



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS**

XU YINSHENG

**UTILIZAÇÃO DE LEVEDURAS *Saccharomyces* NO
CONTROLE DA DETERIORAÇÃO DO QUEIJO PARMESÃO**

**PALMAS-TO
2016**

XU YINSHENG

**UTILIZAÇÃO DE LEVEDURAS *Saccharomyces* NO
CONTROLE DA DETERIORAÇÃO DO QUEIJO PARMESÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Tocantins, para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração: Controle de qualidade e segurança alimentar.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Fonseca Moreira da Silva

**PALMAS-TO
2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

Y51u Yinsheng, Xu .

UTILIZAÇÃO DE LEVEDURAS *Saccharomyces* NO CONTROLE DA
DETERIORAÇÃO DO QUEIJO PARMESÃO. / Xu Yinsheng. – Palmas, TO,
2016.

72 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins
– Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2016.

Orientadora : Juliana Fonseca Moreira da Silva

1. Controle Biológico. 2. Controle Biológico Integrado. 3. *Penicillium*
roqueforti. 4. *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii*. I. Título

CDD 664

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer
forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte.
A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184
do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).**



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS

XU YINSHENG

UTILIZAÇÃO DE LEVEDURAS *Saccharomyces* NO
CONTROLE DA DETERIORAÇÃO DO QUEIJO PARMESÃO

Dissertação DEFENDIDA e APROVADA em 14 de Novembro de 2016, pela Banca
Examinadora constituída pelos membros:

Prof. Dr.ª Juliana Fonseca Moreira da Silva
Orientadora – UFT

Prof. Dr. Guilherme Nobre Lima do Nascimento
UFT

Prof. Dr.ª Ana Kleiber Pessoa Borges
UFT

DEDICATÓRIA

Dedico o meu trabalho aos meus pais, a minha orientadora, as colegas de trabalho Morganna, Camilla e Cristiane e a Deus que me deu vida para realizar o meu trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por nos dar força, paciência e sabedoria nos dias difíceis;

Aos familiares, pelo apoio, incentivo e compreensão;

À Mestrado de Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Federal de Tocantins, pela oportunidade, pela estrutura e suporte técnico;

Aos nossos professores, pelo conhecimento e enriquecimento intelectual. Um agradecimento especial à minha orientadora, Dr.^a Juliana Fonseca Moreira da Silva, pela paciência, dedicação e apoio;

Aos professores Raphael e Paula, pessoas as quais tenho respeito e muitos me ensinaram;

Ao professor Celso UFG que me cedeu fungo para o trabalho e apoios;

Às técnicas de laboratório Cristiane e Márcia pelo apoio e suporte;

Às colegas Camilla, Morganna e Drielly, pela ajuda e apoio durante a pesquisa;

Aos estagiários Raul e Geovanka pela ajuda durante a pesquisa;

Aos colegas do laboratório pelo aprendizado adivindo da convivência;

Aos encarregados da Fenix pela companhia nos almoços;

Aos amigos que conheci em Palmas e que me deram muito apoio durante o período do mestrado.

RESUMO

Penicillium roqueforti é um fungo deteriorante que ocasiona perdas principalmente em queijo parmesão, devido alterações no sabor e na cor do produto final. O controle biológico com leveduras do gênero *Saccharomyces* tem capacidade antifúngica e algumas têm efeito probiótico. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi utilizar leveduras como biocontrole do fungo *P. roqueforti* em queijo parmesão. Inicialmente, realizou análises *in vitro* para verificar a capacidade das leveduras *S. cerevisiae* UFT 5962, UFT 5992, UFT 5976, YEF 186 e *S. boulardii* em reduzir a quantidade de esporos produzidos por *P. roqueforti* e como também investigar o potencial de substâncias GRAS (bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, carbonato de cálcio, cloreto de cálcio nas concentrações 1, 3 e 5% e cloreto de potássio nas concentrações 0,1; 0,5 e 1%) na inibição deste fungo. Foi realizada a segunda etapa do experimento através de testes em queijos parmesão utilizando o controle biológico clássico aplicando as leveduras e o controle biológico integrado onde utilizou a substância GRAS selecionada associado às leveduras antagonistas. Os resultados foram calculados pela área de contaminação e realizado o tratamento estatístico com teste Scott-Knott. Além disso, foi averiguado o tempo de permanência das leveduras na superfície dos queijos parmesão, através da inoculação e re-isolamento das leveduras no queijo. Nos resultados *in vitro* a *S. cerevisiae* UFT 5992 reduziu 92% dos esporos no 7º dia, e não foi observado modificações nas estruturas dos esporos. Das cinco substâncias GRAS testadas o bicarbonato de sódio a 1% obteve 100% de inibição do crescimento fúngico, e as leveduras antagonistas (*S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFT 5992) sobreviveram por 60 dias nesta solução. Os resultados obtidos dos ensaios de controle biológico clássico constataram que a levedura *S. cerevisiae* YEF 186, reduziu em 17,5% o crescimento do *P. roqueforti* comparado com o controle no 13º dias. No controle integrado (*S. cerevisiae* UFT 5992+ BS), a redução fúngica foi de 18%. Nos dois processos, as leveduras sobreviveram por 50 dias demonstrando uma boa adaptação das leveduras em queijo parmesão e podendo agregar valor probiótico ao produto final, estendendo sua vida de prateleira por tempo considerado.

Palavras-Chaves: Controle Biológico; Controle Biológico Integrado; *Penicillium roqueforti*; *Saccharomyces cerevisiae*; *Saccharomyces boulardii*.

ABSTRACT

Penicillium roqueforti is a filamentous fungus that can produce losses, mainly in parmesan cheese, due to alterations in organoleptic characteristics. The biological control, using yeasts from *Saccharomyces* genus can control this pathogen and some species from this genus are considered probiotic. In this way, the objective of this work was to use yeasts to control *P. roqueforti* in parmesan cheese. Initially, *in vitro* assays were performed to verify the *S. cerevisiae*, strains UFT 5962, UFT 5992, UFT 5976, YEF 186 and *S. boulardii* capacity in reducing the spore production by *P. roqueforti*. At the same time, the activities of some GRAS substances (sodium bicarbonate, calcium carbonate and calcium chloride at 1, 3, and 5 % and potassium chloride at 0.1, 0.5, and 1 %) over this pathogen were verified. After this, classical biological control (using only yeasts to control the pathogen) and integrated biological control (using yeast plus selected GRAS substances) assays were realized in the cheese. The results were obtained measuring the growing area of the pathogen and the values were analyzed by Scott-Knott test. The time of endurance of the yeasts on the parmesan surface was obtained by re-isolation of the yeasts inoculated on the cheese surface. *S. cerevisiae* UFT 5992 reduced 92 % of spore production after 7 days, but no morphological alterations were observed in the spores. Sodium bicarbonate at 1 % totally reduced the pathogen growth, and the antagonistic yeasts (*S. boulardii* and *S. cerevisiae* UFT 5992) remained alive in sodium bicarbonate (1 %) for 60 days. In the classical biological control, *S. cerevisiae* YEF 186 reduced the pathogen growth by 17.5 % after 13 days. The integrated control (*S. cerevisiae* UFT 5992 + BS) reduced the pathogen by 18 %. In both processes, the yeasts remained alive for 50 days on the parmesan surface, showing a good possibility of their use as probiotics and increasing the shelf life of this product.

SUMÁRIO

PARTE 1.....	10
1 INTRODUÇÃO GERAL	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Queijo parmesão	14
2.2 Contaminação do queijo parmesão por fungos.....	14
2.2.1 <i>Penicillium roqueforti</i>	15
2.4 Biocontrole com levedura.....	16
2.4.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
2.4.2 <i>Saccharomyces boulardii</i>	18
2.5 Aplicação do controle biológico integrado na deterioração do queijo parmesão.....	19
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL.....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4 REFERÊNCIAS	22
PARTE 2.....	31
CAPÍTULO 1	32
UTILIZAÇÃO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, <i>S. bourardii</i> E SUBSTÂNCIAS GRAS NO CONTROLE DE <i>Penicillium roqueforti</i> IN VITRO	32
1. INTRODUÇÃO	33
2. MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1 Obtenção dos microrganismos	35
2.2 PREPARAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	35
2.2.1. <i>Penicillium roqueforti</i>	35
2.2.2 Leveduras.....	36
2.3 Verificação da inibição do crescimento do <i>P. roqueforti</i> pelas leveduras	36
2.4 Verificação da redução e alterações morfológicas dos esporos do <i>P. roqueforti</i> pelo leveduras antagônicas	36
2.5 Teste de sensibilidade de crescimento do <i>Penicillium roqueforti</i> a substância GRAS	37
2.6 Teste estatístico	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4 CONCLUSÃO.....	44
5 REFERÊNCIAS	44

CAPÍTULO 2	49
UTILIZAÇÃO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YEF 186, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UFT 5992 E <i>Saccharomyces boulardii</i> EM ASSOCIAÇÃO COM SUBSTÂNCIAS GRAS EM QUEIJO TIPO PARMESÃO PARA CONTROLE DE <i>Penicillium roqueforti</i>	49
1. INTRODUÇÃO	50
2. MATERIAIS E MÉTODOS	52
2.1 Obtenção dos microrganismos	52
2.2 Preparação dos microrganismos	52
2.2.1. <i>Penicillium roqueforti</i>	52
2.2.2 Leveduras.....	53
2.3 Teste de resistência das leveduras a substância GRAS	53
2.4 Ensaio de controle biológico	54
2.4.1 Processo de imersão do queijo parmesão em uma solução de levedura antagonica	54
2.4.2 Processo da imersão do queijo parmesão na solução de bicarbonato de sódio e leveduras antagonicas.....	54
2.5 Média da área de incidência das colônias de <i>P. roqueforti</i> em queijo parmesão.....	55
2.6 Contagem populacional das leveduras em queijo parmesão	56
2.7 Teste estatístico	56
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4. CONCLUSÃO	67
5 REFERÊNCIAS	68

PARTE 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

O queijo é um alimento de alto teor nutricional, popularmente utilizado na culinária brasileira (JUSTUS et al., 2011). Segundo o Ministério da Agricultura, Portaria N° 146, (1996) que fixa a Identidade e Qualidade de Queijos, é definido como um produto fresco ou maturado obtido por separação parcial do soro do leite e coagulados através de enzimas produzidas por bactérias específicas.

Dentre os diversos tipos de queijo, o parmesão tem sua origem italiana, sendo antigamente conhecido como Parmigiano Reggiano por ser produzido com leite cru e na região do Vale do Pó na Itália (BATTISTOTI e CORRADINI, 1996). No Brasil, a sua primeira produção foi identificada na região da Serra da Mantiqueira no Estado Minas Gerais, sendo muito utilizado na culinária brasileira para temperar sopas, apreciação do vinho e dos pratos típicos europeus (HOMEWOOD e HESS, 1993).

O queijo parmesão é definido como um queijo maturado, obtido através da coagulação do leite por coalho ou outros coagulantes apropriados, complementado pela ação de bactérias lácticas específicas, tendo sua consistência dura, textura compacta, coloração amarelada e sabor salgado ligeiramente picante (BRASIL, 1997)

Entre os microrganismos deteriorantes envolvidos na contaminação de queijos, os fungos filamentosos são os mais comumente encontrados, geralmente ocasionam alterações visuais e sensoriais no produto, devido ao seu crescimento na parte superficial destes produtos, prejudicando a aceitabilidade dos consumidores e desta forma acarretam prejuízos econômicos para as indústrias e os varejistas (ROPARS et al., 2012).

A produção de metabólitos secundários produzido por fungos em alimentos é conhecido como micotoxinas e apresentam efeitos tóxicos sobre a saúde humana e outros animais, causando efeitos crônicos, como mutagênicas, carcinogênicas, teratogênico ou imunossupressores (LIMA et al., 2016). Entre estas podem citar as aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁), ácido fusárico, patulina, roqueforti C e entre outros, que tem capacidade de causar intoxicações alimentares (MAZIERO e BERSOT, 2010).

Os principais gêneros de contaminação envolvidos em queijos são *Aspergillus* e *Penicillium* com capacidade de produzir micotoxinas (MONTEIRO, 2012), além disso, estes fungos produzem esporos que pode contaminar as várias etapas do processo de produção, maturação, embalagem e até a distribuição nos pontos de vendas (AZAR e NEJAD, 2009).

O Brasil por ser um país de clima tropical úmido, favorece o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes, como por exemplo o *P. roqueforti* que produz Roquefortine C, uma micotoxina causadora de atividade neurotóxica e ácido micofenólico, causador de atividades mutagênicas capaz de induzir alterações cromossômicas (HYMERY et al., 2014).

A fim de evitar a contaminação deste fungo que pode atuar como agente deteriorante e patogênico, vários métodos são utilizados, como a aplicação de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, tratamentos físicos, térmicos e químicos. Entre os tratamentos químicos os mais utilizados são a aplicação de cloreto de sódio, ácido láctico e outros produtos, devido a capacidade desses compostos em inibir o crescimento dos fungos através da redução de pH e da diferença de pressões osmóticas. Já entre os tratamentos físicos mais conhecidos o emprego de embalagens com atmosfera modificada, armazenamento a frio ou irradiação estão entre os mais comumente empregados (SALADINO et al, 2016; LAY et al., 2016).

Alguns métodos alternativos vêm sendo estudados para o controle de fungos em queijos. Entre estes métodos, o controle biológico pode apresentar resultados significativos, como demonstra o estudo de Lynch et al, (2014) ao aplicar bactérias lácticas produtora de ácido orgânicos como fontes de atividade antifúngica em queijo cheddar, obteve inibição no crescimento de *Penicillium expansum* por quatro dias.

Alguns trabalhos já demonstraram a capacidade antifúngica de leveduras, como a *S. cerevisiae* em reduzir o crescimento de *P. digitatum*, *P. commune* e *Botrytis cinerea* e *S. boulardii* contra *Aspergillus parasiticus*, supostamente através da inibição pela competição por espaço e nutriente que é um dos mecanismos de controle biológico utilizados por estas espécies (PLATANIA et al., 2012; PARAFATI et al., 2015; SILVA et al., 2015).

O gênero de leveduras *Saccharomyces* é muito utilizado em controle biológico, pois são microrganismos considerados seguros para o consumo humano de acordo com o *Food Drugs Administration* (FDA) (SWINNEN et al., 2016), a *S. boulardii* além de possuir um efeito probiótico comprovado, apresenta capacidade terapêutica contra várias doenças como diarreia e outras indisposições no trato gastrointestinal do homem (GOEBEL, et al., 2013; MIRANDA et al., 2016; TRIGUEROS et al., 2016).

A eficiência do controle biológico pode ser melhorada pela combinação das leveduras antagonistas com as substâncias GRAS (*Generally recognized as safe*) como bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, quitosana e entre outros, devido a esses compostos apresentarem capacidade antifúngica e não promover alterações visuais e sensoriais nos alimentos, visto que já são utilizados como aditivos alimentares (BELGUESMIA et al., 2014; HONG et al., 2014).

O controle biológico é um método aplicado em pós-colheitas de frutas para a inibição do crescimento de fungos deteriorantes através do uso de leveduras antagonistas (PIMENTA et al., 2010; YOUSSEF e ROBERTO, 2014; YOUSSEF et al., 2014). Nesse sentido o método pode ser adaptado para uso em alimentos processados, como o queijo parmesão. Visto que é um método ainda há pouco explorado e pode se tornar uma estratégia eficiente no controle de fungos deteriorantes destes produtos.

Desta forma a utilização de leveduras em consorciação ao uso de substâncias GRAS pode ser considerada uma estratégia para o controle biológico de *P. roqueforti* em queijo parmesão, uma vez que este fungo causa perdas econômicas aos comerciantes provocando a redução de vida de prateleira deste produto.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi analisar a capacidade de inibição do *P. roqueforti* na deterioração do queijo parmesão utilizando leveduras do gênero *Saccharomyces* e a associação com substâncias GRAS.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Queijo parmesão

O queijo tipo parmesão tem origem italiana, sendo muito utilizado na culinária brasileira para temperar sopa, molho de macarrão e pratos típicos europeus. É fabricado com leite de vaca cru ou pasteurizado, tendo o produto final baixa umidade, consistência dura e textura compacta, granulosa, com crosta firme e lisa. Apresenta coloração ligeiramente amarelada e formato cilíndrico, sendo comercializado geralmente em peças que pesam entre 5 a 10 Kg (PERRY, 2004).

As características físico-químicas encontradas na literatura mostram que o pH deste tipo de queijo varia entre 5,3 a 6,0, a umidade entre 18,2% a 19,6% e atividade de água entre 0,730 a 0,975, apresentando características e nutrientes propícios para o crescimento dos microrganismos (PIMENTEL et al., 2002; BARROS et al., 2011).

O processo de coagulação do queijo tipo parmesão é realizado por diversas espécies de bactérias produtoras de ácido lático que geralmente são microrganismos probióticos, aos quais são definidos como agentes não patogênicos viáveis, que conseguem sobreviver no trato gastrointestinal e aderem nas células intestinais epiteliais. Algumas espécies são capazes de manter a quantidade de células viáveis durante a maturação do queijo (SOLIERI et al., 2012; SOLIERI, et al., 2014), trazendo ao consumidor benefícios a saúde humana, devido as propriedades nutricionais e auxílio na digestividade e no controle da microflora intestinal (BOTTARI et al., 2010; COPPA et al., 2012).

2.2 Contaminação do queijo parmesão por fungos

O transporte e armazenamento em temperaturas inadequadas de queijos podem ocasionar perda de umidade, atividade de água e conseqüentemente causar rachaduras nas superfícies do produto que facilitam a penetração de microrganismos e por seguinte a contaminação e deterioração dos produtos (BARROS et al., 2011).

Entre os microrganismos mais envolvidos na contaminação e deterioração de queijos, estão os fungos filamentosos, onde os gêneros mais frequentemente relacionados à deterioração de queijo são *Mucor* spp, *Cladosporium* spp, *Penicillium* spp, *Fusarium* spp, *Geotrichum* spp, *Aspergillus* spp. e *Moniliella* sp. (LUND, et al., 1995; SALAVESSA, 2009; ABREUS, 2011), que são responsáveis por prejuízos econômicos e sensoriais em alguns tipos de queijos.

Normalmente, estes microrganismos estão presentes em forma de esporos na matéria prima, no processo de manipulação e fabricação, nas câmeras de maturação e nos equipamentos o que facilita a contaminação (TORKAR e GOLCTEGER, 2006).

Alguns métodos alternativos ainda estão sendo estudados para o controle de crescimento e da produção de micotoxinas por estes fungos como a utilização de algumas espécies de leveduras no controle biológico que além de ter capacidade inibitória aos fungos ainda podem agregar valor ao produto final devido ao seu efeito probiótico.

2.2.1 *Penicillium roqueforti*

O gênero *Penicillium* é importante no que se refere à contaminação alimentar, sendo amplamente encontrado no ar, em solo e em produtos alimentícios de origem animal ou vegetal como deteriorante (HOUBRAKEN et al., 2010; MONTEIRO, 2012).

