Thommes, M.; Wang, T.; Zhao, Q.; Paschalidis, I.C.; Segrè, D. Designing metabolic
11 division of labor in microbial communities. **mSystems**, v. 4, n. 4, e00263-18, 2019.
12 Disponível em: <https://doi.org/10.1128/msystems.00263-18>.
- 13 Tilocca, B.; Costanzo, N.; Morittu, V. M.; Spina, A. A.; Soggiu, A.; Britti, D.; Piras, C.
14 (2019). Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. **Journal**
15 **of Proteomics**, v. 210, sn., e 103534, 2019. Disponível em:
16 <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103534>.
- 17 Tortora, G. J.; Funke, B. R; Case, C. L. **Microbiologia**. Artmed, 2017, 935 p.
- 18 UNEP. United Nation Environment Programme. **Food Waste Report 2021**. ONU, 2021.
19 100p. Disponível em: [https://www.unep.org/resources/report/unep-food-waste-index-](https://www.unep.org/resources/report/unep-food-waste-index-report-2021)
20 [report-2021](https://www.unep.org/resources/report/unep-food-waste-index-report-2021).
- 21 Varga, L.; Szigeti, J. Use of ozone in the dairy industry: A review. **International Journal**
22 **of Dairy Technology**, v. 69, n. 2, p. 157–168, 2016. Disponível em:
23 <http://doi.org/10.1111/1471-0307.12302>.
- 24 Vierikova, M.; Hrnčiarikova, E.; Lehotay, J. Determination of natamycin content in cheese
25 using ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Liquid**
26 **Chromatography & Related Technologies**, v. 36, n. 20, p. 2933-2943, 2013. Disponível
27 em: <http://dx.doi.org/10.1080/10826076.2012.731671>.
- 28 Viljoen, B.C.; Hattingh, A. L.; Ikalafeng, B.; Peter, G. Temperature abuse initiating yeast
29 growth in yoghurt. **Food Research International**, v. 36, n. 2, p. 193–197, 2003.
30 Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969\(02\)00138-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0963-9969(02)00138-2).

- 1 Von Wright, A.; Axelsson, L. Lactic acid bacteria: an introduction. In: Viderola, G.;
2 Ouwehand, A.; Seppo, S.; Von Wright, A. **Lactic acid bacteria**, 5ed.CRC Press, 2019.
3 16p.
- 4 Wang, Z.; Xue, R.; Cui, J.; Wang, J.; Fan, W.; Zhang, H.; Zhan, X. Antibacterial activity of
5 a polysaccharide produced from *Chaetomium globosum* CGMCC 6882. **International**
6 **journal of biological macromolecules**, v. 125, sn., p. 376-382, 2019. Disponível em:
7 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.248>.
- 8 Welscher, Y. M.; Napel, H. H.; Balagué, M. M.; Souza, C. M.; Riezman, H.; de Kruijff, B.;
9 Breukink, E. Natamycin Blocks Fungal Growth by Binding Specifically to Ergosterol
10 without Permeabilizing the Membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 10,
11 p. 6393–6401, 2007. Disponível em: <http://doi.org/10.1074/jbc.m707821200>.
- 12 Westall, S.; Filtenborg, O. Spoilage yeasts of decorated soft cheese packed in modified
13 atmosphere. **Food Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 243-249, 1998. Disponível em:
14 [https://orbit.dtu.dk/en/publications/spoilage-yeasts-of-decorated-soft-cheese-packed-in-](https://orbit.dtu.dk/en/publications/spoilage-yeasts-of-decorated-soft-cheese-packed-in-modified-atmos)
15 [modified-atmos](https://orbit.dtu.dk/en/publications/spoilage-yeasts-of-decorated-soft-cheese-packed-in-modified-atmos).
- 16 Wouters, J. T. M.; Ayad, E. H. E.; Hugenholtz, J.; Smit, G. Microbes from raw milk for
17 fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2-3, p. 91–109, 2002.
18 Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00151-0](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00151-0).
- 19 Yalcin, S.K.; Ergul, S.S.; Ozbas, Z. Y. Enzymatic characterization of yeast strains
20 originated from traditional Mihalic cheese. **Journal of Microbiology, Biotechnology and**
21 **Food Science**, v. 6, n. 5, p. 1152–1156, 2017. Disponível em:
22 <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2017.6.5.1152-1156>.
- 23 Yeluri Jonnala, B. R.; McSweeney, P.L.H.; Sheehan, J. J.; Cotter, P. D. Sequencing of
24 the cheese microbiome and its relevance to industry. **Frontiers of Microbiology**, v. 9,
25 sn., p.1020, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01020>.
- 26 Yiannikouris, A.; Jouany, J. P. Mycotoxins in feeds and their fate in animals: a review.
27 **Animal Research**, v. 51, n. 2, p. 81–99, 2002. Disponível em:
28 <http://dx.doi.org/10.1051/animres:2002012>.
- 29 ZACARCHENCO, P. B. Bolores e leveduras em queijos. **Revista TecnOLAT (ITAL)**.
30 Expresso, ano II, v. 129, n. 8, p. 92-99, 2011. ISSN 1807-9733.

- 1 ZANI, G.; CARRIERO, M. D. Atividade antimicrobiana do kefir sobre *Escherichia coli*,
2 *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios**
3 **Cândido Tostes**, v. 76, n. 4, p. 257-266, 2021. Disponível em:
4 <https://doi.org/10.14295/2238-6416.v76i4.867>.
- 5 Zhang, N., Liu, J., Li, J., Chen, C., Zhang, H., Wang, H.-K., & Lu, F.-P. Characteristics
6 and Application in Food Preservatives of *Lactobacillus plantarum* TK9 Isolated from
7 Naturally Fermented Congee. **International Journal of Food Engineering**, v. 12, n. 4,
8 p. 377-384, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/ijfe-2015-0180>.

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

1 4. HIPOTESE

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

A capa de *L. plantarum* (L119) adicionada como cultura em queijos é capaz de inibir ou retardar o desenvolvimento do fungo *P. commune* (M35) durante um período de maturação de 28 dias.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Explorar a capacidade da cepa *L. plantarum* (L119), isolada de queijo artesanal serrano catarinense, como antifúngico contra o contaminante *P. commune* (M35), na produção de queijos maturados por 28 dias.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar e quantificar a produção de esporos pela cepa *P. commune* (M35);

Verificar a atividade antifúngica *in vitro* da cepa *L. plantarum* (L119) estocada;

Avaliar a natureza do composto com atividade antagônica produzido pela cepa *L. plantarum* (L119);

Liofilizar a cepa *L. plantarum* (L119) e verificar a viabilidade do liofilizado;

Produzir queijos com a cepa *L. plantarum* (L119);

Avaliar a interação entre os microrganismos utilizados na fabricação dos queijos (a cepa *L. plantarum* (L119), a cepa *P. commune* (M35) e microrganismos presentes no fermento mesofílico);

Contaminar a superfície dos queijos produzidos com *P. commune* (M35) em diferentes concentrações e avaliar a atividade antifúngica da cepa *L. plantarum* (L119) pela capacidade de controle do crescimento fúngico;

Avaliar a interação, por microscopia eletrônica, existente entre a cepa *L. plantarum* (L119) e o fungo *P. commune* (M35), bem como a interação deste fungo com o fermento comercial mesofílico.

6. ARTIGO CIENTÍFICO A

Artigo para a revista *Journal of Dairy Research*.

Potencial antifúngico da cepa *Lactiplantibacillus plantarum* (L119) frente a contaminação por *Penicillium commune* (M35) em queijos de curta maturação.

Stael Málaga Carrilho^{1*}, Samanta Stinghen de Abreu¹, Luciano Aparecido Panagio², Ronaldo Tamanini³, Alexandre Urbano⁴, Fernanda Montanholi de Lira¹, Natalia Gonzaga³, Éder Málaga Carrilho⁵, Pedro Henrique Ramos Cerqueira⁶, Vanerli Beloti¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina

² Laboratório de Micologia Média e Microbiologia Bucal, Universidade Estadual de Londrina

³ Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina

⁴ Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise, Universidade Estadual de Londrina

⁵ Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Londrina

⁶ Departamento de Estatística, Universidade Estadual de Londrina

***Lactiplantibacillus plantarum*: potencial antifúngico em queijos maturados**

*Correspondence: Stael Málaga Carrilho

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Universidade Estadual de Londrina

Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 Km 380, Campus Universitário

+55 43 3371-5617/ +55 43 996043029

E-mail: stael.te@gmail.com

1 **Resumo**

2 Um dos principais desafios da produção de queijos é o controle do crescimento de fungos
3 indesejáveis em sua superfície, que causam grandes perdas econômicas e às vezes, oferecem riscos
4 à saúde. O experimento, relatado neste artigo, visou explorar a capacidade antifúngica, da cepa
5 *Lactiplantibacillus plantarum* (L119), de inibir ou retardar o desenvolvimento de *Penicillium*
6 *commune* (M35) sobre a superfície de peças de queijos durante o processo de maturação por 28
7 dias. A atividade antagônica *in vitro* foi realizada utilizando duas técnicas descritas em literatura,
8 com avaliação da formação de halos de inibição. Para verificação da natureza do composto inibidor,
9 utilizou-se os sobrenadantes livres de células da cepa L119, tratados por diferentes formas,
10 neutralizados ou não. Para avaliação da atividade antagônica em peças de queijos, foram fabricados
11 nove lotes de oito peças de queijos produzidos com e sem a adição de *L. plantarum* (L119) e
12 contaminados com três diferentes concentrações de *P. commune* (M35), maturados por 28 dias,
13 com registro de imagens a cada sete dias. Análises de Microscopia eletrônica de varredura foram
14 realizadas para observação da possível interação entre os microrganismos. Verificou-se pela análise
15 das imagens pelo software *ImageJ* uma redução da área de contaminação e retardo do crescimento
16 do *P. commune* (M35) nos queijos com *L. plantarum*, sendo possível a observação pelas imagens
17 de microscopia eletrônica de alterações nas hifas. Estudos futuros para elaboração de um fermento,
18 ou cultura aditiva a fermentos comerciais, são desejáveis, considerando a eficiência da cepa L119
19 como bioconservante antifúngico para queijos.

20

21 **Introdução**

22 A produção de queijo no Brasil experimenta um crescimento de mercado notório nos últimos anos
23 (Renteiro, 2023), com um aumento significativo do consumo interno (Siqueira, Oliveira, Lana,
24 2023).

25 Os queijos, ricos em nutrientes, oferecem um ambiente propício ao desenvolvimento de diversos
26 microrganismos. Ao longo das etapas de fabricação, o queijo está sujeito à contaminação por
27 microrganismos indesejados, deteriorantes e patogênicos (Mayo *et al.* 2021; Tilocca *et al.*, 2020),
28 que podem representar um potencial risco à saúde do consumidor (Penna, Gigante, Todorov, 2021)
29 e causar grandes prejuízos econômicos aos produtores e indústrias (Garcia *et al.*, 2016).

30 Diversas estratégias de controle foram desenvolvidas, desde a aplicação de Boas Práticas de
31 Fabricação, tratamentos térmicos, como pasteurização (Awasti, Anand, 2020), e refrigeração

1 (Gontijo *et al.*, 2020), uso de desinfetantes e sanitizantes (Awasti, Anand, 2020) e conservantes
2 químicos (Garnier *et al.*, 2017). No entanto, apesar de efetivas para controle de muitos
3 microrganismos, essas abordagens podem gerar resistência microbiana (Garnier *et al.*, 2017),
4 estimular a produção de micotoxinas (Fodil *et al.*, 2018) e ocasionar perdas nutricionais e alterações
5 organolépticas nos produtos (Awast, Anand, 2020).

6 Dentre os possíveis microrganismos deteriorantes, a presença dos fungos destaca-se como umas
7 das principais causas de descarte da produção de queijos (Pitt, Hocking, 2022), acarretando
8 relevantes perdas econômicas (Queró *et al.*, 2019).

9 A contaminação de queijos por fungos indesejados provoca alterações das propriedades
10 organolépticas do produto (Awasti, Anand, 2020), prejudicando aparência, textura e sabor,
11 resultando na rejeição pelo consumidor (Pit, Hocking, 2022). O problema da contaminação fúngica
12 transcende as alterações organolépticas dos produtos, uma vez que algumas espécies de fungos
13 produzem micotoxinas, metabólitos nocivos à saúde do consumidor (FAO, 2021).

14 Dentre os principais fungos relatados como contaminantes em queijos, destaca-se o *P. commune*.
15 Este microrganismo pode propiciar alterações organolépticas nos queijos (Jurado, Vicente, 2020)
16 e ser responsável pela produção de Ácido Ciclopiazonico (CPA) (Ramos Pereira *et al.*, 2021), uma
17 micotoxina com potencial para causar danos à saúde humana e animal (Hymery *et al.*, 2014).

18 Além disso, estudos indicam que o *P. commune* apresenta resistência aos principais agentes
19 conservantes utilizados (Davidson *et al.*, 2002) e aos principais métodos de controle de
20 desenvolvimento de microrganismos (Gougouli *et al.*, 2011). Esta constatação realça a
21 complexidade envolvida na gestão da resistência antimicrobiana frente as principais medidas de
22 controle existentes.

23 Essa conjuntura, aliada às exigências dos consumidores por alimentos naturais e livres de
24 conservantes químicos (Silva, Silva, Ribeiro, 2018), resultou no desenvolvimento de novas
25 tecnologias, como o uso de bactérias ácido lácticas (BAL) como culturas protetoras. As BAL, por
26 meio de seu metabolismo, produzem substâncias como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio
27 e peptídeos bioativos, capazes de inibir ou controlar o desenvolvimento de microrganismos
28 patogênicos e deteriorantes (Salas *et al.*, 2019; Ng *et al.*, 2020).

