

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**ESCOLA DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Ana Carolina Alves Vieira

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE PROPRIEDADES PROBIÓTICAS E TECNOLÓGICAS  
DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJO ARTESANAL DA  
SERRA GERAL (MG)**

Belo Horizonte

2022

Ana Carolina Alves Vieira

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE PROPRIEDADES PROBIÓTICAS E TECNOLÓGICAS  
DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJO ARTESANAL DA  
SERRA GERAL (MG)**

Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**Área de concentração:** Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

**Orientador:** Marcelo Resende de Souza

**Coorientadoras:** Elisa Helena Paz

e Carla Ferreira Soares

Belo Horizonte

2022

V658a Vieira, Ana Carolina Alves, 1996-  
Avaliação *in vitro* de propriedades probióticas e tecnológicas de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo artesanal da Serra Geral (MG) /Ana Carolina Alves Vieira . - 2022.  
76 f.

Orientador: Marcelo Resende de Souza  
Coorientadoras: Elisa Helena Paz  
Carla Ferreira Soares

Bibliografias: f. 66 a 76  
Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre.  
Área de concentração: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

1. Queijo de Minas - Qualidade - Teses - 2. Bactérias produtoras de ácido láctico - Teses - 3. Probióticos - Teses - 4. Leite fermentado - Análise - Teses - I. Souza, Marcelo Resende de - II. Paz, Elisa, Helena - III. Soares, Carla Ferreira - IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - V. Título.

CDD - 637

Bibliotecária responsável Cristiane Patricia Gomes - CRB2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANA CAROLINA ALVES VIEIRA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Aprovado(a) em 18 de fevereiro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Marcelo Resende de Souza - Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Elisabeth Neumann

Dr.(a). Leonardo Borges Acurcio



Documento assinado eletronicamente por Marcelo Resende de Souza, Professor do Magistério Superior, em 18/02/2022, às 14:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Leonardo Borges Acurcio, Usuário Externo, em 21/02/2022, às 06:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Elisabeth Neumann, Professora do Magistério Superior, em 22/02/2022, às 15:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 1240228 e o código CRC 85FA1A85.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente a Deus por toda força e sabedoria.

A minha mãe, Selma, por sempre me apoiar, acreditar em mim e me dar forças.

Aos meus familiares e amigos por todo apoio e incentivo.

Ao meu noivo, Ialys, por sempre acreditar em mim e sempre me ajudar.

Aos meu orientador Marcelo e as coorientadoras Elisa e Carla, por todo conhecimento, disponibilidade e auxílio para que eu chegasse até aqui.

Aos professores do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal (DTIPOA) pelos ensinamentos.

Ao professor Leonardo Acurcio por me inspirar e me incentivar a trilhar pelo caminho da Inspeção.

A Luciana pela doação das bactérias para as análises do presente trabalho.

A toda equipe dos laboratórios onde foram realizadas as pesquisas, em especial a Isabela, Karen, Gabriela e Elisabeth, que me auxiliaram e permitiram que fossem realizadas as análises.

Aos colegas Thamiris, Gustavo e João Paulo, pelo importante auxílio nas análises realizadas, companheirismo, paciência e dedicação.

Ao Gustavo pela realização das análises estatísticas.

Aos membros da banca Elisabeth, Leonardo, Bruna e Cláudia, pela disponibilidade de estarem presentes e auxiliarem neste momento tão importante.

Ao colegiado de pós-graduação e a CAPES, pela bolsa concedida.

## Resumo

Os queijos artesanais, devido ao uso do leite cru e pingo, são uma importante fonte de micro-organismos, como as bactérias ácido-láticas, as quais podem apresentar potencial efeito probiótico. Existem pesquisas *in vitro* sobre o potencial probiótico de BAL isoladas de queijos artesanais. Porém, até o momento, não existem, pesquisas sobre o potencial probiótico *in vitro* de BAL isoladas de queijo artesanal da região da Serra Geral, bem como de suas matérias-primas e ambiente de produção. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial probiótico *in vitro* de BAL isoladas de queijo artesanal da Serra Geral em diferentes períodos de maturação, além de leite cru e pingo utilizados em sua elaboração; bem como BAL isoladas de bancadas presentes nas instalações destinadas à produção desse alimento, a partir dos testes de antibiograma, tolerância ao suco gástrico e sais biliares e antagonismo. Também foi feita a avaliação do potencial tecnológico de duas BAL com melhores resultados *in vitro*, a partir da produção de leite fermentado e avaliação físico-química e microbiológica desse produto. Foi possível observar que as bactérias avaliadas no presente trabalho foram capazes de sobreviver aos sais biliares artificiais, porém apresentaram baixa sobrevivência ao suco gástrico artificial. Apesar disso, existem métodos como a veiculação dessas bactérias à produtos lácteos (capazes de gerar certa proteção a esses micro-organismos) e a microencapsulação. Somado a isso, os testes *in vitro* não simulam totalmente a realidade do trato gastrointestinal humano. Essas bactérias foram capazes de produzir halos de inibição contra micro-organismos patogênicos avaliados sem inibir a BAL isolada de queijo Minas artesanal. Em relação ao teste de antibiograma, foi observado um perfil de múltipla resistência a diversos antimicrobianos testados, sendo necessário avaliações mais profundas e estudos sobre a possível transmissão de genes de resistência a outras bactérias. A bactéria selecionada para a produção de leite fermentado, foi capaz de coagular o leite após 24 de fermentação e atendeu a todos os requisitos microbiológicos e físico-químicos, exceto para o teor de proteína, segundo a legislação vigente para leite fermentado.

**Palavras-chave:** Micro-organismos probióticos; Efeitos benéficos; Leite fermentado.

## Abstract

Artisanal cheeses, due to the important use of raw milk and drip, are a source of microorganisms, such as lactic acid bacteria, which may have a potential probiotic effect. There is in vitro research on the probiotic potential isolated from artisanal cheeses. However, to date, there is no research on the in vitro probiotic potential of LAB isolated from artisanal environments in the Serra Geral region, such as cheese from its raw materials and production. With this, the present work aimed to evaluate the in vitro probiotic potential of BAL and artisanal cheese isolates from Serra Geral in different maturation periods, in addition to the objective of raw milk used in its elaboration; as well as BALAIS isolated from benches presented in the facilities tested for the production of this food, from the juice tolerance tests and bile salts and bile salts. An evaluation of the technological potential of two LAB with better in vitro results was also made, from the production of fermented milk and physical-chemical and microbiological evaluation of this product. It was observed that the juice survival aids were not able to survive the gas but showed artificial low juice. Despite this, there are methods such as the transmission of bacteria to dairy products (capable of generating some protection to these microorganisms) and microencapsulation. Added to this, in vitro tests do not fully simulate the reality of the human gastrointestinal tract. These bacteria were produced in the manufacture of generation halos against pathogenic microorganisms isolated from Minas. In other bacteria, in the antibiogram test, a resistance profile was observed to several tested antimicrobials, requiring deeper estimates and studies on the possible transmission of resistance genes to resistance. The bacteria for the production of fermented milk selected, was able to coagulate the milk after 24 hours of fermentation and met all microbiological and physicochemical requirements, except for the protein content, according to the current legislation for fermented milk.

**Key-words:** Probiotic microorganisms; Beneficial effects; Fermented milk.

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1. Região da Serra Geral-MG .....	29
Figura 2. Média dos halos de inibição (mm) e desvios-padrão do teste de antagonismo <i>in vitro</i> de BAL contra <i>S. aureus</i> .....	44
Figura 3. Média dos halos de inibição (mm) e desvios-padrão do teste de antagonismo <i>in vitro</i> de BAL contra <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	45
Figura 4. Média dos halos de inibição (mm) e desvios-padrão do teste de antagonismo <i>in vitro</i> de BAL contra <i>L. monocytogenes</i> .....	46
Figura 5. Média dos halos de inibição (mm) e desvios-padrão do teste de antagonismo <i>in vitro</i> de BAL contra <i>E. coli</i> .....	47
Figura 6. Absorbância da amostra <i>Levilactobacillus brevis</i> (LB) frente ao suco gástrico artificial (pH 2,0) e controle (pH 7,0) .....	52
Figura 7. Absorbância da amostra <i>Lactococcus lactis</i> (LL) frente ao suco gástrico artificial (pH 2,0) e controle (pH 7,0) .....	53
Figura 8. Absorbância da amostra <i>Levilactobacillus brevis</i> (LB) frente a sais biliares (Oxgall 0,3%) e controle (MRS puro) .....	54
Figura 9. Absorbância da amostra <i>Lactococcus</i> (LL) frente a sais biliares (Oxgall 0,3%) e controle (MRS puro) .....	55
Figura 10. Acidez titulável dos leites fermentados por <i>Lactococcus lactis</i> (LL) em diferentes dias de estocagem a 7° .....	58
Figura 11. pH dos leites fermentados por <i>Lactococcus lactis</i> (LL) em diferentes dias de estocagem a 7°C .....	58
Figura 12. Teor de proteína dos leites fermentados por <i>Lactococcus lactis</i> (LL) em diferentes dias de estocagem a 7°C .....	59
Figura 13. Teor de umidade dos leites fermentados por <i>Lactococcus lactis</i> (LL) em diferentes dias de estocagem a 7°C .....	60
Figura 14. Contagem de BAL de leite fermentado com <i>Lactococcus lactis</i> (LL) em diferentes dias de estocagem a 7°C .....	62

---

## LISTA DE QUADROS

---

Quadro 1. Componentes de um dossiê técnico-científico .....	17
Quadro 2. Espécie, código e matriz das bactérias selecionadas para avaliação <i>in vitro</i> de potencial probiótico .....	30
Quadro 3. Classificação do perfil de resistência a antimicrobianos .....	32
Quadro 4. Perfil de sensibilidade das BAL isoladas de queijo artesanal da Serra Geral frente a antimicrobianos de importância clínica.....	39

Quadro 5. Média dos halos de inibição (mm) das BAL avaliadas frente ao patógeno <i>Salmonella</i> var. Typhimurium .....	48
Quadro 6. Média dos halos de inibição (mm), desvio-padrão e coeficiente de variação (%) do teste de antagonismo de amostras de BAL para cada bactéria revelador.....	49
Quadro 7. Média dos halos de inibição (mm), desvio-padrão e coeficiente de variação (%) do teste de antagonismo de amostras de BAL frente às bactérias reveladoras .....	49
Quadro 8. Percentual de inibição e classificação quanto ao nível de tolerância ao ácido gástrico artificial (pH 2,0) e aos sais biliare artificias (Oxgall 0,3%) de BAL isoladas de queijo artesanal da Serra Geral-MG .....	50
Quadro 9. Resumo dos resultados obtidos pelas amostras <i>Lactococcus lactis</i> (LL) e <i>Levilactobacillus brevis</i> (LB) nos testes de avaliação do potencial probiótico <i>in vitro</i> .....	56
Quadro 10. Requisitos físico-químicos para leites fermentados segundo a IN nº 46 de 2007 do MAPA.....	61
Quadros 11. Requisitos microbiológicos para leites fermentados segundo a IN nº 46 de 2007 do MAPA .....	61

---

#### LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

BAL	Bactérias ácido-láticas
QMA	Queijo Minas artesanal
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
MRS	De Man, Rogosa e Sharpe
UV	Ultravioleta
FAO/OMS	Food and Agriculture/Organização Mundial da Saúde
BHS	Enzima hidrolase de sais biliare
IL-6	Interleucina-6
UFC	Unidades formadoras de colônias
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
FDA	Food and Drug Administration
DO	Densidade Óptica
IJSEM	International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology

---

---

## LISTA DE SÍMBOLOS

---

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
ml	Mililitros
cm	Centímetros
g	Gramas
%	Por cento
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual
>	Maior que

---

---

## SUMÁRIO

---

1. Introdução.....	12
2. Objetivos.....	13
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. Revisão de literatura.....	14
3.1. Probióticos.....	14
3.1.1. Histórico e definição .....	14
3.1.2. Mecanismos de ação e efeitos benéficos.....	15
3.1.3. Critérios para o desenvolvimento de pesquisas em potenciais probióticos .....	15
3.2. Bactérias ácido-láticas (BAL).....	18
3.2.1. Definição .....	18
3.2.2. Gênero <i>Leuconostoc</i> .....	19
3.2.3. Família <i>Lactobacillaceae</i> .....	20
3.2.4. Gênero <i>Pediococcus</i> .....	21
3.2.5. Gênero <i>Lactococcus</i> .....	22
3.2.6. Potencial probiótico de BAL isoladas de queijos artesanais.....	22
3.3. Leites fermentados.....	25
3.3.1. Histórico e definição.....	25
3.3.2. Elaboração de leites fermentados com potenciais probióticos.....	26
4. Materiais e métodos.....	28
4.1. Coleta de amostras de BAL oriundas de queijo artesanal, pingo, leite cru e superfície de bancada.....	28
4.2. Pesquisa do potencial probiótico.....	30

4.2.1. Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos.....	31
4.2.2. Teste de antagonismo <i>spot on the law</i> .....	32
4.2.3. Teste de resistência ao suco gástrico artificial .....	33
4.2.4. Teste de resistência a sais biliares .....	34
4.3. Elaboração de leite fermentado .....	35
4.3.1. Análises microbiológicas do leite reconstituído.....	35
4.3.2. Teste de fermentação.....	36
4.3.3. Produção de leite fermentado .....	36
4.3.4. Análises físico-químicas .....	37
4.3.5. Análises microbiológicas .....	37
4.4. Análises estatísticas .....	37
5. Resultados e Discussão.....	38
5.1. Susceptibilidade a antimicrobianos.....	38
5.2. Antagonismo <i>spot on the law</i> .....	43
5.3. Sobrevivência ao suco gástrico artificial e sais biliares.....	50
5.4. Produção de leite fermentado.....	55
5.4.1. Análises físico-químicas .....	56
5.4.2. Análises microbiológicas em leite em pó e leite fermentado.....	61
6. Conclusão .....	62
7. Referências .....	64

---

## 1. Introdução

Queijos artesanais são muito comuns na dieta dos consumidores graças aos seus benefícios nutricionais e atributos sensoriais. Além disso, cada vez mais, esses produtos vêm gerando interesse científico, devido ao fato de veicularem micro-organismos com potencial efeito probiótico (DE LA ROSA-ALCARAZ, 2020). Segundo a Lei Estadual nº 23.157 de 2018, publicada pelo IMA: “entende-se por queijo artesanal, aquele elaborado com leite integral, fresco ou cru, com características de identidade e qualidade específicas” (MINAS GERAIS, 2018).