O *Penicillium roqueforti* é classificado como pertencente ao Filo Ascomycota e classe Eurotomyces. Esta espécie é muito utilizada para a produção de queijo do tipo Roquefort, Danish Blue e Gorgonzola. Porém, é considerado um deteriorante e patogênico para outros tipos de queijo, pois tem capacidade de crescimento em ambientes extremos, tais como: baixa temperatura, baixa quantidade de oxigênio e na presença de conservantes ocasionando uma alteração visual e sensorial do produto (OLIVEIRA et al., 2010; HOUBRAKEN et al., 2010).

Este microrganismo desenvolve em ambientes extremos, é capaz de produzir metabólitos secundários, como a roquefortine C, ácido micofenólico e PR-toxina que possuem efeitos neurotóxicos, imunossupressores, mutagênicos e carcinogênicos após 48h de exposição à alta concentração de toxinas (BARROS et al., 2011; FONTAINE et al., 2015).

A capacidade do fungo de crescer em cereais, milho e silagens de capim causam a contaminação dos alimentos ou rações de animais que após a digestão ficará retido no fígado do animal, contaminando futuramente o leite. Esta contaminação pode iniciar na matéria-prima e não é destruído na pasteurização, por isso, fica presente em alguns tipos de queijos

como o queijo Gorgonzola ou Roquefort (HIDALGO et al., 2014). Segundo o trabalho Chen et al. (1982), foi testado esta toxina em ratos e camundongos e estes autores, perceberam que causou nos animais contorção abdominal, diminuição da atividade motora e respiratória.

2.4 Biocontrole com levedura

O biocontrole é um método alternativo, cujo mecanismo baseia-se em interações ecológicas entre indivíduos distintos, através da competição por espaços e nutrientes, pela produção de metabólitos voláteis ou difusíveis com a capacidade antimicrobiana, a presença de enzimas que degradam a parede celular ou o micoparasitismo (GENG et al., 2011).

Entre os microrganismos que podem ser utilizados como agentes de controle biológico, as leveduras são os microrganismos mais utilizados devido à ausência de produção de esporos potencialmente alergênicos ou micotoxinas como os fungos filamentosos, e por raramente produzirem substâncias antagônicas como as bactérias (DRUVEFORS, 2005).

Uma vez que os microrganismos utilizados são aplicados a produtos consumíveis estes devem atender a requisitos rigorosos para a segurança humana, levando em consideração a possibilidade destes agentes deixarem algum resíduo tóxico nos alimentos. Além do fato de já serem amplamente aplicados na indústria alimentícia (PIMENTA et al., 2010; COELHO et al., 2011; FORNER, 2012).

O processo de controle com levedura contra fungos filamentosos envolve também vários mecanismos bioquímicos com papéis funcionais que ainda não são totalmente compreendidos pela ciência. Estes mecanismos podem incluir a capacidade da levedura em aderir em locais específicos tanto nas células hospedeiras, quanto nos microrganismos patogênicos, ainda realizar a secreção de enzimas específicas e substâncias antimicrobianas (LU et al., 2013; LUTZ et al., 2013; CÓRDOVA, et al., 2016). Além disso, algumas leveduras conseguem captar micotoxinas devido à presença de nanoproteínas e β -glucanos na sua parede celular neutralizando a toxicidade no trato gastrointestinal, sendo que estas proteínas não são presentes nas bactérias (SOARES et al., 2005; PINHEIRO et al., 2016).

Segundo Liu e Tsao, (2009) algumas leveduras podem ser benéficas na conservação de derivados do leite, como a *Debaryomyces hansenii* que foi utilizada em iogurte e queijo e conseguiu inibir o crescimento dos fungos: *Aspergillus* sp., *Byssoschlamys fulva*,

Byssochlamys nivea, *Cladosporium* sp., *Eurotium chevalieri*, *Penicillium candidum* e *Penicillium roqueforti* na concentração 10^6 células/mL por 14 dias.

Em outro trabalho realizado por Gkatzionis et al. (2014), foi analisado a eficiência da levedura *Yarrowia lipolytica* sobre *P. roqueforti* em queijo Stilton armazenado por 45 dias. E foi percebido que somente ocorreu a formação de micélios e não a produção de esporos, o que demonstra eficiência em impedir a esporulação deste fungo.

A estratégia da utilização do controle biológico em queijo utilizando leveduras é vantajoso, em relação a outros métodos, devido a não toxicidade, a capacidade antifúngica e algumas serem consideradas probióticas, além disso, consegue agregar mais valor ao produto final trazendo benefícios a saúde humana através da detoxicação das micotoxinas e auxiliando no trato gastrointestinal.

2.4.1 *Saccharomyces cerevisiae*

A espécie *S. cerevisiae* está classificada no domínio Eukaryota dentro do Filo Ascomycota e sua classe é denominada Saccharomycetes. O gênero *Saccharomyces* é unicelular diplóide e se reproduz assexuadamente por brotamento. As suas células apresentam tamanho de aproximadamente 3 μm de diâmetro e são capazes de dividir-se a cada 90 minutos em condições adequadas (SILVA, 2009).

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é bastante heterogênica, pois a sua multiplicação pode se dar por brotamento multilateral ou através da formação de pseudomicélio. Sendo que ela possui intensa atividade fermentativa (ANDRADE et al., 2015; RATCLIFF et al., 2015), o que faz com que esta espécie seja uma das mais importantes para indústria alimentícia, devido sua alta aplicabilidade industrial, como na produção de pães, bebidas fermentadas, álcool, glicerol e outras aplicações em processos tecnológicos (RIO, 2004; FRANCO e LANDGRAF, 2008).

A utilização desta levedura no controle biológico é devido à presença de proteínas na sua parede celular que tem capacidade de romper as barreiras das membranas plasmáticas dos seus alvos, tornando-se mais eficientes na competição de espaços e nutrientes em relação a outros microrganismos (PLATANIA et al., 2012).

Então, de acordo com Kupper et al. (2013), duas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* conseguiram controlar o crescimento de *P. digitatum*, com eficiência de inibição variando de 70 a 85% em frutas de limão Tahiti e laranja Hamlin como controle *in vivo*.

Prado et al. (2011), também comprovaram através de seu estudo a redução de aflatoxina B1 produzida por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* em amendoim que foram tratados com *S. cerevisiae* o que resultou em uma redução de 77,4% e 55,9% da toxina, respectivamente, demonstrando a eficiência desta levedura na redução de micotoxinas.

2.4.2 *Saccharomyces boulardii*

Um microbiologista francês, Henri Boulard, encontrou por volta de 1920 uma nova espécie de levedura, denominada *S. boulardii*, presente na fruta de lichia ao qual era popularmente consumida na Indochina para tratar a diarreia (CANANI et al., 2011), no entanto, por volta de 1950 foi atribuído a *S. boulardii* o efeito terapêutico (MARTINS et al., 2009; LOPES e PINTO, 2010). A partir de então, tornou-se uma levedura extensivamente usada como um probiótico e muitas vezes como um suplemento dietético (MCFARLAND, 2010).

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que oferecem um efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro (FAO, 2006). Assim a *S. boulardii* é utilizada em tratamentos terapêuticos para as perturbações no trato gastrointestinal humano. E em comparação com os probióticos bacterianos, apresenta várias vantagens, como resistência a antibióticos, a baixo pH, a alto teor de sal e as atividades enzimáticas (GIL-RODRÍGUEZ et al., 2015; CASSANEGO et al., 2015), esta bactéria já é considerada probiótica, devido à capacidade de equilibrar a flora gastrointestinal, melhora o sistema imunitário e a recuperação após infecção microbiana. Além disso, estimula o sistema imunológico e previne a formação de substâncias carcinogênicas no intestino e a redução do colesterol (SALMINEN et al., 2016; MALEKI et al., 2016; TRIGUERO et al., 2016).

Vários estudos *in vitro* demonstraram a sua capacidade de inibir o crescimento de vários microrganismos patogênicos, como *Candida albicans*, *E. coli*, *Shigella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Entamoeba histolytica*, *Salmonella typhimurium* e *Yersinia enterocolitica*, o seu mecanismo de controle pode ser através da competição de nutrientes e por espaço no trato intestinal. A presença desta levedura no trato gastrointestinal produz a enzimas serinoproteases que têm ação contra as toxinas produzida por *C. difficile* e

impede a adesão das bactérias patogênicas (MARTINS et al., 2009; CANANI et al., 2011; PRAJAPATI et al., 2013).

No entanto existem poucos estudos sobre o controle desta levedura em fungos filamentosos, mas segundo trabalho da Silva et al. (2015), foi realizado um ensaio *in vitro* com *S. boulardii* como antagonista para redução de esporos de *A. parasiticus*, onde foi obtido redução de 46,3% em comparação com o controle positivo.

2.5 Aplicação do controle biológico integrado na deterioração do queijo parmesão

O controle biológico integrado é uma associação do controle biológico clássico com uma substância GRAS (*Generally recognized as safe*) que são consideradas pela FDA (*Food and Drug Administration*) aditivos alimentares seguros para o ser humano e que podem possuir capacidade antifúngica ou fungistática (PIMENTA et al., 2009).

Entre as substâncias utilizadas que são consideradas seguras para o consumo humano podem-se citar: cloreto de cálcio, carbonato de potássio, bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, entre outros. Estas substâncias contribuem para a redução populacional de fungos filamentosos, devido a sua capacidade de causar stress osmótico e alteração de pH. (YOUSSEF e ROBERTO, 2014).

A inibição do crescimento também pode ser devida a turgescência nas células fúngicas que conseqüentemente causam o encolhimento de hifas e a incapacidade de produzir esporos (YOUSSEF e ROBERTO, 2014; YOUSSEF et al., 2014; FALLANAJ et al., 2016). Além disso, o pH do meio é aumentado, causando a perturbação funcional das proteínas presentes na membrana das células e inibindo a germinação dos esporos (MADANI et al., 2014; LAI et al., 2015).

De acordo com Madani et al. (2014), a aplicação do cloreto de cálcio em *Colletotrichum gloeosporioides*, que é um deteriorante em mamão, obteve melhor resultado na concentração de 2% com 45,8% de gravidade da doença em 35 dias, sendo que o controle já estava 100% contaminado, por outro lado, o teor do cálcio presente no mamão teve um aumento de aproximadamente 78% em relação ao controle, quando realizada a análise físico-química do alimento.

No estudo realizado pelo Yu et al. (2012), estes pesquisadores utilizaram a combinação de *Cryptococcus laurentii* com cloreto de cálcio e obtiveram pouca eficiência na

inibição do *P. expansum* em frutos de pêra, porém ao associar, quitosana na combinação acima, foi verificado uma inibição de 89% do fungo deteriorante.

Segundo Youssef et al, (2012), o bicarbonato de sódio conseguiu inibir *in vitro* 100% o crescimento do *P. digitatum* e *P. italicum*, isso acontece porque esta substância altera o pH do meio afetando a atividade enzimática, a disponibilidade de nutrientes e a transferência de prótons através da membrana plasmática. A utilização do bicarbonato de sódio se deve as propriedades de inalteração do sabor e textura do produto final e a facilidade de encontrar no mercado (LAI et al., 2015; FALLANAJ et al., 2016).

A utilização do controle biológico integrado está sendo uma estratégia utilizada para a redução de crescimento de deteriorantes em alimentos perecíveis, como por exemplo, em queijo parmesão.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Propor uma estratégia eficaz para o controle de *Penicillium roqueforti* em queijos tipo parmesão, através da utilização de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* integradas à substância GRAS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a eficiência de leveduras *S. cerevisiae* e *S. boulardii* na redução do crescimento do *P. roqueforti* *in vitro*;
- Verificar a redução da esporulação de *P. roqueforti* na presença das *S. cerevisiae* e *S. boulardii*;
- Verificar possíveis modificações nos esporos do *P. roqueforti* na presença das *S. cerevisiae* e *S. boulardii*;
- Verificar a eficiência das leveduras *S. cerevisiae* e *S. boulardii* no controle biológico do *P. roqueforti* em queijo parmesão;
- Analisar a resistência *P. roqueforti* a substância GRAS;
- Aplicação do controle biológico clássico e integrado a substância GRAS selecionada para reduzir o crescimento do *P. roqueforti* em queijo parmesão;
- Verificar o tempo de viabilidade das *S. cerevisiae* e *S. boulardii* em queijo parmesão.

4 REFERÊNCIAS

ABREUS, A.N.I.; Contagem Microbiana e Incidência de Aflatoxina M1 em Queijo Ralado e Requeijão, Comercializado em Diferentes Cidades do Estado de Minas Gerais. 2011. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

ANDRADE, R.S.; NETO, J.A.A.; LOPES, R. C.S.Q.; Valorização biotecnológica de soro de leite por fermentação utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. Estudos Tecnológicos em Engenharia, v. 11, n. 2, p. 82-91, 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução de Diretoria Colegiada nº.7, de 18 de fevereiro de 2011. Limites máximos tolerados para micotoxinas em alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 09 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/index.htm>>. Acesso em: 12/05/2015.

AZAR, M.T.; NEJAD, L.R.; The Implementation of HACCP (Harzard Critical Control Point) to UF-FETA Cheese Production Lines. Revista de Ciência Biológica, v.2, n.2, p. 388-394, 2009.

BOTTARI B.; SANTARELLI M.; NEVIANI E.; GATTI. M.; Natural whey starter for Parmigiano Reggiano: Culture-independent approach Journal of Applied Microbiology, v. 108, p. 1676–1684, 2010.

BARROS, J.J.C.; AZEVEDO, A.C.; JÚNIOR, L.R.F.; TABOGA, S.R.; PENNA, A.L.B.; Queijo Parmesão: Caracterização Físico-Química, Microbiológica e Microestrutura. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 31, n. 2, p. 285-294, 2011.

BATTISTOTTI, B.; CORRADINI, C. Italian cheese. In: FOX, P.F. Cheese: chemistry, physics and microbiology. 2nd. ed. Glasgow: Chapman Hall, v.2, p. 221-43, 1996

BELGUESMIA, Y.; RABESONA, H.; MOUNIER, J.; PAWTOWSKY, A.; BLA, G.L.; BARBIER, G.; HAERTLÉ, T.; CHOBERT, J.M.; Characterization of antifungal organic acids produced by *Lactobacillus harbinensis* K.V9.3.1Np immobilized in gellanexanthan beads during batch fermentation. Food Control, v. 38, p. 205-211, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Salsicharia. In: _____. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos físicos e químicos. Brasília, DF, 1981. v. II, cap. 2, p. 15-16.

CASSANEGO, D. B.; RICHARDS, N.S.P.S.; MAZUTTI, M.A.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; Leveduras: Diversidade em Kefir, Potencial Probiótico e Possível Aplicação em Sorvete. *Ciencia e Natura*, v. 37, p. 175-186, 2015.

CANANI, R.M.; CUCCHIARA, S.; CUOMO, R.; PACE, F.; PAPALE, F.; *Saccharomyces boulardii*: A Summary of The Evidence for Gastroenterology Clinical Practice in Adults and Children. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 15, p. 809-822, 2011.

COELHO, A.R.; NÓBREGA, G.M.A.; PAGNOCCA, F.C.; HOFFMANN, F.L.; HARADA, K.; HIROOKA, E.Y.; Avaliação do Potencial Antagônico de Leveduras, visando Biocontrole de Deterioração por *Penicillium expansum*. *Revista Semina: Ciências Agrárias*, v. 32, n. 1, p. 1879-1892, 2011

COPPA, G.V.; MACCARI, F.; ZAMPINI, L.; SANTORO, L.; GALEAZZI, T.; GABRIELLI, O.; VOLPI, N.; Structural characterisation of chondroitin sulphate from Italian cheese Parmigiano-Reggiano. *Food Chemistry*, v. 134, n. 1, p. 195-199, 2012.

CÓRDOVA, N.M.; AGUILAR, R.L.; ASCENCIO, F.; CASTELLANOS, T.; CÓRDOVA, A.I.C.; ANGULO, C.; Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays* L.). *Biological Control*, v. 97, p. 70-79, 2016.

CHEN, F.C.; CHEN, C.F.; WEI, R.D.; Acute toxicity of PR toxin, a mycotoxin from *Penicillium roqueforti*. *Toxicon*, v. 20, n. 2, p. 433-441, 1982.

DRUVEFORS, U.A.; PASSOTH, V.; SCHNURER, J.; Nutrient Effects on Biocontrol of *Penicillium roqueforti* by *Pichia anomala* J121 during Airtight Storage of Wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 4, p. 1865-1869, 2005.

FALLANAJ, F.; IPPOLITO, A.; LIGORIO, A.; GARGANESE, F.; ZAVANELLA, C.; SANZANI, S.M.; Electrolyzed sodium bicarbonate inhibits *Penicillium digitatum* and induces

defence responses against green mould in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v. 115, p. 18-29, 2016.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). *Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. p. 85. Roma, 2006.

FONTAINE, K.; PASSERÓ, E.; VALLONE, L.; HYMERY, N.; COTON M.; JANY, J.L.; MOUNIER, J.; COTON, E.; Occurrence Of Roquefortine C, Mycophenolic Acid And Aflatoxin M1 Mycotoxins In Blue-Veined Cheeses. *Food Control*, v. 47, p. 634-640, 2015.

FORNER, C.; Controle em Pós-Colheita de Bolor Verde em Laranja Pêra com Microrganismos e Tratamentos Térmico. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrônômicas) Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2012.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M.; *Microbiologia dos Alimentos*. Editora Atheneu, ed. 1, 2008.

GENG, P.; CHEN, S.; HU, M.; HAQ, M.R.; LAI, K.; QU, F.; ZHANG, Y.; Combination of *Kluyveromyces marxianus* and sodium bicarbonate for controlling green mold of citrus fruit. *International Journal of Food Microbiology*, v. 151, p. 190-194, 2011.

GIL-RODRÍGUEZ, A.M.; CARRASCOSA, A.V.; REQUENA, T.; Yeasts in Foods and Beverages: *In vitro* Characterisation of probiotic traits. *Food Science and Technology*, v. 64, p. 1156-1162, 2015.

GOEBEL, C.S.; OLIVEIRA, F.M.; SEVERO, L.C.; Infección por *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 30, n. 3, p. 205-208, 2013.

GKATZIONIS, K.; YUNITA, D.; LINFORTH, R.S.T.; DICKINSON, M.; DODD, C.E.R.; Diversity and activities of yeasts from different parts of a Stilton cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v. 177, p. 109-116, 2014.

HIDALGO, P.I.; ULLÁN, R.V.; ALBILLOS, S.M.; MONTERO, O.; BODEGA, M.A.F.; ESTRADA, C.G.; AGUADO, M.F.; MATÍN, J.F.; Molecular characterization of the PR-toxin gene cluster in *Penicillium roqueforti* and *Penicillium chrysogenum*: Cross talk of secondary metabolite pathways. *Fungal Genetics and Biology*, v. 62, p. 11-24, 2014.

HOMEWOOD, J.T.; HESS, H.J. Technology for the developing countries. In: ROBINSON, R.K. Modern dairy technology, 2nd.ed. London: Chapman&Hall, 1993. v.2, p.455-94.