29 Dentre as espécies de BAL com potencial para biocontrole, destaca-se a espécie *L. plantarum*,
30 capaz de promover características organolépticas desejadas aos produtos lácteos (Chen, Hang,
31 2019) e combater microrganismos patogênicos e deteriorantes (Ibrahim, Ouwehand, 2019),

1 incluindo diferentes fungos (Russo *et al.*, 2017), como o *P. commune*, conseguindo reduzir
2 inclusive a produção de micotoxinas (Mareze *et al.*, 2021).
3 As *L. plantarum* tem a Presunção Qualificada de Segurança (PQS) pelas Autoridades Europeias de
4 Segurança Alimentar (EFSA). Além disso, a *L. plantarum* está listada como “Geralmente
5 Reconhecida como Segura” (GRAS) pela *Food Drugs and Administration* (FDA) (Hazards *et*
6 *al.*, 2017; Echegaray *et al.*, 2023).
7 Assim, este estudo foi desenvolvido para explorar a capacidade antifúngica da cepa *L. plantarum*
8 (L119), isolada de queijo artesanal Serrano Catarinense, frente a contaminação por *P. commune*
9 (M35), na produção de queijos maturados por 28 dias.

10

11 **Material e Método**

12

13 *Origens das cepas*

14 A cepa de *L. plantarum* (L119) foi isolada de exemplares de queijo artesanal Serrano catarinense,
15 na Universidade Estadual de Londrina, por estudos anteriores (Seixas, 2014), e a cepa de *P.*
16 *commune* (M35) foi isolada de queijos de ovelhas das províncias de Leon e Zamora no Noroeste
17 da Espanha, em estudos no Laboratório de Micologia de Alimentos do Departamento de Higiene e
18 Inspeção de Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade de León (Ramos-Pereira *et*
19 *al.*, 2019 b).

20

21 *Atividade antagonista in vitro*

22 Para avaliação da atividade antagonista *in vitro*, duas técnicas foram executadas conforme
23 Schillinger e Villarreal (2010) e Magnusson e Schnürer (2001), ambas com modificações. A análise
24 de atividade antagonista foi realizada no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal
25 da Universidade Estadual de Londrina, utilizando o meio Caldo *Man Rogosa & Sharpe* (MRS)
26 (KASVI[®]) para reativação da BAL (L119), ágar Batata Dextrose (Acumedia[®]), para reativação do
27 *P. commune* (M35) e Ágar *Man Rogosa & Sharpe* (MRS) (Acumedia[®]) para realização da técnica.
28 As soluções fúngicas utilizadas foram preparadas de acordo com a metodologia do *Clinical and*
29 *Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2002), com modificações.

30

1 Os resultados de ambas as técnicas foram avaliados pela análise dos halos de inibição formados,
2 com base na metodologia de Cheong *et al.* (2014), com modificações (Quadro 2).

3

4 **Quadro 2** – Técnica de avaliação dos halos formados no teste de atividade antagônica do *L.*
5 *Plantarum* (L119) contra o *P. commune* (M35), com base na metodologia de Cheong *et al.* (2014),
6 com modificações

Ausência de halo de inibição (-):	Quando as colônias de bactéria L119 estavam completamente recobertas pelo fungo M35
Fraca (+):	Quando era possível a visualização das colônias da bactéria L119, porém o halo de inibição não apresentava uma zona límpida ao redor da L119.
Moderada (++):	Quando era possível a visualização das colônias da bactéria L119 e o halo de inibição se apresentava como uma zona límpida estreita ao redor da L119
Forte (+++)	Quando era possível a visualização das colônias da bactéria L119 e o halo de inibição se apresentava uma zona límpida ampla ao redor da L119

7

8 *Avaliação da natureza do componente inibidor do desenvolvimento fúngico*

9 Para investigação do composto microbiano presente na cepa L119 com atividade antifúngica, foi
10 utilizada a metodologia “*Spot on Lawn*” de Lewus, Kaiser e Montville (1991) e Cavicchioli *et al.*,
11 (2017), com modificações.

12 Após a obtenção do sobrenadante livre de células (SLC), este foi porcionado em quatro tratamentos
13 diferentes: O SLC1 foi esterilizado por filtro usando filtros de membrana de acetato de celulose
14 (0,22 µm). O SLC2 foi esterilizado por filtro usando filtros de membrana de acetato de celulose
15 (0,22 µm) e aquecido a 80° C por 10 minutos. O SLC 3 foi neutralizado com NaOH 1N até alcançar
16 pH 6,0 e esterilizado por filtro usando filtros de membrana de acetato de celulose (0,22 µm). O
17 SLC 4 foi neutralizado com NaOH 1N até alcançar pH 6,0 e esterilizado por filtro usando filtros
18 de membrana de acetato de celulose (0,22 µm) e aquecidas a 80° C por 10 minutos.

1 Placas de ágar MRS (Acumedia®) foram semeadas com uma solução contendo *P. commune* em
 2 concentração de 10^7 esporos/ml (CLSI, 2002), previamente a aplicação das soluções SLC em poços
 3 de 5 mm de diâmetro recortados do ágar. Para avaliação dos resultados, foram observadas a
 4 ausência ou presença de halos de inibição ao redor dos poços contendo diferentes SLC.

5

6 *Liofilização da cepa L. plantarum (119)*

7 A cepa L119 foi liofilizada, segundo a técnica descrita por Nieto- Arribas *et. al.* (2009), para
 8 auxiliar na padronização da cultura para fabricação dos queijos.

9

10 *Fabricação dos queijos*

11 A fabricação dos queijos baseada na receita de queijo Minas padrão, de metodologias descritas por
 12 Chaves, Monteiro e Machado (2013) e Lourenço Neto (2013), com modificações.

13 Cada lote de queijo fabricado (Quadro 3), continha oito peças com aproximadamente 400g. Foram
 14 elaborados nove lotes de queijos, sendo testadas três concentrações diferentes de contaminação
 15 fúngica, em triplicata: 10^5 , 10^6 , 10^7 esporos/ml (20 esporos/ cm^2 , 205 esporos/ cm^2 , 2040 esporos/
 16 cm^2 nos queijos).

17

18 **Quadro 3-** Características de Fabricação e Contaminação dos oito queijos, formadores do lote.

Queijos	Característica de Fabricação e Contaminação
Q0	Queijo controle fabricado sem fermento e sem contaminação fúngica posterior
QF	Queijo controle fabricado sem fermento e contaminado com o fungo <i>P. commune</i> (M35)
QM0	Queijo fabricado com 3% (g/L) de fermento industrial mesofílico e sem contaminação fúngica posterior (QM0)
QMF	Queijo fabricado com 3% (g/L) de fermento industrial mesofílico e contaminado com o fungo <i>P. commune</i> M35
QB0	Queijo fabricado com 1% (g/L) de cultura liofilizada da cepa de <i>L. plantarum</i> (L119) sem contaminação fúngica posterior
QBF1/ QBF2/ QBF3	Queijos fabricados com 1% (g/L) de cultura liofilizada da cepa de <i>L. plantarum</i> (L119) e contaminados com o fungo <i>P. commune</i> (M35)

1 *Contaminação das peças de queijo*

2 Para contaminação das peças de queijo, suspensões fúngicas foram preparadas com sete a oito dias
3 de crescimento fúngico de acordo com a metodologia do *Clinical and Laboratory Standards*
4 *Institute*, com modificações (CLSI, 2002), com modificações. Em cada peça foram inoculados 10
5 μL de solução de esporos, em área específica (49 cm^2) da superfície dos queijos. As peças foram
6 incubadas a 12°C , com umidade entre 70% e 75%, por 28 dias.

7

8 *Avaliação da contaminação durante a maturação das peças de queijo*

9 Para avaliação do crescimento fúngico, fotos digitais dos queijos foram realizadas a cada sete dias.
10 As imagens foram processadas e as áreas de crescimento fúngico foram calculadas utilizando o
11 programa *ImageJ* (*ImageJ* software 1.43, versão 64bits- *National Institute of Health- NIH*®),
12 sendo a análise dos dados realizada pelo *software* Microsoft Excel (Microsoft®).

13

14 *Análise de microscopia eletrônica de varredura- MEV*

15 Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura foram realizadas no Laboratório de Microscopia
16 Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina. Para observação em microscópio
17 de varredura (FEI Quanta 200), as amostras foram preparadas de acordo com Mareze *et. al.* (2021),
18 sendo avaliados 5 pontos diferentes da amostra, em diferentes aumentos microscópicos (50x; 1,5
19 kx; 3 kx; 6 kx), para investigação da interação existente entre as bactérias e o fungo.

20

21 **Resultados e Discussão**

22 Como base nos resultados da análise visual das placas para verificação da atividade antagônica da
23 cepa L119 contra o *P. commune* (M35) (Imagens 1 e 2), mostrou que a cepa *L. plantarum* (L119)
24 demonstrou capacidade de inibir o desenvolvimento do *P. commune* (M35) *in vitro*, resultando na
25 formação de um halo límpido ao redor da BAL.

26

27

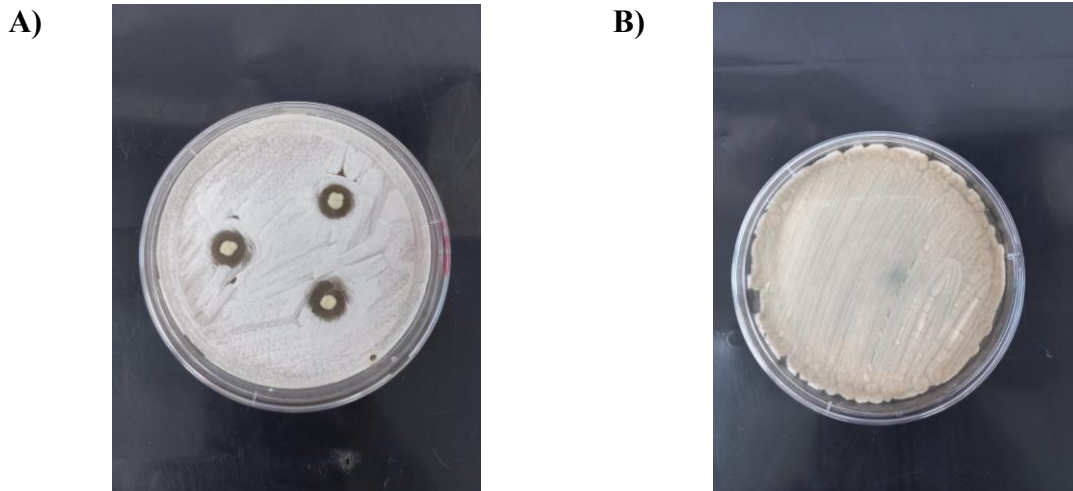
28

29

30

31

1 **Imagem 1.** Resultados obtidos pela realização da técnica descrita por Schillinger e Villarreal
 2 (2010), com a formação de halos de inibição da cepa *L. plantarum* (L119) impedindo o
 3 crescimento fúngico da cepa de *P. commune* (M35).
 4



5 (A) Placa contendo crescimento pontual de *L. plantarum* (10^5 UFC/ml) com observação de halo de inibição do
 6 desenvolvimento de *P. commune* (10^5 esporos/ml). (B) Placa de controle fúngico de *P. commune* (10^5 esporos/ml).
 7

8 **Imagem 2.** Resultados obtidos pela realização da técnica descrita por Magnusson e Schnürer
 9 (2001), com a formação de halos de inibição da cepa *L. plantarum* (L119) impedindo o
 10 crescimento fúngico da cepa de *P. commune* (M35) (10^7 esporos/ml).
 11



12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21 (1) Ausência de halo de inibição na placa controle; (2) Formação de halo moderada (++); (3) Formação de halo Forte
 22 (+++).
 23

24 Embora tenham sido observadas diferentes intensidades nas formações dos halos nas duas técnicas
 25 (Quadro 4 e 5), é importante ressaltar que os resultados obtidos são complementares.

1
2 **Quadro 4-** Avaliação da formação de zona de inibição de crescimento fúngico ao redor da cepa
3 *Lactiplantibacillus plantarum* (L119)

Avaliação da formação de zona de Inibição	Concentração Fúngica (esporos/ml)				
	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
	+++	+++	+++	+++	+++

4
5 **Nota:** (1) Ausência de halo de inibição na placa controle (-); (2) Formação de halo moderada (++); (3) Formação de
6 halo Forte (+++).

7 Técnica descrita por Magnusson e Schnürer (2001) e leitura de Cheong *et al.* (2014), com modificações.

8

9

10 **Quadro 5-** Avaliação da formação de zona de inibição de crescimento fúngico ao redor da cepa
11 *Lactiplantibacillus plantarum* (L119)

Concentração de <i>L. Plantarum</i> (UFC/ml)	Concentração de <i>P. commune</i> (esporos/ml)				
	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
10 ⁵	++	++	++	+	+
10 ⁶	++	++	++	++	+
10 ⁷	++	++	++	++	++
10 ⁸	++	++	++	++	++

12

13 **Nota:** (1) Ausência de halo de inibição na placa controle (-); (2) Formação de halo moderada (++); (3) Formação de
14 halo Forte (+++).

15 Técnica descrita por Schillinger e Villarreal (2010), e leitura de Cheong *et al.* (2014), com modificações.

16

17 A abordagem de Magnusson e Schnürer (2001) com modificações (Quadro 4), permitiu verificar a
18 capacidade da cepa *L. plantarum* de inibir diferentes concentrações fúngicas, enquanto a
19 metodologia de Schillinger e Villarreal (2010) (Quadro 5), complementa essa análise.

20 A técnica de Schillinger e Villarreal (2010), revelou uma diminuição no potencial de inibição
21 quando a concentração de *P. commune* utilizada superou a concentração de *L. plantarum* (Quadro

1 5). No entanto, mesmo nessas condições, foi observada uma atividade inibitória mínima,
2 evidenciada pela formação de halos.