Bactérias ácido lácticas (BAL) compreendem um grupo de micro-organismos capazes de produzir ácido-lático a partir da fermentação de açúcares, como a lactose (BURGAING et al., 2014). Alguns desses micro-organismos são considerados probióticos, por exercerem efeitos benéficos à saúde do consumidor (HERMANNNS et al., 2014). Existe um grande potencial tecnológico para o uso de BAL isoladas de produtos lácteos artesanais, como o queijo, e isso vem gerando um interesse cada vez maior pelo estudo e identificação dessa microbiota, além da avaliação de suas potenciais propriedades probióticas (SILVA, 2016). Segundo a FAO/WHO (2002), “probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidade suficiente, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”.

Existem diversos estudos relacionados às pesquisas *in vitro* sobre o potencial probiótico de BAL isoladas de queijos artesanais. Dentre eles, encontram-se os trabalhos de Costa et al. (2013) e Andrade et al. (2014), que avaliaram o potencial probiótico *in vitro* de BAL isoladas de queijo Minas artesanal (QMA) da Canastra e Silva et al. (2019), que avaliaram o potencial probiótico *in vitro* de *Lactobacillus* spp. isolados de QMA de Araxá. Porém, até o momento, não existem, na literatura, pesquisas sobre o potencial probiótico *in vitro* de BAL isoladas de queijo artesanal da região da Serra Geral, bem como de suas matérias-primas e ambiente de produção.

A avaliação das potenciais propriedades probióticas de BAL isoladas de queijos artesanais é importante para o consumidor, para a ciência, para a economia e também para se agregar valor econômico a esses queijos, devido à possibilidade de identificação de novos micro-organismos probióticos. Com isso, a investigação sobre o potencial probiótico de micro-organismos isolados de queijo artesanal da região da

Serra Geral, em diferentes períodos de maturação, bem como de sua matéria prima e ambiente de produção é necessária para ampliar o conhecimento sobre o queijo elaborado nessa região.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar o potencial probiótico, *in vitro*, de BAL isoladas de queijo artesanal da Serra Geral, além de leite cru e pingo utilizados em sua elaboração; bem como de BAL isoladas de bancadas presentes nas instalações destinadas à produção desse alimento. Além de avaliar o potencial tecnológico de duas BAL com os melhores resultados *in vitro*, a partir da produção de leite fermentado e análises físico-químicas e microbiológicas desse produto.

### **2.2. Objetivos específicos**

Estudar o potencial probiótico, *in vitro*, de BAL isoladas de queijo artesanal da Serra Geral, bem como das suas matérias-primas e ambiente de produção, a partir dos testes:

- Avaliação da sensibilidade a diferentes classes de antimicrobianos de importância clínica, a fim de avaliar se esses micro-organismos são seguros para consumo humano;
- Avaliação do potencial de inibição dessas BAL contra micro-organismos patogênicos, obtidos de amostras de coleção (ATCC), sendo eles: *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591), *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) e *Escherichia coli* (ATCC 25922); além de uma BAL (*Levilactobacillus brevis*), isolada por Valente (2021), de QMA do Campo das Vertentes, a fim de avaliar se as BAL avaliadas são capazes de inibir micro-organismos indesejáveis sem inibir micro-organismos desejáveis;
- Avaliação do perfil de tolerância dessas BAL frente ao suco gástrico artificial e sais biliares, a fim de determinar se esses micro-organismos são capazes de sobreviver às

condições adversas do trato gastrointestinal do hospedeiro e chegar viáveis ao seu local de ação;

- Seleção de duas bactérias com melhores resultados nos testes *in vitro* realizados para a avaliação de seu potencial tecnológico, a partir da fermentação de leite e análises físico-químicas e microbiológicas.

### **3. Revisão de literatura**

#### **3.1. Probióticos**

##### **3.1.1. Histórico e definição**

No início do século XX, o cientista Elie Metchnikoff, avaliou que BAL eram capazes de gerar benefícios à saúde e contribuir para a longevidade de seus hospedeiros, graças a estudos com camponeses da Bulgária, que ingeriam alimentos à base de leite fermentado, e, com isso, possuíam maior longevidade. Ele propôs, então, a ocorrência da modificação da microbiota intestinal, a partir do uso de micro-organismos benéficos, capazes de substituir microrganismos indesejáveis produtores de substâncias tóxicas. A partir disso, esse cientista criou uma dieta de leite fermentado incrementado com uma bactéria denominada, por ele, de “bacilo búlgaro” (BIBEL, 1988). Após, no ano de 1935, surgiu o primeiro produto veiculador de probióticos disponível no mercado, um leite fermentado com presença de *Lactobacillus casei* (RAUTAVA e WALKER, 2009).

Porém, apenas em 1965, Lilly e Stillwell (1965) propuseram a primeira definição de probióticos, como sendo substâncias liberadas por micro-organismos que estimulavam o crescimento de outros micro-organismos. Em 1975, Parker definiu probióticos como sendo micro-organismos e substâncias que afetam o equilíbrio da microbiota intestinal (PAKER, 1975). Já Fuller (1989) os definiu como suplementos alimentares que continham bactérias vivas que produziam efeitos benéficos no hospedeiro, favorecendo o equilíbrio de sua microbiota intestinal. Havenaar e Huis In't Veld (1992) os classificaram como culturas únicas ou mistas de micro-organismos que, quando administrados em animais ou humanos, produziam efeitos benéficos no hospedeiro por incremento das propriedades da microbiota nativa.

Após, ainda houveram outras definições, até que em 2002 foi proposto pela FAO/WHO, a classificação mais aceita até os dias atuais, a qual define probióticos como: “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidade suficiente, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002).

### **3.1.2. Mecanismos de ação e efeitos benéficos**

Existem diversos efeitos benéficos e mecanismos de ação associados ao uso de probióticos, comprovados cientificamente, como a redução da intolerância à lactose, graças a ação da enzima  $\beta$ -galactosidase (DE VRESE et al., 2014); melhora e prevenção de quadros de alergia a leite, devido a pré-hidrólise da enzima  $\beta$ -lactoglobulina (PESCUMA et al., 2015); redução do risco de desenvolvimento de tumores malignos, devido a diminuição dos níveis das enzimas  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -azoredutase e nitroredutase (VASILJEVIC e SHAH, 2008); efeito hipocolesterolêmico, a partir da desconjugação de sais biliares pela enzima hidrolase de sais biliares (BSH) (PERES et al., 2014); inibição de agentes patogênicos intestinais a partir da secreção de componentes proteicos ou ácido orgânico; diminuição da capacidade de adesão de patógenos a células epiteliais intestinais; redução da inflamação da mucosa, estabilidade da barreira gástrica e competição por nutrientes (ZHENG et al., 2014) efeito imunomodulador (LAHTEINEN et al., 2014) e aumento da expressão de células caliciformes, responsáveis pela secreção de muco. Esse muco é composto por mucinas, lisozima e ácidos graxos, os quais possuem ação bactericida (MELLO et al., 2013).

Além disso, estudos vêm demonstrando a ação dos probióticos no sistema nervoso central, os chamados psicobióticos, capazes de reduzir o estresse, ansiedade e depressão de seu hospedeiro (ANDERSON et al., 2017).

### **3.1.3. Critérios para o desenvolvimento de pesquisas em potenciais probióticos**

Para a utilização de micro-organismos como probióticos, eles devem ser avaliados e apresentar determinadas características para poderem ser classificados como probióticos e, assim, serem vinculados a alimentos, por exemplo. Essas características

incluem: ter uma identificação internacionalmente conhecida de espécie e subespécie; resistir à acidez gástrica e aos sais biliares; apresentar efeitos benéficos para o hospedeiro (demonstrados *in vivo* e *in vitro*, por meio de uma dose conhecida); apresentar segurança comprovada; estar viável até ao momento da sua administração, entre outras (FAO/OMS, 2002)

No Brasil, para a utilização de probióticos veiculado por alimentos, é necessária uma avaliação prévia pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), segundo requisitos da Resolução RDC nº 241, de 27 de julho de 2018. Essa avaliação abrange três fundamentos essenciais: comprovação explícita da identidade da linhagem do micro-organismo, de sua segurança e de seu efeito benéfico (ANVISA, 2018). Com isso, para auxiliar nas pesquisas de potenciais probióticos, principalmente por indústrias que necessitam obter autorização para comercializarem produtos com uma linhagem de micro-organismo probiótico, foi criado um dossiê técnico-científico (quadro 1) (ANVISA, 2021).

Quadro 1. Componentes de um dossiê técnico-científico

<b>APRESENTAÇÃO DO DOSSIÊ</b>		
Identificar linhagem do microrganismo e alegação pretendida, informar o produto em que será utilizado, o público-alvo, a dose recomendada, as condições e restrições de uso, advertências e potenciais efeitos adversos		
<b>Comprovação de identidade</b>	<b>Comprovação da segurança</b>	<b>Comprovação do benefício</b>
Nomenclatura	Identidade da classe de risco	Alegações de propriedades funcionais e de saúde
Depósito em coleção de cultura	Histórico de uso	Estudos para caracterização da linhagem probiótica
Origem da linhagem	Revisão de literatura	Estudos para comprovação do benefício de uma alegação
Identificação	Ensaio <i>in vitro</i>	Busca da totalidade de evidências
	Ensaio em animais	Avaliação da qualidade dos estudos
	Ensaio em humanos	Avaliação da totalidade das evidências
	Vigilância pós-mercado	Comprovação de uma alegação em mistura de probióticos

Fonte: ANVISA, 2021.

Segundo este dossiê (ANVISA, 2021), para avaliação de um potencial probiótico, devem ser realizadas a comprovação de sua identidade, a partir da identificação em nível de espécie, de acordo com a nomenclatura binominal mais atual; além da identificação e caracterização em nível de linhagem, por meio de testes fenotípicos e genotípicos, da especificação da origem da linhagem e da comprovação do depósito da linhagem em uma coleção de cultura internacionalmente reconhecida.

A comprovação da segurança desse micro-organismo, outra etapa importante da avaliação, pode ser feita por meio de documentos técnicos ou estudos científicos que

demonstrem comprovação de um histórico de uso seguro do mesmo; ausência de registros de eventos adversos relevantes, obtidos por meio de estudos clínicos ou vigilância pós-uso; ausência de fatores de virulência e patogenicidade relevantes para a saúde humana; ausência de produção de substâncias ou metabólitos que apresentem risco à saúde humana; ausência de resistência à antimicrobianos de importância clínica, a qual pode ser transferível, e susceptibilidade a, pelo menos, dois antibióticos (ANVISA, 2021).

Também deve ser comprovado o efeito benéfico à saúde associado ao uso do probiótico avaliado. Esse efeito pode ter caráter geral ou específico. Essa comprovação requer demonstração da sobrevivência às condições adversas do trato digestório humano (sais biliares e pH ácido do estômago) e evidência de efeito em humanos obtida por meio de estudos, sendo realizados a partir de testes *in vitro* e *in vivo* (modelo animal e humano). Outros testes incluem avaliação do potencial efeito antagonista frente a micro-organismos indesejáveis; facilidade de cultivo; tolerância a aditivos alimentares; estabilidade no alimento (avalia se o potencial probiótico se mantém viável e na concentração adequada - mínimo  $10^7$  UFC/g - por toda vida de prateleira do produto) e estabilidade à manipulação (ANVISA, 2021).

## **3.2. Bactérias ácido-láticas (BAL)**

### **3.2.1. Definição**

BAL são um grupo de micro-organismos que se apresentam na forma de cocos ou bacilos, possuindo células simples, duplas ou tétrades, podendo formar pequenas ou grandes cadeias. Além disso, são caracterizadas como Gram positivo, não formadoras de esporos e catalase negativo. Esses micro-organismos são capazes de produzir ácido láctico como um dos principais metabólitos da fermentação de carboidratos, podendo ser classificadas como homofermentativas ou heterofermentativas, de acordo com produto formado pela fermentação. Homofermentativas produzem ácido láctico como principal produto da fermentação da glicose, já heterofermentativas são capazes de elaborar outras substâncias além do ácido láctico, como o dióxido de carbono, ácido acético e etanol (VINDEROLA, 2019).

Essas bactérias geralmente se encontram distribuídas na natureza de maneira ampla, podendo ser isoladas de ambientes como solo, água, esgoto, silagem, trato intestinal e respiratório, boca e pele de humanos e animais, ocorrendo também em alimentos como frutas, produtos vegetais, carne e leite (KÖNIG et al., 2017). Alguns gêneros representantes desse grupo de bactérias são: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Fructobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (VINDEROLA, 2019).

O gênero *Lactobacillus* spp. foi descrito pela primeira vez em 1901, como *Lactobacillus delbrueckii*, uma espécie indispensável no iogurte, e cresceram exponencialmente desde o início do século 21, graças a novos métodos de sequenciamento genético, sendo que atualmente, são reconhecidas um total de 261 espécies de *Lactobacillus*. Com isso, o International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) divulgou em 2020, uma nova classificação, separando as espécies da família Lactobacillaceae sob *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus* e 23 novos gêneros, com base em várias abordagens e marcadores genéticos (identidade média de nucleotídeos, identidade média de aminoácidos, identidade de aminoácidos do gene central, filogenia do genoma central, genes de assinatura e critérios metabólicos ou ecológicos) (ZHENG et al., 2020).

