



FREDERICO TEIXEIRA CORRÊA

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS VERDE EM
MICROORGANISMOS ISOLADOS E IDENTIFICADOS NA
SUPERFÍCIE DE QUEIJO TIPO GORGONZOLA**

LAVRAS – MG

2017



FREDERICO TEIXEIRA CORRÊA

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS VERDE EM MICRORGANISMOS
ISOLADOS E IDENTIFICADOS NA SUPERFÍCIE DE QUEIJO TIPO
GORGONZOLA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de Doutor.

Dr. Luiz Ronaldo de Abreu

Orientador

Dr. Disney Ribeiro Dias

Coorientador

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

Coorientadora

LAVRAS – MG

2017

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Corrêa, Frederico Teixeira.

Ação antimicrobiana da própolis verde em microrganismos
isolados e identificados na superfície de queijo tipo Gorgonzola /
Frederico Teixeira Corrêa. - 2017.

58 p.

Orientador(a): Luiz Ronaldo de Abreu.

Coorientador(a): Disney Ribeiro Dias, Roberta Hilsdorf Piccoli.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Própolis verde. 2. Análise sensorial. 3. Ação antimicrobiana.
I. de Abreu, Luiz Ronaldo. II. Dias, Disney Ribeiro. III. Piccoli,
Roberta Hilsdorf. IV. Título.

FREDERICO TEIXEIRA CORRÊA

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS VERDE EM MICRORGANISMOS
ISOLADOS E IDENTIFICADOS NA SUPERFÍCIE DE QUEIJO TIPO
GORGONZOLA**

**ANTIMICROBIAL ACTION OF GREEN PROPOLIS IN MICROORGANISMS
ISOLATED AND IDENTIFICATED FROM THE SURFACE OF GORGONZOLA
TYPE CHEESE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 7 de agosto de 2017

Dr. Luiz Ronaldo de Abreu	UFLA
Dra. Sandra Maria Pinto	UFLA
Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli	UFLA
Dr. Adauto Ferreira Barcelos	EPAMIG
Dra. Rita de Cássia Ribeiro Carvalho	UEMG

Dr. Luiz Ronaldo de Abreu
Orientador

LAVRAS – MG

2017

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras por todo aprendizado e por tornar possível a pesquisa.

À CAPES por financiar o trabalho com a pesquisa e meus estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pela oportunidade de realização da pesquisa, pelo aprendizado e outros trabalhos.

Aos meus pais David e Heloísa, por toda lição, força e sabedoria.

Aos meus professores e orientadores Luiz Ronaldo, Sandra, Disney, Roberta, João de Deus e Angélica, pelo aprendizado, pela orientação e pela confiança.

À Bruna que tanto me ajudou, me incentivou, inspirou e esteve sempre ao meu lado.

À minha avó Conceição e meu avô Luiz, por tanta alegria e aprendizado que me passaram.

Aos colaboradores com a pesquisa, professores César, Stephan e Rita e ao Dr. Aduino e Silas por toda ajuda, ideias e aprendizado.

Ao Sérgio, Ana Paula e Gustavo pelas ideias, contribuição com a pesquisa e pela força nos momentos mais difíceis.

À Creusa por toda ajuda, contribuição com os trabalhos e conhecimento.

À Patrícia pelo companheirismo e ajuda nos trabalhos.

Aos meus tios Luiz André e Elza por toda motivação, força e companheirismo.

A todos os meus colegas de disciplina e de departamento

Aos meus colegas do curso de Zootecnia, que tanta força me deram para eu chegar até aqui.

Aos colegas de escola, que contribuíram com o meu aprendizado, momentos de descontração e companheirismo.

A todos meus professores do Instituto Presbiteriano Gammon, por todo ensinamento e lições de vida.

RESUMO

Objetivou-se no presente trabalho, isolar e identificar microrganismos aeróbios mesofílicos contaminantes de superfície de queijo tipo Gorgonzola, avaliar o efeito antimicrobiano do extrato etanólico de própolis verde sobre esses microrganismos e avaliar sensorialmente queijos com aplicação de extrato etanólico de própolis verde em superfície. Queijos tipo Gorgonzola tiveram sua superfície amostrada por raspagem. Diluições adequadas dessas amostras foram inoculadas em meios DRBC (dicloran rosa de bangala clorafenicol) e ágar nutriente, para leveduras e bactérias respectivamente. A identificação foi realizada pela técnica MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of flight). Na avaliação da atividade antimicrobiana do extrato de própolis verde realizou-se o teste de CMB (concentração mínima biocida) em todos os microrganismos isolados da superfície do queijo tipo Gorgonzola. A caracterização do extrato da própolis foi realizada por análises físico-químicas e para a própolis bruta, cromatografia gasosa para identificação de compostos voláteis. Para avaliação sensorial, realizou-se teste de comparação múltipla e teste de aceitação nas concentrações 0% (tratamento controle), 5% e 10% do extrato etanólico de própolis, na superfície dos queijos. Foram identificadas 10 espécies de leveduras pertencentes aos gêneros *Yarrowia*, *Candida*, *Debaryomyces* e *Saccharomyces* e sete espécies de bactérias pertencentes aos gêneros *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium* e *Proteus*. O extrato etanólico de própolis verde apresentou efeito inibitório em bactérias, sendo a espécie *Bacillus cereus* a mais sensível (CMB de 0,31%) e a mais resistente *Proteus vulgaris* (CMB de 5%). As leveduras se mostraram mais resistentes à ação do extrato da própolis sendo a espécie *Saccharomyces cerevisiae* a mais sensível (CMB de 0,63%) e a *Candida parapsilosis* a mais resistente (CMB de 5%). O extrato de própolis apresentou elevada atividade biocida sobre a superfície do queijo, havendo melhora na inibição dos microrganismos em relação ao teste *in vitro*. No mesmo teste, houve uma piora na inibição das leveduras pela natamicina em relação ao teste *in vitro*. No teste de comparação múltipla observou-se diferença significativa em queijos com aplicação de extrato de própolis em relação ao tratamento controle. No teste de aceitação, os queijos envolvidos com extrato de própolis a 5% não diferenciaram em relação ao controle, enquanto que para os aplicados de extrato de própolis a 10%, houve ligeira diminuição da aceitação. O extrato da própolis verde tem potencial e viabilidade para uso em queijo tipo Gorgonzola, inibindo as principais bactérias e leveduras sem causar prejuízo nas características sensoriais do queijo.

Palavras-chave: Própolis verde. Análise sensorial. CG-MS. Ação antimicrobiana. Natamicina

ABSTRACT

The objective of this work was to isolate and identify aerobic mesophilic microorganism contaminants of surface of Gorgonzola cheese, to evaluate the effect of the ethanolic extract of green propolis on bacteria and yeasts isolated from the surface of Gorgonzola cheese and to evaluate sensorially cheeses with the application of ethanolic extract of green propolis on the surface. Adequate dilutions of the samples were inoculated in media DRBC (Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol) and agar nutrient, for yeast and bacteria respectively. The identification was performed by MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of flight) technique. In order to evaluate the inhibition of the green propolis extract, the test of MBC (minimum biocide concentration) was carried out in all species of the microorganisms isolated from the Gorgonzola cheese surface. The characterization of the propolis extract was performed by physical-chemical analysis and for crude propolis, gas chromatography to identify volatile compounds. For sensory evaluation, a multiple comparison test and acceptance test were performed at the concentrations 5 and 10% of the ethanolic extract on the cheeses surface plus control treatment. It were identified 10 species of yeasts belonging to four genera (*Yarrowia*, *Candida*, *Debaryomyces* and *Saccharomyces*) and seven bacterial species belonging to five genera (*Staphylococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium* and *Proteus*). The ethanolic extract of green propolis presented an inhibitory effect in bacteria, being *Bacillus cereus* the most sensitive (0.31% MBC) and the most resistant *Proteus vulgaris* (MBC of 5%). The yeasts showed more resistance to the action of the propolis extract, being the species most sensitive *Saccharomyces cerevisiae* (MBC of 0.63%) and *Candida parapsilosis* the most resistant (MBC of 5%). The propolis extract showed high biocide activity on the microorganism inoculated on the surface of cheese. The multiple comparison test presented significant differences of the cheeses smeared with extract of propolis on the surface in relation to the control treatment. The acceptance test showed that the application of extract of propolis in 5% (g/g) did not differ to control, while the 10% (g/g) concentration brings a little worsening in acceptance. The green propolis extract has potential and viability for use in Gorgonzola type cheese, inhibiting the main bacteria and yeasts with no disadvantage the sensorial characteristics of the cheese.

Keywords: Green propolis. Sensory analysis. GC-MS. Antimicrobial action. Natamycin

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
2.1	Queijos azuis	11
2.2	<i>Penicillium roqueforti</i>	12
2.3	Microrganismos contaminantes dos queijos maturados.....	13
2.3.1	Bactérias.....	14
2.3.2	Leveduras.....	15
2.4	Natamicina e salga no controle do crescimento de microrganismos em queijo Gorgonzola.....	17
2.5	Própolis.....	18
2.5.1	Mercado e produção de própolis no Brasil.....	18
2.5.2	Características químicas da própolis.....	19
2.5.3	Atividade antimicrobiana da própolis.....	20
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1	Própolis.....	22
3.1.1	Coleta e obtenção do extrato etanólico de própolis verde para as análises.....	22
3.1.2	Análise físico-química do extrato etanólico da própolis verde.....	22
3.1.3	Determinação dos compostos químicos voláteis da própolis bruta por CG/MS.....	23
3.1.4	Estimativa do custo de produção e aplicação do extrato etanólico de própolis verde na superfície de queijo tipo Gorgonzola.....	23
3.2	Identificação do microrganismos da superfície de queijo tipo Gorgonzola.....	24
3.2.1	Amostragem.....	24
3.2.2	Isolamento de microrganismos.....	24
3.2.3	MALDI-TOF MS: preparação das amostras e identificação.....	25
3.3	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Mínima Biocida (CMB) do extrato etanólico de própolis sobre microrganismos isolados de queijo tipo Gorgonzola.....	26

3.4	Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis verde e natamicina em superfície de queijo tipo Gorgonzola.....	27
3.5	Análise sensorial.....	28
3.5.1	Preparação dos queijos.....	28
3.5.2	Teste de comparação múltipla.....	29
3.5.3	Teste de aceitação.....	30
3.5.4	Análise estatística dos resultados experimentais.....	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1	Caracterização da própolis verde.....	32
4.1.2	Compostos voláteis identificados na própolis verde bruta.....	33
4.2	Identificação dos microrganismos e número de isolados.....	36
4.3	Concentração mínima inibitória e concentração mínima biocida dos agentes antimicrobianos.....	39
4.4	Atividade antimicrobiana do extrato etanólico da própolis verde e da natamicina em superfície de queijo tipo Gorgonzola.....	42
4.5	Análise sensorial: teste de comparação múltipla e teste de aceitação.....	44
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
6	CONCLUSÃO.....	48
	REFERÊNCIAS	49
	ANEXO A.....	58

1 INTRODUÇÃO

Dentre os queijos finos produzidos no Brasil, o tipo Gorgonzola se destaca como um dos mais importantes. O queijo Gorgonzola tem origem na Itália, sendo esse nome marca registrada de Queijos Azuis feitos com leite de vaca com origem naquele país. No Brasil esse queijo é denominado queijo tipo Gorgonzola ou Queijo Azul brasileiro. A atribuição “Queijos Azuis” se vale pelo desenvolvimento do fungo *Penicillium roqueforti* (cuja colônia é verde azulada) previamente adicionado ao leite na fabricação do queijo.

Um dos problemas mais comuns na produção de Queijos Azuis é a formação de limosidade superficial resultante do crescimento de microrganismos contaminantes. A contaminação ocorre essencialmente na fabricação, mas pode acontecer também durante o armazenamento e na manipulação dos produtos. Esse problema é agravado pelo fato de a embalagem ser permeável ao oxigênio, pois o fungo *Penicillium roqueforti* é aeróbio obrigatório.

As indústrias controlam parcialmente o problema de proliferação de microrganismos indesejáveis na superfície dos queijos com teor elevado de sal e natamicina, um antibiótico produzido por *Streptomyces natalensis*. A natamicina é efetiva contra fungos, mas pouco eficaz em bactérias (OBREGON, 2004). Dentre as alternativas que poderiam complementar ou substituir o uso da natamicina, a própolis verde se destaca em pesquisas pelo seu efeito antimicrobiano (AGA et al., 1994; KONEMANN et al., 2001; FARNESI et al., 2009; ABUBAKAR et al., 2014).

A própolis é sintetizada por abelhas, cuja matéria-prima são substâncias resinosas coletadas das plantas. Os principais constituintes ativos da própolis são principalmente os flavonoides, terpenóides e compostos fenólicos. Entre as propriedades biológicas da própolis defendidas por pesquisadores em estudos, cita-se: propriedades antibacterianas em Velazquez et al., (2007), antiviral em Schnitzler et al., (2010), antioxidante em Moreira et al., (2008), cariostático em Libério et al., (2009) e anticancerígeno em Valente et al., (2011). Por estas razões, a própolis pode ser uma alternativa viável como conservante, pois é benéfico à saúde e não há até o presente momento, pesquisas sobre o efeito sensorial e microbiológico em queijos Gorgonzola, o que justifica novos trabalhos.

Diante do exposto, a presente pesquisa teve como objetivos isolar e identificar microrganismos aeróbios mesofílicos presentes na superfície de queijos tipo Gorgonzola; avaliar o efeito antifúngico e antibacteriano do extrato etanólico de própolis verde (EPPV) em microrganismos identificados na superfície de queijo tipo Gorgonzola; analisar o efeito

inibitório do EEPV e da natamicina na superfície do queijo e analisar o efeito do EEPV na qualidade sensorial de queijos aplicados dessa substância em sua superfície.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Queijos Azuis

De acordo com a Instrução normativa nº 45, de 23 de outubro de 2007 (BRASIL, 2007), entende-se por Queijo Azul, o produto obtido da coagulação do leite por meio de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementado ou não pela ação de bactérias lácticas, mediante processo de fabricação que utiliza fungos específicos (*Penicillium roqueforti*), complementados ou não pela ação de fungos e/ou leveduras subsidiárias, encarregadas de conferir ao produto características típicas durante os processos de elaboração e maturação. Ainda segundo a Instrução normativa nº 45, de 23 de outubro de 2007, o Queijo Azul é classificado como queijo gordo e de média a alta umidade. Deve ser maturado para atingir suas características específicas (em pelo menos 35 dias em temperatura inferior a 15 °C).