3 A eficácia antifúngica de cepas de *L. plantarum* é amplamente respaldada (*Cabo et al.*, 2002;
4 *Delavene et al.*, 2013; *Cheong et al.*, 2014, *Sadiq et al.*, 2019). Essa observação é particularmente
5 relevante, considerando a resistência do *P. commune* à ação de diversas BAL (*Ramos-Pereira et*
6 *al.*, 2019 a), tornando a *L. plantarum* uma boa opção para biocontrole de produtos alimentícios,
7 com ampla aplicabilidade (*Ouiddir et al.*, 2019)

8 *Mareze et al.* (2021), avaliaram a atividade antagonista da cepa L119, em relação a diferentes
9 bactérias patogênicas e frente ao *P. commune*. Os resultados indicam que a cepa L119 não apenas
10 consegue inibir as diversas bactérias patogênicas, mas também o *P. commune*, alinhando-se aos
11 achados deste estudo.

12 *Shillinger e Villarreal* (2010), afirmam que a composição do meio de cultura MRS pode favorecer
13 a produção de metabólitos inibidores do *P. commune*, ressaltando a necessidade de realizar do teste
14 em diferentes substratos, *in vitro* e *in vivo*, devido a essa possível interferência.

15 De qualquer forma, fica evidente, que utilizando a concentração adequada de *L. plantarum*, a
16 bactéria inibe o fungo *P. commune*.

17 No que diz respeito aos possíveis compostos com atividade antagonista, a formação de halos de
18 inibição ocorreu exclusivamente nos tratamentos SLC1 e SLC2 (Quadro 6) (Imagem 3),
19 tratamentos que não passaram pelo processo de neutralização. Isso indica que a inibição do
20 desenvolvimento do *P. commune* está associada com a produção de compostos ácidos pela cepa
21 L119.

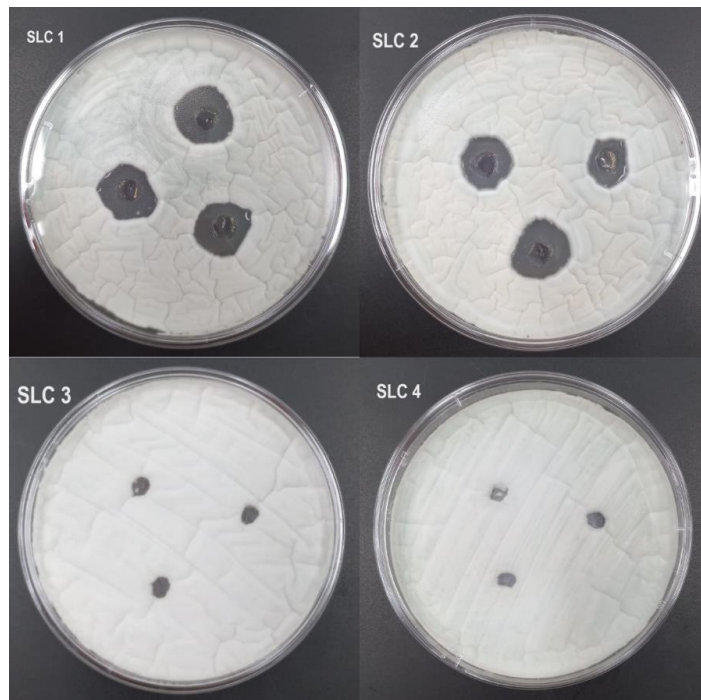
22
23
24
25
26
27
28
29
30

1 **Quadro 6-** Análise da atividade antagônica dos Sobrenadantes Livres de Células (SLC) frente a
 2 presença do *P commune*

Identificação do SLC	Tratamentos	Formação de halo
SLC 1	SLC esterilizado	+
SLC 2	SLC esterilizado e aquecido	+
SLC 3	SLC esterilizado e neutralizado	-
SLC 4	SLC neutralizado e aquecido	-

3
 4 **Nota:** Os tratamentos aplicados ao SLC eram esterilização por filtros de membrana de acetato de celulose (0,22 μm),
 5 neutralização com NaOH 1N e aquecimento a 80° C por 10 min
 6 (+) existência de halo;
 7 (-) ausência de halo.
 8

9 **Imagem 3.** Resultados obtidos na investigação do composto microbiano presente na cepa L119
 10 com atividade antifúngica, pela metodologia “*Spot on Lawn*” de Lewus, Kaiser e Montville
 11 (1991) e Cavicchioli *et. al.*, (2017), com modificações.



12
 13 (SLC1) Formação de halo de inibição; (SLC 2) Formação de halo de inibição; (SLC3) Ausência de halo de inibição;
 14 (SLC4) Ausência de halo de inibição

1 Diferentes mecanismos podem ser responsáveis pela inibição do desenvolvimento do *P. commune*
2 pela L119, tais como a competição por nutrientes, alterações ambientais causadas pela produção
3 de metabólitos, produção de substâncias antimicrobianas e suas modulações de respostas
4 imunológicas (Findanza *et al.*, 2021).

5 Vários estudos identificaram a produção de bacteriocinas por cepas de *L. plantarum* (Wang *et al.*,
6 2018; Wang *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018; Yilmaz *et al.*, 2022), assim como identificaram a
7 produção de diversos outros compostos antimicrobianos, incluindo diferentes ácidos orgânicos,
8 como ácidos láctico, cítrico, butírico e aceto ácidos, além de álcoois e peróxido de hidrogênio (Liu
9 *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2022; Markkinen *et al.*, 2022). Estudos relatam também que as *L. plantarum*
10 produzem de exopolissacarídeos com ação antifúngica (Rajoka *et al.*, 2020)

11 Segundo Stratford e Eklund (2003), um dos possíveis mecanismos de inibição, seria a presença de
12 ácidos orgânicos não dissociados, que se dissociam após penetrarem a membrana celular dos
13 microrganismos, gerando uma gradual acidificação intracelular, desestabilizando a função celular.
14 A produção de ácidos orgânicos pode variar de acordo com as condições ambientais propiciadas,
15 como o pH, as interações microbianas e de acordo com características específicas da cepa estudada
16 (Hafid *et al.*, 2011). Schillinger e Villarreal (2010), observam que uma pequena produção de
17 compostos antifúngicos pode não ser o suficiente para inibir a ação do *P. commune*, mas a interação
18 sinérgica entre ácidos láctico e acético com outros compostos antifúngicos, possibilita a inibição do
19 microrganismo.

20 Portanto, podemos dizer que atividade antifúngica pode advir apenas da presença de um dos fatores
21 descritos, como também da complexa interação entre eles. No entanto, no presente trabalho, pode-
22 se observar que o sobrenadante neutralizado não conseguiu inibir o fungo, o que indica que, embora
23 outros compostos possam atuar, neste caso a inibição se dá principalmente pela acidificação
24 promovida pela L119.

25 Quanto aos testes realizados com a aplicação de *P. commune* diretamente na superfície dos queijos,
26 os resultados obtidos durante o processo de maturação dos queijos contaminados confirmam que a
27 cepa *L. plantarum* L119 é capaz de inibir o desenvolvimento do *P. commune* M35. Destaca-se que
28 a aplicação fúngica inicial de 10^5 esporos/ml representa uma contaminação bastante alta,
29 considerando que a legislação brasileira estabelece valores máximos aceitáveis de contaminação
30 na ordem de 10^3 UFC/ml. Estudos sobre contaminações fúngicas em plantas industriais indicam
31 contaminações máximas na ordem de 10^5 UFC/cm² em queijos (Gargaro *et al.*, 2021; Jahn, Garcia,

1 Coppetti, 2017; Lanita, Silva, 2008; Pereira *et al.*, 2018). Este trabalho apresenta contaminações
2 fúngicas na ordem de 10^5 , 10^6 e 10^7 esporos/ml, após estudos pilotos indicarem a ausência de
3 crescimento fúngico em concentrações inferiores a 10^5 esporos/ml nas condições ambientais,
4 laboratoriais e estruturais possíveis para o desempenho desta pesquisa.

5 As porcentagens de área de desenvolvimento fúngico foram realizadas considerando tanto a área
6 total da superfície fúngica contaminada, quanto a área delimitada de aplicação do fungo, para
7 possibilitar a observação do avanço da contaminação fúngica para além da área de aplicação do
8 fungo nas peças de queijo.

9 As observações revelaram que as alterações no desenvolvimento fúngico na superfície dos queijos
10 tornaram-se visíveis a partir do 14º dia de maturação, não sendo possível visualmente observar o
11 desenvolvimento fúngico até então.

12 Ao considerar os queijos contaminados em concentração inicial de 10^5 esporos/ml, representando
13 uma contaminação de 20 esporos/ cm^2 de queijo (Quadros 7, Tabela 1, e Figura 6), não se
14 evidenciou crescimento fúngico visível até o 21º dia de maturação. Neste estágio, a casca do queijo
15 estava bem consolidada, sendo possível visualizar uma leve cobertura fúngica esbranquiçada.

16 Os queijos fabricados sem fermento, contaminados com 10^5 esporos/ml, apresentaram uma
17 porcentagem média de área contaminada de 18,09% aos 21 dias, considerando a área total da face
18 contaminada do queijo ($95,033 \text{ cm}^2$). Quando considerada a área de aplicação da contaminação
19 (49 cm^2) a porcentagem média de área contaminada foi de 48,46% aos 21 dias.

20 Aos 28 dias de contaminação, os queijos fabricados sem adição de fermento exibiram uma
21 porcentagem média de área contaminada de 24,98%, em relação a área total da face contaminada
22 do queijo ($95,033 \text{ cm}^2$), e 47,86%, quando considerada a área de aplicação da contaminação (49
23 cm^2).

24 Notavelmente, os queijos fabricados com a cultura de *L. plantarum* (L119), assim como os queijos
25 fabricados com fermento mesofílico comercial, contaminados com 10^5 esporos/ml, não
26 apresentaram evidências visuais de crescimento fúngico até o final dos 28 dias de maturação,
27 exibindo unicamente, uma casca espessa.

28 Esses achados sugerem que a aplicação da cepa *L. plantarum* 119 pode ser eficaz na prevenção do
29 desenvolvimento de *P. commune* (M35) durante o processo de maturação dos queijos, mesmo em
30 condições de contaminação inicial relativamente elevadas.

31

1 **Quadro 7-** Análise visual do início das contaminações fúngicas nas peças de queijo fabricadas
 2 com concentração de 10^5 esporos/ ml de *P. commune*
 3

Queijos fabricados com:	Observação dos queijos contaminados com 10^5 de <i>P. commune</i> com crescimento visível pelas fotografias digitais:				
	1º Dia de maturação	7º Dia de maturação	14º Dia de maturação	21º Dia de maturação	28º Dia de maturação
Sem cultura	SC	SC	SC	C	C
Fermento mesofílico	SC	SC	SC	SC	SC
<i>L. plantarum</i> (L119)	SC	SC	SC	SC	SC

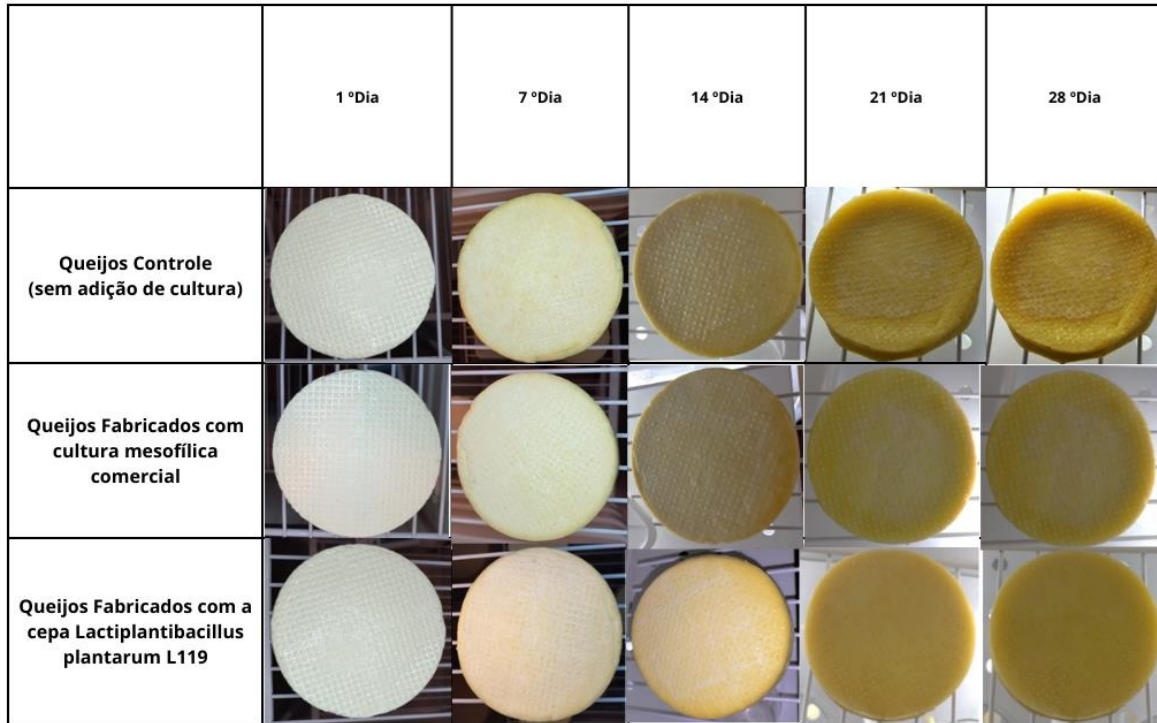
4 **Nota:** (SC) sem crescimento visível; (C) crescimento visível
 5
 6

7 **Tabela 1.** Relação entre a porcentagem da área superficial contaminada dos queijos,
 8 considerando a área total da face do queijo e a área de aplicação da contaminação com *P.*
 9 *commune* em uma concentração fúngica de 10^5 esporos/ml, obtida pela avaliação dos três lotes
 10 fabricados utilizando diferentes culturas.
 11