### 3.2.2. Gênero *Leuconostoc*

O gênero *Leuconostoc* inclui bactérias Gram positivo, células em formato ovoide, anaeróbica facultativa, catalase negativa e heterofermentativa, capazes de produzir ácido lático, D-lactato, CO<sub>2</sub> e etanol, como resultado de sua fermentação. São geralmente encontradas em plantas, de onde se disseminam a outros *habitats*, como o leite cru. Esse gênero inclui 19 espécies ou subespécies, dentre elas: *Leuconostoc mesenteroides* com quatro subspécies, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* e *L. mesenteroides* subsp. *suionicum*, (JEON et al., 2017).

A partir do metabolismo do *Leuconostoc* sp. ocorre a produção de lactose e lactato, os quais contribuem para as propriedades sensoriais de derivados lácteos (KOT et al., 2014). Graças a isso, espécies como *L. mesenteroides* subsp. *Mesenteroides*, *L.*

*mesenteroides* subsp. *Cremonis* e *L. pseudomesenteroides* são geralmente usadas como culturas para a produção de aroma em produtos lácteos fermentados (ALI et al., 2013). Além de sua importância industrial, esses micro-organismos também podem ser utilizados como probióticos, sendo considerados seguros (GRAS - *generally recognized as safe*) (OGIER et al., 2008).

Estudos têm demonstrado a ação bacteriocinogênica desses micro-organismos. Os pesquisadores Jerônimo-Ceneviva (2013) e Paula et al. (2014) observaram, a partir de estudos *in vitro*, que as cepas *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (SJRP55) e (SJRP58) produziram substâncias bacteriostáticas capazes de inibir o crescimento de *L. monocytogenes*, *Aeromonas* sp., *Aeromonas sobria*, *Citrobacter* sp., *Citrobacter freudii*, *Campylobacter* sp. e *Escherichia coli*. Esta característica é de grande interesse para a indústria, pois sua aplicação pode contribuir para a segurança dos alimentos.

### 3.2.3. Família *Lactobacillaceae*

Os *Lactobacillus* foram isolados pela primeira vez em 1900, pelo pediatra alemão Ernest Moro, a partir das fezes de lactentes amamentados com leite materno, atribuindo-lhe o nome de *Bacillus acidophilus*. Essa família classificada como Gram positivo, não formadoras de esporos, possuem formato bacilar ou cocobacilar. São divididos em homofermentativos, heterofermentativos facultativos e heterofermentativos obrigatórios (RAIZEL et al., 2011). Eles podem ser encontrados no solo, água e nas plantas, principalmente na vegetação em decomposição. Além do trato gastrointestinal e trato genital feminino de humanos e animais, como comensais (COUDEYRAS et al., 2008).

Esses micro-organismos são comumente utilizados na elaboração de alimentos devido à sua ação conservante e acidificante, contribuindo para o aumento de sabor, textura, nutrição e conservação do produto final. Esses micro-organismos são utilizados como culturas *starters* ou adjuvantes para produção de alimentos e bebidas, como queijo, vegetais fermentados, carnes fermentadas, vinho e cerveja, pão de massa fermentada, entre outros. São capazes de gerar uma rápida redução do pH da matéria-prima graças a produção de ácido lático, como o principal produto catabólico (GIRAFFA et al.,

2010). Esse gênero é frequentemente utilizado como probiótico, principalmente por ser considerado GRAS (*Generally Recognised As Safe*) (OLIVEIRA et al., 2002).

#### 3.2.4. Gênero *Pediococcus*

Bactérias do gênero *Pediococcus* sp. possuem formato de cocos, geralmente organizados em tétrades, são Gram positivo, não formadoras de esporos, homofermentativas, anaeróbicas facultativas e não possuem motilidade (ZHANG et al., 2005). Esse gênero normalmente é encontrado na microbiota humana e animal (PORTO et al., 2017), além disso, já foi isolado de alimentos fermentados e não fermentados, como leites, queijos, bambu, sorgo, entre outros (BELHADJ et al., 2014).

A espécie *Pediococcus pentosaceus* é utilizado como cultura *starter* na fermentação de produtos vegetais, salsichas e alguns produtos cárneos e lácteos. Algumas cepas são utilizadas para bioconservação desses alimentos, graças a produção de peptídeos antimicrobianos que inibem a multiplicação de patógenos e deteriorantes, podendo ainda serem utilizadas como probióticas. Alguns desses micro-organismos são capazes de produzir a pediocina, bactericina pertencente a classe II de peptídeos antimicrobianos produzidos por BAL, sendo não-antibióticos e estáveis ao calor (PORTO et al., 2017).

É crescente o número de estudos que demonstram a capacidade probiótica de *Pediococcus pentosaceus*, como o trabalho realizado por Lv et al. (2014), no qual foi avaliado a influência de *Pediococcus pentosaceus* (L105) em ratos com insuficiência hepática induzida. Esses autores constataram a redução dos níveis de diversos marcadores, como alanina aminotransferase e bilirrubinas totais, além da redução das anomalias histológicas. Masuda et al. (2010) administraram *Pediococcus pentosaceus* Sn26 isolado de vegetais, em camundongos com diarreia devido à uma alergia induzida pelo aumento das Imunoglobulinas E (IgE), e verificaram diminuição da resposta alérgica, bem como dos sintomas relacionados a diarreia.

### 3.2.5. Gênero *Lactococcus*

Bactérias do gênero *Lactococcus* foram pesquisadas pela primeira vez em 1873, por Joseph Lister na tentativa de provar a teoria de Pasteur, na qual foi utilizado leite fervido como meio nutriente nos experimentos, obtendo assim a primeira cultura bacteriana pura, nomeada *Bacterium lactis* (LISTER, 1873).

O gênero *Lactococcus* é composto por bactérias em formato de cocos, Gram positivo, se apresentam na forma individual, em pares, cadeias curtas ou clusters irregulares. São anaeróbias facultativas, mesofílicas e homofermentativas, intimamente associadas aos alimentos lácteos fermentados (VON WRIGHT, 2012). Esse gênero é comumente encontrado em diversas superfícies e em produtos de origem vegetal e animal, como leite e queijo, além do trato digestório, respiratório e urogenital de humanos (CAVANAGH et al., 2015).

A espécie *Lactococcus lactis* é uma das BAL mais utilizadas na indústria de alimentos (SMID e KLEEREBEZEM, 2014), sendo que algumas cepas dessa espécie são capazes de fermentar citrato e produzir diacetil e acetoína, compostos aromáticos desejáveis em alguns tipos de queijos (SCHLEIFER et al., 1985). Além de sua utilização em alimentos como cultura fermentadora, capaz de gerar características sensoriais desejáveis, essa espécie é capaz de produzir a nisina, sendo esta a única bacteriocina comercialmente utilizada (PORTO et al., 2017). Esse gênero é geralmente reconhecido como seguro (GRAS) (KIMOTO et al., 2004).

### 3.2.6. Potencial probiótico de BAL isoladas de queijos artesanais

Normalmente, não se utilizam culturas iniciadoras comerciais na produção de queijos artesanais, sendo estas substituídas pela microbiota láctica oriunda do ambiente de produção, leite cru e fermento endógeno (pingo). Com isso, os queijos artesanais apresentam uma grande diversidade de bactérias, como as BAL (DORE e FERREIRA, 2012). Essas bactérias são responsáveis pelas alterações físicas e sensoriais no produto final e também por inibirem micro-organismos deteriorantes e patogênicos, auxiliando na conservação e segurança desse alimento. A atividade inibitória dessas bactérias

ocorre devido a competição por nutrientes e sítios de adesão, produção de ácidos orgânicos e bacteriocinas (OZOGUL e HAMED, 2018).

Diversos trabalhos avaliaram o potencial efeito probiótico de BAL isoladas de queijos artesanais, como Costa et al. (2013), que avaliaram o potencial probiótico *in vitro* de BAL - *Weissella paramesenteroides*; *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* e *L. hilgardii* - isoladas de QMA da Serra da Canastra-MG. Os autores constataram que o QMA da Serra da Canastra-MG é apto a veicular potenciais probióticos e que as amostras *L. rhamnosus* B4, *W. paramesenteroides* C10 e *L. rhamnosus* D1 seriam melhores candidatas à potenciais probióticos, pois apresentaram resistência ao menor número de antimicrobianos avaliados; antagonismo contra microrganismos indesejáveis, além de tolerância ao suco gástrico artificial.

Andrade et al. (2014), estudaram o potencial probiótico de algumas espécies de *Lactobacillus* - *L. casei*; *L. plantarum* e *L. rhamnosus* - isolados de QMA da Serra da Canastra-MG, por meio de testes *in vitro*. Esses autores constataram que, dos microrganismos testados, *L. plantarum* (B17) manifestou ser o melhor potencial probiótico *in vitro*, pois o mesmo, além de inibir eficientemente as bactérias patogênicas, foi o único capaz de inibir *S. enterica* var. Typhimurium; ele também apresentou resistência a um menor número de antimicrobianos testados e tolerância ao suco gástrico artificial e aos sais biliares. Como resultado insatisfatório, foi observado uma grande resistência a antimicrobianos por parte de todos os micro-organismos testados.

Oliveira (2016) avaliou o potencial efeito antagonista *in vitro* de *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, isolados de QMA da Serra da Canastra-MG, contra os micro-organismos patogênicos *E. coli* enterohemorrágica 0157:H7 (EHEC) e *E. coli* enteroinvasiva (EIEC). Ele também avaliou, *in vivo*, o potencial efeito protetor dessas amostras atuando contra infecção exercida por EHEC e EIEC em camundongos. As amostras de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* foram testadas anteriormente quanto ao seu potencial probiótico *in vitro*. Foi possível observar, em relação aos testes *in vitro*, que ambas as BAL testadas foram capazes de produzir halos de inibição contra os micro-organismos patogênicos (com maior inibição da EIEC), indicando boa capacidade probiótica de ambas as BAL. Em relação aos testes *in vivo*, foi possível avaliar que não houve translocação bacteriana para o baço e fígado, por parte da *E. coli* EHEC e EIEC. Os animais do grupo tratado com *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 que foram inoculados com EIEC obtiveram melhores resultados na preservação do íleo, com uma

maior preservação por parte do *L. rhamnosus* D1. Sugere-se, então, o uso do *L. rhamnosus* D1 contra a infecção por EIEC, pois o mesmo manteve íleo preservado na maioria dos animais testados, apresentando o melhor resultado de proteção.

Sant'anna et al. (2017) avaliaram o potencial probiótico *in vitro* de BAL - *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *L. paracasei* e *Pediococcus acidilactici* – isoladas de QMA do Campo das Vertentes-MG com diferentes dias de maturação. Eles também avaliaram, *in vivo*, o potencial efeito protetor dessas amostras contra infecção causada por *Salmonella* var. Typhimurium, em camundongos. Em relação aos testes *in vitro*, foi possível avaliar que *Lactobacillus plantarum* mostrou melhor tolerância aos sais biliares e suco gástrico artificial, além de produzir halo de inibição contra *S. Typhimurium*, sendo o melhor candidato à probiótico. E em relação ao teste *in vivo*, foi possível observar que o ganho de peso dos animais do grupo tratado com *L. casei* (um conhecido probiótico comercial) e *L. plantarum* foi o mesmo. Os animais deste último grupo apresentaram maior ganho de peso que os animais do grupo controle (os quais receberam apenas leite estéril).

Cunha (2018), ao avaliar o potencial probiótico *in vitro* de algumas espécies de *Lactobacillus* - *Lactobacillus paracasei*; *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* - observou que todas as amostras avaliadas produziram eficientes halo de inibição contra micro-organismos indesejáveis. A resistência a antimicrobianos manifestada por todas as BAL testadas foi preocupante, devido à chance de transmissão desses genes a micro-organismos patogênicos. Ele também observou que *L. plantarum* (L1) demonstrou melhor tolerância ao suco gástrico artificial e sais biliares, sendo a amostra com o melhor potencial probiótico.

Valente et al. (2019), avaliaram o potencial probiótico *in vitro* e *in vivo* de amostras de *Lactobacillus* - *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* - contra o patógeno *Listeria monocytogenes*. Foi possível avaliar que todas as amostras tiveram um satisfatório desempenho nas avaliações de potencial probiótico *in vitro*, com base nos testes de sensibilidade a antimicrobianos e tolerância ao suco gástrico artificial e sais biliares. Além disso, as duas amostras foram capazes de antagonizar, em meio de cultura, o desenvolvimento de *L. monocytogenes*. Por outro lado, nos testes *in vivo* não foi observado um efeito protetor aparente de *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 quanto à sobrevivência de camundongos após infecção experimental por *L. monocytogenes*, embora o grupo tratado com D1 tenha apresentado maior

desenvolvimento ponderal no pré-tratamento e após o desafio, indicando possível melhor efeito protetor desta BAL.

Acurcio et al. (2020), avaliariam o potencial efeito protetor, *in vivo*, de uma estirpe probiótica conhecida - *Lactobacillus paracasei* (ST11) - isolada de Chamyto® (Nestlé Brasil Ltd.), contra infecção causada por *Salmonella* var. Typhimurium em camundongos. Eles observaram que o micro-organismo avaliado possui propriedades protetoras contra infecção por *Salmonella*, reduzindo sua gravidade a partir de mecanismos como a redução da translocação do patógeno para o alvo órgãos (íleo e fígado), modulação imunológica local (controle inflamação do íleo) e manutenção da microbiota (prevenindo a proliferação excessiva de *S. Typhimurium*).

### **3.3. Leites fermentados**

#### **3.3.1. Histórico e definição**

A fermentação de alimentos é um método antigo de conservação, o qual foi utilizado, primeiramente, devido à ausência de métodos de refrigeração ou pasteurização (SOUZA e BRUNARI, 2017). A produção de leite fermentado ocorreu inicialmente de forma acidental, quando nômades estocaram o leite natural da ordenha em recipientes feitos de abomaso. Esse fato acabou ocasionando a proliferação de bactérias, que alteraram a estrutura desse alimento, transformando-o em um produto com maior atrativo sensorial e maior período de conservação (OLIVEIRA et al., 2018).