HONG, P.; HAO, W.; LUO, J.; CHEN, S.; HU, M.; ZHONG, G.; Combination of hot water, *Bacillus amyloliquefaciens* HF-01 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest decay of mandarin fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v. 88, p. 96-102, 2014.

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A.; Sex in *Penicillium* series Roqueforti. *International Mycological Association Fungus*, v. 1, n.2, p. 171-180, 2010.

HYMERY, N.; VASSEUR, V.; MONIKA, C.; MOUNIER, J.; JANY, J.L.; BARBIER, G.; COTON, E.; Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 13, n. 4, p. 437-456, 2014.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. 21B:1987: milk. cream and evaporated milk: determination of total solids content (reference method).Brussels, 1987. 2 f.

JUSTUS, A.; FERRARI, L.M.B.; RODRIGUES, L.R.; FERREIRA, M.L.; PINTOS, S.M.; ABREU, L.R.; Caracterização Física e Química de Queijos Parmesão Ralado Comercializados na Região Sul de Minas Gerais. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 66, n. 379, p. 16-24, 2011.

KUPPER, K.C.; CERVANTES, A.L.L.; KLEIN, M.N.; SILVA, A.C.; Avaliação de Microrganismos Antagônicos, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o Controle de *Penicillium digitatum*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 35, n. 2, p. 425-436, 2013.

LAI, T.; BAI, X.; WANG, Y.; ZHOU, J.; SHI, N.; ZHOU, T.; Inhibitory Effect Of Exogenous Sodium Bicarbonate On Developmentand Pathogenicity Of Postharvest Disease *Penicillium expansum*. *Scientia Horticulturae*, v. 187, p. 108-114, 2015.

LIU, S.Q.; TSAO, M.; Biocontrol of Dairy, Moulds by Antagonistic Dairy Yeast *Debaryomyces hansenii* in Yoghurt and Cheese at Elevated Temperatures. *Food Control*, v. 20, p. 852-855, 2009.

LIMA, K.S.C.; SANTOS, M.C.; PACHECO, S.; SILVA, O.F.; GODOY, R.L.O.; LIMA, A.L.S.; Controle Da Micotoxina Patulina Por Radiação Gama E Óleo Essencial Da Noz Moscada (*MYRISTICA FRAGRANS*). *Semioses*, v. 9, n. 1, p. 8-16, 2016.

LOPES, T.R. e PINTO, M.A.O.; Aplicação Terapêutica de *Saccharomyces boulardii* em Diarreias: uma Revisão. Revista HU, v. 36, n. 2, p. 107-122, 2010.

LU, L.; LU, H.; WU, C.; FANG, W.; YU, C.; YE, C.; SHI, Y.; YU, T.; ZHENG, X.; *Rhodosporidium paludigenum* induces resistance and defense-related responses against *Penicillium digitatum* in citrus fruit. Postharvest Biology and Technology, v. 85, p. 196-202, 2013.

LUND, F.; FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C.; Associated Mycoflora of Cheese. Microbiologia dos alimentos, v. 12, p. 173-180, 1995.

LUTZ, M.C.; LOPES, C.A.; RODRIGUEZ, M.E.; SOSA, M.C.; SANGORRÍN, M.P.; Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. International Journal of Food Microbiology, v. 164, p. 166-172, 2013.

MADANI, B.; MOHAMED, M.T.M.; BIGGS, A.R.; KADIR, J.; AWANG, Y.; TAYEBIMEIGOONI, A.; SHOJAEI, T.R.; Effect of Pre-Harvest Calcium chloride Applications on Fruit Calcium Level And Post-Harvest Anthracnose Disease Of Papaya. Crop Protection, v. 55, p. 55-60, 2014.

MARTINS, F.S.; BARBOSA, F.H.F.; NICOLI, J.R.; O probiótico *Saccharomyces boulardii*. Revista de Biologia e Ciência da Terra, v. 9, n. 2, p. 171-182, 2009.

MALEKI, D.; HOMAYOUNI, A.; KHALILI, L.; GOLKHALKHALI, B.; Probiotics in cancerprevention, updating the evidence, in: R.R. Watson, V.R. Preedy (Eds.), Bioactive Foods in Health Promotion: Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics, Elsevier, London, 2016, pp. 781–791.

MCFARLAND, L. V.; Systematic Review and Meta-Analysis of *Saccharomyces boulardii* in Adult Patients. World Journal of Gastroenterol, v. 16, n. 18, p. 2202-2222, 2010.

MIRANDA, D.Z.; PALMA, M.; MATOS, G.S.; SCHIEBEL, J.G.; MONTEIRO, C.M.; ARONOVICH, M.; BOZZA, P.T.; BOZZA, F.A.; NIMRICHTER, L.; LOMELI, M.M.; MARQUES, E.T.A.; MARTINS, F.S.; DOURADINHA, B.; Lipid droplet levels vary heterogeneously in response to simulated gastrointestinal stresses in different probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains. Journal of Functional Foods, v. 21, p. 193-200, 2016.

MONTEIRO, M.C.P.; Identificação de Fungos dos Gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em Solos Preservados do Cerrado. 77 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

NALLY, M.C.; PESCE, V.M.; MATURANO, Y.P.; ASSAF, L.A.R.; TORO, M.E.; FIGUEROA, C.; VAZQUEZ, F.; Antifungal modes of action of *Saccharomyces* and other biocontrol yeasts against fungi isolated from sour and grey rots. *International Journal of Food Microbiology*, v. 204, p. 91-100, 2015.

OLIVEIRA, F.C.; Produção de Lipase por *Penicillium roqueforti* e sua Aplicação na Obtenção de Aroma de Queijo. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

PARAFATI, L.; VITALE, A.; RESTUCCIA, C.; CIRVILLERI, G.; Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*, V. 47, P. 95-92, 2015.

PERRY, K.S.P.; Queijo: Aspectos Químicos, Bioquímicos e Microbiológicos. *Química Nova*, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PIMENTA, R.S.; SILVA, J.F.M.; COELHO, C.M.; MORAIS, P.B.; ROSA, C.A.; CORRÊA, A.J.; Integrated Control Of *Penicillium Digitatum* By The Predacious Yeast *Saccharomycopsis Crataegensis* And Sodium Bicarbonate On Oranges. *Brasilian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 404-410, 2010.

PIMENTEL, E.F.; DIAS, R.S.; RIBEIRO-CUNHA, M.; GLÓRIA, B.A.; Avaliação da Rotulagem e da Qualidade Físico-Química e Microbiológica de Queijo Ralado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, n. 3, p. 289-294, 2002.

PINHEIRO, R.E.E.; Potencial de Aplicação de Leveduras como Adsorvente de Aflatoxina B₁ e Probióticos em Piscicultura. 94f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

PLATANIA, C.; RESTUCCIA, C.; MUCCILLI, S.; CIRVILLERI, G.; Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). *Food Microbiology*, v. 30, n. 1, p. 219-225, 2012.

PRADO, G.; MADEIRA, J.E.G.C.; MORAIS, V.A.D.; OLIVEIRA, M.S.; SOUZA, R.A.; PELUZIO, J.M.; GODOY, I.J.; SILVA, J.F.M.; PIMENTA, R.S; Reduction of Aflatoxin B1 in Stored Peanuts (*Arachis hypogaea* L.) Using *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Food Protection, v. 74, n. 6, p. 1003-1006, 2011.

PIMENTA, R.S.; MORAIS, P.B.; ROSA, C.A.; CORRÊA, Jr.; Utilization of Yeasts in Biological Control Programs, In:_____. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications, Spreinger Science, 2009.

PRAJAPATI, P.; PATEL, M.; KRISHNAMURTHY, R.; *Saccharomyces boulardii* - A Probiotic of Choice. CIBTech Journal of Biotechnology, v. 2, n. 2, p. 1-6, 2013.

RATCLIFF, W.C.; FANKHAUSER, J.D.; ROGERS, D.W.; GREIG, D.; TRAVISANO, M.; Origins of Multicellular Evolvability in Snowflake Yeast. Nature Communications, v. 6, 2015.

ROPARS, J.; CRUAUD, C.; LACOSTE, S.; DUPONT, J.; A Taxonomic and Ecological Overview of Cheese Fungi. International Journal of Food Microbiology, n. 3, v. 155, p. 199-210, 2012.

SALAVESSA, J.J.S.M.; Salsicharia Tradicional da Zona do Pinhal. 2009. 299 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

SALADINO, F.; LUZ, C.; MANYES, L. FRANZÓN, M.F.; MECA, G.; In vitro antifungal activity of lactic acid bacteria against mycotoxigenic fungi and their application in loaf bread shelf life improvement. Food Control, v. 67, p. 273-277, 2016.

SALMINEN, S.; KNEIFEL, W.; OUWEHAND, A.C.; Probiotics: application of probiotics in dairy products: established and potential benefits. Reference Module in Food Science, (2016).

SILVA, A.F.; Caracterização Genética de Linhagens de *Saccharomces cerevisiae* Isoladas de Fermentações Espontâneas de Cachaças de Alambique da Bahia. 155f. 2009. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira Santana, Feira de Santana, 2009.

SILVA, F.C.; CHALFOUN, S.M.; BATISTA, L.R.; SANTOS, C.; LIMA, N.; Taxonomia Polifásica para Identificação de *Aspergillus* seção Flavus: Uma Revisão. Revista IFES Ciência, v.1, n. 1, p. 18-40, 2015.

SILVA, J.F.M.; PELUZIO, J.M.; PRADO, G.; MADEIRA, J.E.G.C.; SILVA, M.O.; MORAIS, P.B.; ROSA, C.A.; PIMENTA, R.S.; NICOLI, J.R.; Use of Probiotics to Control Aflatoxin Production in Peanut Grains. Hindawi Publishing Corporation, 2015.

SILVA, J.F.M.; Estratégias para Controle de Aflatoxinas Produzidas por *Aspergillus parasiticus* em Amendoim (*Arachis hypogaea* L.). Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

SOLIERI, L. BIANCHI A.; GIUDICI, P.; Inventory of non starter lactic acid bacteria from ripened Parmigiano Reggiano cheese as assessed by a culture dependent multiphasic approach. Systematic and Applied Microbiology, v. 25, n. 4, p. 270-277, 2012.

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

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M.; Avaliação de Compostos com Atividade Antioxidante em Células da Levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 41, n. 1, p. 95-100, 2005.

SWINNEN, S.; HO, P.W.; KLEIN, M.; NEVOIGT, E.; Genetic determinants for enhanced glycerol growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Metabolic Engineering, v. 36, p. 68-79, 2016.

TORKAR, K.G. & GOLCTEGER, S.; The Presence of some Pathogen Micro Organisms, Yeasts and Moulds in Cheese Samples Produced at Small Dairy-Processing Plants. Asta Agriculturae Slovenica, v. 88, n. 1, p. 37-51, 2006.

TRIGUERO, D.E.G.; FIORESE, M.L.; KROUMOV, A.D.; HINTERHOLZ, C.L.; NADAI, B.L.; ASSUNÇÃO, G.M.; Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, Biochemical Engineering Journal, v. 110, p. 71-83, 2016.

YOUSSEF, K. e ROBERTO, S.R. Applications of salt solutions before and after harvest affect the quality and incidence of postharvest gray mold of 'Italia' table grapes. Postharvest Biology and Technology, v. 87, p. 95-102, 2014.

YU, T.; TU, C.; LU, H.; ZUNUN, M.; CHEN, F.; ZHOU, T.; SHENG, K.; ZHENG, X.; Effect of *Cryptococcus laurentii* and calcium chloride on control of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* infections in pear fruit. *Biological Control*, v. 61, n. 2, p. 169-175, 2012.

YOUSSEF, K.; SANZANI, S.M.; LIGORIO, A.; TERRY, A.I.; Sodium carbonate and bicarbonate treatments induce resistance to postharvest green mould on citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v. 87, p. 61-69, 2014.

MAZIERO, T.M. e BERSOT, L.S.; Micotoxinas em Alimentos Produzidos no Brasil. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 12, n. 1, p. 89-99, 2010.

LYNCH, K.M.; PAWLOWSKA, A.M.; BROSNAN, B.; COFFEY, A.; ZANNINI, E.; FUREY, A. ; MCSWEENEY, P.L.H. ; WATERS, D.M.; ARENDT, E.K.; Application of *Lactobacillus amylovorus* as an antifungal adjunct to extend the shelf-life of Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, v. 34, n. 1, p. 167-173, 2014.

PARTE 2

CAPÍTULO 1

UTILIZAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae*, *S. bourardii* E SUBSTÂNCIAS GRAS NO CONTROLE DE *Penicillium roqueforti* IN VITRO

1. INTRODUÇÃO

Penicillium roqueforti é um agente deteriorante bastante comum em matérias-primas e em alimentos processados. Porém, é um fungo empregado durante o processo de maturação de alguns queijos que apresentam pasta esverdeada (FONTAINE et al., 2015) tais como queijo tipo Roqueforti, Danish Blue e Gorgonzola (OLIVEIRA et al., 2010).

A alta atividade proteolítica que este fungo apresenta, é o principal problema ocasionado durante o armazenamento de queijos que pode alterar a textura e as propriedades organolépticas dos produtos. Apresentando uma maior incidência sobre queijos maturados semiduro como o tipo Parmesão, Jarlsberg e entre outros (KURE et al., 2004; BODEGA et al., 2009).

Outro problema acarretado pela contaminação de *P. roqueforti* é a possibilidade de patogenicidade que algumas cepas podem apresentar durante o seu desenvolvimento, com a produção de micotoxinas, tais como Roquefortine C, que causam atividades neurotóxicas, e ácido micofenólico, que possui atividade mutagênica capaz de induzir alterações cromossômicas (HYMERY et al., 2014).

A contaminação de queijos por este fungo pode ocorrer desde o local da produção, maturação e armazenamento (ROPARS et al., 2015), devido à presença de esporos na circulação de ar das indústrias e na superfície de equipamentos (KURE et al., 2004).

A fim de evitar a contaminação de *P. roqueforti* em alimentos, vários métodos têm sido utilizados, como a aplicação de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle durante o processo de fabricação, tratamentos físicos, térmicos e químicos (LAY et al., 2016).

Além destas estratégias, novos métodos têm sido investigados para o controle de fungos deteriorantes em alimentos e queijos. Entre estes o controle biológico realizado por microrganismos como as bactérias e leveduras tem se destacado como uma alternativa eficaz prolongando a vida de prateleira de tais produtos (LIU e TSAO, 2009; PARAFATI et al., 2015).

Como demonstra o trabalho de Saladino et al., (2016) ao utilizar bactérias lácticas que produzem ácidos orgânicos com capacidade antifúngica, que foram capazes de controlar *P. expansum* e *A. parasiticus*.

Algumas leveduras como *Debaryomyces hansenii* e *Yarrowia lipolytica* já foram utilizadas para reduzir o crescimento de *P. roqueforti* em queijo, como a *D. hansenii* conseguiu uma redução de 50% em comparação com o controle e a *Y. lipolytica* conseguiu impedir a formação de esporos (LIU e TSAO, 2009; PRICE et al., 2014).

Nesta vertente, leveduras podem apresentar-se como microrganismos potenciais para realização do controle biológico em queijos, visto que alguns gêneros como *Saccharomyces* são considerados seguros para o consumo humano, de acordo com o FDA, e possuem uma vasta utilização nas indústrias químicas, alimentícias, farmacêuticas e nutracêuticas (SWINNEN et al., 2016).

Algumas espécies dentro do gênero *Saccharomyces* ainda apresentam ações probióticas como *S. cerevisiae* e *S. boulardii* que promovem diversos benefícios à saúde humana, agindo como agentes terapêuticos contra vários tipos de doenças como, diarreia, colite e outras indisposições no trato gastrointestinal. *S. boulardii*, ainda está associada com a estimulação do sistema imunológico e a prevenção da formação de substâncias carcinogênicas no intestino, bem como a redução da intolerância à lactose e redução do colesterol (GOEBEL, et al., 2013; MIRANDA et al., 2016; TRIGUEROS et al., 2016).

O controle biológico pode ainda ser potencializado pela consorciação dos agentes biológicos, com o emprego de substância GRAS que são compostos químicos considerados como aditivos alimentares seguros para o consumo humano e que podem possuir efeitos antifúngicos (GENG et al., 2011; PALOU et al., 2016).

Entre estas substâncias alguns sais são amplamente utilizados em alimentos, pois possuem atividade antimicrobiana devido à alteração do pH e pressão osmótica do meio influenciando no crescimento dos microrganismos. O bicarbonato de sódio, benzoato de sódio e cloreto de cálcio que possuem efeitos antifúngicos, pois tem a capacidade de reduzir a germinação de esporos do *P. digitatum* e *P. expansum* (GENG et al., 2011; YU et al., 2012; HERRERO et al., 2016).

Considerando então o interesse na aplicação de controle biológico para a redução do crescimento deste fungo deteriorante e ainda futuramente ser aplicado nos produtos alimentícios como o queijo parmesão. O presente estudo teve como objetivo avaliar *in vitro* a atividade de quatro isolados de *S. cerevisiae* e da *S. boulardii* no controle de *Penicillium roqueforti*, além de testar substâncias GRAS na inibição do crescimento deste fungo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos microrganismos

O fungo filamentoso *P. roqueforti* (PV L 049) foi cedido gentilmente pelo Laboratório de Laticínios da Universidade Federal de Goiás.

As leveduras *S. cerevisiae* linhagem YEF 186, *Saccharomyces cerevisiae* UFT 5962, UFT 5976 e UFT 5992 foram obtidas da coleção de cultura Carlos Augusto Rosa do Laboratório de Microbiologia Geral e Aplicada da Universidade Federal do Tocantins – UFT e a levedura *S. boulardii* foi obtida a partir da Coleção de Cultura do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

2.2 PREPARAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

2.2.1. *Penicillium roqueforti*

A reativação dos esporos liofilizados da linhagem de *P. roqueforti* foi realizada primeiramente em um erlenmeyer contendo 30 mL de caldo Batata Dextrose (extrato de batata 4%, dextrose 20%) inoculados por 7 dias a 25°C. Após este período, transferiu 30 µL para a placa de Petri com meio de cultura Ágar Batata (extrato de batata 4%, dextrose 20% e ágar 15%), inoculado por 7 dias a 25°C. Após a observação da formação dos esporos, foi adicionada a placa 10 mL de solução de Tween 80 na concentração de 0,1% juntamente com 10 pérolas de vidro. Foi realizada agitação e posteriormente esta mistura (Tween 80 com esporos deste fungo) foi armazenada em Tubo falcon estéril, transferiu-se 200 µL para um erlenmeyer contendo 30 mL do meio ágar batata, inoculando novamente por 7 dias a 25°C. Após o período de incubação, foi recolhido os esporos no Tubo falcon estéril com 0,1% de Tween 80 e posteriormente foi calculado o número de esporos através da Câmara de Neubauer e ajustado para a concentração de 2×10^6 esporos/mL, para ser utilizada nos experimentos *in vitro* (SILVA, 2013).