DIAS DE MATURAÇÃO	CULTURAS	% crescimento/ Área total da face contaminada do queijo (95,033 cm ²)	% crescimento/ Área em que o fungo foi aplicado na face do queijo (49cm ²)
21 dias	Queijos Controle (sem adição de fermento)	18,09	48,46
	Queijos Fabricados com Fermento Mesofílico Comercial	-*	-*
	Queijos Fabricados com a cepa <i>L. plantarum</i> (L119)	-*	-*
28 dias	Queijos Controle (sem adição de fermento)	24,98	47,86
	Queijos Fabricados com Fermento Mesofílico Comercial	-*	-*
	Queijos Fabricados com a cepa <i>L. plantarum</i> (L119)	-*	-*

12 -* Não houve crescimento visualizável na área contaminada dos queijos elaborados com estas culturas em nenhum
 13 dos lotes fabricados.
 14
 15

- 1 **Figura 6.** Resultado das imagens digitais obtidas durante o processo de maturação dos queijos
 2 contaminados com *P. commune* a 10^5 esporos/cm²



- 3 Nos queijos contaminados com uma concentração de 10^6 esporos/ml (Quadros 8, Tabela 2 e Figura
 4 7), com contaminação estimada de 205 esporos/ cm², observou-se uma notável contaminação
 5 fúngica aparente a partir do 14º dia de maturação. A casca do queijo estava robustamente
 6 consolidada e firme, exibindo uma significativa cobertura fúngica esbranquiçada, nos queijos
 7 fabricados sem fermento.
- 8 Os queijos fabricados sem fermento apresentaram uma porcentagem média de área contaminada
 9 de 22,11% aos 14 dias de maturação, evoluindo para uma porcentagem de 38,47% aos dias de
 10 maturação, considerando a área total da face contaminada do queijo (95, 033 cm²). Ao se
 11 considerar que a área de aplicação da contaminação (49 cm²), a porcentagem média de área
 12 contaminada de 42,89% aos 14 dias, evoluindo para 74,62% aos 21 dias.
- 13 Aos 28 dias de contaminação, os queijos fabricados sem fermento apresentaram uma porcentagem
 14 média de área contaminada de 51,44%, em relação a área total da face contaminada do queijo (95,
 15 033 cm²), e uma porcentagem média de área contaminada de 98,80%, ao considerar que a área de
 16 aplicação da contaminação (49 cm²).

1 **Quadro 8-** Análise visual do início das contaminações fúngicas nas peças de queijo fabricadas com
 2 concentração de 10^6 esporos/ ml de *P. commune*

Queijos fabricados com:	Observação dos queijos contaminados com 10^6 de <i>P. commune</i> com crescimento visível pelas fotografias digitais:				
	1º Dia de maturação	7º Dia de maturação	14º Dia de maturação	21º Dia de maturação	28º Dia de maturação
Sem cultura	SC	SC	C	C	C
Fermento mesofílico	SC	SC	SC	C	C
<i>L. plantarum</i> (L119)	SC	SC	SC	SC	C

3 Nota: (SC) sem crescimento visível; (C) crescimento visível

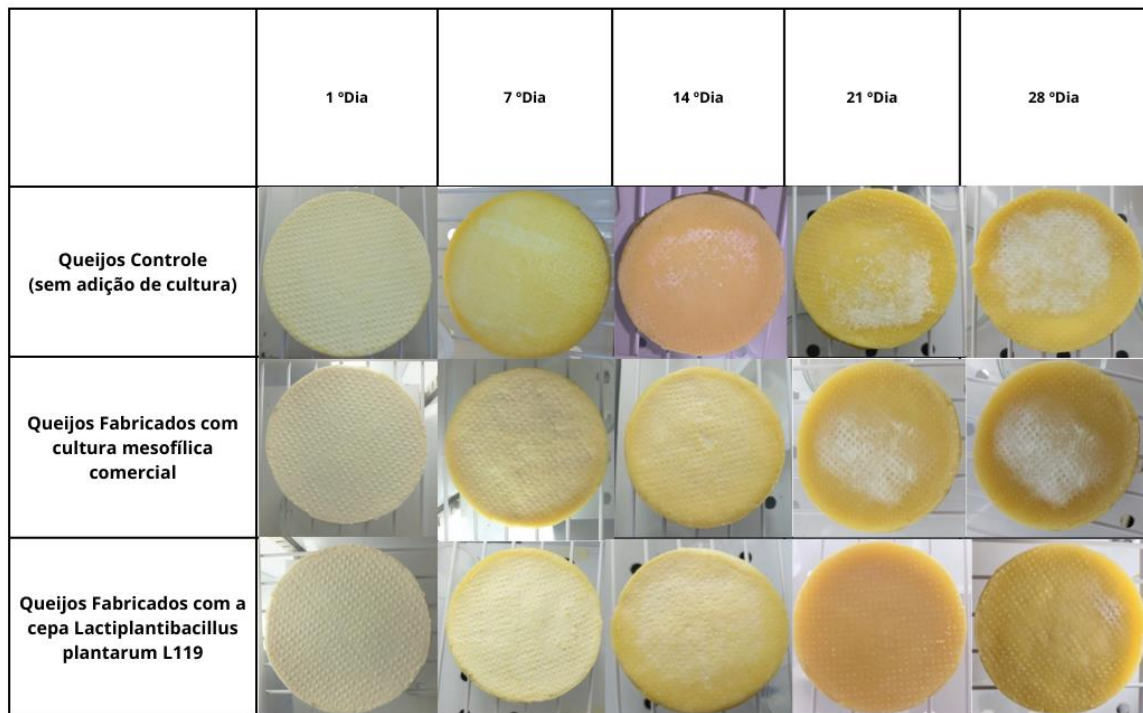
4
5
6
7
8

Tabela 2. Relação entre a porcentagem da área superficial contaminada dos queijos, considerando a área total da face do queijo e a área de aplicação da contaminação com *P. commune* em uma concentração fúngica de 10^6 esporos/ml, obtida pela avaliação dos três lotes fabricados utilizando diferentes culturas

DIAS DE MATURAÇÃO	CULTURAS	% Média da Área contaminada/ Área total da face contaminada do queijo (95,033 cm ²)	% Média da Área contaminada/ Área em que o fungo foi aplicado na face do queijo (49cm ²)
14 dias	Queijos Controle (sem adição de fermento)	22,11	42,896
	Queijos Fabricados com Fermento Mesofílico Comercial	-*	-*
	Queijos Fabricados com a cepa <i>L. plantarum</i> (L119)	-*	-*
21 dias	Queijos Controle (sem adição de fermento)	38,47	74,62
	Queijos Fabricados com Fermento Mesofílico Comercial	30,78	59,70
	Queijos Fabricados com a cepa <i>L. plantarum</i> (L119)	-*	-*
28 dias	Queijos Controle (sem adição de fermento)	51,44	98,80
	Queijos Fabricados com Fermento Mesofílico Comercial	43,74	84,84
	Queijos Fabricados com a cepa <i>L. plantarum</i> (L119)	2,8	5,43

9 -* Não houve crescimento visualizável na área contaminada dos queijos elaborados com estas culturas em nenhum
 10 dos lotes fabricados.
 11
 12

- 1 **Figura 7.** Resultado das imagens digitais obtidas durante o processo de maturação dos queijos
 2 contaminados com *P. commune* a 10^6 esporos/cm²



- 3
 4 Nos queijos fabricados com fermento mesofílico, contaminados com 10^6 esporos/ml, o
 5 desenvolvimento fúngico foi observado a partir do 21º dia, abrangendo parte considerável da
 6 superfície dos queijos contaminada. A porcentagem de contaminação visível, considerando os três
 7 lotes fabricados, foi de 30,78% aos 21 dias de maturação, considerando a área total da face
 8 contaminada do queijo (95,033 cm²). Considerando a área de aplicação da contaminação (49 cm²)
 9 tem -se uma porcentagem média de área contaminada de 59,70% aos 21 dias.
 10 Aos 28 dias de contaminação, os queijos fabricados com fermento mesofílico apresentaram uma
 11 porcentagem média de área contaminada de 43,74%, em relação a área total da face contaminada
 12 do queijo (95,033 cm²), e uma porcentagem média de área contaminada de 84,84%, considerando
 13 a área de aplicação da contaminação (49 cm²).
 14 Em contraste, os queijos fabricados com a cultura de *L. plantarum* (L119) contaminados com 10^6
 15 esporos/ml não apresentaram crescimento fúngico aparente até o 21º dia de maturação. Ao atingir
 16 o 28º dia, apenas um ponto aparente de desenvolvimento fúngico foi observado, com os queijos
 17 apresentando uma casca espessa. A porcentagem média de área contaminada foi de 2,8%,
 18 considerando a área total da face contaminada do queijo (95,033 cm²), e uma porcentagem média

1 de área contaminada de 5,43%, em relação a área de aplicação da contaminação (49 cm²). As
 2 porcentagens de área contaminada nos queijos fabricados com a cultura de *L. plantarum* se
 3 destacam por apresentarem os menores valores percentuais de contaminação.

4 Diante de uma contaminação de 10⁷ esporos/ml (Quadro 9, Tabela 3 e Figura 8), equivalente a
 5 aproximadamente 2040 esporos/ cm² de queijo, os queijos fabricados sem fermento, apresentaram
 6 uma contaminação fúngica visível a partir do 14º dia de maturação. As cascas dos queijos estavam
 7 mais espessas, ao comparar com as cascas dos mesmos representantes com menores concentrações
 8 de contaminação.

9
 10 **Quadro 9-** Análise visual do início das contaminações fúngicas nas peças de queijo fabricadas com
 11 concentração de 10⁷ esporos/ ml de *P. commune*

Queijos fabricados com:	Observação dos queijos contaminados com 10 ⁷ de <i>P. commune</i> com crescimento visível pelas fotografias digitais:				
	1º Dia de maturação	7º Dia de maturação	14º Dia de maturação	21º Dia de maturação	28º Dia de maturação
Sem cultura	SC	SC	C	C	C
Fermento mesofílico	SC	SC	SC	C	C
<i>L. plantarum</i> (L119)	SC	SC	SC	C	C

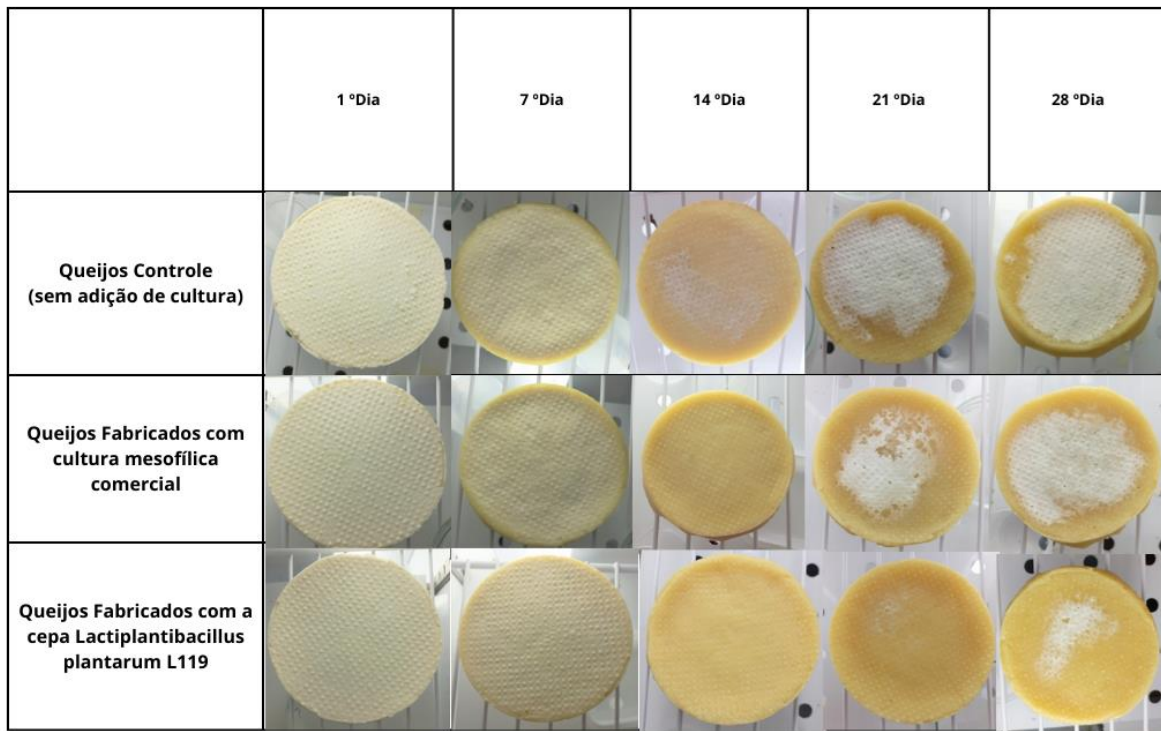
12
 13 **Nota:** (SC) sem crescimento visível; (C) crescimento visível
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25

1 **Tabela 3.** Relação entre a porcentagem da área superficial contaminada dos queijos, considerando
 2 a área total da face do queijo e a área de aplicação da contaminação com *P. commune* em uma
 3 concentração fúngica de 10^7 esporos/ml, obtida pela avaliação dos três lotes fabricados utilizando
 4 diferentes culturas
 5