O queijo Gorgonzola propriamente dito, é um queijo azul de origem italiana, especificamente do Vale do Pó. Esse tipo de queijo deve ser obtido de leite de vaca pasteurizado, ter massa macia, crua, gorda, de cor branca e matizada pelo desenvolvimento do fungo da espécie *Penicillium roquefort*, que cresce internamente à massa e suas enzimas degradam compostos do leite, resultando em sabor e aroma característicos. *Penicillium roquefort* é um fungo aeróbico, mesofílico, sendo seus esporos de coloração esverdeada (LOURENÇO NETO, 2013).

Scott, Robinson e Wilbey (2002) citam que somente na França, existem mais de 30 variedades de Queijos Azuis, incluindo o conhecido Roquefort e que a maioria dos países possui um Queijo Azul próprio.

Entre as principais variedades de Queijo Azul, cita-se o Roquefort (queijo Francês, da cidade de Roquefort, fabricado com leite de ovelha), o Gorgonzola (queijo Italiano, do Vale do Pó, fabricado com leite de vaca), o Stilton (queijo azul inglês, produzido com leite de vaca), o Danablu (queijo azul dinamarquês feito com leite de vaca) e o Blue (queijo azul americano produzido com leite de vaca) (FURTADO, 1991).

Na Convenção Internacional de Stresa ocorrida no ano de 1951, um dos acordos firmados resultou na proteção da nomenclatura dos queijos, onde a utilização do nome Roquefort deve ser realizada somente para queijos produzidos na França, assim como a denominação Gorgonzola, somente para queijos produzidos na Itália, sendo que queijos com as mesmas características produzidos em outras regiões denominam-se queijo tipo

Gorgonzola ou tipo Roquefort ou simplesmente Queijo Azul (SCOTT; ROBINSON; WILBEY, 2002).

O queijo tipo Gorgonzola é produzido com leite de vaca adicionado do fungo *Penicillium roqueforti*, que cresce e esporula nos furos realizados após a salga e aplicação da natamicina. Possui sabor e aroma pungente e textura macia. A textura do queijo tipo Gorgonzola deve ser aberta e apresentar corpo quebradiço e sem elasticidade (FURTADO, 2013).

Durante a maturação dos Queijos Azuis, *P. roqueforti* se desenvolve e produz enzimas que catalisam reações de lipólise, oxidação de ácidos graxos e proteólise que resultam em produtos que acentuam o sabor e o aroma como aminas, ácidos orgânicos, ésteres, ácidos graxos livres, cetonas, entre outros (FATMA, 2013).

Os lipídeos possuem papel fundamental no sabor e no aroma dentre os componentes do queijo tipo Gorgonzola, onde a lipólise fúngica é intensa. Dessa lipólise, muitos ácidos graxos voláteis são produzidos por *Penicillium* que cresce no interior do queijo gerando metabólitos voláteis (GILLOT, G. et al. 2015). Os ácidos graxos de cadeia curta, por serem os mais voláteis, estão entre os mais importantes grupos de compostos para acentuar as características de odor dos queijos maturados por fungos (COLLINS; MCSWEENEY; WILKINSON, 2003)

2.2 *Penicillium roqueforti*

Penicillium roqueforti é um fungo filamentosamente envolvido em processos fundamentais de degradação de substratos encontrados na natureza e produz uma variedade de enzimas e metabólitos secundários. *Penicillium roqueforti* tem sido utilizado principalmente em biotecnologia e na indústria alimentícia (produção de queijos azuis). Seu sistema enzimático tem sido caracterizado bioquimicamente em virtude da diversidade de compostos produzidos. Algumas linhagens desempenham um papel importante na maturação desses queijos, que ocorre devido ao consumo de ácido láctico e produção de metabólitos que resultam em aroma e sabor pronunciados (MARTINEZ-RODRIGUEZ et al., 2014; CAO et al., 2014).

Através de beta-oxidação e a forte atuação das enzimas extracelulares há a formação de duas metilcetonas (2-heptanona e 2-nonanona), oriundas de ácidos decanóicos e octanóicos respectivamente, sendo consideradas responsáveis pelo odor e sabor característicos dos queijos azuis (MARTINEZ-RODRIGUEZ et al., 2014; CAO et al., 2014).

As lipases de origem fúngica são mais efetivas que as de origem animal, porque são mais estáveis e não desnaturam em altas temperaturas ou com alterações no pH (DHEEMAN et al., 2010). As lipases obtidas de *P. roqueforti* apresentam especificidade, mesmo em relação aos ácidos graxos de cadeia curta.

Penicillium roqueforti produz vários tipos de proteases e lipases que diferem em peso molecular, composição de aminoácidos e especificidade do substrato (MASE et al. 1995). Essas lipases modificam as propriedades químicas das gorduras e óleos através da catalisação das reações de interesterificação (LAMBERET; MENASSA, 1983).

A maturação dos queijos azuis é realizada através da fermentação, onde o substrato é o queijo em si. A ação proteolítica intensa das enzimas de *P. roqueforti* causa a liberação de peptídeos e aminoácidos (FUQUAY et al., 2011). Em termos bioquímicos, *P. roqueforti* apresenta um sistema proteolítico complexo consistindo em duas endopeptidases extracelulares (protease ácida e metaloprotease) e exopeptidases (carboxipeptidase ácida e aminoprotease alcalina (ROSENTHAL et al. 1996; IGOSHI et al. 2007).

As endopeptidases extracelulares do *P. roqueforti* são responsáveis pela degradação da alfa e beta-caseína. A protease ácida ataca a beta-caseína resultando em peptídeos que são liberados, mesmo em pH desfavorável. Similarmente, a metaloprotease tem ação na degradação da beta-caseína. Esses processos resultam em altas concentrações de aminoácidos ácidos nos queijos azuis (GRIPON et al., 1980; GENTE et al., 2001).

2.3 Microrganismos contaminantes dos queijos maturados

O processo de maturação de queijos implica em acondicionamento em ambientes de temperatura e umidade controladas, o que pode resultar no crescimento de microrganismos indesejáveis, principalmente na superfície (BERESFORD et al, 2001). Desse crescimento pode ocorrer a formação de limosidade. O processo se inicia com a decomposição de proteínas, carboidratos e lipídios por enzimas produzidas pelos microrganismos e resíduos de células mortas ou lisadas, como segmentos de DNA. Em meio aquoso, esses compostos começam a se reorganizar dando origem a estruturas poliméricas que formam uma matriz de polissacarídeos (FLEMMING; NEU; WINGENDER, 2016).

Esse conjunto de fenômenos resulta em mistura de substâncias com consistência de gel. Quando presente em superfícies de objetos, essas substâncias secam e ocorre a formação do biofilme. Em alimentos, esses componentes ficam presentes como limosidade devido à umidade. Quanto mais intensa a atividade enzimática do microrganismo, maior a tendência de

formação de limosidade. Água e subprodutos resultantes de reações catalisadas por enzimas são fundamentais para geração de compostos e formação do polímero (FLEMMING; NEU; WINGENDER, 2016).

2.3.1 Bactérias

As bactérias estão naturalmente presentes e utilizadas em todos os tipos de produtos lácteos e alimentos, seja na microbiota natural ou nas culturas iniciais adicionadas em condições controladas (YANG et al., 2012). A sua capacidade fermentativa, especialmente a das bactérias do ácido láctico, baseia-se na criação de ambiente ácido através da degradação de carboidratos como lactose, maltose, lactulose e sacarose. A criação de ambiente ácido favorece o desenvolvimento de microrganismos acidófilos como muitas espécies de leveduras (MONTVILLE; MATTHEWS, 2005).

As bactérias mesofílicas têm uma faixa de crescimento ideal entre 25-35 °C, enquanto as espécies termófilas apresentam faixa ótima que pode superar 50 °C. O crescimento de células bacterianas dentro dos produtos lácteos é fortemente influenciado por parâmetros como o pH, atividade da água e os níveis de sal, bem como a temperatura (JOHNSON; STEELE, 2013).

As bactérias podem estar presentes em produtos lácteos como agentes patogênicos, deteriorantes ou mesmo desejáveis como as bactérias que compõem o fermento láctico. Entre bactérias indesejáveis, as mais comuns são *Pseudomonas fluorescens*, *Shewanella putrefaciens*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp. e *Vibrio cholera* (GÁLVEZ et al., 2008, MACHADO et al., 2013).

Durante o desenvolvimento das bactérias, enzimas podem ser liberadas principalmente por *Pseudomonas* causando sabores indesejáveis. Algumas dessas enzimas, vindas do leite cru, podem ser resistentes ao calor não sendo destruídas por temperaturas de pasteurização (SHEEHAN, 2013; GÁLVEZ et al., 2008).

Ponto fundamental no que diz respeito ao crescimento de microrganismos em queijos maturados, é que esses são alimentos que apresentam pH da superfície de aproximadamente 5,5 e sua maturação ocorre em temperaturas de 12-16 °C, com umidade relativa superior a 90%. Estas condições resultam em rápido desenvolvimento de microrganismos (HAYALOGLU; MCSWEENEY, 2014)

Outra particularidade que estimula o desenvolvimento de bactérias é o metabolismo das leveduras, que desaminam aminoácidos para ceto-ácido e NH₃, o que faz com que o pH

na superfície aumente até um ponto onde as bactérias conseguem crescer, além de consumirem o ácido láctico produzido na pelas bactérias lácticas (WYDER, 1998; HAYALOGLU; MCSWEENEY, 2014).

Em Queijos Azuis, o aumento do pH pode ser relativamente rápido devido à atividade fúngica já nos primeiros dias de maturação, aumentando de 5,5 para acima de 7,0. Nestes queijos, as bactérias halotolerantes proliferam nas primeiras três semanas de maturação, após esse período, sua densidade permanece constante durante as próximas cinco semanas (BANJARA; SUHR; HALLEN-ADAMS, 2015; HAYALOGLU; MCSWEENEY, 2014). Pesquisas indicam que a bactéria *Brevibacterium linens* é a principal a crescer na superfície de queijos maturados (HAYALOGLU; MCSWEENEY, 2014). No entanto, estudos realizados por Monnet, Back e Irlinger (2012) indicaram que várias espécies dos gêneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium* e *Micrococcus* também são encontradas na superfície desses queijos.

Staphylococcus é o principal gênero encontrado no início da maturação (dentro de quatro dias) sendo substituídos por bactérias corineformes na 3ª semana de maturação. Os principais gêneros de bactérias corineformes são: *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium* e *Rhodococcus* (BANJARA; SUHR; HALLEN-ADAMS, 2015; IRLINGER; BERG, 1999).

Alibi, Ferjani e Boukadida (2016) destacam que na entre as espécies presentes em queijos, as corineformes halotolerantes estão entre as mais prevalentes. De acordo com Berger et al., (1999) o papel das bactérias na metabolização dos nutrientes se baseiam na produção de carboidrases, peptidases e esterases que geram ácidos, aminoácidos e ácidos graxos livres respectivamente, precursores de muitos dos compostos de sabor.

2.3.2 Leveduras

Os queijos podem apresentar tipos e características específicas que causam um efeito seletivo no crescimento de microrganismos. As espécies presentes são tão diversas quanto à variedade específica de queijo. As principais fontes de contaminação em queijo incluem o ar, equipamento, manipulação e matéria prima (BANJARA; SUHR; HALLEN-ADAMS, 2015).

Dentre os microrganismos presentes em Queijos Azuis, as leveduras se destacam como os mais comuns. As espécies mais frequentemente isoladas são: *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* e várias outras

pertencentes ao gênero *Candida* (BANJARA; SUHR; HALLEN-ADAMS, 2015; IRLINGER F. et al. 2015).

As leveduras mais associadas a Queijos Azuis segundo Almeida et al., (2014) e Mounier, (2008) são espécies *Candida famata*, *Candida catenulata*, *Candida lipolytica*, *Trichosporon cutaneum* e gêneros *Zygosaccharomyces* spp. Em queijos Roqueforti as espécies *Debaryomyces hansenii*, *Candida sphaerica* e outras espécies do gênero *Candida* são as mais frequentes.

Eliskases-Lechner (1998) observou em seus resultados, que 100% das amostras de Queijo Azul estudadas continham leveduras presentes a níveis superiores a 10^5 UFC/g no exterior e 83% das amostras apresentavam leveduras em níveis superiores a 10^3 UFC/g no interior. As espécies mais frequentes foram *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* e *Yarrowia lipolytica*.

Debaryomyces hansenii ocorre com a maior prevalência em Queijos Azuis. Seu frequente isolamento é atribuído a sua capacidade de crescer em baixas temperaturas, sua atividade lipolítica e proteolítica e alta tolerância ao sal (VERRAES, C. et al 2015; IRLINGER et al. 2015). É a principal responsável pela formação de limosidade na superfície dos queijos e sua presença prolonga a sobrevivência das bactérias do ácido lático, pois essa espécie metaboliza o ácido lático e acético contribuindo para a elevação do pH da superfície do queijo (WYDER, 1998).

Entre as espécies de destaque em Queijos Azuis, *Yarrowia lipolytica* possui alta atividade lipolítica e proteolítica extracelular que é o principal fator para sua ocorrência. Outros fatores que aumentam sua prevalência em superfície de Queijos Azuis são sua natureza aeróbia estrita, utilização de ácido lático e a capacidade de crescer em temperaturas de maturação (BANJARA; SUHR; HALLEN-ADAMS, 2015). *Yarrowia lipolytica* apresenta baixo crescimento em temperaturas acima de 37 °C. Por outro lado, consegue crescer em temperaturas de refrigeração ocasionando deterioração de produtos armazenados (ABBAS; TUNÇTÜRK; HESARI, 2015).

Saccharomyces cerevisiae é isolada em menor intensidade em Queijos Azuis devido a sua incapacidade de sobreviver em ambiente com alta concentração de sal. Sua ocorrência pode estar ligada à capacidade de utilizar os peptídeos e produtos da degradação da gordura por outras espécies (ROOSTITA; FLEET, 1996, WELTHAGEN; VILJOEN, 1999).

As espécies de levedura dos gêneros *Trichosporon* e *Debaryomyces* contêm atividade proteolítica endocelular, enquanto que espécies dos gêneros *Kluyveromyces*, *Candida*, *Debaryomyces* e *Yarrowia* contêm atividade proteolítica extracelular (CHOISY et al., 1986,

DEVOYOD, 1990). A atividade proteolítica *Kluyveromyces marxianus var. marxianus* é considerada a maior entre espécies de leveduras. Ela produz três proteases que contribuem para a maturação do Queijo Azul através da sua atividade (CHOISY et al., 1986).