No entanto, apenas no começo do século XX, a partir dos estudos de Elie Metchnikoff, no Instituto *Pasteur*, se iniciou a associação do metabolismo de micro-organismos lácteos com a produção de leites fermentados. A partir de então, teve início a caracterização e o isolamento de diversas culturas lácticas, além da padronização e controle do processo fermentativo pelas indústrias. Em 1908, Elie Metchnikoff iniciou sua defesa sobre os benefícios à saúde relacionados ao consumo de leites fermentados (MENDES, 2011).

Segundo a Instrução Normativa número 46 de 2007 do MAPA: “entende-se por Leites Fermentados os produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de micro-organismos específicos. Estes micro-organismos devem ser viáveis, ativos e

abundantes no produto final durante todo seu prazo de validade. A fermentação do Leite Fermentado ou Cultivado é realizada com um ou vários dos seguintes cultivos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e/ou outras BAL que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto final”. Ainda sobre essa legislação: “o leite fermentado deve apresentar uma contagem mínima de bactérias lácticas viáveis ( $10^6$  UFC/mL) durante toda sua vida de prateleira e ser conservado e comercializado a no máximo 10°C, possibilitando a viabilidade dessas células” (BRASIL, 2007).

### **3.3.2. Elaboração de leites fermentados com potenciais probióticos**

Existe uma grande variedade de produtos lácteos fermentados disponíveis no mercado como os iogurtes, bebidas e sobremesas lácteas, os quais possuem diversidade de sabores e aromas. Eles podem ser enriquecidos com vitaminas, fibras e minerais, os quais relacionam de forma positiva à imagem destes com uma alimentação saudável e nutritiva (GAHRUIE et al., 2015). Estes alimentos são caracterizados como um dos maiores segmentos de alimentos funcionais no mercado, sendo utilizados como veículos promissores de ingredientes funcionais, como micro-organismos probióticos, compostos prebióticos, proteínas, entre outros (AKIN e OZCAN, 2017).

Para a indústria de laticínios, a fermentação é uma ferramenta muito importante para agregar valor ao leite, pois a partir da atividade dos micro-organismos há o desenvolvimento de aroma e sabor desejáveis. Já para os consumidores, além de serem importantes do ponto de vista nutricional, exercem também benefícios à sua saúde, por serem um dos principais veículos de micro-organismos probióticos disponíveis comercialmente (FARVIN et al., 2010).

Porém, a viabilidade dos micro-organismos probióticos em leites fermentados pode ser afetada durante sua elaboração e/ou conservação, graças à fatores como aumento da acidez; presença ou ausência de oxigênio; presença de componentes antimicrobianos e temperatura de armazenamento. Pois esses micro-organismos são muito susceptíveis a condições ambientais, como acidez e temperatura. Com isso, pesquisas sobre micro-organismos potenciais probióticos são importantes e devem ser realizadas antes que os mesmos sejam lançados ao mercado (VASILJEVIC e SHAH, 2008).

Existem, na literatura, diversos estudos sobre a avaliação de leites fermentados com potenciais probióticos, como Viegas et al. (2010) que elaboraram leite fermentado com *Lactobacillus acidophilus* e *Weissella confusa* isolados de queijo de coalho e avaliaram a viabilidade dessas culturas, bem como as características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas dos leites fermentados durante 40 dias de estocagem sob refrigeração. Eles constataram que as culturas avaliadas possuem potencial para serem utilizadas na produção industrial de novos leites fermentados funcionais. E também que o prazo de validade desses produtos armazenados sob refrigeração a 8°C durante 40 dias, garante a contagens bacterianas adequadas para que os micro-organismos exerçam suas funções, além de manter as características físico-químicas e sensoriais desejáveis segundo a legislação.

Mendes (2011), avaliou as características físico-químicas, microbiológicas e a aceitação sensorial de leites fermentados por BAL – *Lactobacillus rhamnosus* e *L. fermentum* - isoladas de queijo coalho. Essa autora observou que os leites fermentados por *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus fermentum* apresentaram características físico-químicas e microbiológicas (incluindo contagens de microrganismos) adequadas e de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2007). No entanto, esses leites apresentaram aceitações distintas nos dois tempos de análise avaliados.

Acurcio (2016) avaliou as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de leite fermentado com *L. plantarum* B7 *L. rhamnosus* D1 ao longo de 15 dias de armazenamento. Ele observou que ambos os leites fermentados apresentaram padrões físico-químicos e microbiológicos adequados, segundo a legislação vigente (BRASIL, 2007). Em relação à análise sensorial dos leites fermentados com 15 dias de armazenamento, não houve diferença entre a aceitação de seu sabor, porém, em relação à aceitação do produto, a amostra de leite fermentado pelo *L. plantarum* (B7), teve sua aceitação estatisticamente inferior.

Valente et al. (2019), avaliaram as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais de leite de cabra fermentado com *Lactobacillus plantarum* e *L. rhamnosus* ao longo de 30 dias de armazenamento e observaram que ambos os leites fermentados apresentaram padrões físico-químicos e microbiológicos adequados durante todo seu período de armazenamento, considerando a legislação brasileira vigente (BRASIL, 2007). Na análise sensorial, o leite fermentado por *L. rhamnosus* apresentou maior aceitação e intenção de compra que os demais tratamentos

Também existem estudos sobre a avaliação, *in vivo*, do potencial efeito protetor de leite fermentado com BAL frente a infecções experimentais. Como o trabalho realizado por Acurcio et al. (2020), que avaliariam o potencial efeito protetor de leite fermentado por *Lactobacillus paracasei* (ST11) contra infecção por *Salmonella* var. Typhimurium. Eles observaram que o leite fermentado por esse micro-organismo possui propriedades protetoras contra infecção por *Salmonella*, reduzindo a gravidade desta através de mecanismos como a redução da translocação do patógeno para o alvo órgãos (íleo e fígado), modulação imunológica local (controle inflamação do íleo) e manutenção da microbiota (prevenindo a proliferação excessiva de *S. Typhimurium*).

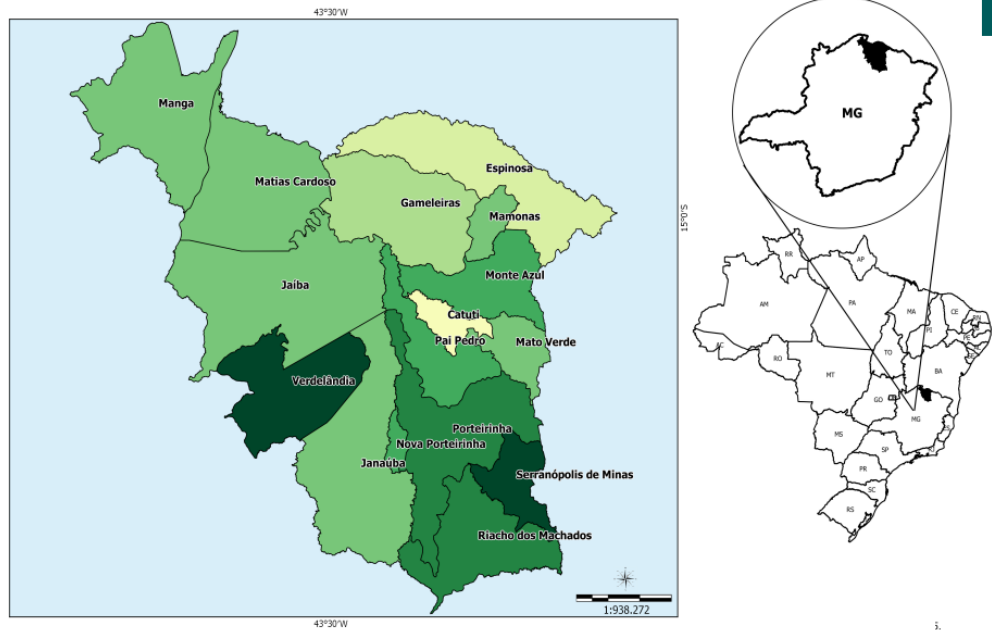
#### **4. Materiais e métodos**

##### **4.1. Coleta de amostras de BAL oriundas de queijo artesanal, pingo, leite cru e superfície de bancada**

Os micro-organismos utilizados no presente trabalho foram previamente isolados de queijos artesanais maturados da Serra Geral-MG, além de leite cru, pingo e superfície de bancada utilizados na elaboração desse queijo, por Rocha (2021). Após isolados, esses micro-organismos foram identificados – a partir da técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF (ASSIS et al., 2017) - e avaliados por Rocha (2021). Essa pesquisadora selecionou doze produtores de queijo artesanal da região da Serra Geral-MG, sendo seis produtores cadastrados no Serviço de Inspeção Municipal (SIM) e seis produtores sem cadastro em órgão fiscalizador, caracterizando os últimos, como representantes da produção informal.

A região da Serra Geral (figura 1), localizada no Norte de Minas Gerais, envolve 17 municípios que são caracterizados por um perfil de pequenos e médios produtores de leite, os quais destinam essa matéria-prima principalmente para a produção de queijo. Atualmente, muitos produtores queijeiros dessa região se mantêm na clandestinidade, enquanto alguns produtores conquistaram a inspeção estadual (IMA) (EMATER, 2018). No dia 19 de junho de 2018 foi aprovada pelo IMA a Portaria nº 1.825, que identificou essa região como produtora de queijo artesanal (MINAS GERAIS, 2018).

Figura 1. Região da Serra Geral-MG



Fonte: IBGE, 2006.

Dos microrganismos isolados, identificados e avaliados por Rocha (2021), foram selecionados, para o presente trabalho, oito BAL (quadro 2) geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) e comumente utilizadas como fermentadoras de produtos lácteos, isoladas de queijo artesanal da Serra Geral, pingo, leite cru e superfície de bancada utilizados para elaboração desse queijo. Para o presente trabalho, foi utilizada a nova nomenclatura proposta pela IJSEM.

Quadro 2. Espécie, código e matriz das bactérias selecionadas para as avaliações *in vitro* de potencial probiótico

<b>Espécie/Matriz</b>	<b>Código</b>
<b>Queijo 14 dias</b>	
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> (LPM)	Q1414
<b>Queijo 21 dias</b>	
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> (LR)	Q221
<i>Levilactobacillus brevis</i> (LB)	Q521
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (PP)	Q621
<i>Lactiplantibacillus platarum</i> (LP)	Q21021
<b>Superfície de bancada</b>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> S9Z (LM)	S92
<b>Leite cru</b>	
<i>Lactococcus lactis</i> (LL)	L1
<b>Pingo</b>	
<i>Lactococcus lactis</i> (LLL)	P1

A conservação desses micro-organismos foi realizada pelo congelamento a -20°C em tubos *Eppendorf* contendo caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Merck, Darmstadt, Germany), adicionado de 20% de glicerol esterilizado.

#### 4.2. Pesquisa do potencial probiótico

As bactérias selecionadas foram testadas, *in vitro*, quanto ao seu potencial efeito probiótico a partir dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos; antagonismo *spot on the law*; tolerância ao suco gástrico artificial e sais biliares. Elas também foram testadas quanto a seu potencial tecnológico a partir da produção e análise físico-química e microbiológica de leite fermentado. Todos os testes foram realizados nos laboratórios de Microbiologia de alimentos e Análises Físico-Químicas I, do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, e também no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos no Instituto de Ciência e Biologia (ICB), ambos na Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG. Todos os testes foram realizados em triplicata.

A ativação das bactérias antes de cada teste foi feita a partir da transferência de 100 µL de cultivo para tubos de ensaio contendo 3mL de caldo MRS (Merck, Darmstadt,

Germany), esses tubos foram encubados durante 24 horas a 37°C. Esse procedimento foi realizado duas vezes, a fim de garantir um maior crescimento das BAL.

#### 4.2.1. Avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos

A avaliação da susceptibilidade das BAL selecionadas a antimicrobianos foi realizada a partir do método de disco difusão, utilizando discos de papel contendo antibacterianos de diferentes classes, segundo a metodologia proposta por Charteris et al. (1998a). Para esse teste, as amostras foram ativadas duas vezes em caldo MRS, plaqueadas e transferidas para um tubo de ensaio contendo 3,5 mL de solução salina (NaCl 0,9%) estéril, até atingir a concentração de 0,5 na escala McFarland, o que equivale a uma concentração de, aproximadamente,  $10^8$  UFC/mL. Após, com auxílio de um *swab* estéril, a solução contida nos tubos foi espalhada por toda a extensão de placas de Petri de 14 cm de diâmetro contendo ágar MRS (Merck, Darmstadt, Germany).

Doze discos contendo antimicrobianos (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) foram espalhados sobre a superfície do ágar MRS. Foram selecionados antimicrobianos de importância clínica, de diferentes classes. Também foram utilizados antimicrobianos de resistência intrínseca para a maioria das bactérias do gênero *Lactobacillus*, como oxacilina e vancomicina (KLEIN et al., 2000). Os antimicrobianos utilizados e suas respectivas concentrações foram:

- Inibidores da síntese da parede celular, com ação bactericida, como os beta-lactâmicos: Penicilina G (PEN) – 10µg e Oxacilina (OXA) – 1µg; glicopeptídeos: Vancomicina (VAN) – 30µg; bem como as cefalosporina de terceira geração: Ceftazidima (CAS) - 30µg.
- Inibidores da síntese proteica, com ação bacteriostática, como as tetraciclina: Tetraciclina (TET) – 30µg; aminoglicosídeos: Gentamicina (GEN) – 10µg, Cloranfenicol (CLO) – 30µg e Amicacina (AMI) - 30µg; macrolídeos: Eritromicina (ERI) – 15µg; e também lincosamidas: Clindamicina (CLI) – 2 µg.
- Inibidores do metabolismo do ácido fólico bacteriano, com ação bactericida, como as Sulfonamidas + Trimetoprim: Sulfazotrim (SUT) – 25µg.