DIAS DE MATURAÇÃO	CULTURAS	% Média da Área contaminada/ Área total da face contaminada do queijo (95,033 cm ²)	% Média da Área contaminada/ Área em que o fungo foi aplicado na face do queijo (49cm ²)
14 dias	Queijos Controle (sem adição de fermento)	32,67	63,37
	Queijos Fabricados com Fermento Mesofílico Comercial	-*	-*
	Queijos Fabricados com a cepa <i>L. plantarum</i> (L119)	-*	-*
21 dias	Queijos Controle (sem adição de fermento)	58,12	112,73
	Queijos Fabricados com Fermento Mesofílico Comercial	34,25	66,42
	Queijos Fabricados com a cepa <i>L. plantarum</i> (L119)	5,97	11,59
28 dias	Queijos Controle (sem adição de fermento)	73,87	143,28
	Queijos Fabricados com Fermento Mesofílico Comercial	64,75	125,59
	Queijos Fabricados com a cepa <i>L. plantarum</i> (L119)	19,35	37,54

6 -* Não houve crescimento visualizável na área contaminada dos queijos elaborados com estas culturas em nenhum
 7 dos lotes fabricados.
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18

- 1 **Figura 8.** Resultado das imagens digitais obtidas durante o processo de maturação dos queijos
 2 contaminados com *P. commune* a 10^7 esporos/cm²



- 3
 4 Os queijos fabricados sem adição de fermento, contaminados com 10^7 esporos/cm², possuíam uma
 5 significativa cobertura fúngica esbranquiçada. A porcentagem média de área contaminada foi de
 6 32,67% aos 14 dias de maturação, aumentando para uma porcentagem de 58,12% aos 21 dias de
 7 maturação, considerando a área total da face contaminada do queijo (95, 033 cm²). Ao considerar
 8 que a área de aplicação da contaminação (49 cm²) tem -se uma porcentagem média de área
 9 contaminada de 63,37% aos 14 dias, evoluindo para 112,73% aos 21 dias.
- 10 Aos 28 dias de contaminação, os queijos fabricados sem fermento apresentaram uma porcentagem
 11 média de área contaminada de 73,87%, em relação a área total da face contaminada do queijo (95,
 12 033 cm²), e uma porcentagem média de área contaminada de 143,28% considerando a área de
 13 aplicação da contaminação (49 cm²).
- 14 Observa-se que a partir do 21 ° dia de maturação a área visível de contaminação já superava a área
 15 em que o fungo foi aplicado nas peças de queijo em 12,73%, indicando condições favoráveis ao
 16 seu desenvolvimento.
- 17 Nos queijos fabricados com fermento mesofílico, a visualização da contaminação fúngica foi
 18 possível a partir do 21º dia, cobrindo uma área relevante da superfície. A média da porcentagem

1 de cobertura fúngica foi de 34,25% da área total da face contaminada do queijo (95, 033 cm²) e
2 66,42% da área de aplicação da contaminação (49 cm²). Aos 28 dias de maturação, a cobertura
3 fúngica média foi de 64,75% da área total da face contaminada do queijo (95, 033 cm²) e de
4 125,59% da área de aplicação da contaminação (49 cm²).

5 Os queijos fabricados com a cultura de *L. plantarum* (L119), contaminados com 10⁷ esporos/ml,
6 apresentaram pequenos pontos fúngicos visíveis a partir do 21º dia de maturação. A média de
7 cobertura fúngica sobre a face contaminada do queijo (95,033) foi de 5,97% e de 11,59% em
8 relação a área de aplicação da contaminação (49 cm²). Ao atingir o 28º dia, tornou-se possível
9 verificar uma área esbranquiçada, representando uma média de 19,35% da área total da face
10 contaminada do queijo (95, 033 cm²) e 37,54% da área de aplicação da contaminação (49 cm²).

11 Comparando os resultados percentuais e visuais obtidos ao 28º dia, entre os queijos produzidos
12 com a L119 e o fermento mesofílico comercial, é evidente que o desenvolvimento fúngico presente
13 nos queijos produzidos com fermento comercial se estendeu em 25,59% para além da área
14 inicialmente aplicada, enquanto os queijos produzidos com a L119, não tiveram nem mesmo 50%
15 de sua área total afetada, demonstrando um maior potencial bioconservante da cepa L119 frente ao
16 *P. commune*, quando comparada ao potencial de conservação do fermento comercial utilizado.
17 Todos os queijos apresentaram uma casca espessa e dura.

18 Destaca-se que os únicos queijos com esporulação visível, evidenciada pela alteração de cor
19 constatada pela presença de pequenos pontos esverdeados, foram os queijos fabricados sem
20 fermento adicionado e contaminados por 10⁷ esporos/ml ao 28º dia de maturação, praticamente
21 recobertos por fungo.

22 A avaliação da evolução do processo de contaminação evidenciou o potencial da cepa L119 em
23 inibir e retardar o desenvolvimento fúngico (Tabela 4).

24

25

26

27

28

29

30

1 **Tabela 4.** Dados da diferença percentual de evolução do desenvolvimento fúngico entre os
 2 diferentes dias de observação, considerando a área total da face contaminada do queijo e a área de
 3 aplicação da contaminação fúngica das peças de queijo.

4

Concentração Fúngica Aplicada (esporos/ml)	Queijo Avaliado	Diferença entre a % de contaminação visível entre o 21º dia e 28º dia de avaliação, em relação a área total da face contaminada do queijo (95, 033 cm ²)	Diferença entre a % de contaminação visível entre o 21º dia e 28º dia de avaliação, em relação a área de aplicação da contaminação fúngica (49cm ²)
10 ⁵	Queijo produzido sem fermento	6,89	0,6
	Queijo produzido com fermento mesofílico comercial	-*	-*
	Queijo produzido com a cepa <i>L. plantarum</i> (L119)	-*	-*
10 ⁶	Queijo produzido sem fermento	12,97	24,18
	Queijo produzido com fermento mesofílico comercial	12,96	25,14
	Queijo produzido com a cepa <i>L. plantarum</i> (L119)	2,8	5,43
10 ⁷	Queijo produzido sem fermento	15,75	30,55
	Queijo produzido com fermento mesofílico comercial	30,5	59,16
	Queijo produzido com a cepa <i>L. plantarum</i> (L119)	13,38	25,95

5 -* Não houve crescimento visualizável na área contaminada dos queijos elaborados com estas culturas em nenhum
 6 dos lotes fabricados.

7

8 Os resultados evidenciados pelas imagens dos queijos reafirmam os resultados obtidos *in vitro*
 9 pelas técnicas executadas em meio MRS, reforçando a eficácia da cepa *L. plantarum* L119 em
 10 inibir o desenvolvimento fúngico, contribuindo para a compreensão do papel dessa cepa na
 11 preservação da qualidade e segurança alimentar durante o processo de maturação de queijos.

1 Os fungos podem modificar tanto características organolépticas quanto as características de
2 maturação da casca. Jurado e Vicente (2020), pontuam que durante o processo de maturação o
3 queijo passa por um processo de evaporação da água da superfície e a consolidação da casca.
4 Ambos os processos podem sofrer modificações de acordo com as etapas tecnológicas
5 desenvolvidas e as condições ambientais propiciadas durante o processo de maturação. O estudo
6 ainda complementa que o *P. commune* pode ser responsável por um maior enrijecimento da casaca
7 e alterações de camadas internas dos queijos contaminados, partindo da hipótese de que as hifas
8 fúngicas do *P. commune* poderiam ampliar a superfície evaporativa fazendo os queijos perderem
9 mais água (Jurado, Vicente, 2020). As possíveis alterações citadas acima, podem ter acontecido no
10 presente estudo, uma vez que os queijos, produzidos neste experimento, apresentaram uma casca
11 rígida e espessa.

12 Os queijos com elevada contaminação aparente, se mostraram mais difíceis de manusear no preparo
13 das amostras para microscopia eletrônica, por apresentar dificuldade no recorte das amostras, o que
14 poderia ser justificado pela hipótese e pela observação experimental relata por Jurado e Vicente
15 (2020), porém a dificuldade de controle de umidade e as limitações do ambiente controlado
16 propiciado para o desenvolvimento deste experimento, podem ter interferido neste processo,
17 intensificando a evaporação e modificando o desenvolvimento do *P. commune*.

18 Por tais motivos, verificar o desenvolvimento desses queijos em ambiente industrial permitiria uma
19 melhor avaliação das condições ambientais e da microbiota residente na interferência da
20 contaminação dos queijos, não excluindo a importância dos resultados obtidos sobre a capacidade
21 antifúngica da cepa L119.

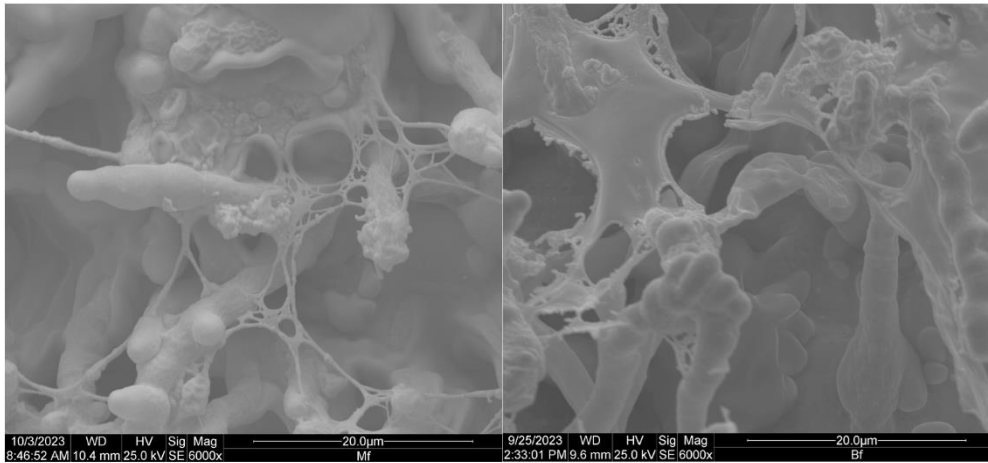
22 As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Imagem 3 e 4) revelaram alterações
23 visíveis em hifas e conídios nos queijos que foram fabricados com a cepa L119 e nos queijos
24 fabricados com o fermento comercial mesofílico. Além de diferentes formações de biofilmes,
25 quando comparadas as imagens dos queijos produzidos com fermento mesofílico comercial e
26 queijos produzidos com a cultura da cepa L119 (Imagem 4). No entanto, não foi possível
27 determinar se o biofilme formado era fúngico ou bacteriano. As imagens do controle mostravam
28 hifas com estrutura tubular, com superfície alongada e lisa, com a presença de muitos conídios
29 ovoides (Imagem 5), as imagens de MEV dos queijos que apresentavam bactérias ácido lácticas,
30 como fermento adicionado, mostravam uma menor quantidade de conídios, com hifas deformadas,
31 com aparência desidratada (Imagem 5). Sendo que os queijos produzidos com L119 as hifas

1 apresentavam uma deformação mais intensa e menos conídios aparentes do que nos queijos
2 produzidos a partir do fermento mesofílico comercial.

3 A atividade antifúngica da cepa L119 não foi só eficaz na redução do crescimento visível dos
4 micélios fúngicos e nos conídios, mas também se indica a possibilidade da geração de danos
5 morfológicos nas hifas e possível inibição da esporulação

6

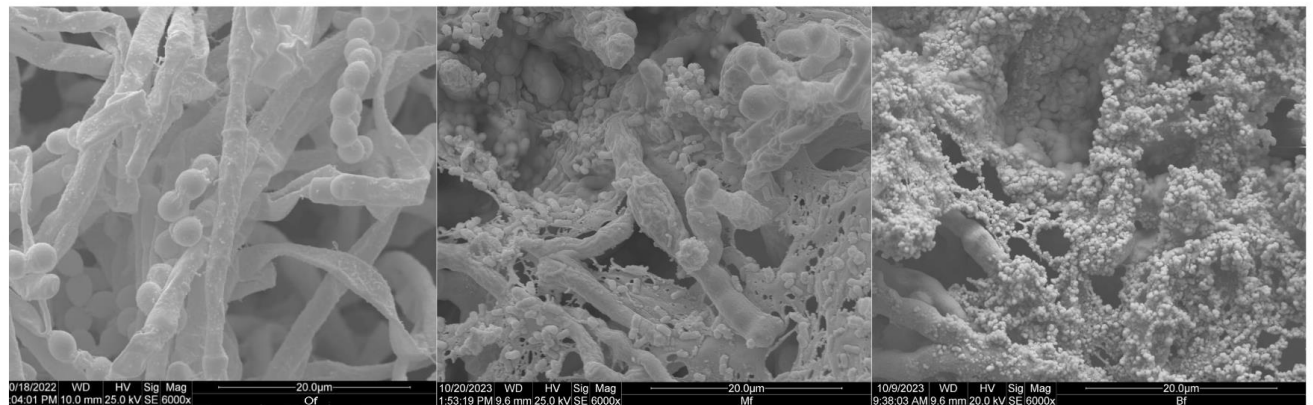
7 **Imagem 4.** Comparação entre as Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura, em magnitude
8 6kx, dos queijos elaborados com fermento mesofílico comercial (Mf) e cultura de *L. plantarum*
9 (L119) (Bf), contaminados com *P. commune* (M35) em concentração de 10^7 esporos/ml com 28
10 dias de maturação.



11

12

13 **Imagem 5.** Comparação entre as Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura, em
14 magnitude 6kx, dos queijos elaborados sem adição de fermento (Of), com fermento mesofílico
15 comercial (Mf) e com a cultura de *L. plantarum* (L119) (Bf), e contaminados com *P. commune*
16 (M35) em concentração de 10^7 esporos/ml com 28 dias de maturação.