Fox et al. (2000) observaram que entre as leveduras encontradas em vários queijos, a espécie *D. hansenii* é a espécie dominante, ocorrendo em praticamente todos os queijos, incluindo Weinkase, Romadour, Limburger, Tilsit, Roquefort, Cabrales, Camembert, Gorgonzola e St. Nectaire.

2.4 Natamicina e salga no controle do crescimento de microrganismos em queijo Gorgonzola

A natamicina é um antifúngico de estrutura plana de anéis macrolídeos que interagem de forma intensa com esteróis, sendo produzida por bactéria *Streptomyces natalensis* em processo similar a biossíntese de ácidos graxos. É amplamente usada na indústria de alimentos para prevenir o crescimento de fungos (MENDES et al., 2001).

No que diz respeito ao mecanismo de ação da natamicina, ela faz distender a parede celular pela ligação com esteróis da membrana citoplasmática. Isso leva a uma alteração da estrutura da membrana que conduz a perda de material celular (MENDES et al., 2001). Mais especificamente, o mecanismo de ação da natamicina é de ruptura do ergosterol da membrana fúngica. Os polienos formam complexos com esteróis e assim interferem na permeabilidade da membrana (THOMAS et al, 2005).

Apesar do seu consistente uso e efetividade, foi observado em pesquisa realizada por Thomas et al., (2005), que não há mudança na composição da microbiota contaminante em laticínios que utilizaram natamicina durante nove anos. A partir dessa pesquisa, os autores inferiram que não existe a tendência de desenvolvimento de resistência pelos microrganismos contaminantes pelo uso de natamicina.

Segundo Pesquisadores Europeus de Aditivos Alimentares e Fonte de Nutrientes Adicionados aos Alimentos - EFSA (2009), a utilização de natamicina em queijos e embutidos não leva à resistência microbiana e seu uso é seguro visto à má absorção e posterior eliminação na forma intacta ou como produtos de degradação. A quantidade segura de ingestão se situa até 0,3 mg/kg/dia (JECFA, 2007).

No Brasil, os limites de uso devem obedecer à legislação (BRASIL, 2001) que estabelece: “Art. 1º - Aprovar a extensão de uso extensão de uso da Natamicina (Pimaricina)

(INS 235), como conservador, para tratamento de superfícies de produtos cárneos embutidos no limite máximo de $1\text{mg}/\text{dm}^2$, ausente em 5mm de profundidade”.

A aplicação da natamicina nos alimentos pode ser realizada diretamente em alimentos líquidos ou na superfície de alimentos sólidos através de imersão, pulverização ou durante a salga (FAJARDO et al., 2010).

Dentre as várias etapas da fabricação de queijos, a salga possui várias funções, tais como: sabor, controle do desenvolvimento microbiano e consistência. Em Queijos Azuis lança-se mão de teor elevado de sal para prolongar a vida de prateleira (PERRY, 2003).

A salga ajuda a controlar o crescimento e atividade bacteriana, proporcionando uma seleção da microbiota do queijo. O mecanismo de ação do sal no controle do crescimento de microrganismos baseia-se no aumento do potencial osmótico do meio, diminuindo a atividade de água e levando à desidratação celular (ORDOÑEZ et al., 2005). No caso de Queijos Azuis, como o Gorgonzola, seu maior teor de sal favorece o crescimento de fungos (PERRY, 2003).

2.5 Própolis

Conforme Anexo VI da Instrução Normativa nº 03, de 19/07/2001 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, MAPA, (BRASIL, 2001), a própolis pode ser conceituada como produto originado de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas por abelhas de brotos, flores e exsudatos de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, enzimas, cera e pólen para a elaboração do produto final.

2.5.1 Mercado e produção de própolis no Brasil

A atividade produtiva e comercial envolvendo a própolis é destaque no mercado nacional e internacional de produtos apícolas. Esta característica deve-se essencialmente à constatação das diversas propriedades biológicas atribuídas aos constituintes químicos desse produto (TEIXEIRA et al., 2003). O Brasil é um dos principais produtores mundiais de própolis, com produção estimada entre 50 a 150 toneladas por ano, sendo que aproximadamente 75% desse total, é exportado especialmente para o Japão (LIMA, 2008). No Brasil existem mais de 10.000 produtores, sendo mais de 4.000 produtores da própolis verde exportando anualmente em torno de 30 milhões dólares na forma de extrato alcoólico ou aquoso, encapsulado, associado a outros vegetais também antioxidantes ou simplesmente na

forma bruta (NASCIMENTO JUNIOR, 2007). Em julho de 2010, as exportações de própolis geraram receita de US\$ 46.417,00 (SEBRAE, 2010).

Minas Gerais produz aproximadamente 29 toneladas de própolis, das quais 20 toneladas são de própolis verde, de acordo com a Cooperativa Nacional de Apicultura (CONAP, 2013).

A própolis apresenta grande potencial mercadológico pois além de inúmeros benefícios para a saúde humana pode também ser utilizada na medicina veterinária como cicatrizante, controle de hemorragias e no tratamento da mastite. Na agricultura, ela é empregada no tratamento de doenças de algumas espécies vegetais, substituindo os defensivos, enquanto na indústria de alimentos é ingrediente funcional de pastilhas, bombons e chicletes (COSTA; OLIVEIRA, 2005).

Diversos tipos de própolis são produzidos no Brasil, porém a qualidade varia de uma região para outra. Park et al. (2000) classificaram as amostras de própolis coletadas em todas as Regiões do país (exceto Região Norte) em 12 grupos, de acordo com a aparência e coloração dos extratos. Posteriormente, foi encontrada uma nova própolis em colmeias localizadas ao longo do litoral e manguezais no nordeste brasileiro, classificada como própolis do grupo 13 ou própolis vermelha. À esta variedade foi dada indicação geográfica pelo INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial).

2.5.2 Características químicas da própolis

A própolis é uma substância resinosa coletada pelas abelhas de exsudatos vegetais. Possui coloração e consistência de diversos tipos e é utilizada para proteção da colmeia contra insetos, além de servir como substância de vedação (WAGH, 2013).

Os principais constituintes da própolis são os flavonóides, ácidos fenólicos e seus ésteres e os terpenóides. Eles possuem papel importante no organismo, pois podem agir como antioxidantes, anti-inflamatórios, antimicrobianos entre outras atividades biológicas (CHEN et al., 2003). De acordo com Wagh (2013), em todos os testes de efeito antioxidante, o extrato aquoso de própolis apresentou maior atividade em relação ao extrato etanólico. Isso pode ser devido ao maior teor de polifenóis extraído pela água.

No Japão, a própolis vem sendo usada como “health food” (alimento funcional). Muitas características biológicas da própolis têm sido estudadas e mostrando resultados positivos como atividade antioxidante, anticancerígena, antimicrobiana, anti-inflamatória e antibiótica (PARK et al., 1998).

A composição química da própolis geral da própolis bruta é de 50 a 60% de resina, 30 a 40% de cera, 5 a 10% de óleos essenciais, 5% de pólen, além de minerais como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e quantidades traços de vitaminas B1, B2, B6, C e E (MARCUCCI, 1995).

Análises de própolis verde confirmaram a presença de compostos ativos como galangina, kaempferol, fisetina, quercetina, morina, miricetina, crisina, apigenina, luteolina, escutelareína, acacetina e a baicaleína, sendo que todos apresentam potencial inibidor de radicais livres inibindo os danos de compostos prejudiciais à saúde. Estes compostos por serem macromoléculas ativas cedem elétrons ao radical livre impedindo dano às moléculas orgânicas do organismo, sem que a ausência desse elétron gere um composto reativo (FIGUEIREDO et al., 2014; SZLISZKA et al., 2013).

De acordo com Chen et al., (2003), a própolis possui uma composição química bem heterogênea e complexa, sendo possível encontrar os diversos grupos químicos, desde aminoácidos até micro e macrominerais. Em termos de ação farmacológica, a principal classe de constituintes da própolis é a dos compostos fenólicos.

Em revisão feita por Orsolich et al., (2003) a atividade quimiopreventiva da própolis em experimentos com animais e culturas de células, pode-se originar de sua capacidade de coibir a síntese de células tumorais através da apoptose do tumor e sua propriedade para ativar macrófagos. Além disso, os flavonóides da própolis desempenham um papel protetor contra a toxicidade dos agentes quimioterapêuticos.

2.5.3 Atividade antimicrobiana da própolis

A atividade antimicrobiana é a atividade biológica da própolis mais estudada. Os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana da própolis são os flavonoides, terpenoides, fenóis e ácidos orgânicos. Entre substâncias químicas pertencentes ao grupo dos flavonoides, a flavanona pinocembrina, flavonol, galagina e o éster feniletil do ácido cafeico, atuam na inibição da RNA-polimerase bacteriana. Os flavonoides como kaempferol, quercetina, galangina e pinocembrina bem como, os ácidos cafeico, benzoico, cinâmico e clorogênico afetam a capacidade das camadas lipoproteicas dos microrganismos de trocar íons, realizar transporte ativo e combinar com substratos. A quercetina aumenta a permeabilidade da membrana afetando o transporte, a capacidade de síntese de ATP e a sua mobilidade (FIGUEIREDO et al., 2014; SZLISZKA et al., 2013).

No que tange às bactérias, os componentes da própolis possuem efeitos sobre a permeabilidade da membrana citoplasmática aos íons, causando a dissipação do potencial de membrana, o que a caracteriza como substância ionófora. O gradiente eletroquímico de prótons através da membrana é essencial para a bactéria manter a síntese de ATP, o transporte através da membrana plasmática e a motilidade; tal efeito contribui para a ação citotóxica da própolis. O efeito ionóforo da própolis pode ainda diminuir a resistência das células a outros compostos antibacterianos explicando a maior sensibilidade frente aos microrganismos gram-positivos do que gram-negativos. Isso ocorre porque a parede celular dos microrganismos gram-positivos é mais permeável, possibilitando que agentes externos alterem mais facilmente a membrana plasmática (ABUBAKAR et al., 2014; KONEMANN et al., 2001).

Entre outros fatos que explicam o motivo da própolis apresentar maior atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas comparativamente às gram-negativas, é que as bactérias gram-negativas possuem uma parede celular mais complexa e maior teor de fosfolípidos que as gram-positivas (SILICI; KUTLUCA, 2005). Bactérias gram-positivas possuem uma parede celular mais espessa, composta por várias camadas de glicopeptídeos, com proteínas e polissacarídeos inseridos. A parede celular das bactérias gram-negativas, por sua vez é mais fina, mas estruturalmente mais complexa, pois possui uma única camada de glicopeptídeos, uma membrana externa com constituição similar a membrana citoplasmática e uma camada de lipopolissacarídeo (LPS) (KONEMANN et al., 2001).

No que diz respeito à atividade antifúngica da própolis, Longhini et al. (2007) obtiveram resultados promissores e concluíram que a própolis apresenta atividade antifúngica mesmo em quantidades muito pequenas. De acordo com Farnesi et al., (2009) esse efeito fungicida da própolis é associado aos flavonoides.

A própolis evidenciou também atividade fungicida em testes *in vitro* contra leveduras (não-dermatófitas) e fungos filamentosos (dermatófitos antropofílicos) reconhecidos como causadoras de onicomicoses e contra *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Ao longo dos anos tem-se verificado uma atividade sinérgica da própolis com diversos antibióticos, tais como benzilpenicilina, tetraciclina e eritromicina, podendo assim ser uma alternativa terapêutica para combater microrganismos resistentes a antibióticos (SILICI; KUTLUCA, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Própolis

3.1.1 Coleta e obtenção do extrato etanólico de própolis verde para as análises

A própolis verde bruta foi coletada na região do baixo Campo das Vertentes do estado de Minas Gerais (Brasil) em colmeias de abelhas da espécie *A. mellifera*. A extração da própolis verde em etanol foi feita segundo Pereira (2008) com adaptações. O processo se baseou na trituração da própolis bruta congelada em liquidificador industrial. Posteriormente a mesma foi pesada e acondicionada em Erlenmeyers hermeticamente fechados, misturada em etanol 99%, numa razão de 40g de própolis bruta/80g de etanol. Os Erlenmeyers foram deixados em agitação (Mesa Agitadora Orbital SL180/A Solab®) por 20 dias em temperatura ambiente. Após esse procedimento realizou-se a filtração em filtro de papel Whatman n°40 dentro de freezer a -20 °C para recipiente âmbar. O extrato filtrado foi armazenado também em freezer a temperatura de -20 °C, protegida da luz e do ar.

3.1.2 Análise físico-química do extrato etanólico da própolis verde

As análises foram realizadas no Departamento de Química, no Laboratório de Análise e Prospecção Química da Universidade Federal de Lavras. Para determinação das características físico-químicas do EEPV e sua adequação à legislação (BRASIL, 2001), o EEPV foi submetido às análises de densidade, teor alcoólico, teor de sólidos solúveis, umidade e ceras. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1977).

O teor de flavonóides totais do EEPV foi determinado por espectrofotometria utilizando-se cloreto de alumínio (AlCl_3) como reagente de deslocamento, de acordo com a metodologia descrita por Woisky (1996). Para o estudo de linearidade e obtenção da equação para determinação do teor de flavonóides totais do EEPV, soluções do padrão quercetina foram preparadas em diferentes concentrações e a curva analítica foi obtida. A avaliação da atividade antioxidante do EEPV foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Woisky (1996). Utilizou-se permanganato de potássio (KMnO_4) como agente oxidante. O tempo de reação foi determinado com o auxílio de um cronômetro.

3.1.3 Determinação dos compostos químicos voláteis da própolis bruta por CG/MS

As análises no sistema de cromatografia gasosa acoplada em espectrômetro de massa (CG-EM) foram realizadas no Departamento de Química, no Laboratório de Análise e Prospecção Química da Universidade Federal de Lavras.

Os compostos foram analisados em cromatógrafo gasoso marca SHIMADZU®, modelo GCMS 2010 segundo Nunes e Guerreiro (2012). Os compostos foram separados em coluna capilar Equility 5, apolar, 30m comprimento x 0,25mm diâmetro interno x 0,25µm espessura do filme. O gás de arraste utilizado foi hélio, a vazão de 1,0 mL. min⁻¹. A vazão da purga foi ajustada para fluxo de 3,0 mL.min⁻¹. As injeções foram realizadas automaticamente por meio do amostrador Combi Pal, com o uso de injetor splitless. A temperatura inicial da coluna foi 40 °C, temperatura de injeção de 300 °C a uma taxa de elevação de 6 °C por minuto. As temperaturas do injetor e detector utilizadas foram 220 e 260 °C, respectivamente. A forma de extração foi a SPME (Micro Extração em Fase Sólida), do tipo Headspace. A fibra utilizada foi a DVB/CAR/PDMS. O condicionamento da fibra foi de 270 °C por 1 hora.