2.2.2 Leveduras

As cepas de leveduras *S. cerevisiae* e *S. boulardii* foram crescidas em placa de Petri contendo meio YMA (glicose 1%, peptona 0,5%, extrato de malte 0,3%, ágar 2%, extrato de levedura 0,3% e cloranfenicol 100 mg/L) por 48h a 25°C. Após este período foi realizado um novo repique para a obtenção da biomassa, onde foi retirada uma alça de cada colônia e repassadas para novas placas contendo o mesmo meio de cultura, armazenadas sob as mesmas condições de crescimento. Para tanto, as placas contendo a biomassa de leveduras crescida foram raspada e adicionadas em tubo falcon contendo 20 mL de solução salina a 0,85%. Para o calculado da quantidade de células foi utilizado Câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para 2×10^8 células/mL em 10 mL de solução salina a 0,85% (SILVA, 2013).

2.3 Verificação da inibição do crescimento do *P. roqueforti* pelas leveduras

As leveduras na concentração de 2×10^8 células/mL foram inoculadas na forma de 'spot', 10µl no centro da placa de Petri contendo meio YMA por 48h a 25°C. Após este período, o experimento foi dividido em: Tratamento 1: (leveduras viáveis) e Tratamento 2: (levedura inativada por vapor de clorofórmio por 30 minutos).

Após crescimento e a inativação dos antagonistas, foram retirados 10µl da solução de esporos de *P. roqueforti* previamente preparada e ajustado na concentração de 2×10^6 , posteriormente foi adicionado em 3,5 mL do meio Ágar de malte semi-sólido (extrato de malte 0,3% e ágar 0,75%), sendo então espalhado na parte superficial do meio YMA, após este processo as placas foram incubadas a 25°C por 7 dias (SILVA, 2013). Todos os tratamentos foram feitos em triplicata e comparadas com controle positivo.

2.4 Verificação da redução e alterações morfológicas dos esporos do *P. roqueforti* pelo leveduras antagônicas

Após a verificação da inibição do crescimento do patógeno, foi realizada a contagem dos esporos produzidos pelos Tratamentos 1 (levedura viáveis) e 2 (levedura inativadas).

Foram adicionados nas placas 10 mL de Tween 80 na concentração de 0,1% juntamente com 10 pérolas de vidro, posteriormente agitou-se lentamente e depois, esta solução contendo os esporos foi recuperada para o tubo falcon estéril. Após este

procedimento, foi retirado 1 mL da solução e transferido para outro tubo falcon contendo 9 mL de Tween 80 a 0,1%. A quantidade de esporos produzidos pelos dois tratamentos foi calculada através de Câmara de Neubauer. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e as imagens dos esporos foram capturadas pelo microscópio óptico (Modelo O500 Inverter da marca Opticam) (SILVA, 2013).

2.5 Teste de sensibilidade de crescimento do *Penicillium roqueforti* a substância GRAS

As substâncias GRAS utilizadas para o teste de sensibilidade foram bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, carbonato de cálcio, cloreto de cálcio e cloreto de potássio, obtidos através das listas disponíveis pela FAO/FDA. Os meios de culturas foram constituídos por meio YMA acrescidos de 1, 3 e 5% da concentração das substâncias acima citadas, exceto cloreto de potássio que foi adicionado nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1,0%, todas as concentrações utilizadas foram de acordo com FAO/FDA.

Após a preparação das placas contendo o meio e as substâncias GRAS nas suas respectivas concentrações foi inoculado no forma de 'spot' 10 µL da solução dos esporos do *P. roqueforti* na concentração de 2×10^6 no centro da placa e colocada a 25°C por 7 dias. As medições dos halos de inibição foram realizadas por um paquímetro digital (mm) e realizadas nos 3, 5 e 7 dias. Todas amostras foram realizados em triplicata e comparadas com o controle positivo (FERREIRA et al., 2015).

2.6 Teste estatístico

Os dados da contagem de esporos deste fungo e das medidas de halos de inibição foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa estatístico ASSISTAT 7.7. Para o teste de contagem de esporos e inibição do fungo pelo *P. roqueforti*. Onde foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade da distribuição dos dados e posteriormente foi utilizado o teste Scott-Knott.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do tratamento 1 (leveduras viáveis) não demonstraram diferenças significativas quando comparadas com o controle positivo, quando observado a coloração do crescimento do *P. roqueforti* no meio de cultura, porém onde houve crescimento das leveduras foi observado um menor esporulação e coloração foi modificada ficando mais clara (Figura 1), supõem-se que ocorreu uma competição por espaço entre a levedura e o deteriorante. No tratamento 2 (leveduras inativadas), não foi observado diferença significativa em relação ao controle, quando observado a coloração do crescimento do patógeno (Figura 2).

Esta alteração de coloração também foi observado no trabalho da Silva et al. (2015), onde os autores verificaram que as leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* (UFMG 905) tinham capacidade inibitória no crescimento do *A. parasiticus*, além disso, no experimento onde as leveduras estavam viáveis houve alteração de coloração durante o crescimento do *A. parasiticus* em comparação com o controle positivo passando de verde-oliva para amarelada, no mesmo experimento os autores observaram que as leveduras quando inativadas pelo vapor de clorofórmio, não modificaram a coloração do crescimento quando comparado ao controle, corroborando aos resultados apresentado neste trabalho.

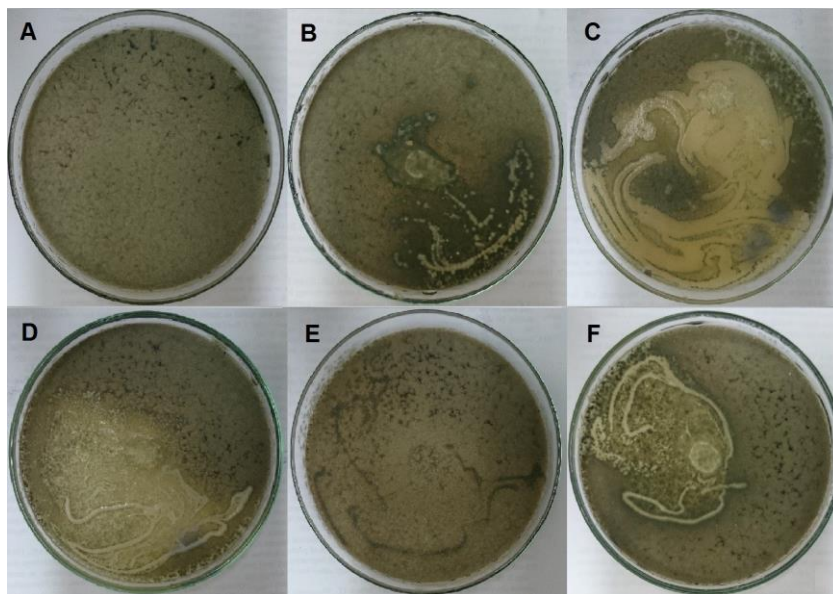


Figura 1. Tratamento 1, as leveduras antagonistas viáveis analisados por sete dias. (A) Controle positivo; (B) *S. cerevisiae* UFT 5962 x *P. roqueforti*; (C) *S. cerevisiae* UFT 5992 x *P. roqueforti*; (D) *S. boulardii* x *P. roqueforti*; (E) *S. cerevisiae* YEF 186 x *P. roqueforti*; (F) *S. cerevisiae* UFT 5976 x *P. roqueforti*.

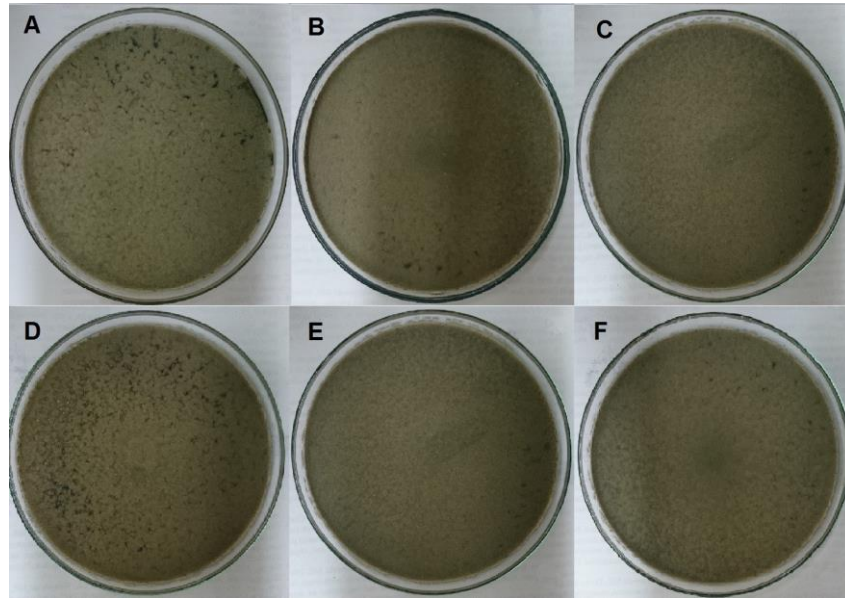


Figura 2. Tratamento 2, as leveduras antagonistas inativadas por vapor de clorofórmio analisado por sete dias. (A) Controle positivo; (B) *S. cerevisiae* UFT 5962 x *P. roqueforti*; (C) *S. cerevisiae* UFT 5992 x *P. roqueforti*; (D) *S. boulardii* x *P. roqueforti*; (E) *S. cerevisiae* YEF 186 x *P. roqueforti*; (F) *S. cerevisiae* UFT 5976 x *P. roqueforti*

Após a verificação do crescimento do deteriorante na presença das leveduras viáveis e inativas, não foram verificadas alterações nas estruturas dos esporos do *P. roqueforti*, na presença das leveduras viáveis e inativas.

Os resultados apresentados são semelhantes ao encontrado no trabalho realizado por HOUBREKEN et al. (2010), ao qual descreveram as estruturas celulares do *P. roqueforti* ao serem submetidos em uma variação de temperatura entre 9 a 37°C, e demonstraram que não ocorreram alterações nas estruturas dos esporos deste fungo, continuando em forma esférica e com parede lisa, corroborando com o que também foi observado nas figuras 3 e 4 deste trabalho.

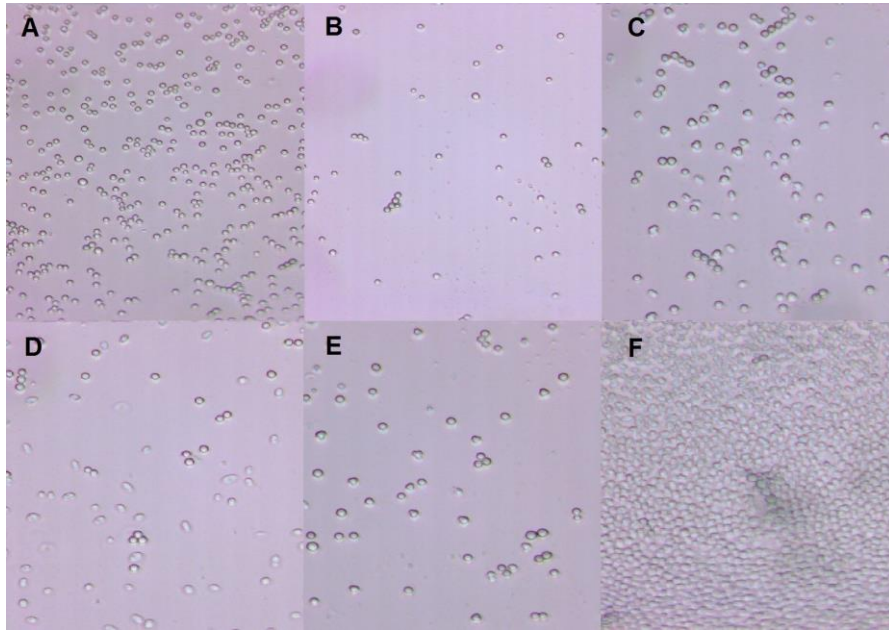


Figura 3. Tratamento 1, micrografia dos esporos do *Penicillium roqueforti* recuperados da solução contendo o as leveduras antagonistas viáveis. (A) Controle positivo; (B) *S. cerevisiae* YEF 186 x *P. roqueforti*; (C) *S. cerevisiae* UFT 5962 x *P. roqueforti*; (D) *S. boulardii* x *P. roqueforti*; (E) *S. cerevisiae* UFT 5992 x *P. roqueforti*; (F) *S. cerevisiae* UFT 5976 x *P. roqueforti*.

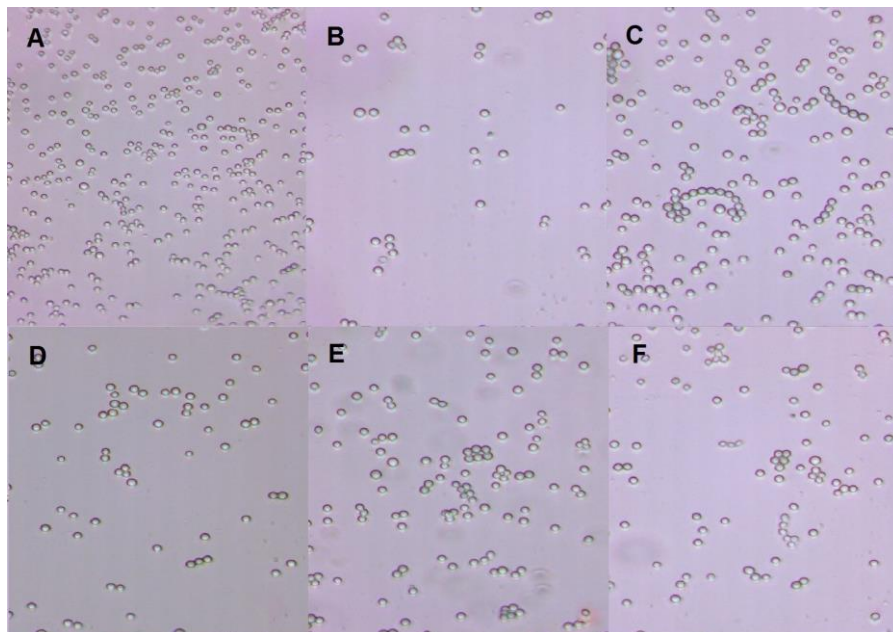


Figura 4. Tratamento 2, Micrografia dos esporos do *Penicillium roqueforti* recuperados da solução contendo os leveduras antagonistas inativas. (A) Controle positivo; (B) *S. cerevisiae* YEF 186 x *P. roqueforti*; (C) *S. cerevisiae* UFT 5962 x *P. roqueforti*; (D) *S. boulardii* x *P. roqueforti*; (E) *S. cerevisiae* UFT 5992 x *P. roqueforti*; (F) *S. cerevisiae* UFT 5976 x *P. roqueforti*.

Posteriormente foi realizada a contagem de esporos, onde os dados obtidos primeiramente foram submetidos à análise estatística ANOVA, e as médias obtidas foram avaliadas quanto à normalidade através do teste de Shapiro-Wilk, o qual não apresentou normalidade, sendo necessário a transformação dos dados para logX. Em seguida foi aplicado o teste estatístico Scott-Knott que dividi o resultado em grupos para verificar a maior redução da concentração de esporos/mL e selecionar as leveduras para aplicação de testes de controle biológicos em queijo parmesão.

Ao analisar os dados estatísticos, apresentados na tabela 1, observamos uma redução significativa na concentração dos esporos, no grupo E compostos pelas leveduras antagonicas viáveis (*S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFT 5992) variando de 88,2% e 92% respectivamente. As leveduras *S. boulardii*, *S. cerevisiae* YEF 186 e *S. cerevisiae* UFT 5992 foram então selecionado para o teste de resistência a substância GRAS, devido à capacidade de redução acima de 80%, da produção de esporos do *P. roqueforti*.

Tabela 1. Porcentagem de redução de esporos do *P. roqueforti* em relação ao tratamento com as leveduras antagonicas viáveis e inativas.

TRATAMENTOS	Mo viáveis		Mo inativas	
	Média (esporos/mL)	Redução de esporos (%)	Média (esporos/mL)	Redução de esporos (%)
Controle <i>P. roqueforti</i>	26,17 ^a	-	26,17 ^a	-
<i>S. cerevisiae</i> YEF186	5,01 ^d	80,86	5,82 ^c	77,73
<i>S. boulardii</i>	3,09 ^e	88,18	15,19 ^b	41,96
<i>S. cerevisiae</i> UFT 5962	5,94 ^d	77,28	12,25 ^b	53,18
<i>S. cerevisiae</i> UFT 5976	5,56 ^d	78,75	11,25 ^b	57,00
<i>S. cerevisiae</i> UFT 5992	2,09 ^e	92,00	13,42 ^b	48,70

** significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$)

*Médias seguidas de letras minúsculas demonstram diferenças estatísticas em relação ao controle positivo (letra a) pelo teste de Scott-knott ($p \leq 0,05$).

Os resultados obtidos foram semelhantes ao encontrado por Yao et al. (2004), estes autores utilizaram no processo *in vitro* o meio NYDA e as leveduras antagônicas *Cryptococcus laurentii* e *Trichosporon pullulans* para testarem a capacidade de inibição do crescimento de *Penicillium expansum*, eles observaram que as leveduras *C. laurentii* e *T. pullulans* conseguiram reduzir 59,5 e 72,1% a produção de esporos em relação ao controle.

A redução de esporos também foi percebida por Silva, (2013) ao utilizar as leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* (UFMG 905) para verificar a capacidade antifúngica sobre o crescimento de *A. parasiticus*, onde *S. boulardii* e *S. cerevisiae* (UFMG 905), que estavam viáveis conseguiram reduzir 46,3% e 45,8% em comparação com o controle, e as leveduras inativadas apresentaram redução de 24,9% e 22,6% também comparado ao controle.

O *P. roqueforti* foi submetido ao teste de sensibilidade a substâncias GRAS (bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, carbonato de cálcio, cloreto de potássio e cloreto de cálcio), os dados mostraram que o bicarbonato de sódio e carbonato de sódio conseguiram inibir 100% do crescimento do *P. roqueforti* nas concentrações de 1%, 3% e 5% (Figura 5 e 6). As outras substâncias GRAS utilizadas não foram verificadas uma redução satisfatória.