17

18

19

1 **Conclusão**

2 O estudo demonstrou a habilidade antifúngica da cepa *L. plantarum* (L119) frente a contaminação
3 por *P. commune* (M35), tanto *in vitro*, quanto em peças de queijo de curta maturação, comprovando
4 o potencial desta bactéria ácido láctica para formulação de um bioconservante antifúngico. Essa
5 constatação possibilita o desenvolvimento de um fermento ou cultura aditiva para queijos com
6 efeito antifúngico, a partir de uma cepa de *Lactiplantibacillus plantarum* obtida de um alimento de
7 mesma categoria. Para aplicabilidade deste microrganismo, considera-se relevante a identificação
8 do composto responsável pela atividade antagônica, assim como a análise da manutenção do
9 potencial antagônico perante a interação da cepa L119 com outros microrganismos inoculados
10 como cultura nos diferentes queijos. Estudos que ampliem a amostragem ou contemplem a
11 realidade industrial, seriam bem-vindos, assim como a associação da cepa L119 com fermentos
12 comerciais.

13

14 **Referências**

15

- 16 Awast, N.; Anand, S. The Role of Yeast and Molds in Dairy Industry: An update. In: Minj, J.;
17 Kumari, A.; Sudhakaran V, A. **Dairy Processing: Advanced Research to Applications**. Springer,
18 2020. p. 243- 262. <https://doi.org/10.1007/978-981-15-2608-4>.
- 19 Cabo, M. L.; Braber, A. F.; Koenraad, P. M. F. J. Apparent antifungal activity of several lactic acid
20 bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. **Journal of Food**
21 **Protection**, v. 65, n. 8, p. 1309-1316, 2002. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.8.1309>
- 22 Cavicchioli, V.Q.; Camargo, A.C.; Todorov, S.D.; Nero, L.A. Novel bacteriocinogenic
23 *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus* strains with antilisterial activity isolated from
24 Brazilian artisanal cheese. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 4, p: 2526–2535, 2017.
25 <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12049>
- 26 Chaves, A. C. S. D.; Monteiro, R. P.; Machado, R. L. P. Etapas do processo de produção. In:
27 Monteiro, R. P.; Matta, V. M. **Queijo Minas artesanal: valorizando a agroindústria familiar**.
28 Embrapa, 2018. cap. 4, p. 55-70.
29 <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/199140/1/cap-4-queijo-minas-p-55-a-70.pdf>
- 30 Chen W.; Hang F. Lactic Acid Bacteria Starter. In: Chen W (Ed.). **Lactic Acid Bacteria**. Springer,
31 2020.p. 93-143. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7283-4_5.

- 1 Cheong, E.Y.L., Sandhu, A., Jayabalan, J., Kieu Le, T.T., Nhiep, N.T., My Ho, H.T., Zwielehner,
2 J., Bansal, N., Turner, M.S. Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the
3 common cheese spoilage mold *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in
4 cheese. **Frontier in Microbiology**, v. 46, sn., p. 91–97, 2014.
5 <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.011>.
- 6 Davidson P. M.; Salminen S.; Thorngate III J. H. **Food Additives**.2 ed. Marcel Dekker, Inc., 2002.
7 934p.
- 8 Delavenne, E.; Cliquet, S.; Trunet, C.; Barbier, G.; Mounier, J.; Le Blay, G. Characterization of
9 the antifungal activity of *Lactobacillus harbinensis* K. V9.3.1Np and *Lactobacillus rhamnosus*
10 K.C8.3.1I in yogurt. **Food Microbiology**, v. 45, sn., p. 10–17, 2015.
11 <http://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.017>.
- 12 Echegaray, N.; Yilmaz, B.; Sharma, H.; Kumar, M.; Pateiro, M.; Ozogul, F.; Lorenzo, J.M. A novel
13 approach to *Lactiplantibacillus plantarum* from probiotic Properties to the omic insights.
14 **Microbiological Research**, v. 268, sn., p. 127-289, 2023.
15 <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127289>.
- 16 FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nation. **Micotoxins**. 2021.
17 <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins>.
- 18 Fidanza, M.; Panigrahi, P.; Kollmann, T.R. *Lactiplantibacillus plantarum*- Nomad and Ideal
19 Probiotic. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, e 712236, 2021.
20 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.712236>.
- 21 Fodil, S.; Delgado, J.; Varvaro, L.; Yaseen, T.; Rodríguez, A. Effect of potassium sorbate (E-202)
22 and the antifungal PgAFP protein on *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A production
23 in raisin simulating media. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 15, p. 5785-
24 5794, 2018. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9128>.
- 25 Garcia, J.K.S.; Prates, R.P.; Farias, P.K.S.; Gonçalves, S.F.; Souza, C.N. Qualidade microbiológica
26 de queijos frescos artesanais comercializados na região norte de Minas Gerais. **Caderno de**
27 **Ciências Agrárias**, v.8, n. 2. P. 58-65, 2016.
28 <https://periodicos.ufmg.br/index.php/ccaufmg/article/view/2924/1768>. ISSN 2447-6218.
- 29 Gargaro, I. M.; Baldacim, M. G.; Marins, A. R. De.; Campos, T. A. F. De.; Silva, N. M. Da.;
30 Feihrmann, A. C. Ozonation in a cold room during the partial maturation of parmesan

- 1 cheese. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 17, p. e91101724298, 2021.
2 <http://doi.org/10.33448/rsd-v10i17.24298>.
- 3 Garnier, L.; Valence, F.; Pawtowski, A.; Auhustsinava-Galerie, L.; Frotté, N.; Baroncelli, R.;
4 Deniel, F.; Coton, E.; Mounier, J. Diversity of spoilage fungi associated with French dairy
5 products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, sn., p.191–197, 2017.
6 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026>.
- 7 Gontijo, M. T. P.; Silva, J. S.; Vidigal, P. M. P.; Martin, J. G. P. Phylogenetic distribution of the
8 bacteriocin repertoire of lactic acid bacteria species associated with artisanal cheese. **Food**
9 **Research International**, v. 128, sn., p. 1-38, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108783>.
- 10 Gougouli, M.; Kalantzi, K.; Beletsiotis, E.; Koutsoumanis, K.P. Development and application of
11 predictive models for fungal growth as tools to improve quality control in yogurt production. **Food**
12 **Microbiology**, v. 28, n. 8 p.1453–1462, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.07.006>.
- 13 Hafid, H.S.; Rahman, N.A.A.; Abd-Aziz, S.; Hassan, M.A. Enhancement of organic acids
14 production from model kitchen waste via anerobic digestion. **African Journal of Biotchnology**,
15 v. 10, n. 65, p. 14507-14515, 2011. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1360>.
- 16 Hazards, E.; Panel, O.B.; Ricci, A.; Allende, A.; Bolton, D.; Chemaly, M.; Davies, R.; Fernández
17 Escámez P.S. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food
18 or feed as notified to EFSA 5: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September
19 2016. **EFSA Journal**, v. 15, n. 3, e07045, 2017. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7045>.
- 20 Hymery, N.; Vasseur, V.; Coton, M.; Mounier, J.; Jany, J-L.; Barbier, G.; Coton, E. Filamentous
21 Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food**
22 **Safety**, v. 13, n. 4, p. 437–456, 2014. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12069>.
- 23 Ibrahim, F.; Ouwehand, A.C. The genus *Lactobacillus*. In: Viderola, G.; Ouwehand, A.C.;
24 Salminen, S.; Wright, A.V. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects** 5ed.
25 CRC Press, 2019. p. 23. <https://doi.org/10.1201/9780429057465>
- 26 Jahn, R. C.; Garcia, M. V.; Coppetti, M. V. Deterioração Fúngica em Indústrias de Queijo Tipo
27 Tropical. **Brazilian Journal of Food Research**, v.8, n. 1, p.16-25, 2017.
- 28 Jurado, M.; Vicente, C. *Penicillium commune* affects textural properties and waste distribution of
29 hard and extra-hard cheeses. **Journal of Dairy Research**, v. 8, n. 1, p. 117-122, 2020.
30 <http://doi.org/10.1017/S0022029919000906>.

- 1 Lewus, C.B.; Kaiser, A.; Montville, T.J. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by
2 bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Applied and environmental**
3 **Microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1683-1688, 1991. [https://doi.org/10.1128%2Faem.57.6.1683-](https://doi.org/10.1128%2Faem.57.6.1683-1688.1991)
4 1688.1991.
- 5 Liu, Y.; Zheng, S.; Cui, J.; Guo, T.; Zhang J. *Lactiplantibacillus plantarum* Y15 alleviate type 2
6 diabetes in mice via modulating gut microbiota and regulating NF- κ B and insulin signaling
7 pathway. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 935=945, 2022.
8 <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00686-5>.
- 9 Liu, D.M.; Huang, Y.Y.; Liang, M.H. Analysis of the probiotic characteristics and adaptability of
10 *Lactiplantibacillus plantarum* DMDL 9010 to gastrointestinal environment by complete genome
11 sequencing and corresponding phenotypes. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v.158,
12 sn., sp. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113129>
- 13 Lourenço Neto, J. P.M. **Queijos: aspectos tecnológicos**. 1ed. Instituto Candido Tostes. Master
14 Graf, 2013.170-198p.
- 15 Magnusson, J. and Schnurer, J. *Lactobacillus coryniformis* Subsp. *Coryniformis* Strain Si3
16 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound. **Applied and Environmental**
17 **Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 1-5, 2001. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.1.1-5.2001>
- 18 MAREZE, P. **Inhibitory Potential of *Lactiplantibacillus Plantarum* as Biocontrol of Spoilage**
19 **and Mycotoxygenic *Penicillium* in Cheese**. 2021. 98 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) –
20 Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em
21 Ciência Animal, Londrina, 2021.
- 22 Markkinen, N.; Pariyani, R.; Jokioja, J.; Kortensniemi, M.; Laaksonen, O.; Yang, B. NMR-based
23 metabolomics approach on optimization of malolactic fermentation of sea buckthorn juice with
24 *Lactiplantibacillus plantarum*. **Food Chemistry**, v. 366, sn., sp., 2022.
25 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130630>.
- 26 Mayo, B.; Ammor, M.S.; Delgado, S.; Alegría, A. Fermented milk products. In: Tmang, J.P.,
27 Kilasapathy, K. **Fermented Food and Beverages of the World**. Taylor & Francis, 2010; pp. 263–
28 288. <https://doi.org/10.1201/EBK1420094954>
- 29 CLSI. Norma M38-A.-**Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a**
30 **Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma**
31 **Aprovada**, v. 22, n. 116, 2002.

- 1 Ng, Z.J.; Abu Zarin, M.; Lee, C.K.; Tan, J.S. Application of bacteriocins in food preservation and
2 infectious disease treatment for humans and livestock: A review. **RSC Advances**, v. 10, n. 64,
3 p.38937–38964, 2020. <https://doi.org/10.1039/D0RA06161A>.
- 4 Netto, M. **A geografia do queijo minas artesanal**. 2011. 420f. Tese (Doutorado) - Universidade
5 Estadual Paulista, Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro, SP, 2011.
- 6 Nieto-Arribas, P.; Poveda, J. M.; Seseña, S.; Palop, L.; Cabezas, L. Technological characterization
7 of *Lactobacillus* isolates from traditional Manchego cheese for potential use as adjunct starter
8 cultures. **Food Control**, v. 20, n. 12, p. 1092–1098, 2009.
9 <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.03.001>.
- 10 Ouiddir, M.; Bettache, G.; Leyva Salas, M.; Pawtowski, A.; Donot, C.; Brahimi, S.; Mabrouk, K.;
11 Coton, E.; Mounier, J. Selection of Algerian lactic acid bacteria for use as antifungal bioprotective
12 cultures and application in dairy and bakery products. **Food Microbiology**. v. 82, sn., p. 160-170,
13 2019. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2019.01.020>.
- 14 Penna, A.L.B.; Gigante, M.L.;Todorov, S.D. Artisanal Brazilian Cheeses- History, Marketing,
15 Technological and Microbiological Aspects. **Foods**, v. 10, n. 7, p. 1562, 2021.
16 <https://doi.org/10.3390/foods10071562>.
- 17 Pereira, M.; Fernandes Freire, Ítala S.; Colletti Escatolin, L.; Da Silva, J. R.; Caon, S. Qualidade
18 do Queijo Artesanal Serrano Catarinense quanto a Contagem Fúngica, Aflatoxina M1 e
19 Sujidades. **Pubvet**, [S. L.], v. 12, n. 07, sp., 2018. [http://doi.org/10.22256/Pubvet.V12n7a121.1-](http://doi.org/10.22256/Pubvet.V12n7a121.1-8)
20 8.
- 21 Pitt, J.I.; Hocking, A.D. **Fungi and Food Spoilage**. 4ed. Springer, 2022, 645 p.
22 <https://doi.org/10.1007/978-3-030-85640-3>.
- 23 Quéro, L.; Girard, V.; Pawtowski, A.; Tréguer, S.; Weil, A.; Arend, S.; Cellière, B.; Polsinelli, S.;
24 Monnin, V.; Van Belkum, A.; Vasseur, V.; Nodet, P.; Mounier, J. Development and application of
25 MALDI-TOF MS for identification of food spoilage fungi. **Food Microbiology**, v. 81, sn., p. 76–
26 88, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.05.001>.
- 27 Rajoka, M.S.R.; Wu, Y.; Mehwish, H.M.; Bansal, M.; Zhao, L. *Lactobacillus* exopolysaccharides:
28 New perspectives on engineering strategies, physiochemical functions, and immunomodulatory
29 effects on host health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 103, sn., p.36-48, 2020.
30 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.06.003>.