Os compostos foram identificados pela comparação de seus espectros de massas com os espectros das bibliotecas Wiley 8 e FFNSC 1.2. A abundância relativa dos compostos foi expressa como a área percentual relativa de cada pico cromatográfico (área normalizada em %).

3.1.4 Estimativa do custo de produção e aplicação do extrato etanólico de própolis verde na superfície de queijo tipo Gorgonzola

Para estimativa do custo de produção da aplicação de EEPV sobre a superfície de uma peça inteira de queijo tipo Gorgonzola, levou-se em conta o custo de compra da própolis bruta no estado de Minas Gerais segundo consulta a apiários locais e área aproximada de uma peça inteira de queijo tipo Gorgonzola, bem como o custo de etanol (neste caso etanol 92,8%) utilizado na confecção de extrato etanólico da própolis, sendo eles:

- Custo de 1kg de própolis bruta de boa qualidade: R\$200,00
- Custo de 1L de etanol laboratorial 92,8%: R\$7,00
- Custo de 1L de EEPV a 5% (concentração ideal de uso segundo as conclusões do trabalho)

O custo de aplicação da natamicina foi estimado através de consulta a funcionários de laticínios produtores de queijo tipo Gorgonzola.

3.2 Identificação dos microrganismos da superfície de queijo tipo Gorgonzola

3.2.1 Amostragem

Inicialmente, realizou-se consulta pessoal aos funcionários do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) para obtenção de informações sobre as marcas com maior volume produtivo de queijo tipo Gorgonzola e possuidoras do Selo de Inspeção Federal (SIF) localizadas no estado de Minas Gerais (Brasil). Na sequência, amostras foram coletadas ao longo do ano de 2015.

As amostras foram coletadas de sete diferentes marcas, com fábricas localizadas em regiões distintas de Minas Gerais, sendo elas designadas pelas letras: A (Centro), B (Alto Paranaíba), C (Zona da Mata), D (Noroeste), E (Triângulo Mineiro), F e G (ambas no Campo das Vertentes). De cada marca foram coletados queijos de três lotes distintos, totalizando 21 amostras. O tempo de maturação considerando a data de fabricação, foi de 3-4 meses para todos os queijos.

Os queijos tipo Gorgonzola em suas embalagens originais foram identificados e devidamente acondicionados em caixas isotérmicas, contendo material atóxico-reutilizável como agente refrigerante e conduzidas até o laboratório onde foram armazenadas a temperatura de refrigeração até o momento das análises.

3.2.2 Isolamento de microrganismos

O procedimento de isolamento dos microrganismos foi realizado no Laboratório de Fermentações do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras.

Alíquotas de vinte e cinco gramas da limosidade superficial do queijo tipo gorgonzola foram transferidos para sacos plásticos contendo 225mL de água peptonada a 0,1% e homogeneizados em equipamento Stomacher® (Mayo Homogenius HG 400, São Paulo, Brasil) por 5 minutos e 460 golpes por minuto. Diluições seriadas foram preparadas e 0,1 mL das diluições adequadas foram plaqueadas.

Para isolamento de leveduras, realizou-se o cultivo em Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol (DRBC, Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA) e incubação a 28 °C/48-72 h. Para bactérias, utilizou-se ágar nutriente, incubadas a 30 °C/24-48h. Após determinação do número de colônias, estas foram diferenciadas de acordo com seu morfotipo. Foram avaliadas as

características de tamanho tipo, estrutura da borda, cor, textura, aparência, elevação, brilho e forma da colônia segundo Dias e Schwan (2010). Após esse procedimento, realizou-se amostragem de cada morfotipo, através de cálculo do número de isolados representativos, de acordo com metodologia descrita em Senguna et al., (2009). Após isolamento, as culturas foram purificadas e armazenadas (a -80 °C) em caldo nutriente e caldo YEPG (yeast extract peptone dextrose) para bactéria e levedura respectivamente, contendo 40% de glicerol.

3.2.3 MALDI-TOF MS: preparação das amostras e identificação

O procedimento de identificação dos microrganismos foi realizado no Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, do Departamento de Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Lavras.

A identificação dos isolados bacterianos foi realizada pela adição de alíquotas de 6µL de solução orgânica contendo água, acetonitrila e ácido tricloroacético (na proporção 50:47,5:2,5). Para células de leveduras, microtubos contendo 6µL de ácido fórmico/acetonitrila (25:75) foram utilizados após adição da solução orgânica, amostras foram homogeneizadas em agitador tipo vortex durante 60 segundos e centrifugadas a 4000 x g durante 60 segundos à temperatura ambiente.

Alíquotas de 1µL de cada amostra foram transferidas para os poços da placa Maldi Flex Target 96 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), adicionadas de 1µL de matriz (solução saturada de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinamico (CHCA, Fluka, Buchs, Suíça) em acetonitrila/ácido trifluoro acético (na proporção 50%/2,4%, respectivamente) e suavemente homogeneizadas (OLIVEIRA et al., 2015). A calibração do equipamento foi realizada com *Escherichia coli* K12 cultivada em meio LB (Luria-Bertoni) a 37 °C por 18 horas segundo Passarini et al. (2013).

A identificação foi realizada utilizando a biblioteca Biotyper. Para a análise de cluster, os espectros brutos foram convertidos em arquivos de texto usando o software FlexAnalysis (versão 3.4) contendo a lista de picos (m/z) e suas intensidades. Os espectros foram então atenuados, a linha de base foi subtraída e as intensidades de sinal foram normalizadas utilizando a versão de software mMass 5.5. Posteriormente à identificação os microrganismos foram depositados na Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola (CCMA) do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras.

3.3 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Mínima Biocida (CMB) do extrato etanólico de própolis sobre microrganismos isolados de queijo tipo Gorgonzola

Para análises sobre o efeito inibitório do EEPV, utilizou-se as bactérias *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus lugdugensis*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Corynebacterium flavescens* e *Bacillus cereus* e leveduras *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida parapsilosis*, *Candida zeylanoides*, *Candida guilliermondii*, *Candida intermedia*, *Candida nervogensis*, *Candida sphaerica*, *Candida kefir* e *Saccharomyces cerevisiae* previamente isoladas e identificadas.

As bactérias, mantidas em meio de congelamento (100mL de água destilada; 15mL de glicerol, 0,5g de peptona bacteriológica, 0,3g de extrato de levedura e 0,5g de NaCl, pH 7,2-7,4), foram ativadas pela transferência de 150µL da cultura estoque para tubos contendo 5mL de caldo infusão cérebro coração (BHI) e incubadas a 37 °C por 24h. Após esse período, alíquotas de 100µL foram inoculadas em ágar Triptona de Soja (TSA) e incubadas a 37 °C por 24h. As culturas de leveduras foram ativadas empregando o mesmo procedimento, em meio YEPG (yeast extract peptone dextrose) e cultivo a 25 °C por 48-72h.

Os inóculos foram padronizados pela coleta de massa celular com auxílio de alça de repicagem e transferência para solução salina (0,85% m/v). As suspensões celulares foram padronizadas empregando-se o fator 0,5 da escala de McFarland e medidas em espectrofotômetro (DO_{600nm}) obtendo-se a densidade óptica média de 0,09 ($1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹).

A determinação da concentração mínima inibitória (MIC) foi realizada empregando-se a técnica de microdiluição em TSB (tryptic soy broth) para bactérias e caldo YEPG para leveduras, usando microplacas de poliestireno de 96 poços segundo descrito em NCCLS (2003) com modificações. Em cada poço, foram acondicionados 10 µL da suspensão padronizada, 150µL de meio de cultivo e 150µL de solução contendo EEPV nas concentrações de 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,313 e 0,156%. Foram realizados dois controles, um sem a inoculação dos microrganismos e o outro contendo as concentrações de etanol nas diluições utilizadas do extrato. Foram realizados ensaios com natamicina (Natamax®) (natamicina -min. 50% + lactose max. 50%) para comparação da efetividade da EEPV sobre leveduras, sendo as concentrações utilizadas de 400; 200; 100; 50; 25; 12; 6; 3; 1,5; 0,75 e 0,37ppm.

As placas foram incubadas a 35-37 °C/ 24-48h e 48-72h para bactérias e leveduras, respectivamente. Após incubação, as placas foram avaliadas e as CMI foram definidas como as menores concentrações do EEPV e natamicina que não permitiram a turvação do meio de cultivo.

Após a determinação das CMI, as CMB foram realizadas pelo plaqueamento de alíquotas de 10µL das culturas dos poços que não apresentaram crescimento em placas de Petri contendo TSB e YEPG para bactérias e leveduras respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C por 24-48 h (bactérias) e 24-72h (leveduras). A CMB foi definida como a menor concentração de antimicrobiano onde houve ausência de crescimento visível em placas de Petri.

O experimento foi realizado em triplicata e três repetições.

3.4 Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico de própolis verde e natamicina em superfície de queijo Tipo Gorgonzola

Queijo tipo Gorgonzola sem a adição de natamicina foi adquirido no mercado. Os queijos foram abertos em câmara de fluxo laminar e com uso de lâmina foram retiradas fatias de 0,5 cm de espessura, transferidas para placas de Petri. As fatias foram expostas por 60 min. à luz UV para desinfecção da superfície. A aplicação do EEPV na superfície das fatias de queijo simulou o padrão de aplicação da solução diluída de natamicina em imersão por 5 segundos, drenagem do excesso e secagem (DANISCO, 2015).

Foram realizados cinco tratamentos considerando a concentração do EEPV em % sendo eles:

- 0%: controle (C)
- 1,25%: EEPV1,25
- 2,50%: EEPV2,50
- 5,00%: EEPV5,0
- 10% : EEPV10,0.

Para a natamicina, os tratamentos empregados em ppm foram:

- 10ppm: (N10)
- 50ppm: (N50)
- 250ppm: (N250)
- 1250 ppm: (N1250)

Foram utilizados os isolados de *S. saprophyticus*, *S. equorum*, *Y. lipolytica* e *D. hansenii*. Sobre a superfície de cada fatia de queijo foram inoculadas três alíquotas de 10 μ L da suspensão microbiana padronizada a 0,5 na escala McFarland de cada isolado. As fatias foram incubadas a 37 °C por 24-48h e 25 °C por 48-72h para bactérias e leveduras respectivamente, sendo observado em seguida a presença ou ausência de crescimento microbiano sobre o queijo.

Não se realizou avaliação de inibição do EEPV sobre *P. roqueforti*, pois além do mesmo ser um fungo de desenvolvimento interno ao queijo, pré-testes indicaram que nas condições do experimento não havia penetração do EEPV para o interior do queijo.

3.5 Análise sensorial

Para a realização da análise sensorial, o projeto que originou a presente pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Lavras sob o número 57513116.1.0000.5148. A análise sensorial foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial, do Departamento de Ciência dos Alimentos, da Universidade Federal de Lavras.

3.5.1 Preparação dos queijos

Os queijos tipo Gorgonzola utilizados no presente trabalho foram comprados em peças inteiras (aproximadamente 3,2kg), de laticínio local. A aplicação do EEPV na superfície dos queijos seguiu o padrão de aplicação da solução diluída de natamicina (Natamax®) em imersão por cinco segundos, drenagem do excesso e secagem em câmara fria (DANISCO, 2015).

As concentrações de EEPV para aplicação na superfície dos queijos se basearam nos valores máximos de CMB para o microrganismo mais resistente ao EEPV neste teste (5%). Por segurança e considerando o benefício resultante do consumo de própolis, também se utilizou do dobro do valor máximo de CMB para o teste sensorial (10%). As concentrações de 5 e 10% (m/m) de EEPV foram alcançadas através de diluição em etanol 99%, tendo em vista que ao se aplicar o EEPV na superfície dos queijos, o etanol evapora e forma-se um filme de própolis.

Após a aplicação do EEPV nas concentrações de 5 e 10 %, os queijos foram deixados em câmara fria até a secagem completa. Os cortes realizados foram de 10g, sendo calculado

uma área de 30% com o EEPV, observando a uniformização da amostra, tendo em vista que o queijo será consumido como um todo, não só a casca.

3.5.2 Teste de comparação múltipla

Para verificar se há diferença significativa na preferência entre as amostras com adição EEPV em superfície, foi utilizado um teste de comparação múltipla, onde os tratamentos controle (C), os adicionados de EEPV a 5% (m/m) e 10% (m/m) foram comparados com uma amostra de referência (correspondente ao controle). Estes foram avaliados por 40 consumidores não treinados que consomem queijos azuis com regularidade, os quais utilizaram uma escala hedônica de sete pontos (0= nenhuma diferença do controle; 1= diferença muito ligeira; 2= diferença ligeira/moderada; 3= diferença moderada; 4= diferença moderada/grande; 5= diferença grande; 6= diferença muito grande) quanto aos atributos sabor e odor. Para a avaliação, os produtos foram desenformados e cortados no mesmo dia da análise sensorial. As porções de 10g foram apresentadas em copos plásticos descartáveis. Cada bandeja com quatro amostras codificadas foram numeradas aleatoriamente com três dígitos. Além das amostras codificadas (CONT, EEPV 5% e EEPV 10%) foi oferecida também a amostra de referência que correspondia ao tratamento controle (C). A ficha do teste pode ser visualizada na Figura 1.

Figura 1: ficha do teste de comparação múltipla

TESTE DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA			
Você está recebendo uma amostra Controle (C) e 3 amostras codificadas. Prove a amostra Controle e em seguida cada uma das amostras codificadas e avalie na escala de 0 a 6, o quanto cada amostra difere da amostra Controle em relação ao odor e ao sabor.			
0 - Nenhuma diferença do Controle			
1 - Diferença muito ligeira			
2 - Diferença ligeira/moderada			
3 - Diferença moderada	Amostra nº	Sabor	Odor
4 - Diferença moderada/grande	_____	_____	_____
5 - Diferença grande	_____	_____	_____
6 - Diferença muito grande	_____	_____	_____

Fonte: Do autor (2017)

3.5.3 Teste de aceitação

Os queijos foram submetidos ao teste de aceitação, utilizando escala hedônica de 1 a 9. Os tratamentos foram baseados em um controle (C) sem aplicação de EEPV e dois com aplicação de EEPV na superfície de queijos tipo Gorgonzola nas concentrações 5 e 10%. Foram recrutados 67 provadores não treinados, com conhecimento em Ciência dos Alimentos e maiores de 18 anos. Os provadores foram selecionados em função de consumirem queijos azuis e com interesse em participar do teste. Os testes foram realizados em cabines individuais sob luz vermelha. As amostras codificadas em três dígitos foram apresentadas em simultâneo, em copos descartáveis brancos, cortadas em pedaços triangulares. A temperatura de apresentação das amostras foi de 12 °C. A ficha utilizada pode ser visualizada na Figura 2.