- Inibidores da multiplicação celular, com ação bactericida, como as quinolonas de terceira geração: Ciprofloxacina (CIP) – 5µg.

O controle de qualidade dos discos contendo os antimicrobianos foi realizado utilizando amostra conhecida de *Escherichia coli* (ATCC 25922). Após a adição dos discos nas placas de Petri, estas foram incubadas sob aerobiose, durante 48 horas, a 37°C. A leitura dos halos de inibição foi realizada com auxílio de um paquímetro digital Mitutoyo Digimatic Caliper (Mitutoyo Sul Americana Ltda., São Paulo, Brasil) e as amostras foram classificadas quanto à sua susceptibilidade (quadro 3), segundo Charteris et al. (1998a).

Quadro 3. Classificação do perfil de resistência a antimicrobianos

Antimicrobiano	Susceptibilidade (mm)		
	Resistente	Moderadamente resistente	Sensível
Penicilina (10 µg)	≤19	20-27	≥28
Gentamicina (10 µg)	≤12	-	≥13
Amicacina (30 µg)	≤15	16-17	≥18
Vancomicina (30 µg)	≤14	15-16	≥17
Eritromicina (15 µg)	≤13	14-17	≥18
Cloranfenicol (30 µg)	≤13	14-17	≥18
Tetraciclina (30 µg)	≤14	15-18	≥19
Sulfazotrim (25 µg)	≤ 11	12-16	≥ 17
Oxacilina (1µg)	≤ 19	-	≥ 20
Ciprofloxacina (5 µg)	≤13	14-18	≥19
Clindamicina (2 µg)	≤8	9 11	≥18
Ceftazidima (30 µg)	≤15	16-18	≥19

Fonte: Charteris et al. (1998a).

#### 4.2.2. Teste de antagonismo *spot on the law*

Teste de antagonismo indireto ou *spot on the law* tem como objetivo avaliar o potencial de inibição das bactérias avaliadas contra microrganismos indesejáveis e desejáveis, a partir da produção de substâncias inibitórias. Foi utilizada a técnica

proposta por Tagg et al. (1976), na qual é possível avaliar o efeito antagonista de potenciais probióticos (denominados produtores) contra outros micro-organismos (denominados reveladores), a partir da produção de substâncias inibitórias. Como micro-organismos reveladores foram utilizadas quatro bactérias oriundas de coleção, sendo elas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Listeria monocytogenes* (ATTC 15313) e *Escherichia coli* (ATTC 25922); além de uma BAL (*Levilactobacillus brevis*), isolada por Valente (2021) de QMA do Campo das Vertentes.

Para essa análise, os micro-organismos produtores foram devidamente ativados duas vezes em caldo MRS e incubados a 37°C, durante 24 horas, sob aerobiose. Cinco µL da cultura ativada de cada micro-organismo produtor foi colocado no centro de placas de Petri contendo meio de cultivo ágar MRS, formando os *spots*. Essas placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, sob aerobiose. Após, foram adicionados 1 mL de clorofórmio nas tampas dessas placas, o qual agiu durante 30 minutos, com o objetivo de inativar as bactérias que cresceram dentro dos *spots*, restando apenas as substâncias produzidas por elas. Posteriormente, as placas foram expostas a luz ultravioleta durante 30 minutos, a fim de garantir a completa eliminação dessas bactérias.

Em seguida, 10 µL dos microrganismos reveladores, devidamente ativados duas vezes em caldo BHI (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) – para os patógenos ou MRS – para as BAL, foram adicionados em tubos com 4 mL de ágar semi-sólido BHI, a fim de produzir um inócuo de 4%. Esses tubos foram vertidos sobre os *spots*, formando uma segunda camada.

As placas foram então incubadas a 37°C por 48 horas sob aerobiose e os halos de inibição, que se formaram devido a ação de substâncias antagonistas, produzidas pelos micro-organismos produtores contra os micro-organismos reveladores, foram medidos com auxílio de um paquímetro digital.

#### **4.2.3. Teste de resistência ao suco gástrico artificial**

O teste de resistência ao suco gástrico artificial foi realizado com o objetivo de se avaliar a tolerância dos potenciais probióticos frente ao meio ácido do estômago. Foi utilizada a técnica descrita por Silva et al. (2013), na qual as amostras dos potenciais probióticos foram ativadas duas vezes em caldo MRS. Após, as mesmas foram centrifugadas a 5.000g por 5 minutos, os sobrenadantes formados após a centrifugação

foram descartados, restando apenas os *pellets* das bactérias, os quais foram lavados com solução salina três vezes. Em seguida, esses *pellets* foram suspensos em 1 mL de solução ácida (feito com ácido clorídrico, pepsina e água destilada) de pH 2,0 - para o grupo experimental e 1mL de solução salina (NaCl 0,9% de pH 7,0 - para o grupo controle. As amostras foram incubadas na estufa a 37°C durante 2 horas.

As amostras foram novamente centrifugadas e foi feita a limpeza dos *pellets* com solução salina 0,9% e após, as bactérias foram suspensas em MRS. O inóculo a 2% (v/v) também foi preparado em Caldo MRS. Então, foi preparada a microplaca de fundo chato, com 96 poços. Nesses poços, foram colocados 200µl de cada amostra, após passagem por pH 2,0 (grupo experimental) e pH 7,0 (grupo controle). A microplaca foi incubada por 254 horas no equipamento espectrofotômetro (Microplate, Spectrophotometer System 47 SpectraMax 340 – Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, Estados Unidos), a 37°C. A absorbância do cultivo foi determinada pela leitura da densidade óptica (DO) 620nm a cada uma hora, durante 24 horas, para a realização da leitura da curva de inibição das bactérias.

O percentual de inibição foi calculado segundo a fórmula:  $(1-SG/AT) \times 100$ , sendo que SG e AT correspondem às áreas sob a curva de crescimento das bactérias tratadas com suco gástrico artificial e do controle, respectivamente. A interpretação dos resultados, segundo a porcentagem de inibição, foi realizada a partir do critério proposto por Acurcio et al. (2014), no qual as amostras testadas foram consideradas tolerantes quando apresentaram percentual de inibição <40%, moderadamente tolerantes com percentual entre 40 e 80% e sensíveis quando superior a 80%.

#### **4.2.4. Teste de resistência a sais biliares**

Esse teste foi realizado com o objetivo de se avaliar a tolerância dos potenciais probióticos frente aos sais biliares e baseou-se no método descrito por Walker e Gilliland (1993) e Silva et al. (2013). Primeiramente, as amostras foram ativadas em caldo MRS e incubados sob aerobiose a 37°C por 24 horas. Após, os microorganismos ativados foram colocados em microtubos com diluição de 4% (v/v), em caldo MRS. Em seguida, 100µL do conteúdo dos microtubos foram transferidos para um poço na microplaca de 96 poços contendo 100µl de caldo MRS puro (grupo

controle) e outros 100µL foram transferidos para outro poço na mesma placa contendo caldo MRS com 0,6% (p/v) de sais biliares (Oxgall) (grupo experimental).

A microplaca foi então incubada no equipamento espectrofotômetro, a 37°C. A absorbância do cultivo foi determinada pela leitura da DO 620nm a cada uma hora, durante 24 horas de incubação, para a realização da leitura da curva de inibição das bactérias. Ao final, o inóculo das amostras foi de 2% e a concentração de sais biliares 0,3% nos poços, simulando, *in vitro*, o ambiente intestinal.

O percentual de inibição de foi calculado segundo a fórmula:  $(1-ASB/AC) \times 100$ , sendo ASB: absorbância da amostra com sais biliares e AC: absorbância da amostra controle. A interpretação dos resultados, segundo a porcentagem de inibição, foi realizada a partir do critério proposto por Acurcio et al. (2014), no qual as amostras testadas foram consideradas tolerantes quando apresentaram percentual de inibição <40%, moderadamente tolerantes quando o percentual fosse entre 40 e 80% e sensíveis quando superior a 80%.

### **4.3. Elaboração de leite fermentado**

Foram selecionadas duas BAL que obtiveram melhores resultados nos testes de avaliação de potencial probiótico *in vitro* para a elaboração de leite fermentado. A fim de avaliar, se essas culturas, individualmente e em associação, seriam eficazes na fermentação do leite, atingindo parâmetros físico-químicos e microbiológicos adequados, previstos na legislação vigente para leite fermentado (BRASIL, 2007). Para essa análise, foram utilizados três lotes diferentes de leite em pó desnatado da marca Mólico (Nestlé®, Araçatuba, São Paulo, Brasil). Esses leites foram reconstituídos com 10% de água destilada e esterilizados na temperatura de 110°C durante 10 minutos.

#### **4.3.1. Análises microbiológicas do leite reconstituído**

Primeiramente, foi testada a inocuidade do leite em pó reconstituído a partir dos testes microbiológicos de contagem global de mesófilos aeróbios (UFC/mL), pesquisas de

coliformes a 30°C e a 45°C (NMP/mL), *Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp. (APHA, 2002) e contagem de bolores e leveduras (TOURNAS et al., 2001).

#### **4.3.2. Teste de fermentação**

As BAL selecionadas foram avaliadas quanto a sua capacidade fermentativa, a partir da avaliação da formação de coágulo em leite. Para isso, as culturas selecionadas foram ativadas, duas vezes, em caldos MRS. Após esse procedimento, foram transferidos 0,25 mL de cultivo, para cultura individual e 0,125 mL de cada cultivo, para cultura mista, para tubos de ensaio contendo 10 mL de leite em pó reconstituído e esterilizado. Os tubos de ensaio foram incubados a 37°C durante 24 horas e após, foi avaliada a formação, ou não, de coágulos. Apenas as BAL capazes de fermentar o leite e produzir coágulo firme foram selecionadas para os demais testes.

#### **4.3.3. Produção de leite fermentado**

Foi realizado, a produção de leite fermentado utilizando-se três diferentes lotes de leite em pó desnatado, para a realização de análises físico-químicas e microbiológicas com 1, 7 e 14 dias de armazenamento a 7°C. Sendo realizada uma repetição para cada lote, e três réplicas para cada leite fermentado.

Para a elaboração desse leite, foram transferidos 100 µL das culturas selecionadas para tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo MRS. Esses tubos foram incubados a 37°C durante 24 horas. Após, foi realizado uma segunda ativação dessas culturas. Com isso, 2,5% (v/v) da cultura ativada, com contagem das BAL realizada por plaqueamento, foram inoculadas em três recipientes de 100 mL contendo leite em pó desnatado reconstituído a 10%, elaborado a partir de três lotes da marca Mólico (Nestlé®, Araçatuba, São Paulo, Brasil), tratados termicamente a 110°C por 10 minutos e incubados a 37°C por tempo necessário até a coagulação do leite. Após a fermentação, os produtos fermentados foram armazenados sob refrigeração a 7°C, sendo retirados apenas para a realização de análises físico-químicas e microbiológicas.

#### 4.3.4. Análises físico-químicas

Foi realizado a avaliação físico-química dos leites fermentados com 1, 7 e 14 dias de armazenamento a 7°C a partir das seguintes análises: determinação do pH (Gehaka PG1800, São Paulo, Brasil); determinação da acidez titulável (OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS, 2019); teor umidade na estufa (Gehaka G4023D, São Paulo, Brasil) e balança (Shimadzu AY220, São Paulo, Brasil); teor de proteínas (OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS, 2019) e teor de gordura (OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS, 2019).

#### 4.3.5. Análises microbiológicas

Também foi realizado a análise microbiológica das amostras de leite fermentado com 1, 7 e 14 dias de estocagem, utilizando diluições decimais seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  dos leites fermentados em solução salina (0,9% de NaCl). Após, duas microgotas de 10  $\mu$ L das diluições foram adicionadas ao ágar MRS e incubadas sob aerobiose a 37°C durante 48 horas. Após esse período, a enumeração dos micro-organismos foi feita a partir da multiplicação da média do número de colônias formadas nas duas microgotas por 100 e também pelo inverso da diluição (IDF, 1997).

#### 4.4. Análises estatísticas

Para a realização das análises estatísticas do presente trabalho, foi utilizado o software Graphpad Prism 7.0 (Graphpad Software, San Diego, Califórnia, EUA). No qual as médias dos halos de inibição do teste de antagonismo *spot on the lawn* foram submetidas à análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e de variância pelo teste Two-way ANOVA. A comparação entre as médias foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5%.

Os parâmetros físico-químicos dos leites fermentados foram submetidos à análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk, ao Two-way ANOVA e comparados pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Para as avaliações de contagens bacterianas, a mesma análise estatística foi utilizada após a transformação logarítmica desses dados.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Susceptibilidade a antimicrobianos

Foi possível observar no quadro 4. os resultados do teste de avaliação a susceptibilidade dos potenciais probióticos frente a diferentes antimicrobianos de importância clínica. Os micro-organismos foram classificados como sensíveis (S), moderadamente sensíveis (MS) e resistentes (R) de acordo com a média dos halos de inibição obtidos.

Quadro 4. Perfil de sensibilidade das BAL isoladas de queijo artesanal da Serra Geral frente a antimicrobianos de importância clínica

		Micro-organismos							
Classes	Droga/concentração (µg)	LMP	LR	LB	PP	LP	LM	LL	LLL
Aminoglicosídeos	GEN (10µg)	R	R	S	R	R	R	S	R
	AMI (30 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
Beta-lactâmicos	PEN (10 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S
	OXA (1µg)	R	R	R	R	R	R	S	R
Macrolídeos	ERI (15 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S
Tetraciclínas	TET (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S
Anfenicóis	CLO (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S
Quinolonas	CIP (5 µg)	R	MS	R	R	R	R	MS	R
Glicopeptídeos	VAN (30 µg)	R	R	R	R	R	R	S	R
Lincosamidas	CLI (2 µg)	S	S	R	S	MS	S	S	S
Cefalosporinas	CAS (30 µg)	S	MS	S	S	S	S	S	S
Sulfonamidas + Trimetoprim	SUT (25 µg)	R	R	S	R	MS	R	R	R
<b>Resistência total:</b>		50% (6/12)	41,6% (5/12)	41,6% (5/12)	50% (6/12)	41,6% (5/12)	50% (6/12)	16,6% (2/12)	50% (6/12)

Legenda: Penicilina = PEN; Vancomicina = VAN; Eritromicina = ERI; Cloranfenicol = CLO; Tetraciclina = TET; Gentamicina = GEN; Sulfazotrim = SUT; Oxacilina = OXA; Amicacina = AMI; Ciprofloxacina = CIP; Clindamicina = CLI; Ceftazidima = CAS. LPM - *Leuconostoc pseudomesenteroides*; LM - *Leuconostoc mesenteroide*; LP - *Lactiplantibacillus plantarum*; LR - *Lacticaseibacillus rhamnosus*; LB - *Levilactobacillus brevis*. PP - *Pediococcus pentosaceus*; LL e LLL - *Lactococcus lactis*.