- 1 Ramos- Pereira, J. **Biocontrol de *Penicillium* alterantes y micotoxigénicos em queso madurado**
2 **(tipo Castellano) mediante el uso de bacterias ácido- lácticas como cultivos proctetores.** 2019.
3 192 f. Tese (Doctorado em Ciências Veterinaria e de los Alimentos) – Universidad de León,
4 Facultad de Veterinaria, León, Espanha.
- 5 Ramos-Pereira, J.; Mareze, J.; Patrino, E.; Santos, J.A.; Lopéz- Dias, M.T. Polyphasic
6 identification of *Penicillium* spp. isolated from Spanish semi-hard ripened cheeses. **Food**
7 **Microbiology**, v. 84, sn., p. 103253, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103253>.
- 8 Ramos-Pereira, J., Mareze, J., Fernández, D., Rios, E. A., Santos, J. A.; López-Díaz, T.-M.
9 Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from milk against *Penicillium commune*, *P.*
10 *nordicum*, and *P. verrucosum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 355, e109331,
11 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109331>
- 12 Rentero, N. Projeção de tendências para o leite aqui e lá fora. **Anuário do Leite**, EMBRAPA,
13 2023. P. 22-25. [https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1154264/anuario-](https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1154264/anuario-leite-2023-leite-baixo-carbono)
14 [leite-2023-leite-baixo-carbono](https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1154264/anuario-leite-2023-leite-baixo-carbono).
- 15 Russo, P.; Arena, M.P.; Fioco, D.; Capozzi, V.; Drider, D.; Spano, G. *Lactobacillus plantarum* with
16 broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based
17 products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 247, sn., p. 48-54, 2017.
18 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.027>.
- 19 Sadiq, F. A.; Yan, B.; Tian, F.; Zhao, J.; Zhang, H.; Chen, W. Lactic Acid Bacteria as Antifungal
20 and Anti-Mycotoxigenic Agents: A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews in Food**
21 **Science and Food Safety**, v. 18, n.5, p. 1403-1436. 2019. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.12481>
- 22 Salas, M. L.; Mounier, J.; Maillard, M.B.; Valence, F.; Coton, E.; Thierry, A. Identification and
23 quantification of natural compounds produced by antifungal bioprotective cultures in dairy
24 products. **Food Chemistry**. v. 301, sn., e125260, 2019.
25 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125260>
- 26 Schillinger, U.; Villarreal, J. V. Inhibition of *Penicillium nordicum* in MRS medium by lactic acid
27 bacteria isolated from foods. **Food Control**, v. 21, n. 2, p. 107–111, 2010.
28 <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.11.010>.
- 29 Seixas, F. N. (2014). **Phylogenetic identification and technological characterization of the**
30 **autochthonous lactic acid microbiota of the artisanal Serrano Catarinense cheese and its**

- 1 **antagonistic potential to pathogens.** PhD (Doctorate in Animal Science) – Universidade Estadual
2 de Londrina, Londrina.
- 3 Silva, C.C.G.; Silva, S.P.M.; Ribeiro, S.C. Application of bacteriocins and protective cultures in
4 dairy food preservation. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, sn., p. 594, 2018.
5 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>.
- 6 Siqueira, K.B.; Oliveira, S. J. M.; Lana M.S. O consumo de lácteos e a nova dinâmica demográfica
7 do país. **Anuário do Leite**, EMBRAPA, 2023. p 42-3. [https://www.embrapa.br/busca-de-](https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1154264/anuario-leite-2023-leite-baixo-carbono)
8 [publicacoes/-/publicacao/1154264/anuario-leite-2023-leite-baixo-carbono](https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1154264/anuario-leite-2023-leite-baixo-carbono)
- 9 Stratford, M.; Eklund, T. Organic acids and esters. In: Russel, N.J.; Gould, G.W. **Food**
10 **Preservatives**, Kluwer Academic/ Plenum Publisher, 2003 p. 48–84. [https://doi.org/10.1007/978-](https://doi.org/10.1007/978-0-387-30042-9_4)
11 [0-387-30042-9_4](https://doi.org/10.1007/978-0-387-30042-9_4).
- 12 Tilocca, B.; Costanzo, N.; Morittu, V. M.; Spina, A. A.; Soggiu, A.; Britti, D.; Piras, C. Milk
13 microbiota: Characterization methods and role in cheese production. **Journal of Proteomics**, v.
14 210, sn., e 103534, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2019.103534>.
- 15 Wang, W.; He, J.; Pan, D.; Wu, Z.; Guo, Y.; Zeng.; Lian, L. Metabolomics analysis of
16 *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 adhesion activity under initial acid and alkali stress. **PLoS**
17 **One**, v. 13, n. 5, p. 1-16, 2018. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0196231>.
- 18 Wang, Y.; Qin, Y.; Xie, Q.; Zhang, y.; Hu, J.; Li, P. Purification, and characterization of plantaricin
19 LPL-1, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPL-1 isolated from
20 fermented fish. **Frontiers. Microbiology**, v. 9, sn., p. 2276, 2018.
21 <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02276>.
- 22 Wang, J.; Ji, H.; Wang, S.; Liu, H.; Zhang, W.; Zhang, D.; Wang, Y. Probiotic *Lactobacillus*
23 *plantarum* promotes intestinal barrier function by strengthening the epithelium and modulating gut
24 microbiota. **Frontiers. Microbiology**. v. 9, p. 1953, 2018.
25 <http://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01953>.
- 26 Yilmaz, B.; Bangar, S.P.; Echegaray, N.; Suri, S.; Tomasevic, I.; Lorenzo, J. M.; Ozogul, F. The
27 impacts of *Lactiplantibacillus plantarum* on the functional properties of fermented foods: a review
28 of current knowledge. **Microorganisms**, v. 10, n. 4, p. 826, 2022.
29 <http://doi.org/10.3390/microorganisms10040826>.
- 30
31

7. CONCLUSÃO

O estudo demonstrou a capacidade antifúngica da cepa *L. plantarum* (L119) frente a contaminação por *P. commune* (M35) *in vitro*, e o potencial desta bactéria ácido láctica, obtida a partir de um queijo, para formulação de um bioconservante antifúngico para este alimento. A atividade antifúngica observada na cepa *L. plantarum*, está provavelmente associada à sua produção de ácidos orgânicos. Além disso, considera-se a possível interação entre diferentes ácidos orgânicos e compostos antifúngicos produzidos pela cepa, a serem identificados em estudos futuros.

A liofilização da cepa L119 permitiu a produção padronizada quanto ao inóculo, de queijos de curta maturação que foram contaminados com diferentes concentrações de *P. commune*.

As imagens digitais analisadas pelo *software ImageJ*, possibilitaram a comprovação do potencial antifúngico da *L. plantarum* frente a contaminação das peças por *P. commune*. Essa constatação possibilita o desenvolvimento de um fermento ou cultura aditiva com efeito antifúngico, a partir da cepa L119.

Os resultados obtidos neste estudo colaboram com a compreensão da interação entre o *P. commune* (M35) e a *L. plantarum* (L119), bem como para o avanço no desenvolvimento de estratégias eficazes no controle da contaminação fúngica em produtos alimentícios, destacando a aplicabilidade da L119 como potencial agente bioconservante em queijos.

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45

ANEXOS

ANEXO A:**Descrição detalhada de Material e Método****AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPOROS DA CEPA DE *PENICILLIUM COMMUNE* (M35):**

A análise de produção de esporos foi realizada no Laboratório de Micologia Médica e Microbiologia Bucal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina, para avaliação da capacidade de produção de esporos da cepa *P. commune* (M35), quando cultivada em tubos contendo 20 ml de ágar Batata Dextrose (Acumedia®). Esta cepa foi isolada, em estudos anteriores no Laboratório de Micologia de Alimentos do Departamento de Higiene e Inspeção de Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade de León, com queijos de ovelhas das províncias de Leon e Zamora no Noroeste da Espanha (Ramos-Pereira *et al.*, 2019 b).

Para avaliação, a cepa M35, conservada em solução de água ultrapura com 60% de glicerol P.A. (MERK®), foi reativada em tubo inclinado de ágar Batata Dextrose (Acumedia®) e repicada para uma série de 40 tubos inclinados, contendo 20 ml de ágar Batata Dextrose (Acumedia®). Diariamente, oito suspensões de esporos foram preparadas, de acordo com a metodologia do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2002), adicionando a cada tubo cultivado 5 ml de solução tampão fosfato salino 1% e com pH 7,4 (PBS- SIGMA®) e 0,05% de Solução estéril de *Tween* 80 (Acumedia®). Contagens diárias de esporos foram realizadas em Câmara de Neubauer, durante 20 dias. A partir da observação do crescimento e das contagens obtidas (Quadro 10), a concentração máxima a contemplar a necessidade de esporos para realização dos experimentos foi selecionada, entre o 7º e o 8º dia de crescimento.

1 **Quadro 10-** Avaliação do crescimento do *P. commune* (M35) e contagem de
 2 esporos produzidos em 20 dias.

DIA	DILUIÇÃO	Médias das Contagens em Câmara de Neubauer								Média dos Tubos	CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE ESPOROS
		Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8		
1	sem	19	25	15	16	18	21	15	24	19,125	1,91*10 ⁴
2	sem	74	72	88	83	75	76	75	83	78,25	7,82*10 ⁴
3	sem	105	75	73	75	81	84	73	75	80,125	8,01*10 ⁴
4	sem	131	135	125	126	138	136	129	116	129,5	1,29*10 ⁴
5	-1	145	146	172	127	118	168	169	118	145,375	1,45*10 ⁵
6	-1	172	185	165	172	159	187	169	122	166,375	1,66*10 ⁵
7	-2	288	269	255	247	255	238	198	268	252,25	2,52*10 ⁶
8	-3	254	289	224	285	186	257	255	297	255,875	2,55*10 ⁷
9	-3	223	276	218	287	228	241	232	289	249,25	2,49*10 ⁷
10	-3	216	225	258	276	271	291	189	153	234,875	2,34*10 ⁷
11	-3	211	243	265	256	188	274	196	229	232,75	2,32*10 ⁷
12	-3	187	213	162	206	174	255	223	196	202	2,02*10 ⁷
13	-3	149	148	244	209	169	181	217	133	181,25	1,81*10 ⁷
14	-3	203	209	247	252	189	221	251	265	229,625	2,29*10 ⁷
15	-3	198	176	175	269	287	285	204	206	225	2,25*10 ⁷
16	-3	148	263	188	227	186	273	202	194	210,125	2,1*10 ⁷
17	-3	155	225	232	227	276	274	164	145	212,25	2,12*10 ⁷
18	-3	287	221	206	217	184	194	257	136	212,75	2,12*10 ⁷
19	-3	131	135	236	141	225	136	245	148	174,625	1,74*10 ⁷
20	-3	137	248	224	147	145	156	119	126	162,75	1,62*10 ⁷
19	-3	141	145	135	252	229	136	136	146	165	1,65*10 ⁷
20	-3	167	125	143	143	145	127	132	142	140,5	1,4*10 ⁷

3

4 **ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIFUNGICA DA CEPA DE *L. PLANTARUM* (L119)**
 5 **CONTRA O FUNGO *P. COMMUNE* (M35):**

6 A cepa L119 foi isolada de exemplares de queijo artesanal Serrano catarinense,
 7 na Universidade Estadual de Londrina por estudos anteriores (Seixas, 2014), sendo
 8 mantida a -80°C em Caldo *Man Rogosa & Sharpe* (MRS) (KASVI[®]) suplementado com
 9 20% de glicerol. Para avaliação da atividade antagônica, duas técnicas foram executadas
 10 conforme Schillinger e Villarreal (2010) e Magnusson e Schnürer (2001), ambas com
 11 modificações, sendo a leitura das análises realizada com base na metodologia de
 12 Cheong *et al.* (2014).

13

14

Técnica 1:

15

16

17

18

Para avaliação da atividade antagônica da cepa de *L. plantarum* (L119) contra o
 fungo *P. Commune* (M35), foi utilizada a técnica descrita por Schillinger e Villarreal (2010)
 e Cheong *et al.* (2014), com modificações. A análise de atividade antagônica foi realizada

1 no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da Universidade Estadual de
2 Londrina. A cepa L119 foi reativada em Caldo MRS (KASVI[®]) e incubada a 30°C por 24
3 horas.

4 Após a turvação do caldo, soluções de concentrações de 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸
5 UFC/ml, foram preparadas, com auxílio de escala *Mc Farland* e 10 µL de cada solução
6 foi aplicado pontualmente em três locais da placa de ágar MRS (Acumedia[®]). As placas
7 foram incubadas a 30°C por 48 horas.

8 Para preparo das soluções fúngicas, a cepa M35 foi semeada em tubos
9 inclinados contendo ágar Batata Dextrose (Acumedia[®]), incubados a 25°C por sete dias.
10 Cinco diferentes concentrações (10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ esporos/ml) foram preparadas de
11 acordo com a metodologia do Clinical and Laboratory Standards Institute, com
12 modificações (CLSI, 2002). As placas de ágar MRS com a cepa L119 cultivada foram
13 recobertas por uma sobrecamada de ágar Batata Dextrose (Acumedia[®]) com cada
14 solução de esporos preparada em duplicata. As placas foram incubadas a 25°C por 10
15 dias, para a observação da formação de zonas de inibição ao redor das colônias de L119.

16

17 Técnica 2:

18

19 Para avaliação da atividade antagônica da cepa de *L. plantarum* (L119) contra o
20 fungo *P. commune* (M35), foi utilizada a técnica descrita por Magnusson e Schnürer
21 (2001) e Cheong (2014), com modificações. A análise de atividade antagônica foi
22 realizada no Laboratório de Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, da
23 Universidade Estadual de Londrina. A cepa L119 foi reativada em caldo MRS (KASVI[®])
24 e incubada a 30°C por 48 horas.

25

26 Após a turvação do caldo, as culturas foram semeadas por esgotamento em Ágar
27 MRS (Acumedia[®]) e incubadas a 30°C por 48 horas. Colônias isoladas de L119 foram
28 repicadas linearmente em dois pontos da placa de ágar MRS, utilizando palitos estéreis,
29 incubando a 30°C por 48 horas. As placas de ágar MRS com a cepa L119 cultivada foram
30 recobertas por uma sobrecamada de ágar Batata Dextrose (Acumedia[®]) com soluções
31 de esporos em cinco diferentes concentrações (10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ esporos/ml),
preparadas de acordo com a metodologia do *Clinical and Laboratory Standards Institute*,

1 com modificações (CLSI, 2002). As placas foram incubadas a 25°C por 10 dias, para a
 2 observação da formação de zonas de inibição ao redor das colônias de L119. A avaliação
 3 foi realizada, em duplicata.