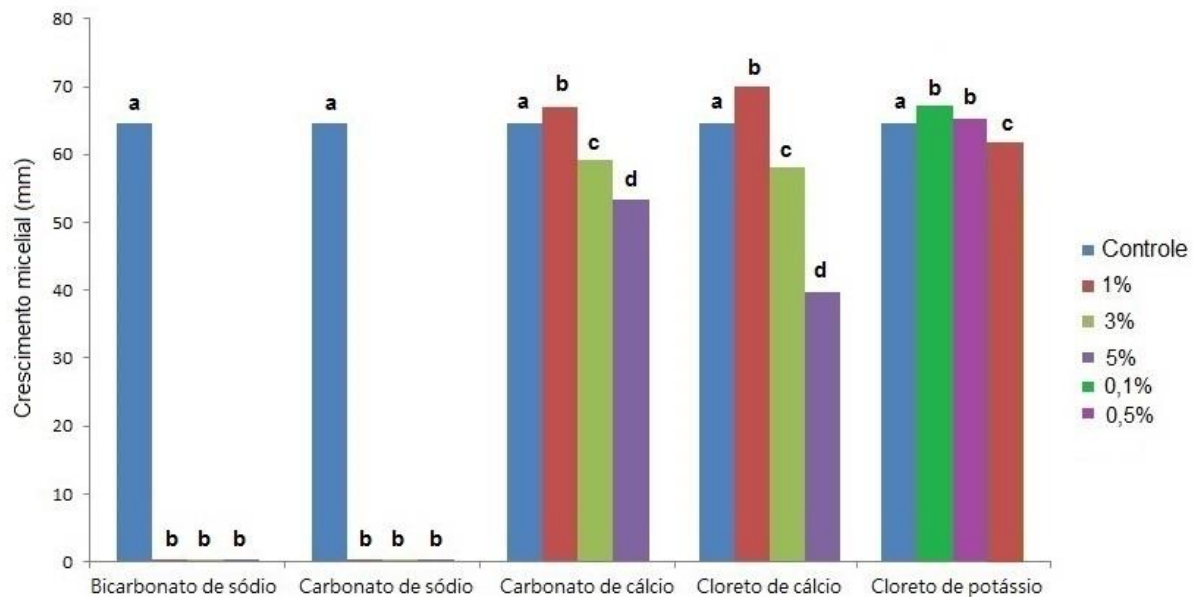


Figura 5. Efeito das diferentes substâncias GRAS em diferentes concentrações sobre o crescimento de *P. roqueforti*, após 7 dias de incubação a 25°C. *médias seguidas de letras minúsculas distintas nas barras, diferem entre si pelo teste de Scott-knott ($p \leq 0,05$).

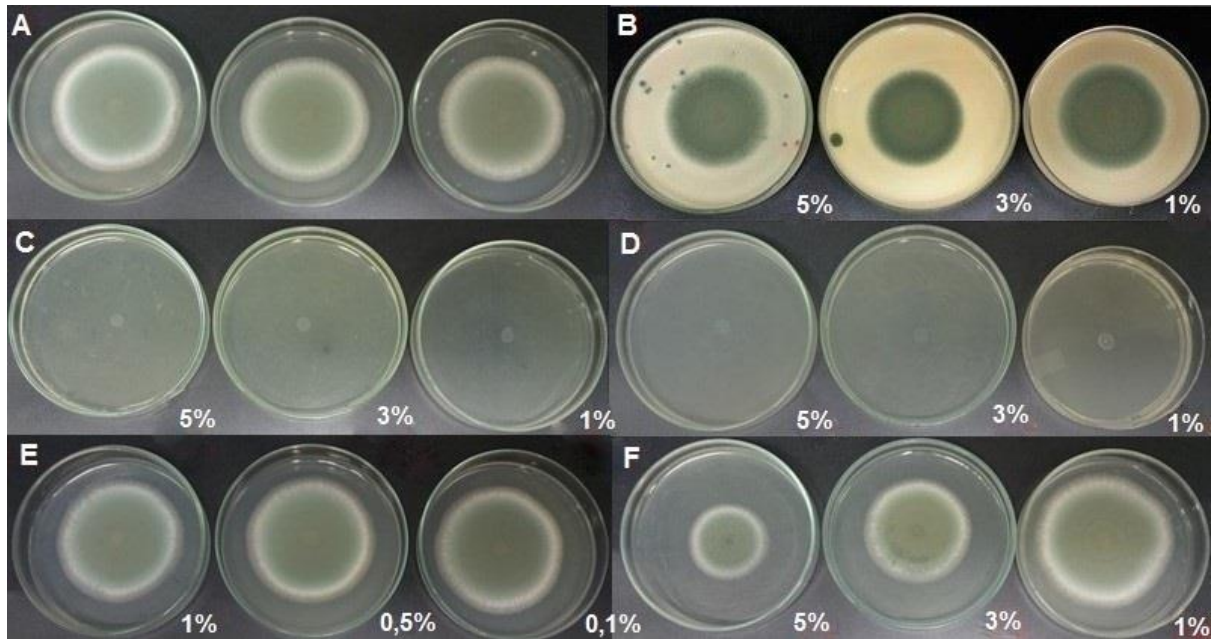


Figura 6. Crescimento micelial do *P. roqueforti*. (A) = controle positivo. (B) = carbonato de cálcio. (C) = carbonato de sódio. (D) = bicarbonato de sódio. (E) = cloreto de potássio. (F) = cloreto de cálcio.

No trabalho de Youssef et al. (2012) os resultados observados foram semelhantes ao encontrado em nosso estudo, pois o bicarbonato de sódio conseguiu inibir *in vitro* 100% o crescimento micelial dos fungos *P. digitatum* e *P. italicum*.

O trabalho realizado por Ferreira et al. (2015), utilizando os fungos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium guttiforme* corroboram com os resultados encontrados neste experimento, no qual foram utilizadas as mesmas substâncias GRAS.

A capacidade de inibição do bicarbonato de sódio pode estar relacionada à alteração do pH do meio afetando assim a atividade enzimática de fungos (FALLANAJ et al., 2016). Segundo Lai et al. (2015), a utilização deste sal pode ainda alterar a transferência de prótons através da membrana plasmática, promovendo a redução do crescimento micelial.

Os efeitos das substâncias GRAS, como os sais de carbonatos e bicarbonato de sódio, já são conhecidos contra uma grande variedade de patógenos e são utilizados por terem uma ação principalmente fungistática (YOUSSEF et al., 2014; PALOU et al., 2016).

Estas substâncias mostraram uma boa eficiência no controle do crescimento *P. roqueforti*, sendo que ambas foram eficazes em todas as concentrações utilizadas no estudo, inclusive na menor concentração testada (1%). O bicarbonato de sódio devido a sua utilização em produtos alimentícios, demonstra uma boa estratégia para o controle de *P. roqueforti*, pois não altera o sabor e textura do produto final, sendo uma estratégia já estudada para aumentar período de conservação de frutas. Além de ser facilmente encontrado no mercado e é mais

acessível quando comparado com outras substâncias GRAS (BRU et al., 2013; LAI et al., 2015; FALLANAJ et al., 2016).

4 CONCLUSÃO

As leveduras *S. boulardii*, *S. cerevisiae* YEF 186 e *S. cerevisiae* UFT 5992 apresentaram maior redução de esporos de *Penicillium roqueforti*. As substâncias GRAS bicarbonato de sódio e carbonato de sódio apresentaram 100% de controle do crescimento do fungo. Desta forma, as leveduras selecionadas, juntamente com as substâncias bicarbonato de sódio e carbonato de sódio, demonstram a possibilidade de serem empregadas em testes de controle biológico em queijo parmesão para a redução do crescimento deste fungo deteriorante.

5 REFERÊNCIAS

BODEGA, F.M.A.; MAURIZ, E.; GÓMEZ, A.; MARTÍN, J.F.; Proteolytic activity, mycotoxins and andrastin A in *Penicillium roqueforti* strains isolated from Cabrales, Valdeón and Bejes-Tresviso local varieties of blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, v. 136, n. 1, p. 18-25, 2009.

BRU, L.V.; OBSZYNSKI, C.M.; SAMSOEN, M.; SABOU, M.; WALLER, J.; CANDOLFI, E.; Antifungal Activity of Sodium Bicarbonate Against Fungal Agents Causing Superficial Infections. *Mycopathologia*, v. 173, p. 153-158, 2013.

FALLANAJ, F.; IPPOLITO, A.; LIGORIO, A.; GARGANESE, F.; ZAVANELLA, C.; SANZANI, S.M.; Electrolyzed sodium bicarbonate inhibits *Penicillium digitatum* and induces defence responses against green mould in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v. 115, p. 18-29, 2016.

FERREIRA, E.M.S.; MALTA, C.M.; COELHO, C.M.; PIMENTA, R.S.; Substâncias GRAS no controle do crescimento de *Colletotrichum Gloeosporioides* e *Fusarium guttiforme* in vitro. *J. Bioen. Food Sci.*, v. 2, v. 4, p. 183-188, 2015.

FERREIRA, E.M.S.; MALTA, C.M.; GONZAGA, L.V.; BICALHO, J.O.; PIMENTA, R.S.; Avaliação da Resistência de Leveduras Biocontroladoras à Substâncias “GRAS” – (Generally Regarded As Safe). *J. Bioen. Food Sci.*, v. 2, n. 4, p. 178-182, 2015.

FONTAINE, K.; HYMERY, N.; LACROIX, M.; PUEL, O.; RIGALMA, K.; GAYDOU, V.; COTON, E.; MOUNIER, J.; Influence of intraspecific variability and abiotic factors on mycotoxin production in *Penicillium roqueforti*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 215, p. 187-193, 2015.

GENG, P.; CHEN, S.; HU, M.; HAQ, M.R.; LAI, K.; QU, F.; ZHANG, Y.; Combination of *Kluyveromyces marxianus* and sodium bicarbonate for controlling green mold of citrus fruit. *International Journal of Food Microbiology*, v. 151, p. 190-194, 2011.

GOEBEL, C.S.; OLIVEIRA, F.M.; SEVERO, L.C.; Infección por *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 30, n. 3, p. 205-208, 2013.

HERRERO, C.M.; RAMÍREZ, P.A.M.; PALOU, L.; Evaluation of sodium benzoate and other food additives for the control of citrus postharvest green and blue molds. *Postharvest Biology and Technology*, v. 115, p. 72-80, 2016.

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A.; Sex in *Penicillium* series *Roqueforti*. *IMA Fungus*, v.1, n. 2, p. 171-180, 2010.

HYMERY, N.; VASSEUR, V.; MONIKA, C.; MOUNIER, J.; JANY, J.L.; BARBIER, G.; COTON, E.; Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 13, n. 4, p. 437-456, 2014.

KUPPER, K.C.; CERVANTES, A.L.L.; KLEIN, M.N.; SILVA, A.C.; Avaliação de Microrganismos Antagônicos, *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* para o Controle de *Penicillium digitatum*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 35, n. 2, p. 425-436, 2013.

KURE, C.F.; SKAAR, I.; BRENDENHAUG, J.; Mould contamination in production of semi-hard cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v. 93, n. 1, p. 41-49, 2004.

LAI, T.; BAI, X.; WANG, Y.; ZHOU, J.; SHI, N.; ZHOU, T.; Inhibitory Effect Of Exogenous Sodium Bicarbonate On Developmentand Pathogenicity Of Postharvest Disease *Penicillium expansum*. *Scientia Horticulturae*, v. 187, p. 108-114, 2015.

LAY, C.L.; MOUNIER, J.; VASSEUR, V.; WEILL, A.; BLAY, G.; BARBIER, G.; COTON, E.; In vitro and in situ screening of lactic acid bacteria and propionibacteria antifungal activities against bakery product spoilage molds. *Food Control*, v. 60, p. 247-255, 2016.

LIU, S.Q. e TSAO, M.; Biocontrol of dairy moulds by antagonistic dairy yeast *Debaryomyces hansenii* in yoghurt and cheese at elevated temperatures. *Food Control*, v. 20, n. 9, p. 852-855, 2009.

MIRANDA, D.Z.; PALMA, M.; MATOS, G.S.; SCHIEBEL, J.G.; MONTEIRO, C.M.; ARONOVICH, M.; BOZZA, P.T.; BOZZA, F.A.; NIMRICHTER, L.; LOMELI, M.M.; MARQUES, E.T.A.; MARTINS, F.S.; DOURADINHA, B.; Lipid droplet levels vary heterogeneously in response to simulated gastrointestinal stresses in different probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Functional Foods*, v. 21, p. 193-200, 2016.

NALLY, M.C.; PESCE, V.M.; MATURANO, Y.P.; ASSAF, L.A.R.; TORO, M.E.; FIGUEROA, L.I.C.; VAZQUEZ, F.; Antifungal modes of action of *Saccharomyces* and other biocontrol yeasts against fungi isolated from sour and grey rots. *International Journal of Food Microbiology*, v. 204, p. 91-100, 2015.

OLIVEIRA, F.C.; Produção de Lipase por *Penicillium roqueforti* e sua Aplicação na Obtenção de Aroma de Queijo. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

PALOU, L.; ALI, A.; FALLIK, E.; ROMANAZZI, G.; GRAS, Plant- And Animal-Derived Compounds As Alternatives To Conventional Fungicides For The Control Of Postharvest Diseases Of Fresh Horticultural Produce. *Postharvest Biology and Technology*, 2016.

PARAFATI, L.; VITALE, A.; RESTUCCIA, C.; CIRVILLERI, G.; Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*, V. 47, P. 95-92, 2015.

PIMENTA, R.S.; SILVA, J.F.M.; COELHO, C.M.; MORAIS, P.B.; ROSA, C.A.; CORRÊA, A.J.; Integrated Control Of *Penicillium Digitatum* By The Predacious Yeast *Saccharomycopsis Crataegensis* And Sodium Bicarbonate On Oranges. *Brasilian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 404-410, 2010.

PRICE, E.J.; LINFORTH, R.S.T.; DODD, C.E.R.; PHILIPS, C.A.; HEWSON, L.; HORT, J.; GKATZIONIS, K.; Study of the influence of yeast inoculum concentration (*Yarrowia lipolytica* and *Kluyveromyces lactis*) on blue cheese aroma development using microbiological models. *Food Chemistry*, v. 145, p. 464-472, 2014.

ROPARS, J.; VEGA, R.C.R.; VILLAVICENCIO, M.L.; GOUZY, J.; SALLET, E.; DUMAS, E.; LACOSTE, S.; DEBUCHY, R.; DUPONT, J.; BRANCA, A.; GIRAUD, T.; Adaptive Horizontal Gene Transfers between Multiple Cheese-Associated Fungi. *Current Biology*, v. 25, n. 19, p. 2562-2569, 2015.

SALADINO, F.; LUZ, C.; MANYES, L. FRANZÓN, M.F.; MECA, G.; In vitro antifungal activity of lactic acid bacteria against mycotoxigenic fungi and their application in loaf bread shelf life improvement. *Food Control*, v. 67, p. 273-277, 2016.

SILVA, J.F.M.; Estratégias para Controle de Aflatoxinas Produzidas por *Aspergillus parasiticus* em Amendoim (*Arachis hypogaea* L.). Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

SILVA, J.F.M.; PELUZIO, J.M.; PRADO, G.; MADEIRA, J.E.G.C.; SILVA, M.O.; MORAIS, P.B.; ROSA, C.A.; PIMENTA, R.S.; NICOLI, J.R.; Use of Probiotics to Control Aflatoxin Production in Peanut Grains. Hindawi Publishing Corporation, 2015.

SWINNEN, S.; HO, P.W.; KLEIN, M.; NEVOIGT, E.; Genetic determinants for enhanced glycerol growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, v. 36, p. 68-79, 2016.

TRIGUERO, D.E.G.; FIORESE, M.L.; KROUMOV, A.D.; HINTERHOLZ, C.L.; NADAI, B.L.; ASSUNÇÃO, G.M.; Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 110, p. 71-83, 2016.

YAO, H.; TIAN, S.; WANG, Y.; Sodium bicarbonate enhances biocontrol efficacy of yeasts on fungal spoilage of pears. *International Journal of Food Microbiology*, v. 93, p. 297-304, 2004.

YOUSSEF, K. e LIGORIO, A.; SANZANI, S.M.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A.; Control of storage diseases of citrus by pre- and postharvest application of salts. *Postharvest Biology and Technology*, v. 72, p. 57-63, 2012.

YOUSSEF, K.; SANZANI, S.M.; LIGORIO, A.; TERRY, A.I.; Sodium carbonate and bicarbonate treatments induce resistance to postharvest green mould on citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v. 87, p. 61-69, 2014.

CAPÍTULO 2

UTILIZAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* YEF 186, *Saccharomyces cerevisiae* UFT 5992 E *Saccharomyces boulardii* EM ASSOCIAÇÃO COM SUBSTÂNCIAS GRAS EM QUEIJO TIPO PARMESÃO PARA CONTROLE DE *Penicillium roqueforti*

1. INTRODUÇÃO

O queijo parmesão é originário da Itália, onde a sua fabricação é realizada com leite *in natura* ou pasteurizado, sendo caracterizado como um queijo semigordo, com baixo teor de umidade, textura compacta e granulosa (HOMEWOOD e HESS, 1993; BRASIL, 1997).

Os fungos filamentosos são geralmente os microrganismos mais envolvidos em casos de deterioração de queijos maturados e causam diversos problemas durante a produção e armazenagem, principalmente por possuírem a capacidade de crescerem em baixo teor de umidade, atividade de água e temperatura (LUND, et al., 1995; PITT e HOCKING, 2009; PEIXOTO et al., 2012).

Entre as espécies de fungos, que mais geram prejuízos na produção de queijos é o *Penicillium roqueforti* e é considerado um dos mais envolvidos quando se tratando de queijos semigordos e maturados como o tipo parmesão, pois este microrganismo pode causar modificações no sabor e na cor dos produtos, além de possuir a capacidade de produzir micotoxinas, como Roquefortine C, ácido micofenólico e PR-toxinas, que possuem efeitos neurotóxicos e imunossupressores ao homem (BARROS et al., 2011; FONTAINE et al., 2015; SERNA, 2015).

Penicillium roqueforti é capaz de crescer em temperaturas de refrigeração e em temperatura ambiente, nestas condições conseguem produzir micotoxinas por isso o seu controle deve ser rigoroso durante toda a produção (MORAIS, 2005; OLIVEIRA, 2010; FAIRCLOUGH et al., 2011; MIOSO et al., 2015).

Alguns métodos de controle da contaminação de queijos por fungo filamentosos são aplicados durante o processo de fabricação e no produto final, como aplicação de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle, tratamentos físicos, térmicos e químicos. Entre estes, as mais utilizadas são as substâncias químicas como cloreto de sódio, ácido láctico, entre outros, devido a sua capacidade inibitória através da redução de pH e da diferença de pressões osmóticas. (LAY et al, 2016; SALADINO et al., 2016).

Métodos alternativos têm sido buscados para ampliar o controle de fungos filamentosos em queijos. Entre estes, o controle biológico aponta ser uma nova possibilidade a ser explorada. Visto que é um método já amplamente utilizando na conservação de alimentos como as frutas e que apresenta excelentes resultados (PIMENTA et al., 2010; YOUSSEF et al., 2014).

O controle biológico tem como objetivo o controle de um microrganismo através de outro por mecanismo de ação, tais como: parasitismo, produção de antibióticos, predação, entre outros. Sendo comum a presença de mais de um tipo de interação (GENG et al., 2011).

A eficiência do controle biológico em queijos ainda é pouco estudado. Todavia, alguns autores utilizaram as leveduras *Debaryomyces hansenii* e *Yarrowia lipolytica* e obtiveram resultados positivos na redução do crescimento do *P. roqueforti* em queijo (LIU e TSAO, 2009; GKATZIONIS et al, 2014; PRICE et al., 2014).