Figura 2: ficha utilizada no teste de aceitação

Ficha de análise sensorial			
Nome: _____			
Data: _____			
Frequência de consumo de queijo Gorgonzola:			
<input type="checkbox"/> 1x ao mês		<input type="checkbox"/> Diariamente	
<input type="checkbox"/> 1x na semana		<input type="checkbox"/> Não costuma consumir	
Preencha a tabela abaixo segundo seu grau de aceitação para as amostras codificadas de queijo Gorgonzola, de acordo com as notas:			
1: Desgostei extremamente	2: Desgostei muito	3: Desgostei moderadamente	
4: Desgostei pouco	5: Nem gostei e nem desgostei	6: Gostei pouco	
7: Gostei moderadamente	8: Gostei muito	9: Gostei extremamente	
Código da amostra	Sabor	Odor	Impressão Global
Comentários: _____			

Fonte: Do autor (2017)

3.5.4 Análise estatística dos resultados experimentais

A montagem do experimento para a análise sensorial foi realizada em blocos casualizados. Realizou-se análise de variância (ANOVA) e teste de médias para dados significativos (Duncan e Scott-Knott para o teste de comparação múltipla e aceitação

respectivamente) ao nível de 5% de significância utilizando programa computacional SISVAR® (FERREIRA, 2003) e SENSOMAKER® (NUNES; PINHEIRO, 2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da própolis verde

Os parâmetros físico-químicos do EEPV utilizado na presente pesquisa e sua adequação à legislação (BRASIL, 2001) está disponível na Tabela 1.

Tabela 1- Parâmetros físico-químicos do EEPV e sua adequação à legislação

Análise	Valor observado	Legislação*
Extrato seco (%)	20,7	Mínimo de 11% (m/v)
Flavonoides totais (mg/mL)	11,3	ND
Flavonoides totais (%)	1,3	Mínimo 0,25%(m/m)
Atividade de oxidação (s)	< 3	Máximo 22 segundos
Compostos fenólicos (%)	5,9	Mínimo 0,50% (m/m)
Teor alcoólico (°GL)	63	Máximo de 70° GL (v/v)
Acetato de chumbo	+	+
Hidróxido de chumbo	+	+
Grau Brix (%)	40,4	ND

*: BRASIL (2001)

ND: Não disponível na legislação

Todos os parâmetros analisados estão dentro do estabelecido pela legislação brasileira. Destaca-se o baixo tempo de oxidação (< 3 segundos), o alto teor de flavonoides (1,3%) e compostos fenólicos (5,9%). Os flavonoides são os principais responsáveis pela inibição de microrganismos de acordo com Cushnie e Lamb (2005), portanto quanto maior sua concentração na própolis maior sua atividade biológica. A atividade antimicrobiana é a atividade biológica da própolis mais estudada.

Entre substâncias químicas pertencentes ao grupo dos flavonoides, a flavanona, pinocembrina, flavonol, galagina e o éster feniletil do ácido cafeico, atuam na inibição da RNA-polimerase bacteriana (FIGUEIREDO et al., 2014; SZLISZKA et al., 2013). No que diz respeito ao potencial inibitório, o alto teor de flavonoides (1,3%) e compostos fenólicos (5,9%) indica maior poder de inibição sobre microrganismos, já que é a partir destes compostos que ela ocorre (FIGUEIREDO et al., 2014; SZLISZKA et al., 2013). A efetividade destes compostos pode diferir segundo o tipo de bactéria.

As bactérias gram- negativas possuem uma membrana adicional à camada externa, que consiste em fosfolipídios, proteínas e lipopolissacarídeos, sendo ela mais resistente à ação dos compostos antimicrobianos (SILICI; KUTLUCA, 2005). Assim, a própolis apresenta maior inibição em bactérias gram-positivas.

Análises de própolis verde conduzidas por Figueiredo et al., (2014) e Szliszka et al., (2013) confirmaram a presença de flavonoides como galangina, kaempferol, fisetina, quercetina, morina, miricetina, crisina, apigenina, luteolina, escutelareína, acacetina e a baicaleína, sendo que todos apresentam potencial inibidor de radicais livres que atenuam os danos de compostos prejudiciais à saúde.

Os flavonoides por serem macromoléculas ativas cedem elétrons ao radical livre impedindo dano às moléculas orgânicas do organismo (como ácidos graxos insaturados), sem que a ausência desse elétron gere um composto reativo. A alta concentração de flavonoides do EEPV pesquisado indica maior potencial de benefício à saúde no seu consumo.

De acordo com Chen et al., (2003), a própolis possui uma composição química bem heterogênea e complexa, sendo possível encontrar os diversos grupos químicos, desde aminoácidos até micro e macrominerais. O elevado teor encontrado de extrato seco do EEPV (20,7%) representa maior potencial nutricional.

O custo envolvido na produção do EEPV e seu uso em escala industrial são viáveis conforme observado no Anexo A. No Brasil existem mais de 10.000 produtores, sendo mais de 4.000 produtores da própolis verde, exportando anualmente em torno de 30 milhões dólares na forma de extrato alcoólico ou aquoso, encapsulado, associado a outros vegetais também antioxidantes ou simplesmente na forma bruta (NASCIMENTO JUNIOR, 2007).

Minas Gerais produz aproximadamente 29 toneladas de própolis, das quais 20 toneladas são de própolis verde, de acordo com a Cooperativa Nacional de Apicultura (CONAP, 2013). A alta produção relativa da própolis verde, a torna mais atrativa de ser trabalhada em relação aos outros tipos principalmente a vermelha que é mais rara e mais cara.

4.1.2 Compostos voláteis identificados na própolis verde bruta

Os dados referentes à concentração dos compostos orgânicos voláteis identificados em CG/MS, área normalizada dos picos expressa em porcentagem e principais espectros de massa em ordem crescente de intensidade (m/z) para cada composto químico, estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Compostos químicos identificados na própolis bruta, área normalizada dos picos expressa em porcentagem e principais espectros de massa em ordem crescente de intensidade (m/z) para cada composto químico identificado em CG/MS.

Composto	% de área	Principais m/z
α -tujona	0,91	93; 91; 77
α -pineno	7,61	93; 91; 92
Sabineno	0,19	93; 91; 77
β -pineno	10,29	93; 69; 79
Mirceno	1,47	93; 69; 91
δ - 3- careno	4,82	93; 91; 79
p-cimeno	0,55	119; 91; 134
*	0,43	-
Limoneno	11,37	93; 68; 67
*	0,31	-
Linalool	5,33	71; 93; 55
α -Cubebeno	1,47	105; 119; 161
*	1,55	-
α -Copaeno	4,73	105; 119; 161
α -Gurjuneno	1,74	105; 119; 161
γ -cariofileno	13,80	93, 69, 133
*	0,48	-
γ -cadineno	1,66	161; 105; 119
*	0,52	-
Aromadendreno	9,90	91; 105; 161
*	0,68	-
α -humuleno	1,28	93; 80; 121
Aloaromadendreno	1,10	91; 105; 93
6 α Cadina-1,4-dieno	3,15	161; 105; 119
Germacreno D	2,72	161; 105; 91
*	1,08	-
*	1,74	-
Germacreno B	2,79	161; 105; 119
*	2,11	-
δ -cadineno	3,30	161; 119; 105

Continua na próxima página

Tabela 2: Continuação

Espatuleno	0,78	91; 105; 119
Total identificado (%)	91,10	
Total não identificado (%)	8,90	

*: compostos não identificados

Os terpenóides α -pineno β -pineno, Limoneno γ -cariofileno e Aromadendreno foram os mais predominantes na análise, com áreas em porcentagem de 7,61; 10,29; 11,37; 13,80 e 9,90% respectivamente. A porcentagem total de compostos voláteis não identificados na CG/MS foi de 8,90%.

Os terpenoides são associados à defesa do vegetal contra microrganismos e outros agentes além de promover a cicatrização em caso de lesão. Isso explica o porquê de essas substâncias terem poder inibitório sobre microrganismos. Os compostos α -pinene e o β -pinene são terpenos bicíclicos e podem ser encontrados nos óleos essenciais de espécies vegetais. A matéria prima para produção própolis pelas abelhas são exsudatos vegetais, com isso muitas substâncias são encontradas em ambos (BAKKALI et al., 2008).

O Aromadendreno é um composto sesquiterpenoide ($C_{15}H_{24}$) que ocorre como constituinte principal de óleos de vários eucaliptos. De acordo com Mulyaningsih et al., (2011), o mesmo apresenta alto potencial antimicrobiano. Esse pode alquilar proteínas e perturbar a conformação das células. Sendo esse composto altamente lipofílico, provoca-se a ruptura de biomembranas celulares (WINK, 2008). A partir dessa afirmação denota-se que uma própolis rica nesse composto apresenta boa ação contra microrganismos.

Outras propriedades biológicas dos terpenóides é corroborada por Rather et al. (2012) que em análise das atividades antioxidante e antimicrobiana de compostos pineno, cariofileno e germacreno D, observaram que o cariofileno e germacreno D apresentaram efeitos inibitórios contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. typhi* e *K. pneumonia* em relação aos pinenos. Embora esses microrganismos não tenham sido identificados nas amostras dos queijos, isso não desabona a ação antimicrobiana desses terpenoides.

Além do efeito antimicrobiano, os terpenoides também podem apresentar benefícios à saúde. Segundo Legault e Pichette (2007), o cariofileno (identificado com 13,80% de área na própolis bruta) é considerado um agente anti-inflamatório, analgésico e anticoagulante. Ele atua bloqueando a síntese de prostaglandinas pela inibição da ciclooxigenase, que converte o ácido araquidônico em endoperóxidos cíclicos, precursores de prostaglandinas. Em trabalho conduzido por Tamble et al. (1996), o cariofileno apresentou efeito citoprotetor

gastrointestinal por meio da ingestão oral, inibindo as injúrias induzidas por agentes que causam lesões necróticas no estômago. De acordo Lam et al., (1989) o limoneno é um potente estimulante da GST (Glutathione S-Transferase), uma enzima desintoxicante que promove a conjugação de carcinógenos que sofreram prévia bioativação.

4.2 Identificação dos microrganismos e número de isolados

O número de isolados de leveduras e bactérias identificadas nos queijos tipo Gorgonzola das diferentes marcas está apresentado na Tabela 3.

Tabela 3- Número de isolados de leveduras e bactérias identificadas em queijos tipo Gorgonzola de diferentes marcas (A, B, C, D, E, F e G).

Espécies	Marcas							Total
	A	B	C	D	E	F	G	
<i>Y. lipolytica</i>	14	15	2	6	13	0	10	60
<i>C. sphaerica</i>	7	0	0	0	0	0	7	14
<i>D. hansenii</i>	10	0	23	7	0	3	9	52
<i>C. parapsolosis</i>	6	0	6	0	0	0	3	16
<i>C. intermedia</i>	6	0	0	0	9	0	0	15
<i>C. nervogensis</i>	3	0	0	6	0	0	0	9
<i>S. cerevisiae</i>	9	0	0	0	0	0	0	9
<i>C. guilliermondii</i>	0	0	0	0	0	8	0	8
<i>C. zeylanoides</i>	0	0	0	0	0	9	0	9
<i>C. kefir</i>	3	0	0	0	0	0	0	3
<i>S. saprophyticus</i>	19	27	12	0	11	0	0	70
<i>S. equorum</i>	24	29	4	16	21	32	34	160
<i>B. cereus</i>	2	0	0	0	0	0	0	2
<i>E. faecalis</i>	14	0	0	0	0	5	7	27
<i>C. flavescens</i>	23	0	0	0	0	0	0	23
<i>S. lugdugensis</i>	0	0	0	8	0	0	0	8
<i>P. vulgaris</i>	0	0	0	0	0	11	0	11

Yarrowia lipolytica se destacou entre todas as espécies de leveduras sendo que o número de isolados total 60. As marcas A e B tiveram maior número, com 14 e 15 isolados respectivamente. Em seguida a espécie *D. hansenii* se destaca com 52 isolados sendo a marca C a que apresentou maior número: 23. A espécie de bactéria predominante em todas as regiões foi *S. equorum* sendo 160 o número de isolados totais. As marcas F e G se destacam com 32 e

34 isolados respectivamente. Destaca-se também a espécie *S. saprophyticus* que apresentou número de isolados para as marcas A e B de 19 e 27 respectivamente, sendo 70 o total. A marca A apresentou números elevados tanto de leveduras quanto de bactérias, pois nela se identificou todas as espécies de bactérias exceto *S. lugdugensis* e *P. vulgaris*.

A prevalência das espécies dos microrganismos identificados e sua importância são defendidas em outros trabalhos científicos. Segundo os autores Ozturk e Sagdic (2014) e Mendoza et al, (2014), *D. hansenii* apresenta alta atividade lipolítica e baixa atividade proteolítica, enquanto *Y. lipolitica* apresenta alta atividade lipolítica e proteolítica. Esses fatores (alta quantidade de nutrientes e produção de enzimas pelos microrganismos) contribuem para acelerar a deterioração de superfície do queijo tipo Gorgonzola e explicam a alta frequência com que aparecem nos queijos. A formação da limosidade ocorre em um processo simbiótico dos microrganismos o qual diversos componentes são degradados e sintetizados de acordo com as características metabólicas de cada espécie.

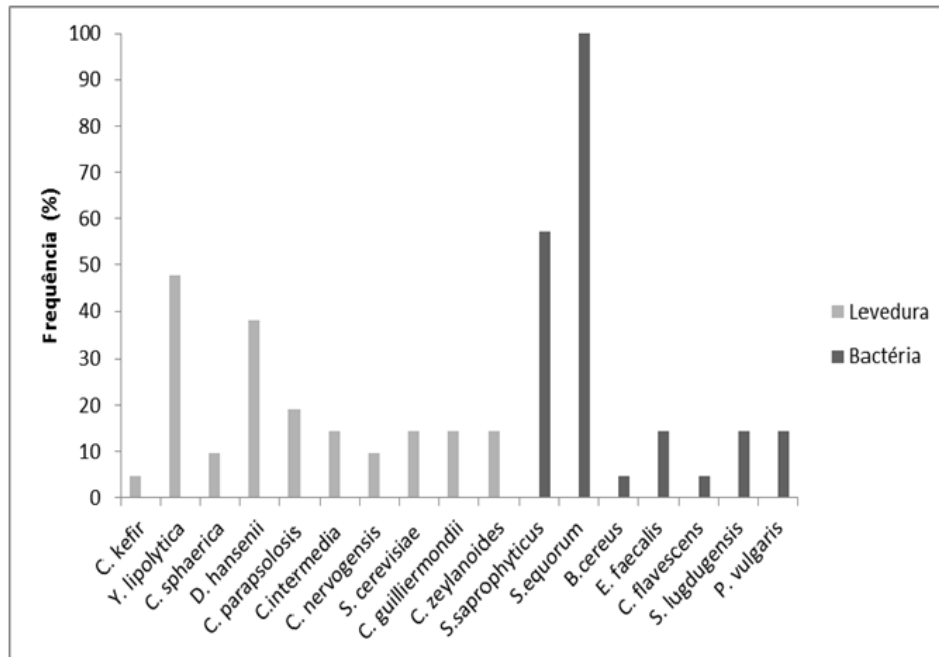
A limosidade superficial dos queijos é formada a partir do crescimento de microrganismos e quanto mais intensa a atividade enzimática, maior a tendência de formação de limosidade. Presença de água e decomposição proteolítica, lipolítica e expolissacarídeos são fundamentais para geração de moléculas para formação do polímero que constitui essa limosidade (WINGENDER; FLEMMING; NEU, 2016).