Com os resultados obtidos foi possível observar que todos as BAL avaliadas (100%) foram sensíveis aos antimicrobianos penicilina, tetraciclina e cloranfenicol. Resultados semelhantes foram encontrados por Valente et al. (2019) e James et al. (2016), ao avaliarem o perfil de sensibilidade de *Lactobacillus* a antimicrobianos. A resistência ao cloranfenicol já era esperada, pois seu uso em animais de produção é proibido, devido aos efeitos colaterais sobre a medula óssea da espécie humana (PAES et al., 2009).

Droga	Micro-organismos								
	LMP	LR	LB	PP	LP	LM	LL	LLL	
PEN	S	S	S	S	S	S	S	S	8/8
TET	S	S	S	S	S	S	S	S	8/8
CLO	S	S	S	S	S	S	S	S	8/8

Sensibilidade à eritromicina, clindamicina e ceftazidima também foram observados por 100%, 75% e 87,5% das amostras avaliadas, respectivamente.

Droga	Micro-organismos								
	LMP	LR	LB	PP	LP	LM	LL	LLL	
ERI	S	S	S	S	S	S	S	S	8/8
CLI	S	S	R	S	MS	S	S	S	6/8
CAS	S	MS	S	S	S	S	S	S	7/8

Apesar disso, foi observado um perfil de multirresistência por parte de muitos micro-organismos avaliados (87,5%) a diversos antimicrobianos, sendo esse perfil determinado pela resistência das BAL avaliadas frente a três ou mais drogas, salvo aquelas de resistência intrínseca por grande parte dos *Lactobacillus* (vancomicina e oxacilina).

Droga	Micro-organismos						
	LMP	LR	LB	PP	LP	LM	LLL
GEN	R	R	S	R	R	R	R
AMI	R	R	R	R	R	R	R
PEN	S	S	S	S	S	S	S
OXA	R	R	R	R	R	R	R
ERI	S	S	S	S	S	S	S
TET	S	S	S	S	S	S	S
CLO	S	S	S	S	S	S	S
CIP	R	MS	R	R	R	R	R
VAN	R	R	R	R	R	R	R
CLI	S	S	R	S	MS	S	S
CAS	S	MS	S	S	S	S	S
SUT	R	R	S	R	MS	R	R
<b>Multirresistência:</b>	4	3	3	4	3	4	4

Resistência a antimicrobianos é um grande problema de saúde única, o qual pode gerar consequências graves, devido à falta de opção terapêutica para o tratamento de infecções causadas por esses micro-organismos (ANVISA, 2017). Ela pode ocorrer devido a mecanismos intrínsecos ou adquiridos. A resistência intrínseca ocorre de forma natural, como parte de um processo de evolução bacteriana, como a resistência de bactérias do gênero *Lactobacillus* a oxacilina e vancomicina (KLEIN et al., 2000; ANVISA, 2007). Já a resistência adquirida ocorre por meio da pressão seletiva exercida pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, podendo ocorrer transferência de genes de resistência a outras bactérias (ANVISA, 2007).

Também foi possível avaliar que nenhuma amostra foi sensível a todos os antimicrobianos testados. O que diverge do resultado encontrado por Silva et al. (2019), que ao avaliarem o perfil de resistência de *Lactobacillus* spp. isolados de QMA de Araxá-MG frente a antimicrobianos, observaram que uma amostra (*L. plantarum* C0) foi sensível a todos os antimicrobianos testados. Apesar disso, esse mesmo autor observou que muitas amostras apresentaram resistência a múltiplos antimicrobianos, assim como no presente trabalho.

Foi observado que a grande maioria das bactérias avaliadas (75%) apresentaram resistência à ciprofloxacina. Essa resistência pode ser justificada devido a características intrínsecas desses micro-organismos relacionadas à estrutura da parede celular, permeabilidade de membrana e mecanismos de efluxo (ABRIOUEL et al.,

2015). Esses resultados conferem com os obtidos por Costa et al. (2013) e Andrade et al. (2014).

Droga	Micro-organismos								
	LMP	LR	LB	PP	LP	LM	LL	LLL	
CIP	R	MS	R	R	R	R	R	R	6/8

87,5% das amostras avaliadas apresentaram resistência à vancomicina. Resultados semelhantes foram encontrados em diversos trabalhos (RODRÍGUEZ-ALONSO et al., 2009; COSTA et al., 2013; ANDRADE, et al., 2014; WONG et al., 2015; VALENTE et al., 2019). Entretanto, Hermanns et al. (2014) demonstraram uma sensibilidade à vancomicina por grande parte dos micro-organismos avaliados. Segundo Klein et al. (2000), o uso de bactérias resistentes à vancomicina como probióticos não gera riscos relacionados à transferência de genes de resistência a outros micro-organismos, por se tratar de uma resistência intrínseca.

Droga	Micro-organismos								
	LMP	LR	LB	PP	LP	LM	LL	LLL	
VAN	R	R	R	R	R	R	S	R	7/8

Diversas amostras (87,5%) apresentaram resistência à oxacilina, a qual pode ter ocorrido devido a uma possível impermeabilidade da parede celular das bactérias ou pela ação das enzimas  $\beta$ -lactamases (CHARTERIS et al., 1998). Resultados semelhantes foram encontrados por Silva et al. (2019), ao avaliarem o potencial probiótico de *Lactobacillus* isolados de QMA de Araxá-MG.

Droga	Micro-organismos								
	LMP	LR	LB	PP	LP	LM	LL	LLL	
OXA	R	R	R	R	R	R	S	R	7/8

75% das bactérias avaliadas apresentaram resistência à gentamicina e todas as amostras testadas foram resistentes a amicacina, possivelmente devido à mecanismos relacionados à permeabilidade de membranas ou ausência de citocromos que permitiriam a ligação dos antimicrobianos (ABRIOUEL et al., 2015).

Droga	Micro-organismos								
	LMP	LR	LB	PP	LP	LM	LL	LLL	
GEN	R	R	S	R	R	R	S	R	6/8
AMI	R	R	R	R	R	R	R	R	8/8

75% bactérias avaliadas apresentaram resistência a sulfazotrim.

Droga	Micro-organismos								
	LMP	LR	LB	PP	LP	LM	LL	LLL	
SUT	R	R	S	R	MS	R	R	R	6/8

Foi possível observar que a amostra *Lactococcus lactis* (LL) apresentou o melhor perfil de sensibilidade as drogas testadas, sendo resistente a apenas dois dos antimicrobianos testados. A segunda amostra com melhor perfil de sensibilidade observada foi *Levilactobacillus brevis* (LB), resistente a cinco dos doze antimicrobianos testados.

Apesar desses resultados, algumas amostras apresentaram perfil de resistência a múltiplos antimicrobianos, como *Lacticaseibacillus rhamnosus* (LR) e *Lactiplantibacillus plantarum* (LP), as quais foram resistentes, ou moderadamente sensíveis, a sete dos doze antimicrobianos testados.

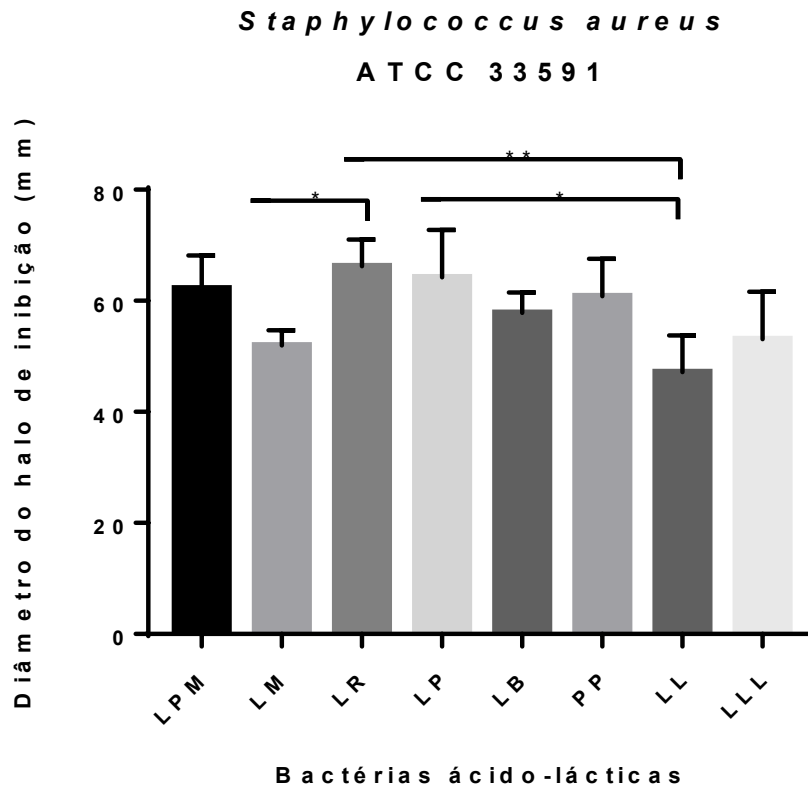
Droga	Micro-organismos	
	LB	LLL
GEN	S	R
AMI	R	R
PEN	S	S
OXA	R	R
ERI	S	S
TET	S	S
CLO	S	S
CIP	R	R
VAN	R	R
CLI	R	S
CAS	S	S
SUT	S	R
<b>Resistência total:</b>	5/12	2/12

Devido a importância da resistência a antimicrobianos e a transferência de genes de resistência para a saúde pública, é importante que sejam selecionadas cepas que apresentem resistência a um menor número possível de antimicrobianos. Sendo importante também o estudo de genes de resistência e possível transferência de genes a outras bactérias, para a seleção probióticos que apresentem maior segurança aos seus consumidores.

### ***5.2. Antagonismo spot on the law***

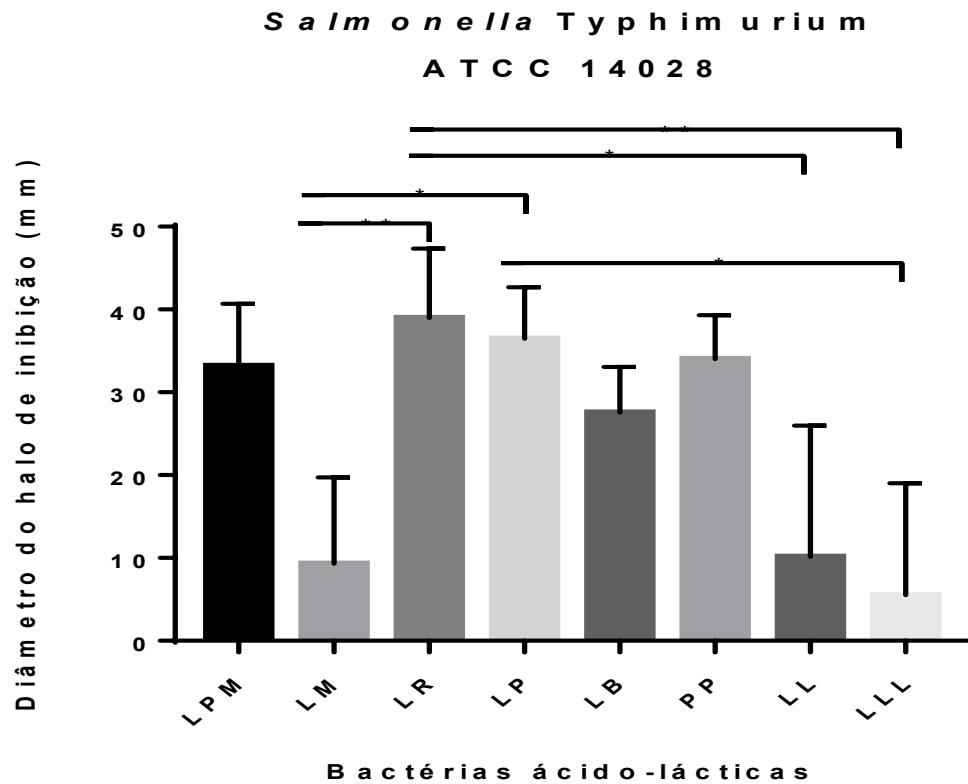
Os resultados do teste antagonismo *spot on the law*, no qual foram avaliados a ação de potenciais probióticos contra os patógenos *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocitogenes* e *Eschericia coli*, além de *Lactobacillus brevis* isolado de QMA do Campo das Vertentes estão apresentados nas figuras (2,3,4 e 5).