As leveduras são os microrganismos mais empregados no controle biológico, devido a não produção de esporos potencialmente alergênicos ou micotoxigênicos e raramente produzem substâncias antagônicas como as bactérias (DRUVEFORS, 2005; SCHNÜRER e JONSSON, 2011).

De acordo com (FDA), alguns gêneros de leveduras *Saccharomyces* são consideradas seguras para o consumo humano e podem trazer benefícios a saúde (SWINNEN et al., 2016). As espécies *S. cerevisiae* e *S. boullardi* são utilizadas para aplicação de controle biológico, devido à capacidade que possuem de competir por espaços e nutrientes. Além de que, *S. boullardii* possui ação probiótica comprovada, melhorando o sistema imunológico e a prevenção da formação de substâncias carcinogênicas no intestino (GOEBEL, et al., 2013; MIRANDA et al., 2016; TRIGUEROS et al., 2016).

A associação de leveduras com substâncias GRAS, pode aumentar a eficiência no controle de fungos, pois estas substâncias são consideradas pela FDA aditivos alimentares seguros para o ser humano, e também pode possuir capacidade fungicida ou fungistática que potencializam o controle biológico (HONG et al., 2014), principalmente o bicarbonato de sódio que já é amplamente aplicado em produtos alimentícios devido a não alteração de sabor e textura do produto final e tem preço mais barato em comparação com outras substâncias (LAI et al., 2015; FALLANAJ et al., 2016).

Alguns estudos já demonstraram a capacidade do controle de crescimento de *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* e *Penicillium expansum* através da combinação desta substância com leveduras antagônicas resultando na proteção dos frutos contra estes fungos e consequentemente o seu aumento de vida de prateleira (JANISIEWICZ et al., 2008; GENG et al., 2011; YOUSSEF et al., 2014; QUI et al., 2015).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi analisar a possibilidade de associar as leveduras *S. boullardii*, *S. cerevisiae* YEF 186 e *S. cerevisiae* UFT 5992 com a substância GRAS, bicarbonato de sódio, contra o fungo *P. roqueforti* em queijo tipo parmesão.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos microrganismos

O *P. roqueforti* (PV L 049) foi cedido gentilmente pelo Laboratório de Laticínios da Universidade Federal de Goiás. As leveduras *S. cerevisiae* linhagem YEF 186, *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFT 5992 foram obtidas da coleção de cultura Carlos Augusto Rosa do Laboratório do Laboratório de Microbiologia geral e Aplicada da Universidade Federal do Tocantins – UFT e a levedura *S. boulardii* foi obtida a partir da Coleção de Cultura do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

2.2 Preparação dos microrganismos

2.2.1. *Penicillium roqueforti*

A reativação dos esporos liofilizados da linhagem de *P. roqueforti* foi realizada primeiramente em um erlenmeyer contendo 30 mL de caldo Batata Dextrose (extrato de batata 4%, dextrose 20%) inoculados por 7 dias a 25°C. Após este período, transferiu-se 30 µL para a placa de Petri com meio de cultura Ágar Batata (extrato de batata 4%, dextrose 20% e ágar 15%), inoculado por 7 dias a 25°C. Após a observação da formação dos esporos, foi adicionado a placa 10 mL de solução de Tween 80 na concentração de 0,1% juntamente com 10 pérolas de vidro. Foi realizada agitação e posteriormente esta mistura (Tween 80 com esporos deste fungo) foi armazenada em Tubo falcon estéril, transferiu-se 200 µL para um erlenmeyer contendo 30 mL do meio ágar batata, inoculando por 7 dias a 25°C. Após o período de incubação, foi recolhido os esporos no Tubo falcon estéril com 0,1% de Tween 80 e posteriormente foi calculado o número de esporos através Câmara de Neubauer e ajustado para a concentração de 2×10^6 esporos/mL, para ser utilizada nos experimentos *in vitro* (SILVA, 2013).

2.2.2 Leveduras

As cepas de leveduras *S. cerevisiae* YEF 186, UFT 5992 e *S. boulardii* foram crescidas em placa de Petri contendo meio YMA (glicose 1%, peptona 0,5%, extrato de malte 0,3%, ágar 2%, extrato de levedura 0,3% e cloranfenicol 100 mg/L) por 48h a 25°C. Após o crescimento, para a obtenção de biomassa, foi retirada uma alça de cada colônia e foram repassadas para novas placas contendo o mesmo meio de cultura, onde foram armazenadas sob as mesmas condições de crescimento citada a cima. Apartir das placas contendo a biomassa de leveduras crescida, estas foram raspada com auxilio de espátulas e adicionadas em tubos falcons contendo 20 mL de solução salina a 0,85%. Para o calculado da quantidade de células foi utilizado Câmara de Neubauer e a concentração foi ajustada para 2×10^8 células/mL (SILVA, 2013).

2.3 Teste de resistência das leveduras a substância GRAS

Para realizar o teste de resistência das leveduras as substancias GRAS, foram preparados erlenmeyer contendo caldo GYMP (1% extrato de levedura; 0,5% peptona; 1% glicose; 0,02% fosfato de sódio monobásico) e adicionados concentração de 1%, 3% e 5% de bicarbonato de sódio ao meio de cultura. Após a preparação do meio, foram inoculado as leveduras na concentração de 2×10^8 nos frascos e incubados em agitador rotativo a 100 rpm a 25°C. Após a inoculação, foi realizado o plaqueamento das leveduras para a contagem populacional através do equipamento Eddy Jet Spiral plater (IUL, INSTRUMENTS) em placas contendo o meio de cultura YMA, sendo incubado a 25°C por 48h. Após período de incubação, foi realizada a contagem do número de colônias através do equipamento Flash & gol (IUL, INSTRUMENTS) e os resultados foram demonstrados em log (UFC/g).

As análises do crescimento das leveduras foram realizadas a cada 2 dias, e após completar um período de 40 dias foi realizada a cada 10 dias (FERREIRA et al., 2015)

2.4 Ensaio de controle biológico

2.4.1 Processo de imersão do queijo parmesão em uma solução de levedura antagônica

Para realização dos testes de controle biológico com as leveduras em queijos tipo parmesão, foram adquiridas 30 peças no comércio local da cidade de Palmas-To, sendo obtidos na forma fracionada e com formato triangular cortado pelo próprio comerciante, igual ao qual é utilizada para venda.

As peças de queijos foram inoculados com as leveduras *S. boulardii*, *S. cerevisiae* YEF 186 e *S. cerevisiae* UFT 5992 através da imersão em uma solução de água salina na concentração de 0,85% e contendo $2,0 \times 10^8$ células/mL de cada levedura durante o período de 5 min. Decorrido o tempo, os queijos foram separados e armazenados em potes plásticos estéreis, e incubados a temperatura ambiente variando entre 25 a 30°C por 24 h., após este períodos o experimento foi dividido em tratamentos: Tratamento 1 controle negativo (apenas a levedura *S. boulardii*), Tratamento 2 controle negativo (apenas a levedura *S. cerevisiae* YEF 186), Tratamento 3 controle negativo (apenas a levedura *S. cerevisiae* UFT 5992), Tratamento 4 (*S. boulardii* + *P. roqueforti*), Tratamento 5 (*S. cerevisiae* YEF 186 + *P. roqueforti*), Tratamento 6 (*S. cerevisiae* UFT 5992+ *P. roqueforti*), Tratamento 7 controle positivo (apenas o fungo deteriorante). Após 24h, os tratamentos 4, 5, 6 e 7 foram inoculados com o fungo *P. roqueforti* através da deposição de 10µL da suspensão de esporos na concentração de 2×10^4 esporos/mL em três pontos distintos da superfície do queijo. Todos os tratamentos foram incubados a temperatura de 12 °C por até 13 dias e realizados em triplicata (SILVA, 2013).

Para avaliar a área de contaminação do queijo nos tratamentos foi utilizado o programa QUANT v.1.0.1 (VALE et. al., 2003).

2.4.2 Processo da imersão do queijo parmesão na solução de bicarbonato de sódio e leveduras antagônicas

Foram obtidas 30 peças de queijos parmesões da mesma maneira como foi citado no processo anterior.

Os queijos foram inoculados com as leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFT 5992 através da imersão em uma solução de bicarbonato de sódio na concentração de 1% e

contendo $2,0 \times 10^8$ células/mL de cada levedura durante o período de 5 min. Decorrido o tempo, os queijos foram separados e armazenados, em potes plásticos estéreis, e incubados a temperatura ambiente variando entre 25 a 30°C por 24 h., após este períodos o experimento foi dividido em tratamentos: Tratamento 8 controle negativo (BS + *S. boulardii*), Tratamento 9 (BS + *S. cerevisiae* UFT 5992), Tratamento 10 controle negativo (apenas a levedura *S. boulardii*), Tratamento 11 controle negativo (apenas a levedura *S. cerevisiae* UFT 5992), Tratamento 12 (*S. boulardii* + BS + *P. roqueforti*), Tratamento 13 (*S. cerevisiae* UFT 5992 + BS + *P. roqueforti*), Tratamento 14 controle negativo (apenas o bicarbonato de sódio), Tratamento 15 controle positivo (apenas o fungo deteriorante). Após o período de crescimento das leveduras nos queijos, os tratamentos foram inoculados com o fungo *P. roqueforti* através da deposição de 10µL da suspensão de esporos na concentração de 2×10^4 esporos/mL em três pontos distintos da superfície do queijo. O controle positivo foi realizado pela inoculação do fungo sozinho. Todos os tratamentos foram incubados a temperatura de 12 °C por até 21 dias e realizados em triplicata (SILVA, 2013).

Para avaliar a área de contaminação do queijo das amostras dos tratamentos (bicarbonato de sódio a 1% com a levedura) e do controle positivo foi utilizado o programa QUANT v.1.0.1 (VALE et. al., 2003).

2.5 Média da área de incidência das colônias de *P. roqueforti* em queijo parmesão

A incidência do crescimento de *P. roqueforti* inoculados em queijo tipo parmesão foi avaliado através do cálculo das médias das áreas (mm²) de crescimento do fungo, obtidas por cálculos realizados pelo programa QUANT v.1.0.1. (VALE et. al., 2003). Para tanto, foi realizado a captação de fotos da parte superficial dos queijos apartir de todos os tratamentos citados anteriormente.

Para o cálculo da área de incidência de crescimento de *P. roqueforti* foi inicialmente definido uma área média triangular (35 mm de comprimento e 8 mm de altura) a partir das fotos obtidas dos queijos tratados e foi posteriormente calculado a porcentagem de contaminação pelo programa.

Segundo Assis et al. (1999) a porcentagem de redução de severidade da contaminada (RS) foi calculada através da equação:

$$RS \% = \frac{RSc - RSt}{RSc} \times 100$$

Onde: RSc a área contaminada no controle positivo (somente com fungo) e RSt a área contaminada nos tratamentos experimentais.

2.6 Contagem populacional das leveduras em queijo parmesão

A contagem populacional das leveduras antagonicas presentes na superfície dos queijos tipo parmesão nos controles negativos foram analisados em diferentes período de tempo de incubação. Foram retirados pequenos pedaços de cerca de 1cm³ do queijo e colocando em tubos contendo 9 mL de água destilada. Após homogeneização, retirou-se 1 mL desta diluição e transferiu-se para tubo de eppendorf 1,5 mL, sendo assim homogeneizado e realizado o plaqueamento pelo equipamento Eddy Jet Spiral plater (IUL, INSTRUMENTS), onde foi retirado a alíquota de 50 µL da amostra e inoculado nas placas de Petri contendo meio YMA, sendo incubadas a temperatura de 25 °C por 48h. Após este período, foi contado o número de colônias através do equipamento Flash & gol (IUL, INSTRUMENTS).

A contagem das leveduras foi realizado por um período de 60 dias (SILVA, 2013).

2.7 Teste estatístico

Os dados das médias das áreas de contaminação foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa estatístico ASSISTAT 7.7 para averiguar se houve diferença estatística em relação ao controle positivo. Foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade da distribuição dos dados e posteriormente utilizado o teste Scott-Knott para verificar se os tratamentos tiveram diferença estatística em relação ao controle positivo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de resistência das leveduras *S. cerevisiae* YEF 186, *S. Boulardii* e *S. cerevisiae* UFT 5992 *in vitro*, em diferentes concentrações de bicarbonato de sódio. Demonstraram que a levedura *S. cerevisiae* YEF 186 conseguiu sobreviver somente por 8 dias nas concentrações de 1 e 3% de bicarbonato de sódio e na concentração de 5% permaneceu viável durante 6 dias como mostra a figura 1.

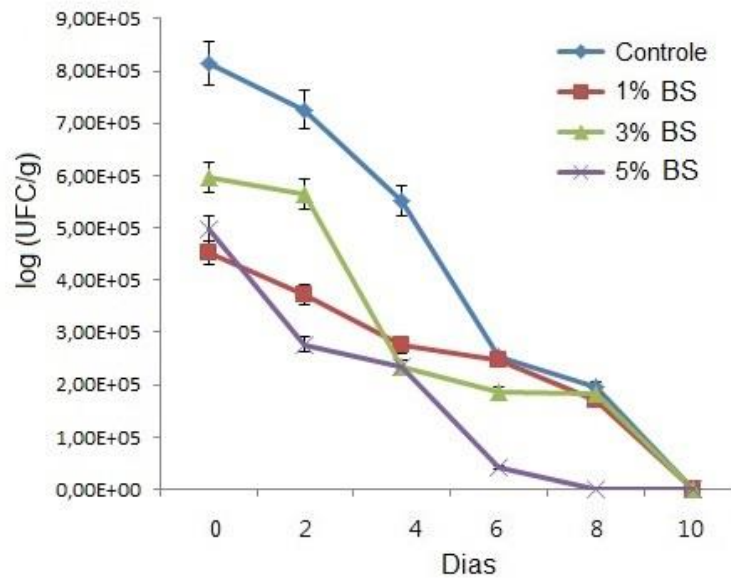


Figura 1. Efeito de diferentes concentrações de bicarbonato de sódio (BS) no crescimento do *S. cerevisiae* YEF 186 *in vitro*.

S. boulardii sobreviveu durante 60 dias na concentração de 1% de bicarbonato de sódio, sendo que nas concentrações de 3 e 5% permaneceu viável durante 40 dias (Figura 2). Este resultado também foi obtido pela levedura *S. cerevisiae* UFT 5992 (Figuras 3).

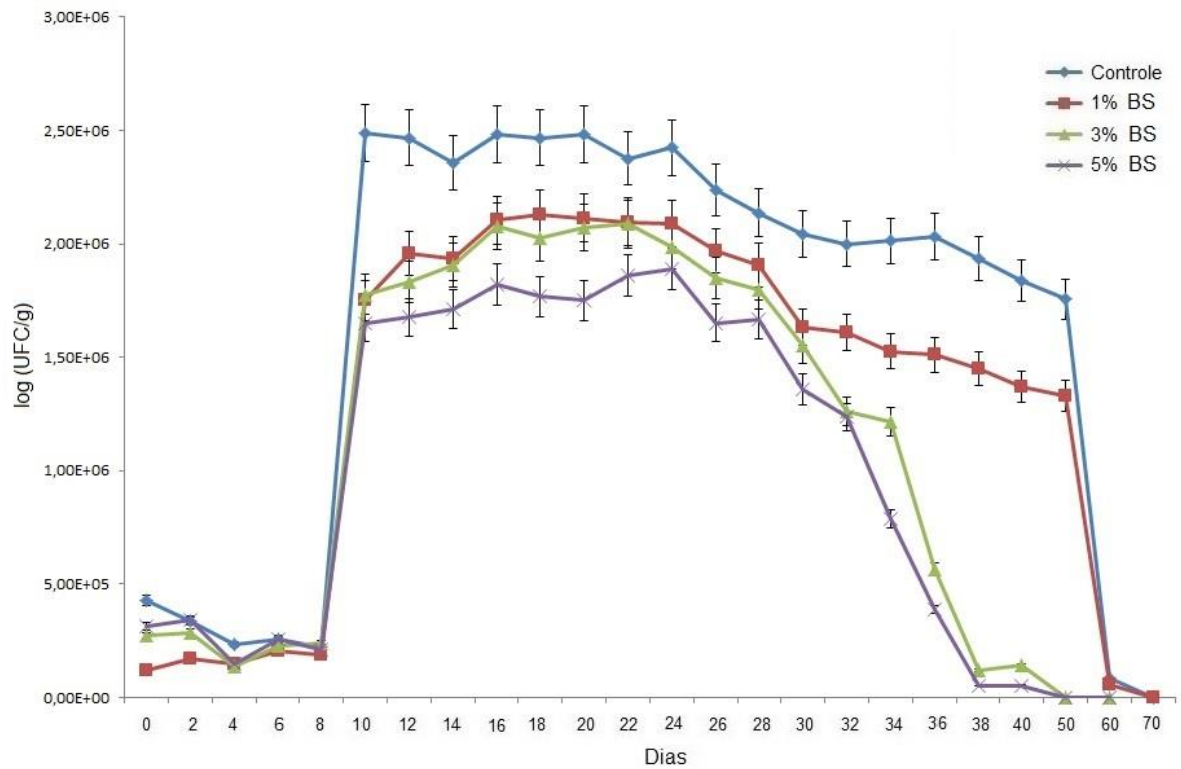


Figura 2. Efeito de diferentes concentrações de bicarbonato de sódio (BS) no crescimento do *S. boulardii* *in vitro*.

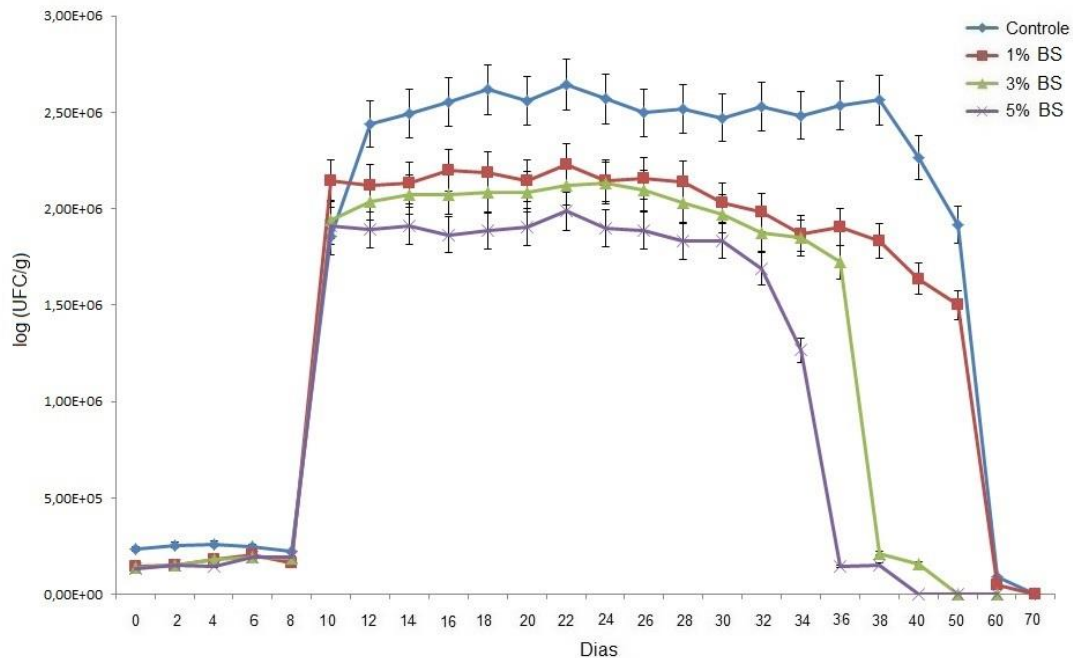


Figura 3. Efeito de diferentes concentrações de bicarbonato de sódio (BS) no crescimento do *S. cerevisiae* UFT 5992 *in vitro*.