O papel das bactérias, principalmente as do gênero *Staphylococcus* é degradar peptídeos e açúcares. Outro ponto de destaque é que as colônias desses gêneros, pode apresentar coloração amarela intensa ou laranja (SMI, 2014). Observou-se que a limosidade na superfície dos queijos pesquisados apresentava intensa coloração amarelada.

Assim como observado no presente trabalho, Banjara, Suhr e Hallen-Adams (2015) e Irlinger e Berg (1999) destacam a importância do gênero *Staphylococcus* em queijos. De acordo com esses autores, o gênero *Staphylococcus* é o principal encontrado no início da maturação (dentro de quatro dias) sendo substituídos por bactérias corineformes na 3ª semana de maturação. A espécie *Corynebacterium flavescens* foi observada na marca A, o que reforça a afirmação dos referidos autores sobre sua presença em queijos.

Na Figura 3 é apresentada a frequência das espécies de leveduras e bactérias dadas em porcentagem, sobre o total de queijo tipo Gorgonzola pesquisado.

Figura 3: Frequência das espécies de leveduras e bactérias dada em porcentagem, sobre o total de queijo tipo Gorgonzola pesquisado.



Fonte: Do autor (2017)

A espécie *Y. lipolytica* foi encontrada em 47,62% dos queijos analisados, seguida da espécie *D. hansenii* que foi identificada em 38,10% dos queijos. Assim como *Y. lipolytica*, *D. hansenii* é espécie comum a diversos ambientes (LIMA et al., 2009).

S. equorum e *S. saprophyticus* foram as bactérias mais prevalentes, com frequências de 100,00 e 57,14% respectivamente. *S. equorum* e *S. saprophyticus* apresentam boa capacidade proteolítica, por outro lado, apresentam baixa atividade lipolítica, além de dar coloração amarelada ao limo da superfície.

Staphylococcus é o principal gênero encontrado no início da maturação sendo substituídos por bactérias corineformes com o passar do período da maturação (BANJARA; SUHR; HALLEN-ADAMS, 2015; IRLINGER; BERG, 1999). Observou-se que além das espécies *S. equorum* e *S. saprophyticus*, *C. flavescens* também foi identificada nos queijos estudados.

Alibi, Ferjani e Boukadida (2016) destacam que na comunidade bacteriana de queijos, as corineformes halotolerantes estão entre as mais prevalentes. No presente estudo as mais prevalentes foram bactérias do gênero *Staphylococcus*.

A formação de limosidade na superfície do queijo é acentuada pela atividade lipolítica, a qual é desempenhada pelas leveduras, principalmente *Y. lipolytica* (CARVALHO, 2010; FLEMMING; NEU WINGENDER, 2016). A partir dessas informações, conclui-se que bactérias e leveduras possuem papel complementar na deterioração da superfície do queijo.

As leveduras mais associadas a Queijos Azuis segundo Almeida, et al (2014) e Mounier, (2008) são espécies *Candida famata*, *Candida catenulata*, *Candida lipolytica*, *Trichosporon cutaneum* e gêneros *Zygosaccharomyces* spp. Em queijos Roqueforti as espécies *Dabaryomyces hansenii*, *Candida sphaerica* e outras espécies do gênero *Candida* são as mais frequentes. Essas afirmações concordam com os resultados observados no presente trabalho.

Eliskases-Lechner (1998) observou em seus resultados, que 100% das amostras de Queijo Azul estudadas continham leveduras presentes a níveis superiores a 10^5 UFC/g no exterior e 83% das amostras apresentavam leveduras em níveis superiores a 10^3 UFC/g no interior. As espécies mais frequentes foram *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* e *Yarrowia lipolytica*.

A ocorrência da espécie *Debaryomyces hansenii*, não mostra especificidade de ambientes. Esta afirmação é salientada por Banjara et al. (2015) que ao pesquisar as espécies de fungos em queijos de diversos tipos adquiridos no comercio de Lincoln - Nebraska (EUA), (região de clima temperado, bem diferente do estado de Minas Gerais), observaram que a espécie citada foi a mais abundante, presente em 79 % de todos os queijos estudados. Ceugniz et al. (2015) ao estudar os microrganismos presentes em queijo artesanal tipo Tomme d'orchies (Nomain, França) observaram por meio de análise bioquímica e de sequenciamento genético, que a maioria das leveduras isoladas eram das espécies *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* e *Kluyveromyces marxianus*. Estes resultados corroboram os observados na presente pesquisa.

4.3 Concentração mínima inibitória e concentração mínima biocida dos agentes antimicrobianos

Os intervalos da concentração mínima inibitória (CMI), da concentração mínima biocida (CMB) do EEPV e do etanol expressas em porcentagem (g/g) sobre as espécies de leveduras e bactérias, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4- Concentrações mínimas inibitórias (CMI) e biocida (CMB) do EEPV, do controle de etanol e natamicina sobre as espécies de leveduras e bactérias isoladas de queijo tipo Gorgonzola

	Agente inibitório (%)			
	Controle etanólico		EEPV	
	CMI	CMB	CMI	CMB
Leveduras				
<i>Candida parapsilosis</i>	10,0	>10,0	1,25	5,0
<i>Yarrowia lipolytica</i>	>10,0	>10,0	1,25	2,5
<i>Debaryomyces hansenii</i>	>10,0	>10,0	1,25	2,5
<i>Candida zeylanoides</i>	2,5	10,0	0,63	2,5
<i>Candida guilliermondii</i>	5,0	10,0	1,25	2,5
<i>Candida intermedia</i>	5,0	10,0	0,63	1,25
<i>Candida nervogensis</i>	5,0	5,0	1,25	1,25
<i>Candida sphaerica</i>	5,0	10,0	0,62	1,25
<i>Candida kefir</i>	2,5	5,0	1,25	2,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10,0	>10,0	0,62	0,62
Bactérias				
<i>Staphylococcus lugdugensis</i>	5,0	>10,0	0,62	1,25
<i>Enterococcus faecalis</i>	5,0	10,0	0,63	1,25
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	5,0	10,0	0,31	0,63
<i>Staphylococcus equorum</i>	5,0	10,0	0,31	0,63
<i>Proteus vulgaris</i>	10,0	>10,0	2,5	5,0
<i>Corynebacterium flavescens</i>	1,25	5,0	0,16	0,63
<i>Bacillus cereus</i>	5,0	10,0	0,16	0,31
			Natamicina (ppm)	
Leveduras			MIC	CMB
<i>Yarrowia lipolytica</i>			1,5	12,5
<i>Candida parapsilosis</i>			6,25	12,5
<i>Candida nervogensis</i>			3,1	6,25
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			1,5	3,1
<i>Candida guilliermondii</i>			1,5	3,1
<i>Candida zeylanoides</i>			1,5	3,1
<i>Candida sphaerica</i>			1,5	3,1
<i>Debaryomyces hansenii</i>			1,5	1,5
<i>Candida intermedia</i>			1,5	1,5
<i>Candida kefir</i>			1,5	3,1

Entre as espécies de leveduras e bactérias, as concentrações de álcool necessárias para promover a inativação dos microrganismos foi sempre maior que a do EEPV, indicando que o efeito do EEPV vem principalmente da constituição química da própolis, sendo o etanol apenas um agente de solubilização dos seus compostos. Entre as espécies de leveduras, todas necessitaram de concentrações maiores ou iguais a 10% de etanol para inativação, exceto *C. nervogensis* (5,0% de etanol). Em relação às concentrações de EEPV, *C. parapsilosis* necessitou de 5,0% para inativação, sendo a mais resistente.

Saccharomyces cerevisiae foi a espécie mais sensível, inativando-se com 0,62% de EEPV. As outras espécies de leveduras tiveram o CMB de EEPV entre 1,25 e 2,50%.

Assim como as espécies de leveduras, todas necessitaram de concentrações maiores ou iguais a 10% de etanol para inativação, exceto a *C. flavescens* (5,00%). Em relação ao EEPV, as espécies *S. saprophyticus*, *S. equorum* (as mais frequentes) e *C. flavescens* necessitaram de 0,63% de EEPV para atingir a CMB, já a *B. cereus* foi a mais sensível ao EEPV, sendo inativada com 0,31%. A mais resistente ao EEPV e ao etanol foi a espécie *P. vulgaris*, a única espécie gram-negativa identificada. A própolis apresenta maior atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas comparativamente às gram-negativas. Uma das hipóteses explicativas é que as bactérias gram-negativas possuem uma parede celular mais complexa e maior teor de fosfolípidos que as gram-positivas (SILICI; KUTLUCA, 2005). Bactérias gram-positivas possuem uma parede celular mais espessa, composta por várias camadas de glicopeptídeos, com proteínas e polissacarídeos inseridos. A parede celular das bactérias gram-negativas, por sua vez é mais fina, mas estruturalmente mais complexa, pois possui uma única camada de glicopeptídeos, uma membrana externa com constituição similar a membrana citoplasmática e uma camada de lipopolissacarídeo (LPS) que são glicolipídios complexos que conferem resistência às bactérias (KONEMANN et al., 2001).

A eficiência da própolis verde em relação ao etanol é explicada pela presença de flavonóides como a galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol, além de terpenóides e fenilpropanóides como os ácidos cafeico e clorogênico (GARCIA et al., 2009).

Os componentes da própolis possuem efeitos sobre a permeabilidade da membrana citoplasmática aos íons, causando a dissipação do potencial de membrana, o que a caracteriza como substância ionófora. O gradiente eletroquímico de prótons através da membrana é essencial para a bactéria manter a síntese de ATP, o transporte através da membrana plasmática e a motilidade; tal efeito contribui para a ação citotóxica da própolis. O efeito ionóforo da própolis pode ainda diminuir a resistência das células a outros compostos antibacteriano explicando a maior sensibilidade frente aos microrganismos gram-positivos do que gram-negativos. (ABUBAKAR et al., 2014; KONEMANN et al., 2001).

Quando se compara a atividade do EEPV com a atividade antimicrobiana da natamicina, observa-se que a mesma foi superior ao EEPV, com valores de CMB entre 1,5 a 12,5ppm, enquanto que para o EEPV, os valores foram de 0,62 a 5,00%. Apesar da superioridade da natamicina em relação à própolis, a mesma possui limitação de uso devido à legislação (BRASIL, 2001).

A própolis pode ser usada em maior quantidade devido ao seu potencial nutricional e terapêutico. Ainda que a natamicina seja superior contra leveduras, autores corroboram o alcance da própolis como elemento de inibição de muitas espécies. De acordo com Koc et al., (2007) a própolis tem efeito fungicida sobre *C. famata*, *C. glabrata*, *C. Kefyr*, *C. pelliculosa*, *C. parapsilosis* e *P. ohmeri*.

Outro fator de extrema importância no uso da própolis é que a mesma causa inibição de espécies bacterianas, o que não ocorre com a natamicina. A atividade antifúngica da natamicina depende da sua ligação com esteróis da membrana celular, especialmente o ergosterol, que é o principal esteroide de membranas fúngicas. Esses compostos estão presentes nas membranas das células de fungos filamentosos e leveduras, que não existem nas bactérias, assim a natamicina não tem efeito sobre elas segundo Thomas et al. (2005). Além do efeito inibitório da própolis sobre bactérias, há o benefício à saúde.

4.4 Atividade antimicrobiana do extrato etanólico da própolis verde e da natamicina em superfície de queijo tipo Gorgonzola

O resultado da atividade antimicrobiana de quatro concentrações do EEPV e da natamicina sobre as quatro espécies de microrganismos mais predominantes na identificação em queijo tipo Gorgonzola, está apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Crescimento de microrganismos inoculados em micro gotas (10 μ L) sobre superfície de queijo tipo Gorgonzola previamente aplicada de extrato etanólico da própolis verde e de natamicina.

Espécies	EEPV(%)			
	1,25	2,5	5,0	10,0
<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	-	-	-
<i>Debaromyces hansenii</i>	+	-	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus equorum</i>	-	-	-	-
Espécies	Controle de natamicina (ppm)			
	10	50	250	1250
<i>Yarrowia lipolytica</i>	+	+	+	-
<i>Debariomyces hansenii</i>	+	+	-	-

+: houve crescimento

-: não houve crescimento

As concentrações de natamicina necessárias para inibir o crescimento das leveduras na superfície do queijo foram muito menores que do EEPV. O ensaio *in situ* indica com mais confiabilidade, o efeito dos agentes antimicrobianos em relação ao teste *in vitro*, pois os alimentos são mais complexos que os meios de cultura utilizados.

Conforme observado na Tabela 5, a concentração de EEPV para inibição total do crescimento da espécie *Y. lipolytica* e *D. hansenii* ocorreu a partir de 1,25% para *Y. lipolytica* e 2,50 para *D. hansenii*, enquanto as bactérias (*S. saprophyticus* e *S. equorum*) foram inibidas desde a concentração de 1,25%. *Y. lipolytica* foi mais sensível ao própolis e mais resistente à natamicina em relação à espécie *D. hansenii*. A natamicina inibiu completamente as leveduras testadas na concentração acima de 250ppm para *D. hansenii* e 1250ppm para *Y. lipolytica*.

Nota-se melhor desempenho da própolis sobre a inibição de *Y. lipolytica* em relação ao teste no queijo (2,5% contra 1,25% de EEPV). Em relação à natamicina, houve redução de inibição tanto de *D. hansenii* quanto de *Y. lipolytica* (250 e 1250ppm de *D. hansenii* e *Y. lipolytica* respectivamente contra CMB de 1,5 e 12,5ppm de *D. hansenii* e *Y. lipolytica* respectivamente).