4 Os resultados de ambas as técnicas foram avaliados pela análise dos halos de
 5 inibição formados, com base na metodologia de Cheong *et al.* (2014), com modificações
 6 (Quadro 2):

7
 8 **Quadro 2-** Técnica de avaliação dos halos formados no teste de atividade
 9 antagônica do *L. Plantarum* (L119) contra o *P. commune* (M35), com base na metodologia
 10 de Cheong *et al.* (2014), com modificações.

Ausência de halo de inibição (-):	Quando as colônias de bactéria L119 estavam completamente recobertas pelo fungo M35
Fraca (+):	Quando era possível a visualização das colônias da bactéria L119, porém o halo de inibição não apresentava uma zona límpida ao redor da L119
Moderada (++):	Quando era possível a visualização das colônias da bactéria L119 e o halo de inibição se apresentava como uma zona límpida estreita ao redor da L119
Forte (+++)	Quando era possível a visualização das colônias da bactéria L119 e o halo de inibição se apresentava uma zona límpida ampla ao redor da L119

11
 12 **AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS COMPOSTOS DA CEPA L119 COM ATIVIDADE**
 13 **ANTIFÚNGICA:**

14
 15 Para investigação do composto microbiano presente na cepa L119 com atividade
 16 antifúngica foi utilizada a metodologia “*Spot on Lawn*” de Lewus, Kaiser e Montville (1991)
 17 e Cavicchioli *et al.*, (2017), com modificações. A cepa L119 foi semeada em caldo MRS,
 18 incubada a 36°C por 48 horas. A cultura foi centrifugada a 14.500 rpm, por 15 minutos,
 19 para obtenção do sobrenadante livre de células (SLC), que foi porcionado em diferentes
 20 tratamentos. O SLC1 foi esterilizado por filtro usando filtros de membrana de acetato de

1 celulose (0,22 µm). O SLC2 foi esterilizado por filtro usando filtros de membrana de
2 acetato de celulose (0,22 µm) e aquecido a 80° C por 10 minutos. O SLC 3 foi neutralizado
3 NaOH 1N até alcançar pH 6,0 e esterilizado por filtro usando filtros de membrana de
4 acetato de celulose (0,22 µm). O SLC 4 foi neutralizado NaOH 0.1N até alcançar pH 6,0
5 e esterilizado por filtro usando filtros de membrana de acetato de celulose (0,22 µm) e
6 aquecidas a 80° C por 10 minutos. Placas de ágar MRS (Acumedia®) foram semeadas
7 com uma solução de tampão fosfato salino 1%, com pH 7,4 (PBS- SIGMA®), contendo *P.*
8 *commune* em concentração de 10⁷ esporos/ml com solução fúngica preparadas (CLSI,
9 2002), previamente a aplicação das soluções SLC em poços de 5mm de diâmetro
10 recortados do ágar. Para avaliação dos resultados, foram observadas a ausência ou
11 presença de halos de inibição ao redor dos poços contendo diferentes CFS.

12

13 LIOFILIZAÇÃO DA CEPA DE *L. PLANTARUM* (L119):

14

15 A liofilização da cepa L119 foi realizada para auxiliar na padronização da cultura
16 para fabricação dos queijos. Foi utilizada a metodologia de Nieto-Arribas *et. al.* (2009)
17 para o processo de liofilização e para análise de viabilidade, a metodologia de De Valdez,
18 *et. al.*, 1985, ambas com modificações. No Laboratório de Inspeção de Produtos de
19 Origem Animal da Universidade Estadual de Londrina, a cepa L119 foi inoculada
20 (0,5%(g/v)) em 1 litro de caldo MRS (KASVI®), incubado a 36 °C por 24 horas.

21

22 A centrifugação da amostra foi realizada no Laboratório de Ecologia Microbiana
23 do Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade
24 Estadual de Londrina. O caldo foi centrifugado em Centrífuga refrigerada (Sorvall
25 RC5C Plus®) a 8000 rpm por 15 minutos a 5°C. Os peletes obtidos foram lavados duas
26 vezes com Tampão Fosfato 50 mM, pH 7, e foram ressuspensos em *Skim Milk*
(10%(g/v)) (MERK®/ SIGMA®) acrescido de 4 % de Lactose-D (Dinâmica®).

27

28 As amostras foram transportadas ao Laboratório da Pós-graduação em Ciência
29 e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, para realização do
30 congelamento por 10 horas, a -80°C (SANYON®) e liofilização, sendo a pressão do
equipamento (CRIST Alpha 2-4 LD Plus®) de 0.04 a 2 mB e a temperatura do

1 condensador alcançando – 55°C. A liofilização da cepa durou aproximadamente 36
2 horas.

3 Para controle da contagem e viabilidade bacteriana, foram realizados
4 plaqueamento por profundidade em placas com ágar MRS (Acumedia®), incubadas a
5 36°C por 48 horas, nas diferentes etapas do processo. Após o processo de liofilização, a
6 atividade de água do liofilizado foi verificada (*AquaLab Series 4TEV-duo*®). A viabilidade
7 do liofilizado foi determinada realizando o plaqueamento por profundidade após
8 reidratação de 0,1g de liofilizado em 9 ml e Salina Peptonada, incubando a 36°C por 48
9 horas. A cepa liofilizada foi armazenada em porções de 1,5 g, em Falcons estéreis, a -
10 20°C

11 A partir da observação dos resultados (Quadro 11) obtidos pela análise de
12 viabilidade bacteriana, foi possível estipular uma pesagem ideal em mg de liofilizado para
13 obtenção da concentração ideal de cultura para preparo dos queijos.

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

1 **Quadro 11-** Análise da viabilidade bacteriana nas diferentes etapas de preparo
 2 do liofilizado

Avaliações:	1^a Liofilização	2^a Liofilização	3^a Liofilização	4^a Liofilização
Contagem bacteriana da cepa L119 inoculada (0,5% (g/v)) em Caldo MRS:	5,4 x10 ⁹ UFC/ml	5,4 x10 ⁹ UFC/ml	5,8 x10 ⁹ UFC/ml	5,4 x10 ⁹ UFC/ml
Contagem bacteriana da amostra contendo a cepa L119 em <i>Skim Milk</i> acrescido de 4% de Lactose-D:	5,2 x10 ⁹ UFC/ml	5,1x 10 ⁹ UFC/ml	5,56 x10 ⁹ UFC/ml	5,1 x10 ⁹ UFC/ml
Contagem bacteriana da amostra contendo a cepa L119 após congelamento por 8 horas a -80°C:	3,6 x10 ⁹ UFC/ml	3,2 x10 ⁹ UFC/ml	4,2 x10 ⁹ UFC/ml	4,8 x10 ⁹ UFC/ml
Contagem bacteriana em 1g do liofilizado da cepa L119:	1,48 x10 ¹² UFC/g	3,37 x10 ¹² UFC/g	3,4 x10 ¹² UFC/ml	2,85 x10 ¹² UFC/ml
Atividade de Água	0,134Aw	0,17Aw	0,175Aw	0,15Aw

3
 4
 5
 6

1 PREPARO DE CULTURAS DE LIOFILIZADO DA CEPA DE *L. PLANTARUM*
2 (L119):

3
4 Para cada partida na fabricação de queijos, 150 ml de cultura da cepa L119
5 liofilizada, eram preparados em tubos contendo 30 ml de *Skim Milk* (10% (g/v)) (Wacher-
6 Rodarte *et. al*, 1993), inoculados com 1% de cepa L119 liofilizada. No preparo dos queijos
7 com fermento comercial foi utilizado cultura lática mista mesofílica/termofílica
8 homofermentativa, composta *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis*
9 subsp. *lactis* e *Streptococcus thermophilus* (RicaNata®).

10
11 ELABORAÇÃO DE QUEIJOS DE CURTA MATURAÇÃO COM DIFERENTES
12 CULTURAS E CONTAMINAÇÃO DAS PEÇAS COM *P. COMMUNE* (M35)

13
14 A fabricação dos queijos foi baseada na receita de queijo Minas Padrão, de
15 metodologias descritas por Chaves, Monteiro e Machado (2013) e Lourenço Neto (2013),
16 com modificações.

17 Cada lote de queijo (Quadro 3), continha oito peças com aproximadamente 400g,
18 foi constituído por: um queijo controle fabricado sem fermento e sem contaminação
19 fúngica posterior (Q0); um queijo controle fabricado sem fermento e contaminado com o
20 fungo *P. commune* (M35) (QF); um queijo fabricado com 3% (g/L) de fermento industrial
21 mesofílico e sem contaminação fúngica posterior (QM0); um queijo fabricado com 3%
22 (g/L) de fermento industrial mesofílico e contaminado com o fungo *P. commune* (M35)
23 (QMF); um queijo fabricado com 1% (ml/L) de cultura liofilizada da cepa de *L. plantarum*
24 (L119) sem contaminação fúngica posterior (QB0) e 3 peças de queijos fabricados com
25 1% (ml/L) de cultura liofilizada da cepa de *L. (L119)* e contaminados com o fungo *P.*
26 *commune* (M35) (QBF1, QBF2, QBF3).

27
28
29
30

1 **Quadro 3-** Características de Fabricação e Contaminação dos oito queijos,
2 formadores do lote.

Q0	Queijo controle fabricado sem fermento e sem contaminação fúngica posterior
QF	Queijo controle fabricado sem fermento e contaminado com o fungo <i>P. commune</i> (M35)
QM0	Queijo fabricado com 3% (g/L) de fermento industrial mesofílico e sem contaminação fúngica posterior (QM0)
QMF	Queijo fabricado com 3% (g/L) de fermento industrial mesofílico e contaminado com o fungo <i>P. commune</i> M35
QB0	Queijo fabricado com 1% (g/L) de cultura liofilizada da cepa de <i>L. plantarum</i> (L119) sem contaminação fúngica posterior
QBF1/ QBF2/ QBF3	Queijos fabricados com 1% (g/L) de cultura liofilizada da cepa de <i>L. (L119)</i> e contaminados com o fungo <i>P. commune</i> (M35)

3

4 Foram elaborados nove lotes de queijos, sendo testadas três concentrações
5 diferentes de contaminação fúngica, em triplicata: 10^5 , 10^6 , 10^7 esporos/ml. (20 esporos/
6 cm^2 , 205 esporos/ cm^2 , 2040 esporos/ cm^2 nos queijos).

7 O lote fabricado era mantido em forma, sendo refrigerado por 12 horas. As
8 suspensões fúngicas foram preparadas a partir de tubos inclinados de ágar Batata
9 Dextrose (Acumedia®), incubados a 25°C entre 7 dias e 8 dias. O esporos foram
10 suspensos em Tampão Fosfato Salino 1%, com pH 7,4 (PBS- SIGMA®) e as
11 concentrações a serem utilizadas (10^5 , 10^6 , 10^7 esporos/ ml) foram preparadas com
12 auxílio de uma Câmara de Neubauer de acordo com a metodologia do *Clinical and*
13 *Laboratory Standards Institute*, com modificações (CLSI, 2002).

14 A contaminação fúngica foi realizada aplicando 10 μL de solução de esporos,
15 espalhando, com auxílio de uma alça Drigalski, em área específica (49 cm^2) da superfície
16 de uma lateral das peças, com auxílio de um molde. As peças foram incubadas a 12°C,
17 com umidade entre 70% e 75%, por 28 dias. Para avaliação do crescimento fúngico, fotos
18 foram tiradas a cada sete dias. As imagens foram processadas e as áreas de crescimento
19 fúngico foram calculadas utilizando o programa *ImageJ* (*ImageJ* software 1.43ª, versão

1 64bits- *National Institute of Health- NIH*®), sendo a análise dos dados realizada pelo
2 *software Microsoft Excel* (Microsoft®).

3

4 AVALIAÇÃO DOS QUEIJOS EM MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE 5 VARREDURA (MEV):

6

7 As imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura foram realizadas no
8 Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da universidade Estadual de
9 Londrina, para visualizar a morfologia do *P. commune*, na tentativa de identificação do
10 possível mecanismo de interação do fungo com as diferentes bactérias presentes neste
11 estudo.

12 Ao fim dos 28 dias de maturação, foram recortados cubos de queijo de 1 cm³ em
13 áreas de transição, limiar entre a área do queijo que apresenta, e que não apresenta
14 macroscopicamente fungo em sua superfície. As amostras foram fixadas por imersão em
15 solução de Glutaraldeído 25% (2,5% (v/v) com 0.1 M de Tampão Cacodilato de Sódio pH
16 7,2, por oito horas a 4°C. Após esta etapa, as amostras foram lavadas três vezes com
17 0.1M de Tampão Cacodilato de Sódio pH 7,2, por 15 minutos, e desidratadas em
18 lavagens em série, com diferentes graduações de álcool etílico (30%, 50%, 70%, 80%,
19 90%), mantendo as amostras imersas por 15 minutos em cada graduação alcóolica e
20 finalizando a desidratação da amostra com uma série de três banhos, em álcool etílico
21 100%, por 15 minutos.

22 As amostras seguiram para procedimento de secagem em ponto crítico com
23 dióxido de carbono (BALTEC CPD 030 Secador de Ponto Crítico) e foram recobertas com
24 ouro (BALTEC SDC 050 *Sputter Coater*). Para observação em microscópio de varredura
25 (FEI Quanta 200), as amostras foram fixadas em *stubs* de alumínio, recobertos por fita
26 de carbono. Pelo menos 5 pontos diferentes da amostra foram observados, em diferentes
27 aumentos microscópicos, para avaliação geral da interação existente entre as bactérias
28 e o fungo.

29