Figura 2. Média dos halos de inibição (mm) e desvios-padrão do teste de antagonismo *in vitro* de BAL contra *S. aureus*



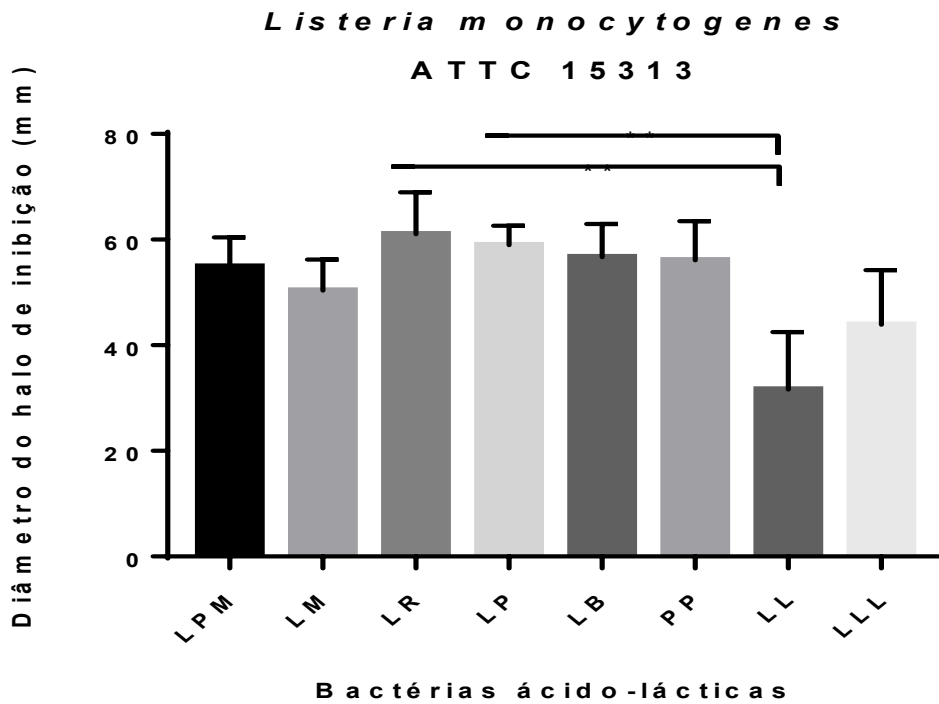
Legenda: LPM - *Leuconostoc pseudomesenteroides*; LM - *Leuconostoc mesenteroide*; LP - *Lactiplantibacillus plantarum*; LR - *Lacticaseibacillus rhamnosus*; LB - *Levilactobacillus brevis*. PP - *Pediococcus pentosaceus*; LL e LLL - *Lactococcus lactis*. Barras seguidas por \* e \*\* indicam diferenças pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) e pós-teste de Dunn.

Figura 3. Média dos halos de inibição (mm) e desvios-padrão do teste de antagonismo *in vitro* de BAL contra *Salmonella* var. Typhimurium



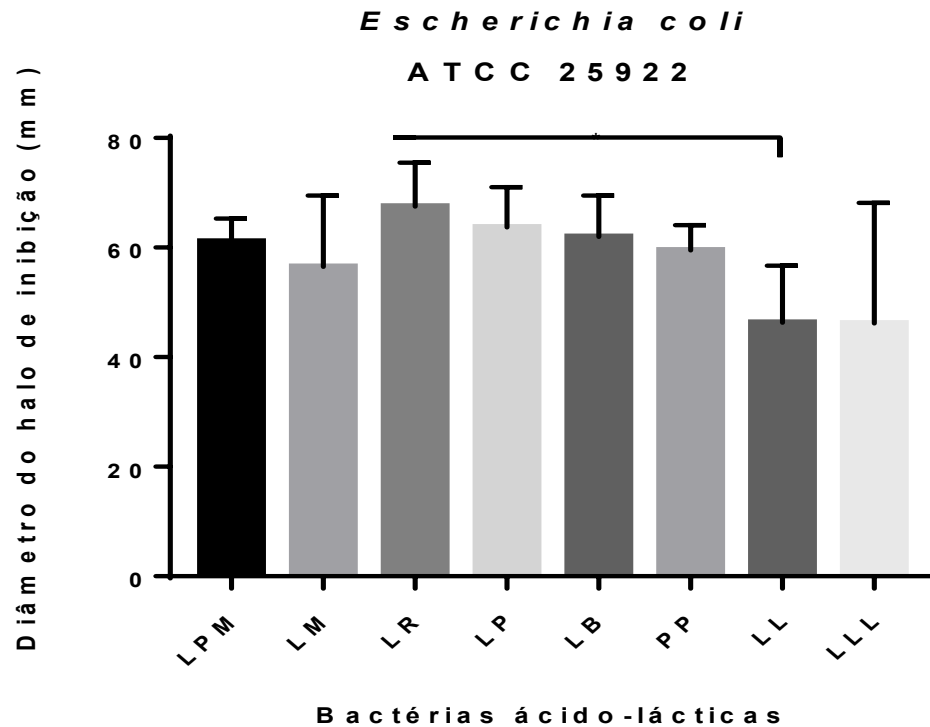
Legenda: LPM - *Leuconostoc pseudomesenteroides*; LM - *Leuconostoc mesenteroide*; LP - *Lactiplantibacillus plantarum*; LR - *Lacticaseibacillus rhamnosus*; LB - *Levilactobacillus brevis*. PP - *Pediococcus pentosaceus*; LL e LLL - *Lactococcus lactis*. Barras seguidas por \* e \*\* indicam diferenças pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) e pós-teste de Dunn.

Figura 4. Média dos halos de inibição (mm) e desvios-padrão do teste de antagonismo *in vitro* de BAL contra *L. monocytogenes*



Legenda: LPM - *Leuconostoc pseudomesenteroides*; LM - *Leuconostoc mesenteroide*; LP - *Lactiplantibacillus plantarum*; LR - *Lacticaseibacillus rhamnosus*; LB - *Levilactobacillus brevis*. PP - *Pediococcus pentosaceus*; LL e LLL - *Lactococcus lactis*. Barras seguidas por \* e \*\* indicam diferenças pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) e pós-teste de Dunn.

Figura 5. Média dos halos de inibição (mm) e desvios-padrão do teste de antagonismo *in vitro* de BAL contra *E. coli*



Legenda: LPM - *Leuconostoc pseudomesenteroides*; LM - *Leuconostoc mesenteroide*; LP - *Lactiplantibacillus plantarum*; LR - *Lacticaseibacillus rhamnosus*; LB - *Levilactobacillus brevis*. PP - *Pediococcus pentosaceus*; LL e LLL - *Lactococcus lactis*. Barras seguidas por \* e \*\* indicam diferenças pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) e pós-teste de Dunn.

A partir dos resultados apresentados, foi possível observar que todas as amostras avaliadas foram capazes de produzir halos de inibição frente aos micro-organismos patogênicos. Apesar disso, em repetições de algumas amostras avaliadas não foi possível observar formação de halos de inibição frente ao patógeno *Salmonella* var. Typhimurium (quadro 5). Andrade et al. (2014), ao avaliarem o potencial efeito antagonista de algumas amostras de *Lactobacillus* spp. observou que apenas uma amostra (*L. plantarum* B17) foi capaz de inibir o patógeno *Salmonella* var. Typhimurium.

Também foi possível observar que nenhuma bactéria avaliada produziu halos de inibição frente a BAL isolada de QMA do Campo das Vertentes. A não ocorrência de inibição observada frente à essa BAL possibilita sua utilização em associação com as

BAL avaliadas, podendo ser possível aumentar a sua ação inibitória contra outros micro-organismos (COSTA et al., 2013).

Quadro 5. Média dos halos de inibição (mm) das BAL avaliadas frente ao patógeno *Salmonella* var. Typhimurium

<i>Salmonella</i> Typhimurium (SAL)							
LPM	LM	LR	LP	LB	PP	LL	LLL
30,83	21,26	34,21	34,92	20,37	38,6	0	0
25,35	15,26	42,72	25,02	29,13	24,31	27,61	33,12
23,99	19,40	24,44	37,05	23,55	33,27	33,3	0
40,6	0	47,74	41,78	31,84	37,12	0	0
39,9	0	42,17	38,19	25,41	37,59	0	0
38,53	0	42,66	41,87	35,11	33,27	0	0
33,2	9,32	38,99	36,47	27,56	34,02	10,15	5,52

Legenda: LPM - *Leuconostoc pseudomesenteroides*; LM - *Leuconostoc mesenteroide*; LP - *Lactiplantibacillus plantarum*; LR - *Lacticaseibacillus rhamnosus*; LB - *Levilactobacillus brevis*. PP - *Pediococcus pentosaceus*; LL e LLL - *Lactococcus lactis*.

O teste de antagonismo *spot on the law* ou antagonismo indireto avalia a capacidade de micro-organismos potenciais probióticos (produtores) de inibirem outros micro-organismos (reveladores) a partir da produção de substâncias inibitórias. Dentre essas substâncias estão os ácidos orgânicos, como o ácido lático (LEBEER et al., 2008). Além dos peptídeos antimicrobianos de baixo peso molecular, como as bacteriocinas, os quais possuem diferentes mecanismos de ação (MOKOENA, 2017).

A partir do teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%, foi possível avaliar que não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre as médias dos halos de inibição formados em relação aos micro-organismos reveladores (quadro 6). Pelo mesmo teste também foi possível observar que não houve variação ( $p > 0,05$ ) entre a capacidade inibitória das BAL testadas (quadro 7). Resultados semelhantes foram encontrados por Andrade et al. (2014).

Quadro 6. Média dos halos de inibição (mm), desvio-padrão e coeficiente de variação (%) do teste de antagonismo de amostras de BAL para cada bactéria reveladora

Revelador	Média (mm)	Desvio-padrão	Coeficiente de variação (%)
STA	57,93a	6,66	11%
SAL	24,40a	13,76	56%
LT	51,69a	9,72	19%
EC	57,84a	7,82	14%
LB	0	0	0%

Legenda: STA – *Staphylococcus aureus*; SAL – *Salmonella Typhimurium*; LT – *Listeria monocitogenes*; EC – *Escherichia coli*; LBT – *Levilactobacillus brevis*.

Quadro 7. Média dos halos de inibição (mm), desvio-padrão e coeficiente de variação (%) do teste de antagonismo de amostras de BAL frente às bactérias reveladoras

Amostras	Média (mm)	Desvio-padrão	Coeficiente de variação (%)
LPM	42,28b	26,36	62%
LM	33,63b	26,74	80%
LR	46,75b	28,54	61%
LP	44,66b	27,43	61%
LB	40,80b	26,59	65%
PP	42,10b	25,93	62%
LL	27,03b	21,28	79%
LLL	29,73b	24,92	84%

Legenda: LPM - *Leuconostoc pseudomesenteroides*; LM - *Leuconostoc mesenteroide*; LP – *Lactiplantibacillus plantarum*; LR - *Lactiacaseibacillus rhamnosus*; LB - *Levilactobacillus brevis*. PP - *Pediococcus pentosaceus*; LL e LLL - *Lactococcus lactis*.

Com isso, foi possível concluir que todas as BAL avaliadas foram capazes de produzir halos de inibição frente a micro-organismos patogênicos, sem diferença entre sua capacidade inibitória. Nenhuma bactéria produziu halos de inibição frente a BAL reveladora (*Levilactobacillus brevis*).

É importante, em futuros estudos, avaliar quais substâncias inibitórias foram produzidas pelos potenciais probióticos avaliados, a partir de testes como a avaliação do perfil fermentativo das BAL (LIMA et al., 2009) e caracterização da natureza proteica das substâncias antagonistas produzidas (LEWUS et al., 1991).

### 5.3. Sobrevivência ao suco gástrico artificial e sais biliares

Os resultados do quadro 8. demonstram o percentual de inibição das bactérias avaliadas frente as condições adversas do suco gástrico artificial e sais biliares. As amostras foram classificadas quanto a sua tolerância, segundo Acurcio et al. (2014).

Quadro 8. Percentual de inibição e classificação quanto ao nível de tolerância ao ácido gástrico artificial (pH 2,0) e sais biliares (Oxgall 0,3%) de BAL isoladas de queijo artesanal da Serra Geral-MG

Amostra	Percentual de inibição	
	Suco gástrico	Sais biliares
LPM	75,31% (MT)	11,0% (T)
LR	85,51% (S)	67,3% (MT)
LB	62,27% (MT)	3,7% (T)
PP	75,0% (MT)	29,8% (T)
LP	78,5% (MT)	6,08 % (T)
LM	82,1% (S)	18,10% (T)
LL	74,54% (MT)	13,4% (T)
LLL	79,0% (MT)	3,8% (T)

Legenda: LPM - *Leuconostoc pseudomesenteroides*; LM - *Leuconostoc mesenteroide*; LP - *Lactiplantibacillus plantarum*; LR - *Lacticaseibacillus rhamnosus*; LB - *Levilactobacillus brevis*. PP - *Pediococcus pentosaceus*; LL e LLL - *Lactococcus lactis*. Tolerantes (T) - percentual de inibição <40%; moderadamente tolerantes (MT) - percentual for entre 40 e 80%; sensíveis (S) - superior a 80%.

Devido ao fato dos micro-organismos avaliados no presente trabalho terem sido isolados de ambientes de acidez predominante, pois a elaboração do queijo é feita normalmente em meio ácido, era esperado que essas bactérias fossem adaptadas à condição adversa de elevada acidez (RESEDE et al., 2011; COSTA et al., 2013). Apesar disso, nenhuma amostra avaliada foi tolerante ao suco gástrico artificial, sendo consideradas apenas sensíveis (2/8) ou moderadamente tolerantes (6/8). Esse resultado foi observado, possivelmente, devido ao grande desafio em que essas bactérias foram expostas de elevada acidez (pH 2,0) durante um tempo prolongado, a partir de um teste *in vitro* que não simula totalmente a realidade do trato gastrointestinal humano.

Diferentes resultados foram encontrados por Costa et al. (2013) e Valente et al. (2019), que ao avaliarem a tolerância de BAL isoladas de QMA da Serra da Canastra e do

Campo das Vertentes, respectivamente, ao suco gástrico artificial (pH 2,0) avaliaram que todas as amostras testadas foram consideradas tolerantes.

Amostra	Percentual de inibição
	Suco gástrico
LPM	75,31% (MT)
LR	85,51% (S)
LB	62,27% (MT)
PP	75,0% (MT)
LP	78,5% (MT)
LM	82,1% (S)
LL	74,54% (MT)
LLL	79,0% (MT)

Segundo a ANVISA (2018), para que um produto seja comercializado no Brasil com a denominação de probiótico, é necessário comprovar seu efeito benéfico, a partir de testes como a comprovação da sobrevivência da cepa avaliada frente as condições adversas do suco gástrico e sais biliares. Pois é fundamental que o micro-organismo avaliado chegue em quantidade suficiente em seu local de ação, para desempenhar suas funções benéficas ao organismo do consumidor.