Provavelmente esse efeito ocorreu pelo fato de o EEPV, que foi diluído em etanol e ser rico em resina, ter formado filme protetor sobre a superfície do queijo ao secar, o que dificultou o acesso dos microrganismos aos nutrientes do queijo. Resa, Jagus e Gerscheson (2014) compararam amostra de queijo controle com amostras de queijo com aplicação de natamicina em filme à base de amido de tapioca e de queijo com aplicação de natamicina por pulverização, para o crescimento de *S. cerevisiae*, *Z. rouxii* e *Y. lipolytica*, sendo o método mais eficaz o de aplicação de filme, visto que a pulverização foi efetiva somente nas primeiras 24 horas, retomando o crescimento microbiológico após esse período, semelhante ao controle. Isso indica que o efeito da natamicina não é prolongado, concordando com os resultados vistos na presente pesquisa.

A vantagem no uso da própolis também está presente no custo de produção. A aplicação do EEPV (de acordo com as condições experimentais do presente trabalho) nas concentrações de inibição do microrganismo mais resistente (5%) é de aproximadamente 22 centavos de reais por peça de queijo (Anexo A). Isso indica o EEPV além do apelo na saudabilidade e no poder de inibição de microrganismos, também é vantajoso a nível econômico. Há a possibilidade de fabricação de um produto de alto valor agregado tendo em vista os resultados dessa pesquisa.

4.5 Análise sensorial: teste de comparação múltipla e teste de aceitação

A análise sensorial é de fundamental importância ao se testar uma nova substância em alimentos ou desenvolver um novo produto alimentício. Apesar do desempenho do EEPV em inibir microrganismos, seu uso poderia ser limitado em função de prejuízos ao sabor e ao odor dos queijos. Na Tabela 6 são apresentados os escores médios dos atributos sensoriais de queijo tipo Gorgonzola com aplicação de EEPV a 5 e 10% (m/m) em sua superfície e o tratamento controle (C) no teste de comparação múltipla e o resultado do teste de aceitação.

Tabela 6 - Escores médios dos atributos sensoriais de queijo tipo Gorgonzola com aplicação de EEPV a 5 e 10% em sua superfície e o tratamento controle no teste de comparação múltipla e o resultado do teste de aceitação

Teste de comparação múltipla			
Tratamento	Sabor	Odor	
Controle	1,50a	1,23a	
EEPV 5%	2,36b	2,18b	
EEPV 10%	2,76b	2,94c	
Teste de aceitação			
Tratamento	Sabor	Odor	Impressão global
Controle	6,89a	6,50a	6,64a
EEPV 5%	6,53a	6,79a	6,80a
EEPV 10%	5,82b	5,86b	5,98b

Letras iguais na coluna indicam ausência de diferença significativa ao teste de Duncan (Teste de comparação múltipla) e de Scott-Knott (Teste de aceitação) ao nível de 5% de significância

No teste de comparação múltipla, as notas médias das amostras situaram-se na escala entre 1 (diferença muito ligeira) e 3 (diferença moderada), apresentando diferença em relação ao controle tanto para o sabor e principalmente o odor em se tratando da concentração a 10% de EEPV. Nota-se que para o atributo sabor, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos C e EEPV a 5 e 10%, onde a maior adição do extrato resultou em percepção ligeira a moderada. Por outro lado, quando se compara a aplicação de EEPV na concentração 5 e 10%, não se percebe diferença significativa para o mesmo atributo.

Para o atributo odor, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos C, EEPV a 5 e 10%, onde a maior adição do extrato resultou em percepção ligeira a moderada. Os resultados apresentados denotam que queijos aplicados de EEPV em superfície se diferenciam em relação ao controle. Não se nota interferência clara no sabor do queijo, pois em nenhum dos atributos citados, foi observada diferença em relação às concentrações maior e menor de EEPV.

Foi observado que os provadores perceberam diferença da amostra com 0% de EEPV e o controle (médias de 1,50 e 1,23 para sabor e odor respectivamente), fato usual em se tratando de avaliação sensorial com provadores não treinados. A maior diferença em relação ao controle foi percebida no atributo odor, considerando o EEPV a 10% (escala de 2,94).

O teste de aceitação foi realizado em virtude da diferença percebida no teste de comparação múltipla. As notas de aceitação para os atributos odor, sabor e impressão global foram medidas em escala de 1 a 9. Para os três atributos citados, os queijos aplicados de EEPV a 5% e o tratamento controle não diferiram significativamente no teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

No caso da aplicação de EEPV a 10%, houve uma piora nas médias de aceitação para os três atributos analisados, o que indica que nessa concentração, o EEPV começa a interferir negativamente no produto. Embora haja essa interferência, ela é discreta, pois a escala se encontra próxima de “gostei ligeiramente” enquanto para o tratamento controle e EEPV a 5%, as notas médias ficaram próximas de “gostei moderadamente”. A pequena diferença observada é factível em se tratando de queijo Gorgonzola, pois o mesmo apresenta sabor e odor fortes devido ao desenvolvimento do fungo *Penicillium roqueforti* e a produção de compostos voláteis oriundos da metabolização da gordura e de proteínas do queijo, isso ajuda a mascarar o sabor e odor fortes da própolis. De acordo com Figueiredo et al, (2015) a própolis verde apresenta sabores balsâmico, amargo, picante e adstringente. Seu odor pode ser floral, forte e canforoso. Essa característica poderia levar à rejeição de um produto alimentício adicionado de própolis e seus extratos. Tal situação não ocorreu nas concentrações utilizadas no presente trabalho.

Comparando o teste de aceitação com o teste de comparação múltipla, conclui-se que a própolis pode ser aplicada à superfície do queijo tipo Gorgonzola sem prejudicar o sabor e o odor, pois em ambas as análises, mesmo em concentração de 10%, o EEPV não interferiu de forma pronunciada. Ainda assim, o EEPV na concentração de 5%, foi capaz de inibir os microrganismos mais resistentes no teste de CMB e no teste *in situ* 2,5% inibiu todos os microrganismos identificados com maior frequência na superfície dos queijos. Esses fatos

tornam seguro o uso do EEPV ao nível de 5% sem prejudicar a qualidade sensorial dos queijos, tendo ainda o benefício à saúde trazido pelo consumo de própolis.

Embora tenha sido observada diferença significativa no sabor e no odor dos queijos aplicados de EEPV a 5% na superfície em relação ao controle no teste de comparação múltipla, o teste de aceitação indicou que esta diferença não implica em piora da qualidade sensorial, pois nesse teste as notas não mostraram diferenças significativas para odor, sabor e impressão global.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato etanólico de própolis verde tem viabilidade de uso como conservante de queijo tipo Gorgonzola quando aplicado sobre sua superfície. Pesquisas podem ser realizadas para avaliação do efeito no desenvolvimento do fungo *Penicilium roqueforti*.

6 CONCLUSÕES

Os principais microrganismos identificados na superfície de queijo tipo Gorgonzola foram leveduras *Yarrowia lipolytica* e *Debaryomyces hansenii* e bactérias *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus equorum*.

O EEPV pode ser usado com segurança na concentração de 5% em superfície de queijo tipo Gorgonzola, pois nessa concentração não há interferência no sabor e no odor e inibe-se os microrganismos mais prevalentes de forma completa.

Na análise sensorial foi observado que o extrato etanólico de própolis verde pode ser usado nas concentrações de 5% e 10% sem afetar de forma expressiva o odor e o sabor do queijo tipo Gorgonzola.

REFERÊNCIAS

- ABBAS J.; TUNÇTÜRK, Y.; HESARI, J. Extension Shelf Life of Cheese: A Review. **International Journal of Dairy Science**, v. 10, n. 2, p. 44-60, 2015.
- ABUBAKAR, M. B.; ABDULLAH, W. Z.; SULAIMAN, S. A.; ANG, B. S. Polyphenols as key players for the antileukaemic effects of propolis. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 1-11, 2014.
- AGA, H.; SHIBUYA, T.; SUGIMOTO, T.; KURIMOTO, M.; NAKAJIMA, S. H. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, p. 945-946, 1994.
- ALIBI, S.; FERJANI, A.; BOUKADIDA, F. Implication of *Corynebacterium* species in food's contamination. **Journal of Coastal Life Medicine**. v. 9, n. 2, p.123-156, 2016
- ALMEIDA M, et al. Construction of a dairy microbial genome catalog opens new perspectives for the metagenomic analysis of dairy fermented products. **BMC Genomics**, v. 15, p. 1101-1120, 2014.
- BANJARA, N.; SUHR, M. J.; HALLEN-ADAMS, H. E. Diversity of Yeast and Mold Species from a Variety of Cheese Types. **Current Microbiology**. 2015. 459 p.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; ADNYANA, I. K.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A. A. G.; KADOTA, S. Cytotoxic hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Perú, The Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 1-2, p. 239-246, 2000.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: A review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A.; MARCUCCI, M. C.; POPOV, S. Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung, Tubingen**, v. 50, n. 2, p. 167-172, 1995.
- BANKOVA V. S., CASTRO S. L., MARCUCCI M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin, **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3-15, 2000.
- BERESFORD, T. P.; NORA A. F.; NOELLE L.; BRENNAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**. Dairy Products Research Centre, Teagasc, Moorepark, Fermoy, Ireland. 2001. p. 259-274.
- BERGER, C.; KHAN, J. A.; MOLIMARD, P.; MARTIN, N.; SPINNLER, H. E. Production of sulfur flavors by ten strains of *Geotrichum candidum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 5510-5514, 1999.
- BRASIL . Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Estabelece regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, Distrito Federal, n. 7, 10 jan. de 2001. Seção 1, p. 45-53.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC nº 28, de 23 de fevereiro de 2001, Aprova a extensão de uso da Natamicina (Pimaricina) (INS 235), como conservador, para tratamento de superfícies de produtos cárneos embutidos no limite máximo de 1mg/dm² ausente em 5 mm de profundidade. **Diário Oficial da União**. Brasília, 2 mar 2001.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa no 45, de 23 de outubro de 2007. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Azul, na forma do Anexo a presente Instrução Normativa. **Diário Oficial da União**. Brasília, 24 out 2007.

_____. Ministério Da Agricultura Pecuária e Abastecimento. (2001). Instrução Normativa nº 3 –ANEXO VII– Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de extrato própolis. **Diário Oficial da União**. Brasília, 19 jan. 2001.

CAO, M.; FONSECA, L. M.; SCHOENFUSS, T. C.; RANKIN, S. A. Homogenization and lipase treatment of milk and resulting methyl ketone generation in blue cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 5726–5733, 2014.

CHEN, C. N.; WU, C. L.; SHY, H. S.; LIN, J. K. Cytotoxic Prenylflavanones from Taiwanese Propolis. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 4, p. 503-506, 2003.

CHOISY C.; DESMAZEAUD, M.; GRIPON, J.C.; LAMBERET, G.; LENOIR, J.; TOURNEUR, C. **Microbiological and biochemical aspects of ripening**. In Cheesemaking (Eds A. Eck) p.62-89. New York. Lavoisier Publishing, 1986.

COLLINS, Y. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; WILKINSON, M. G. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 841–866, 2003.

COSTA, P. S. C.; OLIVEIRA, J.S. **Manual Prático de Criação de Abelhas**. Editora Aprenda Fácil, Viçosa. 2005.

CPGC. **Consortium for the protection of Gorgonzola Cheese**. Disponível em: <http://www.gorgonzola.com>. Acesso em: 10 jul 2017.

CUSHNIE, T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

DANISCO (2015). The Cheese Corner. disponível em <http://www.danisco.com/food-beverages/dairy/insights-for-cultured-dairy-newsletter/september-2015/the-cheese-corner/>. Acesso em 10 de Ago 2016.

DEVOYOD, J. J. **Yeasts in cheese-making**. In **Yeast Technology** (Eds JFT Spencer and D.M. Spencer) pp.228-240. Berlin. 1990.

DHEEMAN, D. S.; FRIAS, J. M.; HENEHAN, G. T. M. Influence of cultivation conditions on the production of a thermostable extracellular lipase from *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 1-17, 2010.

DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Isolamento e identificação de leveduras. In: Fatima M. S. MOREIRA; HUISING E. J.; BIGNELL, D. E. (Org.). **Manual de Biologia dos Solos Tropicais - Amostragem e Caracterização da Biodiversidade**. Lavras: UFLA, 2010, v.1 , p. 227-277.

EFSA. Scientific opinion on the use of natamycin (E 235) as a food additive. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). **European Food Safety Authority – EFSA**, v.7, n.12, 2009.

ELISKASES-LECHNER, F.; GINZINGER, W. The yeast flora of surface-ripened cheeses. **Milchwissenschaft**, v. 50, p.458–462,1995.

FAJARDO, P. et al. Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 101, n. 4, p. 349-356, 2010.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4ª Edição, 1977, 988p.

FARNESI, A. P.; AQUINO-FERREIRA, R.; JONG D.; BASTOS, J. K.; SOARES, A. E. E. Effects of stingless bee and honey bee propolis on four species of bacteria. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 635–640, 2009.

FATMA, A. M. H.; MONA, A M.; ABD EL- GAWAD, A. K. Flavour Compounds in Cheese (Review). **Research on Precision Instrument and Machinery**, v. 2, n. 2, p. 1-29, 2013.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Nov./Dec. 2011.

FIGUEIREDO, F. J. B. et al. Physicochemical characterization and flavonoid contents of artisanal brazilian green propolis. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 3, p. 64-68, 2015.

FIGUEIREDO, S. M.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; ALMEIDA, B. D. E. M.; ABREU, S. R. L.; DE ABREU, J. A. S.; FILHO, S. A. V., et al. Immunomodulatory Properties of Green Propolis. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, v. 8, p. 85–94, 2014.

FLEMMING H. C.; NEU T.; WINGENDER J. **The Perfect Slime: microbial extracellular polymeric substances (EPS)**. IWA Publishing, London, 2016, 336p.

FOX, P. F., GUINEE, T. P., COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc. 2000. 587p.

FLEET, G. H. Yeasts in dairy products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 68, p. 199-211, 1990.

FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do queijo**. 2. ed. São Paulo: Editora Globo S.A, 1991

_____, M. M. **Queijos especiais**. São Paulo. Setembro Editora, 2013. 275p.

GÁLVEZ A.; LÓPEZ R. L.; ABRIOUEL H.; VALDIVIA O. N. B. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, p. 125–152, 2008.

GARCÍA, L.A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A. et al. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**, v. 58, n.9, p. 537–552, 2009.