Segundo o trabalho realizado por Ferreira et al. (2015), utilizando a mesma metodologia para testar a capacidade de sobrevivência da levedura UFT 5852 no caldo

GYMP contendo bicarbonato de sódio, demonstrou resultados semelhantes aos obtidos pela levedura *S. cerevisiae* YEF 186, conseguindo sobreviver por apenas 7 dias em concentrações de 1, 3 e 5% de bicarbonato de sódio.

Outro estudo realizado por Pimenta et al. (2010), a levedura antagônica *Saccharomycopsis crataegensis* em teste *in vitro* conseguiu nos 7 dias analisados manter a mesma concentração celular igual à inicial nas concentrações de 1%, 2% e 5% de bicarbonato de sódio.

As leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFT 5992 utilizadas em nosso estudo, demonstraram resistência a esta substância nas diferentes concentrações, pois conseguiram permanecer viáveis na mesma concentração celular durante 40 dias. Devido a isso, para realização do controle biológico integrado a substância GRAS as duas leveduras foram selecionadas por apresentaram maior resistência.

No teste de controle biológico, o tratamento 7 (controle positivo) foi detectado o crescimento da colônia de *P. roqueforti* após o quinto dia de incubação, sendo que os tratamentos 4, 5 e 6, com as leveduras *S. boulardii*, *S. cerevisiae* YEF 186 e *S. cerevisiae* UFT 5992, o aparecimento da colônia típica foi observado a partir do sétimo dia, o que demonstra que as leveduras apresentaram capacidade inibitória, pois conseguiram reduzir o desenvolvimento do fungo por dois dias (Figura 4).

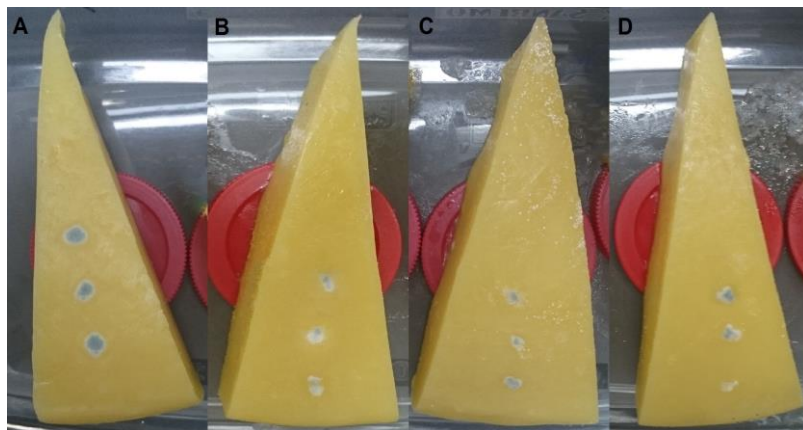


Figura 4. As peças dos queijos parmesões inoculados com os esporos de *P. roqueforti* após 7 dias de incubação. (A) Controle positivo; (B) *S. boulardii*+ *P. roqueforti*; (C) *S. cerevisiae* UFT 5992 + *P. roqueforti*; (D) *S. cerevisiae* YEF 186 + *P. roqueforti*.

Após o aparecimento das colônias iniciou-se a determinação das áreas de contaminações na parte superficial do queijo, onde os dados das médias das áreas obtidas foram submetidos à análise estatística, porém devido a não normalidade dos dados detectado

pelo teste de Shapiro-Wilk, foi necessária a transformação para log X. Sendo posteriormente avaliado estatisticamente através do teste de Scott-Knott que divide as áreas de incidência em grupos e demonstram se estes grupos dos tratamentos com leveduras tiveram diferença estatística em relação ao controle positivo.

O teste de Scott-Knott dividiu os resultados em dois grupos, sendo o controle positivo (Grupo a) e as leveduras antagonistas representadas no Grupo b. Neste processo, as leveduras *S. boulardii*, *S. cerevisiae* YEF 186 e *S. cerevisiae* UFT 5992 (Grupo b) foram avaliadas somente por 13 dias e apresentaram-se estatisticamente diferente do controle (Grupo a) o que pode ser observado na figura 5. As leveduras *S. boulardii*, *S. cerevisiae* YEF 186 e *S. cerevisiae* UFT 5992 conseguiram no 13º dia uma redução de severidade da contaminação deste fungo em 9,9%, 17,5% e 15%, respectivamente como demonstra na figura 6.

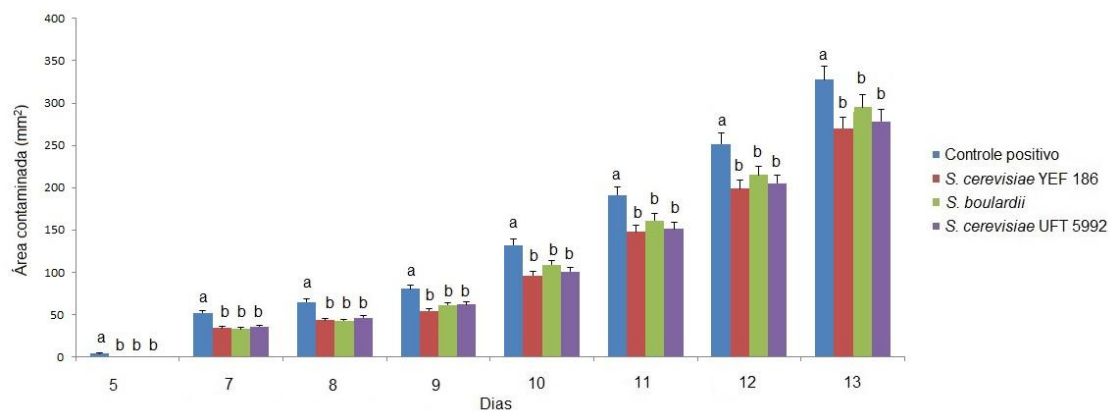


Figura 5. Área contaminada por *P. roqueforti* em queijo tipo parmesão, sendo controlado pelas leveduras *S. boulardii*, *S. cerevisiae* YEF 186 e *S. cerevisiae* UFT 5992. Teste Scott-Knott significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0.05$) com controle positivo como Grupo a e as leveduras antagonista como Grupo b.

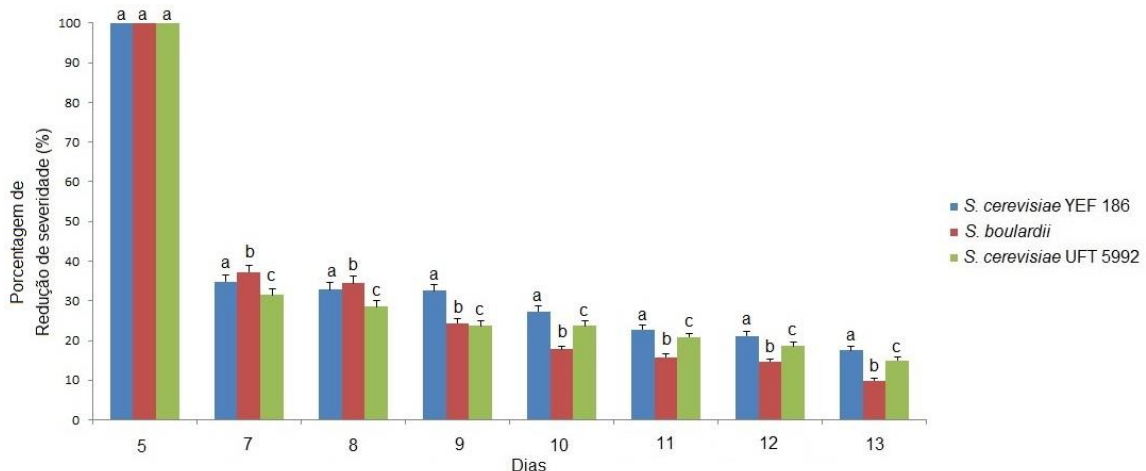


Figura 6. Porcentagem de redução de severidade da contaminação causada pelo *P. roqueforti* controlado pelas leveduras *S. boulardii*, *S. cerevisiae* YEF 186 e *S. cerevisiae* UFT 5992. Teste Scott-Knott significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0.05$).

Os queijos parmesões ao serem submetidos ao método com embalagem a vácuo a sua durabilidade são de 6 meses, mas nos comércios são vendidos em forma de fatias pequenas triangulares recobertos por filme plástico, e desta forma reduz-se a vida de prateleira para 7 dias. Porém utilizando-se do método de controle biológico com as leveduras *S. boulardii*, *S. cerevisiae* YEF 186 e *S. cerevisiae* UFT 5992 foi possível estender a vida de prateleira por mais 6 dias como observado acima na figura 4. Isso pode ter ocorrido devido à formação de biofilme pela reprodução das leveduras, criando uma proteção na parte superficial do produto.

Outra possibilidade seria o mecanismo de controle que estas espécies podem deter através da competição por espaços e nutrientes apresentados por vários autores (PLATANIA et al., 2012; PARAFATI et al., 2015).

No trabalho de Liu e Tsao (2009), foi realizado o controle biológico de *P. roqueforti* em queijo utilizando a levedura *Debaryomyces hansenii* na concentração de 10^6 células/mL, onde conseguiram reduzir o crescimento do fungo por 14 dias analisados. Estes resultados corroboram com os obtidos pelo nosso estudo, onde as leveduras *S. boulardii*, *S. cerevisiae* YEF 186 e *S. cerevisiae* UFT 5992 controlaram por 13 dias o crescimento do fungo *P. roqueforti*.

No trabalho de Gkatzionis et al, (2014) foi observado que a levedura *Yarrowia lipolytica* conseguiu inibir completamente a formação de esporos do *P. roqueforti* em queijo Stilton estocado por 45 dias. Este trabalho mostra uma eficiência maior de controle que o obtido por nosso estudo, porém isso pode ter ocorrido devido aos metabólitos produzidos pela espécie *Y. lipolytica*, pois no mesmo trabalho foi demonstrado que a levedura *Kluyveromyces lactis* não mostrou a mesma eficiência no controle deste fungo.

No controle biológico integrado, o crescimento da colônia do *P. roqueforti* no tratamento 15 (controle positivo) foi detectado no 7º dia, sendo que nos tratamentos 12 (*S. boulardii* + BS + *P. roqueforti*) e 13 (*S. cerevisiae* UFT 5992 + BS + *P. roqueforti*) iniciaram somente no 10º dia, demonstrando que estes tratamentos conseguiram adiar por três dias o crescimento deste fungo (Figura 7).

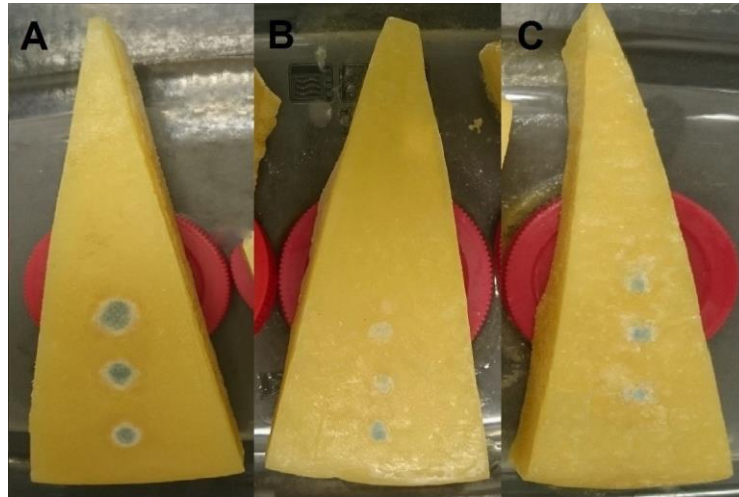


Figura 7. As peças dos queijos parmesões do 10º dia com seus respectivas leveduras antagônicas com 1% de bicarbonato de sódio inoculados com os esporos de *P. roqueforti* e o controle positivo. (A) Controle positivo; (B) *S. boulardii* + BS; (C) *S. cerevisiae* UFT 5992 + BS.

Após o aparecimento da colônia do deteriorante, iniciou o cálculo das médias das áreas de contaminação e posteriormente submetidos à análise estatístico. Inicialmente, foi realizado a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk, mas devido a não normalidade, então, foi necessário a transformação dos dados em log X. Depois foram analisados pelo teste de Scott-Knott que divide as áreas de incidência em grupos e avaliando a capacidade reduzir o desenvolvimento deste fungo através da diferença estatística dos tratamentos integrados em relação ao controle positivo. Este teste estatístico dividiu o controle positivo como o Grupo a e os tratamentos integrados como grupo c (Figura 8). Através dos resultados estatísticos, percebeu que houve diferença estatística até o 17º dia, aumentando a vida de prateleira por 10 dias em comparação com a vida de prateleira apresentados pelos comerciantes. Além disso, as leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFT 5992 com bicarbonato de sódio obtiveram uma redução da severidade da área de contaminação em relação ao controle positivo por 17,7 e 18%, respectivamente (Figura 9).

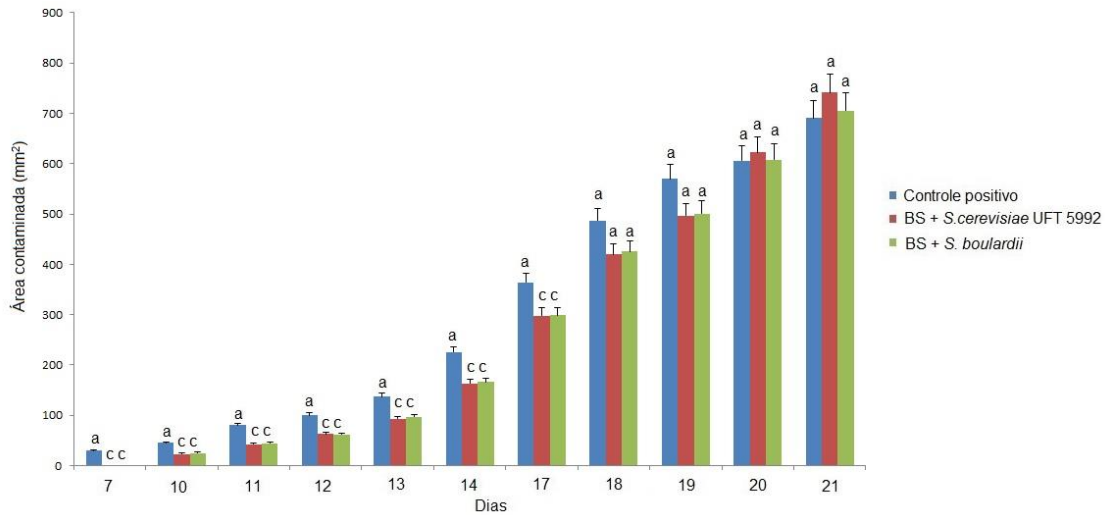


Figura 8. Médias da área de contaminada por *P. roqueforti* em queijo tipo parmesão, sendo controlado pelas leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFT 5992 em combinação com o bicarbonato de sódio (BS) na concentração de 1%. Teste Scott-Knott significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0.05$) com controle positivo como Grupo a e as leveduras como Grupo c.

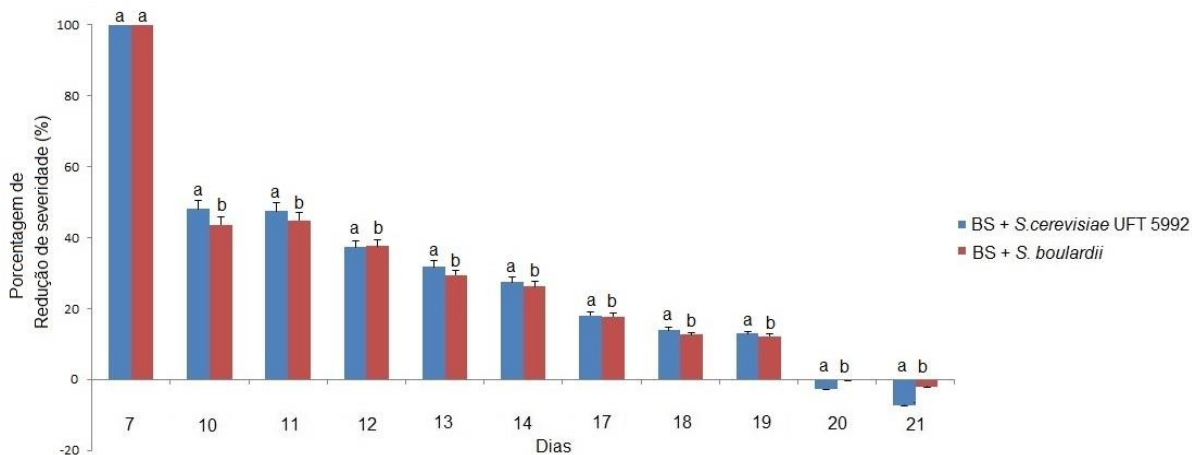


Figura 9. Porcentagem de redução de severidade da contaminação causadas pelo *P. roqueforti* no processo da combinação das leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFT 5992 com o bicarbonato de sódio (BS) na concentração de 1%. Teste Scott-Knott significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p < 0.05$).

O possível controle deste fungo deteriorante através do mecanismo citado anteriormente pode ser devido ao bicarbonato de sódio ter capacidade de inibir a germinação dos esporos, devido à alteração do pH do meio afetando a atividade enzimática, a disponibilidade de nutrientes e a transferência de prótons através da membrana plasmática dos microrganismos (LAI et al., 2015; FALLANAJ et al., 2016).

A capacidade do controle integrando entre leveduras e bicarbonato de sódio também foi visto por Geng et al, (2011) que utilizou a levedura *Kluyveromyces marxianus* em

consorcio ao bicarbonato de sódio 2% aplicados em banana, e conseguiu reduzir o *P. digitatum* em 58,33% no sexto dia do experimento.

Zhu et al. (2013) também realizou o processo de integração da levedura *Rhodosporidium paludigenum* com bicarbonato de sódio nas concentrações de 2% e 5% em limão asiático, e obteve resultados da redução da lesão por *P. digitatum* em 60 e 62,5% respectivamente no quinto dia do experimento.