GARCIA, A.; RHODEN, S. A.; RUBIN-FILHO, C. J.; NAKAMURA, C.V.; PAMPHILE, J. A. Diversity of foliar endophytic fungi from the medicinal plant *Sapindus saponaria* L. and their localization by scanning electron microscopy. **Biological Research**, v. 45, p. 139-148, 2012.

GENTE, S.; BILLON-GRAND, G.; POUSSEREAU, N.; FEVRE, M. Ambient alkaline pH prevents maturation but not synthesis of ASPA, the aspartyl protease from *Penicillium roqueforti*. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 38, p. 323–328, 2001.

GILLOT, G. et al. Insights into *Penicillium roqueforti* Morphological and Genetic Diversity **PLoS One**. v. 10, n. 6, 2015.

GÓMEZ-CARAVACA, A. M., GÓMEZ-ROMERO, M., ARRÁEZ-ROMÁN, D., SEGURA-CARRETERO, A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, p.1220- 1234, 2006.

GRANGE J. M. DAVEY R. W., Antibacterial properties of propolis (bee glue), **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 83, n. 3, p. 159–160, 1990.

GRIPON, J.-C.; AUBERGER, B.; LENOIR, J. Metalloproteases from *Penicillium caseicolum* and *P. roqueforti*: comparison of specificity and chemical characterization. **International Journal of Biochemistry**, v. 12, p. 451–455, 1980.

HA, J.K.; LINDSAY, R.C. Release of volatile branchedchain and other fatty acids from ruminant milk fats by various lipases. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.76, n.3, p.677-690, Mar. 1993.

HAYALOGLU, A., MCSWEENEY, P. Primary biochemical events during cheese ripening. **Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Developments**, v.1, p. 134–166, 2014.

IGOSHI, K.; HARA, H.; KOBAYASHI, H. Two kinds of extracellular protease from wheat bran medium cultured by *Penicillium roqueforti*. **Milk Science**, v. 56, p. 1–7, 2007.

IRLINGER, F.; BERGERE, J. L. Use of conventional biochemical tests and analyses of ribotype patterns for classification of micrococci isolated from dairy products. **Journal of Dairy Research**, v.66, p.91–103. 1999.

JECFA. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Sixtyseventh meeting of the Joint FAO/WHO **Expert Committee on Food Additives – JEFCA**. Toxicological recommendations and information on specifications, n. 58, 2007.

JOHNSON, M.; STEELE, J. Fermented dairy products in **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**, eds Doyle M. P., Buchanan R. L., editors. (Washington, DC: ASM Press;), 581–594, 2013.

KINSELLA, J.E.; HWANG, D.H. Enzymes of *Penicillium roqueforti* involved in the biosynthesis of cheese flavor. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Cleveland. v.8, n.1, p.191-228, 1976.

KOC, A. N.; SILICI, S.; MULTU-SARIGUZEL, F.; SAGDIC, O., Antifungal activity of propolis in four different fruit juices. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, p. 57–61, 2007.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHERECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico microbiológico**. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 1465p.

KROL W., SCHELLER S., SHANI J., PIETZ G., CZUBA Z., Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*, **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, v. 43, n. 5, p. 607–609, 1993.

LAM, L.K.T.; LI, Y.; HASEGAWA, S. Effects of citrus limonoids on glutathione S-transferase activity in mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 878-880, 1989.

LAMBERET, G.; MENASSA, A. Purification and properties of an acid lipase from *Penicillium roqueforti*. **Journal of Dairy Research**, v. 50, p. 459–468, 1983.

LEGAULT, J; PICHETTE, A. Potentiating effect of beta-caryophyllene on anticancer activity of alpha-humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 12, p.1643-1647, 2007.

LIBÉRIO, S. A.; PEREIRA, A. L.; ARAÚJO, M. J.; DUTRA, R. P.; NASCIMENTO, F. R.; MONTEIRO-NETO, V.; RIBEIRO, M. N.; GONÇALVES, A. G., GUERRA, R. N. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. **Journal of Ethnopharmacology** . v. 125, p.1–9, 2009.

LIMA, G. **Estudo sobre Mel, Cera e Própolis**. ApexBrasil, Brasília. 2008.

LIMA, C. D. L. C.; LIMA, L. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; FERREIRA, E. G.; ROSA, C. A. Lactic acid bacteria and yeasts associated with the artisanal Minas cheese produced in the region of Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 266-272, 2009.

LONGHINI, R.; RAKSA, S. M.; OLIVEIRA, A. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; FRANCO, S. L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 388-395, 2007.

LOURENÇO NETO, J. P. M. **Queijos: aspectos tecnológicos**. 1. ed. Juiz de fora: Master Graf, 2013.

- LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.18, p.447–454, 2008.
- MACHADO, S. G.; BAZZOLLI D, M. S.; VANETTI M, C. D. Development of a PCR method for detecting proteolytic psychrotrophic bacteria in raw milk. **International Dairy Journal**, v. 29, p. 8–14, 2013.
- MARCUCCI M. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26 p.83–99, 1995.
- MARTÍNEZ, M. A. et al. Effect of natamycin on cytochrome P450 enzymes in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 281-284, 2013.
- MARTINEZ-RODRIGUEZ, et al., Effect of high hydrostatic pressure on mycelial development, spore viability and enzyme activity of *Penicillium roqueforti*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 168, p. 42–46, 2014.
- MASE, T.; MATSUMIYA, Y.; MATSUURA, A. Purification and characterization of *Penicillium roqueforti* IAM 7268 lipase. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, p. 329–330, 1995.
- MENDES, M. V.; RECIO, E.; FOUCES, R.; LUITEN, R.; MARTÍN, J. F.; APARICIO, J. F. Engineered Biosynthesis of Novel Polyenes: A Pimaricin Derivative Produced by Targeted Gene Disruption in *Streptomyces natalensis*. **Chemistry & Biology**, v. 8, p. 635-644, 2001.
- MONNET, C.; BACK, A.; IRLINGER, F. Growth of Aerobic Ripening Bacteria at the Cheese Surface Is Limited by the Availability of Iron. **Applied and Environmental Microbiology**. v.78, p. 3185–3192, 2012.
- MONTVILLE T. J.; MATTHEWS K. R. Fermentative organisms in **Food Microbiology**, Washington, DC: ASM Press, 2005.
- MOREIRA, L.; DIAS, L. G.; PEREIRA, J. A.; ESTEVINHO, L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p. 3482–3485, 2008.
- MOUNIER, J.; MONNET, C.; JACQUES, N.; VALLAEYS, T.; ARDITI, R.; SARTHOU, A.S.; HÉLIAS, A.; IRLINGER, F. Microbial Interactions within a Cheese Microbial Community. **American for Society Microbiology**, v. 74, n.1., p. 172-181, 2008.
- MULYANINGSIH, S; SPORER, F., REICHLING J.; WINK, M. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. **Pharmaceutical Biology**, v.49, n.9, p. 893–899, 2011.
- NASCIMENTO JUNIOR, A. V. 2007. **A produção de própolis no Brasil**. In: Anais do IV Seminário de Própolis do Nordeste, ilhéus, 24–26 out. 2007, p. 36–43.

NCCLS. The National Committee for Clinical Laboratory Standards. The Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard. 6^a ed. **NCCLS document M7-A6**. Wayne (PA): NCCLS; 2003.

NUNES, C. A.; GUERREIRO, M. C. Characterization of Brazilian green propolis throughout the seasons by headspace GC/MS and ESI-MS **Journal of the Science of Food and Agriculture** v.92, p. 433–438, 2012.

NUNES, C. A.; PINHEIRO, A. C. M. **Senso Maker**, version 1.9. UFLA, Lavras - MG, 2014.

OBREGÓN A.C. **Métodos de Conservación em Cárnicos y Lácteos. Mundo Lácteo e Cárnico**, p. 24. 2004. Disponível em:
http://www.alimentariaonline.com/media/MLC003_metNutrert.pdf. Acesso em 12 jan 2017.

ORDOÑEZ, J. A et al. Tecnologia de alimentos. **Alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, v. 2, 2005.

ORSOLIC, N.; BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 265-273, 2003.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos da própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, n.3, p. 232-239, 1998.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; MOURA, F. F. Evaluation of brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science**, v.21, n.2, p.85-90, 2000.

PEREIRA D. A. **Extração aquosa de própolis e secagem em leite de espuma para uso em alimentos**. Dissertação (Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia), Itapetinga, 2008.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F.R. M. S.; NETO, F.R.A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 321–326, 2002.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, p. 293-300, 2003.

PRATT, D. E.; WATTS, B. M. The antioxidant activity of vegetable extracts. I: Flavone aglycones. **Journal of Food Science**, v.29, p.27-31, 1964.

RATHER, M. A.; DAR, B. A.; DAR, M. Y.; WANI, B. A.; SHAH, W. A.; BHAT, B. A.; GANAI, B. A.; BHAT, K. A.; ANAND, R.; QURISHI, M. A. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia L.* and its constituents. **Phytomedicine Jena**, v. 19, p. 1185-1190, 2012.

RESA, C. P. O.; JAGUS, R. J.; GERSCHESON, L. N. Natamycin efficiency for controlling yeast growth in models systems and on cheese surfaces. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 101-108, 2014

ROOSTITA, R.; FLEET, G. H. The occurrence and growth of yeasts in Camembert and Blue-veined cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.28, p.393-404, 1996.

ROSENTHAL, I.; BERNSTEIN, S.; ROSEN, B. Alkaline phosphatase activity in *Penicillium roqueforti* and blueveined cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 16–19, 1996.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. The role of the phenetyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. **Fitoterapia**, v. 73 p. 530-537, 2002.

SCHNITZLER, P.; NEUNER, A.; NOLKEMPER, S.; ZUNDEL, C.; NOWACK, H.; SENSCH, K. H., Reichling, J. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. **Phytotherapy Research** v. 24, p.20–28. 2010.

SCOTT, R.; ROBINSON R. K.; WILBEY R. A. **Fabricación de Queso**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 2002

SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas empresas) 2010. Exportação Brasileira de Cera de Abelha (Própolis). Disponível em <http://www.sebrae.com.br/setor/apicultura/sobre/apicultura/mercado/exportacoes/Exportacoes%20Julho.pdf>; acesso em 14 fev. 2017.

SENGUNA, I. Y., NIELSEN, D. S., KARAPINAR, M., & JAKOBSEN, M. Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. **International Journal Food Microbiology**, v. 135, p. 105-111, 2009.

SHEEHAN J. J. Milk quality and cheese diversification. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**. v. 1, p.52243–5253, 2013.

SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V. C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S. M. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 4, n. 1, p.1-4, 2007.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 536p.

SMÂNIA, A. Jr.; MONACHE, F.D.; SMÂNIA, E.F.; GIL, M.L.; BENCHETRIT, L.C.; CRUZ, F.S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. **Journal Ethnopharmacol**. v. 45, p. 177-181. 1995.

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 99, 69–73. 2005

SMI (STANDARDS FOR MICROBIOLOGY INVESTIGATIONS). **Identification of *Staphylococcus* species, *Micrococcus* species and *Rothia* species** **Bacteriology – Identification** v. 7, n.3, p. 9 -32, 2014.

SZLISZKA, E.; KUCHARSKA, A. Z.; SOKOL-LETOWSKA, A.; MERTAS, A.; CZUBA, Z. P.; KROL, W. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Effect of Ethanolic Extract of Brazilian Green Propolis on Activated J774A.1 **Macrophages. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM.** 976415, 2013

TEIXEIRA, E.W., MESSAGE, D., MEIRA, R. M. S. A.; SALATINO, A. Indicadores da origem botânica da própolis, importância e perspectivas. Revisão bibliográfica. **Boletim de Indústria Animal**, v. 60, p. 83-106, 2003.

THOMAS, L. V.; INGRAM-, R. E.; BEVIS, H. E.; BRIGHTWELL, P.; WILSON, N.; DELVES-BROUGHTON, J. Natamycin Control of Yeast Spoilage of Wine. **International Association for Food Protection - Food Protection Trends**, v. 25, p. 510-517, 2005.

VALENTE, M. J.; BALTAZAR, A. F.; HENRIQUE, R.; ESTEVINHO, L. M.; CARVALHO, M. Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth in vitro. **Food and Chemical Toxicology** v. 49, p. 86–92. 2011.

VALENTINE, N. et al. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 71, n.1, p. 58-64. 2005.

VAN DEN TEMPEL, T. AND JAKOBSEN, M. Yeasts associated with Danablu. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 25-31, 1998.

VELAZQUEZ, C., et al. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. **Applied Microbiology**. v. 103, p.1747–1756, 2007.

VERRAES, C. et al. A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. **International Dairy Journal**, v. 50, 2015.

WELTHAGEN, J. J.; VILJOEN, B. C. The isolation and identification of yeasts obtained during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. **Food Microbiology**, v.16, p.63-73, 1999.

WINK M. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures used in phytomedicine. **Current Drug Metabolism**, v.9, p. 996–1009, 2008.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedure for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**. v. 37, n.2, p. 99-105, 1998.

WYDER, M.T. & PUHAN, Z. Role of selected yeasts in cheese ripening: evaluation in aseptic cheese curd slurries. **International Dairy Journal**, v.9, p.117-124, 1998.

YANG, E.; FAN, L.; JIANG, Y.; DOUCETTE, C.; FILLMORE, S. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. **AMB Express**. v. 10, n. 2, p.48-54, 2012.

ANEXO A- Estimativa do custo de aplicação do extrato de própolis verde

Estimativa do custo de produção da aplicação de EEPV em queijo tipo Gorgonzola segundo as conclusões dessa pesquisa

Custo de 1kg de própolis bruta de boa qualidade: R\$200,00

Custo de 1L de etanol laboratorial 92,3%: R\$7,00

Custo de 1L de EEPV a 5% (concentração ideal de uso segundo as conclusões do trabalho): R\$21,20 ou R\$ 0,021/mL

Área aproximada de uma peça inteira de queijo tipo Gorgonzola: 2160cm²

Necessidade de EEPV em mL para recobrir toda a superfície do queijo (segundo metodologia utilizada no trabalho): 10,3mL

Estimativa do custo da matéria-prima utilizada: $10,3 * 0,021 = R\$0,22$ por peça de queijo. Com 1L de EEPV a 5% se produz 97 queijos.

Estimativa do custo de produção da aplicação de natamicina em queijo tipo Gorgonzola

Para realização dessa estimativa foi realizada consulta a funcionários de laticínio local.

Custo de 1L de natamicina: R\$250,00

Diluição utilizada: 300mL/400L de água => R\$75/400mL

Rendimento: 200 queijos

Estimativa de custo: R\$0,38/queijo

Obs.: O laticínio citado dilui a natamicina em salmoura para evitar custos de mão-de-obra, portanto isso justifica o maior custo.