Os queijos utilizados como controle negativo (leveduras em associação ao bicarbonato de sódio) nos teste de controle biológico foram submetidos ao teste de contagem populacional das leveduras para verificar o período de permanência destas sobre produto. As figuras 10 e 11 mostram os resultados da permanência das leveduras na superfície dos queijos analisados.

No processo de controle biológico utilizando as leveduras *S. boulardii*, *S. cerevisiae* YEF 186 e *S. cerevisiae* UFT 5992 foi possível recuperá-las por até 50 dias (Figura 10). Mesmo resultado foi obtido no controle biológico integrado com bicarbonato de sódio a 1% onde as leveduras, *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFT 5992 conseguiram sobreviver também por 50 dias (Figura 11), mesmo com a presença do bicarbonato de sódio.

Segundo o trabalho de Gallina et al. (2011), demonstrou que com as bactérias probióticas utilizadas nas bebidas lácteas fermentadas permaneceram viáveis no produto por período de 30 dias, no nosso trabalho, foi demonstrado que as leveduras conseguiram sobreviver por até 50 dias, mostrando-se mais eficiente quando comparadas com as bactérias lácteas.

As leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFT 5992 sobreviveram na superfície do queijo mesmo com a presença do bicarbonato de sódio a 1% o que foi observado no trabalho do Ippolito et al, (2005), onde os autores demonstraram que a levedura *Aureobasidium pullulans* inoculadas no fruto de cereja conseguiu permanecer na superfície por um período de 22 dias.

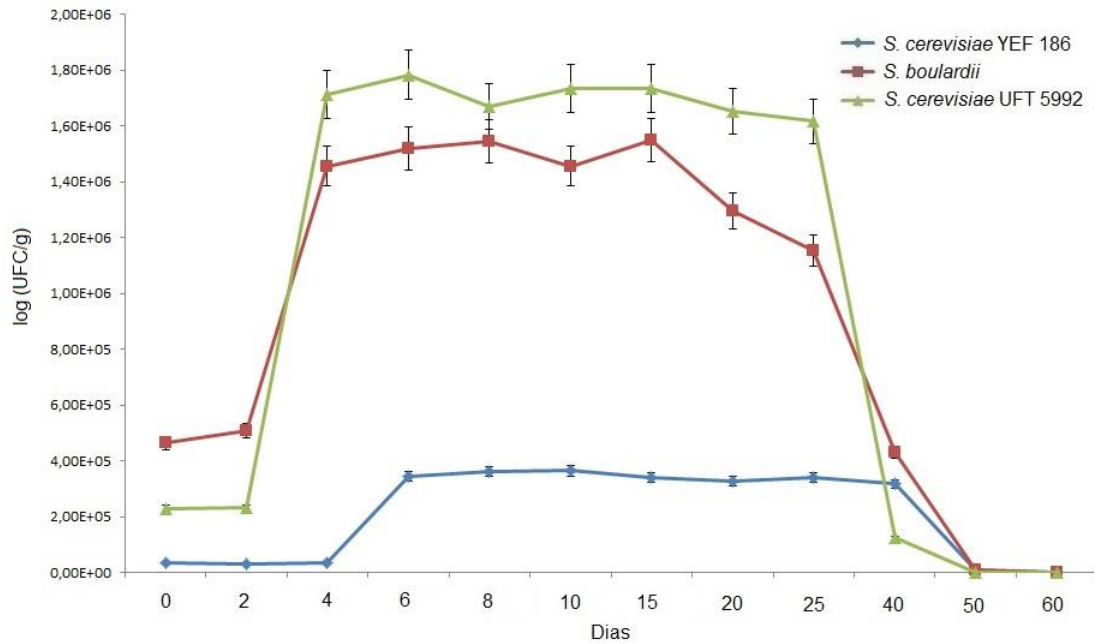


Figura 10. Curva de crescimento das leveduras antagonistas *S. boulardii*, *S. cerevisiae* YEF 186 e *S. cerevisiae* UFT 5992 durante o período de 60 dias.

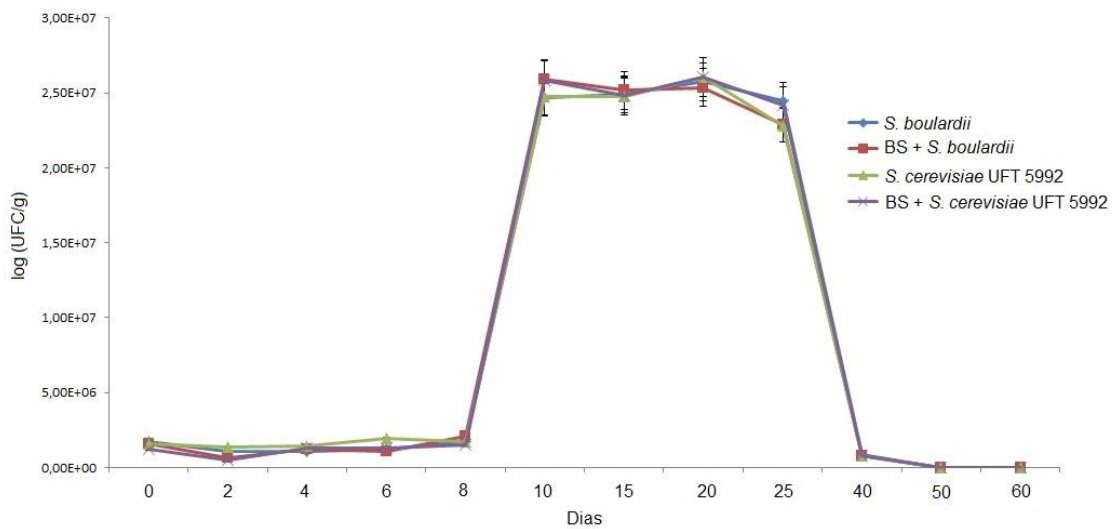


Figura 11. Curva de crescimento das leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFT 5992 sem a presença do bicarbonato de sódio (BS) e com a sua presença durante 60 dias analisadas. Barras representam erros padrão.

As leveduras antagonistas *S. boulardii* e *S. cerevisiae* UFT 5992 conseguiram permanecer viáveis na superfície do queijo por 50 dias protegendo-o provavelmente através da formação do biofilme, portanto a levedura *S. boulardii* já é considerada um probiótico por trazer benefício à saúde do consumidor e neste trabalho conseguiu prolongar a vida de

prateleira do queijo parmesão. O uso de microrganismo probiótico no queijo poderia agregar mais propriedades funcionais ao produto final devido aos benefícios trazidos a saúde humana.

4. CONCLUSÃO

O controle biológico integrado mostrou-se mais eficiente do que o controle biológico clássico, devido ao aumento o tempo de vida de prateleira do produto, e reduzindo por aproximadamente 18% a incidência da contaminação.

As leveduras *S. boulardii*, *S. cerevisiae* YEF 186 e *S. cerevisiae* UFT 5992 conseguiram permanecer viáveis na superfície do queijo por um período de 50 dias, reduzindo o crescimento do *P. roqueforti*.

A levedura *S. cerevisiae* YEF 186 permanecer viável por apenas 7 dias no bicarbonato de sódio, mas esta levedura reduziu em aproximadamente 18% a incidência de contaminação.

5 REFERÊNCIAS

- ASSIS, S.M.P.; MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; SILVA, G.; MARANHÃO, E.A.A. (1999). *Antagonism of yeasts Xanthomonas campestris* PV. *Campestris* on *Cabbage phylloplane* in field. *Rev. Microbiol.* 30, 191-195.
- BARROS, J.J.C.; AZEVEDO, A.C.; JÚNIOR, L.R.F.; TABOGA, S.R.; PENNA, A.L.B.; Queijo Parmesão: Caracterização Físico-Química, Microbiológica e Microestrutura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 31, n. 2, p. 285-294, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Parmesão. Portaria 353 de 4 de setembro de 1997. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 08 set. 1997. Seção 1, p. 1968. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>.
- DRUVEFORS, U.A.; PASSOTH, V.; SCHNURER, J.; Nutrient Effects on Biocontrol of *Penicillium roqueforti* by *Pichia anomala* J121 during Airtight Storage of Wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 4, p. 1865-1869, 2005.
- FALLANAJ, F.; IPPOLITO, A.; LIGORIO, A.; GARGANESE, F.; ZAVANELLA, C.; SANZANI, S.M.; Electrolyzed sodium bicarbonate inhibits *Penicillium digitatum* and induces defense responses against green mould in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v. 115, p. 18-29, 2016.
- FAIRCLOUGH, A.; CLIFFE, D.; KNAPPER, S.; Factors affecting *Penicillium roqueforti* (*Penicillium glaucum*) in internally mould ripened cheeses: implications for pre-packed blue cheeses. *International Journal Of Food Science & Technology*, v. 48, n. 8, p. 1586-1590, 2011.
- FERREIRA, E.M.S.; MALTA, C.M.; GONZAGA, L.V.; BICALHO, J.O.; PIMENTA, R.S.; Avaliação da Resistência de Leveduras Biocontroladoras à Substâncias “GRAS” – (Generally Regarded As Safe). *J. Bioen. Food Sci.*, v. 2, n. 4, p. 178-182, 2015.
- FIGUEROA, C.; VAZQUEZ, F.; Antifungal modes of action of *Saccharomyces* and other biocontrol yeasts against fungi isolated from sour and grey rots. *International Journal of Food Microbiology*, v. 204, p. 91-100, 2015.

FONTAINE, K.; PASSERÓ, E.; VALLONE, L.; HYMERY, N.; COTON M.; JANY, J.L.; MOUNIER, J.; COTON, E.; Occurrence Of Roquefortine C, Mycophenolic Acid And Aflatoxin M1 Mycotoxins In Blue-Veined Cheeses. *Food Control*, v. 47, p. 634-640, 2015.

GALLINA, D.A.; ALVES, A.T.S.; TRENTO, F.K.H.S.; CARUSI, J.; Caracterização de Leites Fermentados Com e Sem Adição de Probióticos e Prebióticos e Avaliação da Viabilidade de Bactérias Láticas e Probióticas Durante a Vida-de-Prateleira. UNOPAR Científica. *Ciências Biológicas e da Saúde*, v. 13, n. 4, p. 239-244, 2011.

GENG, P.; CHEN, S.; HU, M.; HAQ, M.R.; LAI, K.; QU, F.; ZHANG, Y.; Combination of *Kluyveromyces marxianus* and sodium bicarbonate for controlling green mold of citrus fruit. *International Journal of Food Microbiology*, v. 151, n. 2, p. 190-194, 2011.

GKATZIONIS, K.; YUNITA, D.; LINFORTH, R.S.T.; DICKINSON, M.; DODD, C.E.R.; Diversity and activities of yeasts from different parts of a Stilton cheese. *International Journal of Food Microbiology*, v. 177, p. 109-116, 2014.

GOEBEL, C.S.; OLIVEIRA, F.M.; SEVERO, L.C.; Infección por *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 30, n. 3, p. 205-208, 2013.

HONG, P.; HAO, W.; LUO, J.; CHEN, S.; HU, M.; ZHONG, G.; Combination of hot water, *Bacillus amyloliquefaciens* HF-01 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest decay of mandarin fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v. 88, p. 96-102, 2014.

HOMEWOOD, J.T. e HESS, H.J. Technology for the developing countries. In: ROBINSON, R.K. *Modern dairy technology*, 2nd.ed. London: Chapman&Hall, v.2, p.455-94, 1993.

IPPOLITO, A.; SCHENA, L.; PENTIMONE, I.; NIGRO, F; Control Of Postharvest Rots Of Sweet Cherries By Pre- And Postharvest Applications Of *Aureobasidium pullulans* In Combination With Calcium Chloride Or Sodium Bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, v. 35, p. 245-252, 2005.

JANISIEWICZ, W.J.; SAFTNER, R.A.; CONWAY, W.S.; YODER, K.S.; Control of blue mold decay of apple during commercial controlled atmosphere storage with yeast antagonists and sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, v. 49, n. 3, p. 374-378, 2008.

LAI, T.; BAI, X.; WANG, Y.; ZHOU, J.; SHI, N.; ZHOU, T.; Inhibitory effect of exogenous sodium bicarbonate on development and pathogenicity of postharvest disease *Penicillium expansum*. *Scientia Horticulturae*, v. 187, p. 108-114, 2015.

LAY, C.L.; MOUNIER, J.; VASSEUR, V.; WEILL, A.; BLAY, G.; BARBIER, G.; COTON, E.; *In vitro* and *in situ* screening of lactic acid bacteria and propionibacteria antifungal activities against bakery product spoilage molds. *Food Control*, v. 60, p. 247-255, 2016

LUND, F.; FILTENBORG, O.; FRISVAD, J.C.; Associated Mycoflora of Cheese. *Microbiologia dos alimentos*, v. 12, p. 173-180, 1995.

LIU, S.Q.; TSAO, M.; Biocontrol of Dairy, Moulds by Antagonistic Dairy Yeast *Debaryomyces hansenii* in Yoghurt and Cheese at Elevated Temperatures. *Food Control*, v. 20, p. 852-855, 2009.

MIOSO, R.; MARANTE, F.J.T.; LAGUNA, I.H.B.; Chemical constituents of the fermentation broth of the marine-derived fungus *Penicillium roqueforti*. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 32, v. 3, p. 147-152, 2015.

MIRANDA, D.Z.; PALMA, M.; MATOS, G.S.; SCHIEBEL, J.G.; MONTEIRO, C.M.; ARONOVICH, M.; BOZZA, P.T.; BOZZA, F.A.; NIMRICHTER, L.; LOMELI, M.M.; MARQUES, E.T.A.; MARTINS, F.S.; DOURADINHA, B.; Lipid droplet levels vary heterogeneously in response to simulated gastrointestinal stresses in different probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Functional Foods*, v. 21, p. 193-200, 2016.

MORAIS, V.M.F.; Identificação de Fungos Leveduriformes e Filamentosos em Queijo de Manteiga. (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2005.

OLIVEIRA, F.C.; Produção de Lipase por *Penicillium roqueforti* e sua Aplicação na Obtenção de Aroma de Queijo. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

PALOU, L.; ALI, A.; FALLIK, E.; ROMANAZZI, G.; GRAS, plant- and animal-derived compounds as alternatives to conventional fungicides for the control of postharvest diseases of fresh horticultural produce. *Postharvest Biology and Technology*, 2016.

PARAFATI, L.; VITALE, A.; RESTUCCIA, C.; CIRVILLERI, G.; Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*, V. 47, P. 95-92, 2015.

PEIXOTO J.P.N.; NASCIMENTO, J.W.B.; FURTADO, D.A.; OLIVEIRA, C.J.B.; GOMES, J.P.; Qualidade Do Ambiente E Níveis De Contaminação Por Microrganismos Em Queijarias, No Agreste Paraibano. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 12, n. 2, p. 177-183, 2012.

PIMENTA, R.S.; SILVA, J.F.M.; COELHO, C.M.; MORAIS, P.B.; ROSA, C.A.; CORRÊA, A.J.; Integrated Control Of *Penicillium digitatum* By The Predacious Yeast *Saccharomycopsis Crataegensis* And Sodium Bicarbonate On Oranges. *Brasilian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 404-410, 2010.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D.; *Fungi and Food Spoilage*. Springer, 3a ed., 2009.

PRATO, G.; MADEIRA, J.E.C.C.; MORAIS, V.A.D.; OLIVEIRA, M.S.; SOUZA, R.A.; PELUZIO, J.M.; GODOY, I.J.; SILVA, J.F.M.; PIMENTA, R.S.; Reduction of Aflatoxina B1 in Stored Peanuts (*Arachis hypogaea* L.) Using *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Protection*, v. 74, n. 6, p. 1003-1006, 2011.

PRICE, E.J.; LINFORTH, R.S.T.; DODD, C.E.R.; PHILIPS, C.A.; HEWSON, L.; HORT, J.; GKATZIONIS, K.; Study of the influence of yeast inoculum concentration (*Yarrowia lipolytica* and *Kluyveromyces lactis*) on blue cheese aroma development using microbiological models. *Food Chemistry*, v. 145, p. 464-472, 2014.

PLATANIA, C.; RESTUCCIA, C.; MUCCILLI, S.; CIRVILLERI, G.; Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). *Food Microbiology*, v. 30, n. 1, p. 219-225, 2012.

QUI, X.; XIAO, H.; XUE, C.; YU, C.; YANG, R.; CAI, Z.; SI, L.; Biocontrol of gray mold in grapes with the yeast *Hanseniaspora uvarum* alone and in combination with salicylic acid or sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, v. 100, p. 160-167, 2015.

SALADINO, F.; LUZ, C.; MANYES, L. FRANZÓN, M.F.; MECA, G.; In vitro antifungal activity of lactic acid bacteria against mycotoxigenic fungi and their application in loaf bread shelf life improvement. *Food Control*, v. 67, p. 273-277, 2016.

SCHNÜRER, J. e JONSSON, A. *Pichia anomala* J121: A 30-year Overnight Near Success Biopreservation Story. Springer Netherlands, v. 99, n. 1, p. 5-12, 2011.

SERNA, C.M.B.; Avaliação da Atividade Antifúngica de Óleo Essencial de Orégano (*Origanum vulgare*) Nanoemulsionado e Estudo de Caso em Queijo Minas Padrão. Dissertação (Mestrado em Ciência da Engenharia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, 2015.

SILVA, J.F.M.; PELUZIO, J.M.; PRADO, G.; MADEIRA, J.E.G.C.; SILVA, M.O.; MORAIS, P.B.; ROSA, C.A.; PIMENTA, R.S.; NICOLI, J.R.; Use of Probiotics to Control Aflatoxin Production in Peanut Grains. *The Scientific World Journal*, p. 1-8, 2015.

SILVA, J.F.M.; Estratégias para Controle de Aflatoxinas Produzidas por *Aspergillus parasiticus* em Amendoim (*Arachis hypogaea* L.). Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

SWINNEN, S.; HO, P.W.; KLEIN, M.; NEVOIGT, E.; Genetic determinants for enhanced glycerol growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, v. 36, p. 68-79, 2016.

TRIGUERO, D.E.G.; FIORESE, M.L.; KROUMOV, A.D.; HINTERHOLZ, C.L.; NADAI, B.L.; ASSUNÇÃO, G.M.; Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, *Biochemical Engineering Journal*, v. 110, p. 71-83, 2016.

VALE, F.X.R.; FERNANDES, F.E.I.; LIBERATO, J.R.; QUANT – A Software for Plant Disease Severity Assessment. 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch, New Zealand, 2003.

YOUSSEF, K.; SANZANI, S.M.; LIGORIO, A.; IPPOLITO, A.; TERRY, L.A.; Sodium carbonate and bicarbonate treatments induce resistance to postharvest green mould on citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v. 87, p. 61-69, 2014.

ZHU, R.; LU, L.; GUO, J.; LU, H.; ABUDUREHEMAN, N.; YU, T.; ZHENG, X.; Postharvest Control of Green Mold Decay of Citrus Fruit Using Combined Treatment with Sodium Bicarbonate and *Rhodosporidium paludigenum*. *Food and Bioprocess Technology*, v. 6, p. 2925-2930, 2013.