Apesar disso, os potenciais probióticos selecionados podem ser veiculados a um derivado lácteo. Pois os produtos alimentícios, como os lácteos, são capazes de contribuir para a sobrevivência de probióticos ao suco gástrico, principalmente devido a seu efeito tamponante e protetor (ROSS et al., 2005). Charteris et al. (1998b), observaram que algumas cepas da espécie *Lactobacillus* spp. foram capazes de sobreviver pela passagem pelo estômago humano, principalmente quando veiculadas com produtos lácteos ou alimentos à base de proteínas de leite.

Outros recursos também podem ser utilizados, como a microencapsulação, a qual permite a sobrevivência de micro-organismos a situações adversas, como o meio ácido do estômago ou os sais biliares. Microencapsulação é um processo que imobiliza e protege micro-organismos graças a um material encapsulante. Esse método pode ser mecânico ou físico-químico. As partículas geradas possuem diâmetros de tamanho pequeno, podendo variar de nanômetros a poucos milímetros. Sua estrutura pode ser

mantida em condições adversas do meio, sendo que o conteúdo da cápsula deve ser liberado somente no sítio de ação adequado (BORGOGNA et al., 2010).

A curva com a média da absorbância das três repetições das amostras *Levilactobacillus brevis* (LB) e *Lactococcus lactis* (LL) durante 24 horas frente a condição adversa do suco gástrico (pH 2,0) e controle (pH 7,0) foi apresentada na figura 6 e 7. Em relação as duas bactérias, foi possível avaliar uma absorbância maior no grupo controle quando comparadas às bactérias tratadas com suco gástrico artificial, durante toda a análise, o que indica um crescimento maior das bactérias do grupo controle.

Figura 6. Absorbância da amostra *Levilactobacillus brevis* (LB) frente ao suco gástrico artificial (pH 2,0) e controle (pH 7,0)

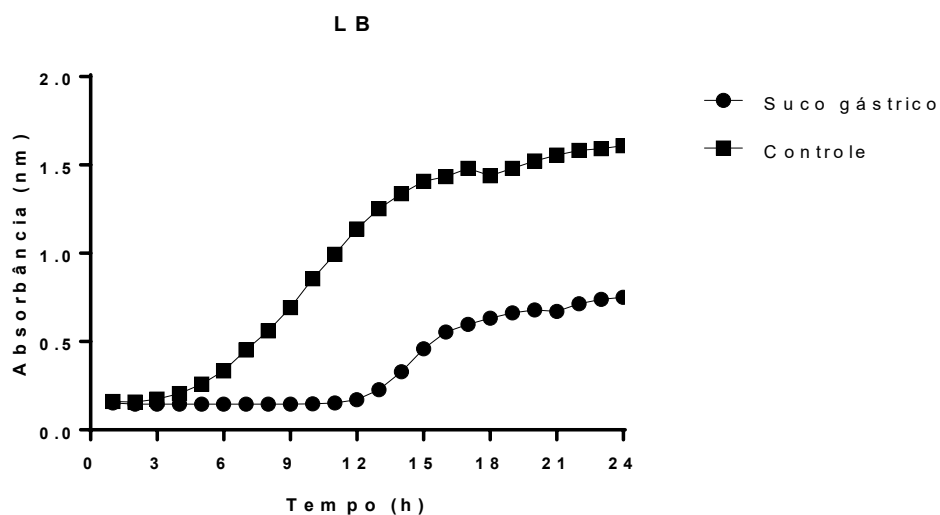
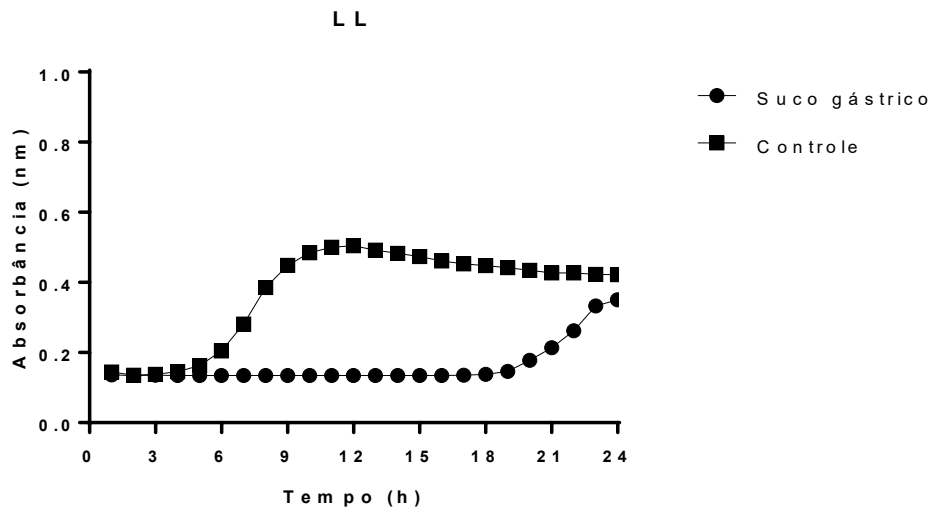


Figura 7. Absorbância da amostra *Lactococcus lactis* (LL) frente ao suco gástrico artificial (pH 2,0) e controle (pH 7,0)



Em relação aos sais biliares 87,5% das amostras (7/8) foram consideradas tolerantes, apenas uma moderadamente tolerante e nenhuma sensível a essa condição adversa. Esses achados diferem dos resultados encontrados por outros pesquisadores, no qual grande parte dos potenciais probióticos avaliados se mostraram sensíveis ou moderadamente tolerantes aos sais biliares (COSTA et al., 2013; VALENTE et al., 2019; SILVA, 2016).

Amostra	Percentual de inibição
	Sais biliares
LPM	11,0% (T)
LR	67,3% (MT)
LB	3,7% (T)
PP	29,8% (T)
LP	6,08 % (T)
LM	18,10% (T)
LL	13,4% (T)
LLL	3,8% (T)

A curva com a média da absorbância das três repetições das amostras *Levilactobacillus brevis* (LB) e *Lactococcus lactis* (LL) durante 24 horas frente à condição adversa dos sais biliares (Oxgall 0,3%) e controle (MRS puro) foi apresentada nas figuras 8 e 9. Em ambas as amostras é possível observar uma maior absorbância em bactérias do grupo tratado com sais biliares que no grupo controle durante maior parte da análise. Isso indica que essas bactérias obtiveram um melhor crescimento quando tratadas com sais biliares artificiais do que com MRS puro (controle), apesar dos sais biliares serem considerados uma condição adversa a esses micro-organismos. Possivelmente devido ao desenvolvimento de mecanismos de defesa como a desconjugação de sais biliares pela enzima hidrolase de sais biliares (BSH) (PERES et al., 2014).

Figura 8. Absorbância da amostra *Levilactobacillus brevis* (LB) frente a sais biliares (Oxgall 0,3%) e controle (MRS puro)

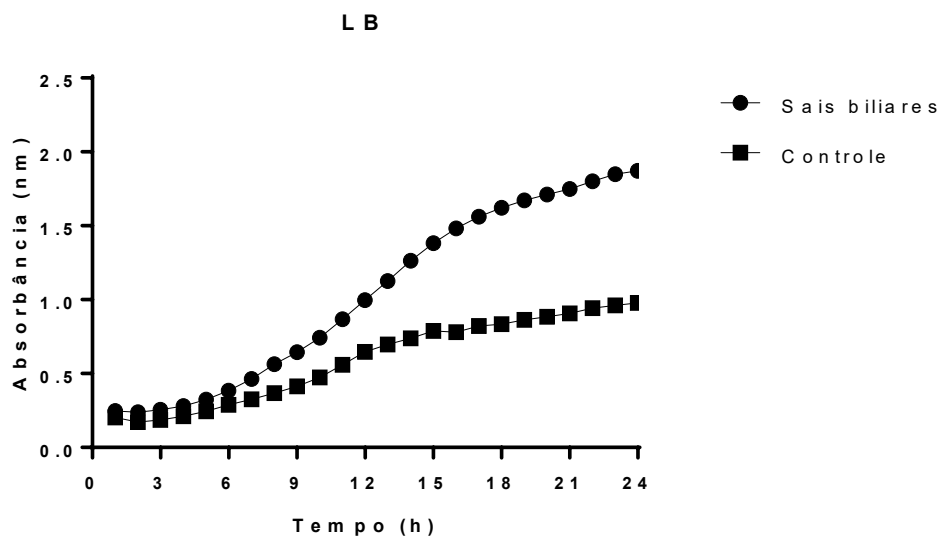
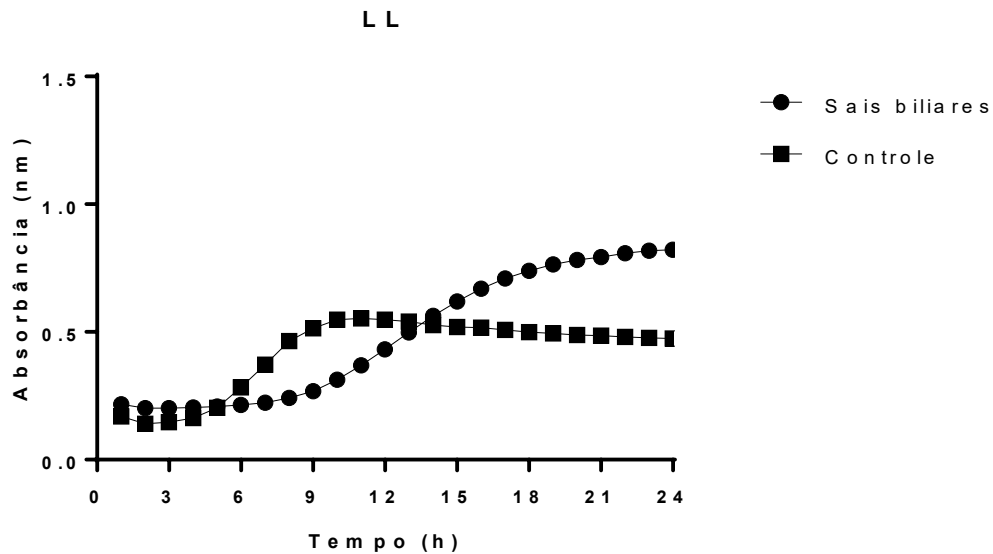


Figura 9. Absorbância da amostra *Lactococcus lactis* (LL) frente a sais biliares (Oxgall 0,3%) e controle (MRS puro)



Foi possível concluir que a amostra *Levilactobacillus brevis* (LB) apresentou menor percentual de inibição ao suco gástrico artificial (62,27% de inibição) quando comparado a demais amostras. Embora, nenhuma amostra foi considerada tolerante a essa condição adversa. Todas as amostras, exceto *Lactobacillus rhamnosus* (LR), apresentaram tolerância aos sais biliares.

#### 5.4. Produção de leite fermentado

Foram selecionadas duas amostras que apresentaram melhores resultados nos testes de antibiograma, antagonismos e sobrevivência ao suco gástrico e sais biliares para a produção de leite fermentado. Com isso, foram selecionadas as amostras *Lactococcus lactis* (LL) e *Levilactobacillus brevis* (LB), as quais apresentaram, respectivamente, sensibilidade a maior classe de antimicrobianos testados; foram capazes de produzir halos de inibição contra micro-organismos patogênicos sem inibir micro-organismos desejáveis; além apresentarem tolerância aos sais biliares e moderada tolerância ao suco gástrico artificial (quadro 9).

Além disso, *Lactococcus lactis* é a principal espécie de BAL utilizada como cultura iniciadora de diversos alimentos, sendo comumente utilizada pelas indústrias para a fabricação de produtos lácteos fermentados, como os queijos. Essa cultura desempenha um papel fundamental em relação à qualidade desses produtos, sua vida de prateleira, preservação e atributos sensorial (GONZÁLEZ REVELLO et al., 2016). A espécie *L. lactis* foi a primeira a ter o genoma completamente sequenciado, sendo bactérias de fácil manipulação genética, além de não produzirem produtos metabólicos tóxicos e serem reconhecidas como GRAS (BOLOTIN et al, 2001; KIMOTO et al., 2004).

Quadro 9. Resumo dos resultados obtidos pelas amostras *Lactococcus lactis* (LL) e *Levilactobacillus brevis* (LB) nos testes de avaliação do potencial probiótico *in vitro*

Amostra	Testes			
	Antibiograma	Antagonismo	Tolerância ao SG	Tolerância aos SB
LL	Sensibilidade a 10 antimicrobianos	Produziu halo de inibição contra patógenos sem inibir a BAL desejável	Moderadamente tolerante	Tolerante
LB	Sensibilidade a 7 antimicrobianos	Produziu halo de inibição contra patógenos sem inibir a BAL desejável	Moderadamente tolerante	Tolerante

Porém, após a prova de fermentação, durante 24 horas, apenas o leite fermentado com a amostra *Lactococcus lactis* (LL) e associação de *Lactococcus lactis* (LL) com *Levilactobacillus brevis* (LB) produziram coágulo firme. Com isso, foi selecionado apenas a amostra LL para as demais etapas, pois apesar de não apresentar os melhores resultados *in vitro*, em comparação ao LB, ela apresentou o melhor potencial tecnológico.

#### 5.4.1. Análises físico-químicas

Em relação as análises físico-químicas realizadas no leite fermentado com *Lactococcus lactis* (LL) com 1, 7 e 14 dias de estocagem, foi possível observar um aumento gradativo de sua acidez (figura 10) ao longo de seu período de estocagem. O aumento da acidez titulável ocorre devido à persistente atividade das bactérias lácticas, que conseguem, até certo ponto, manter suas atividades metabólicas fermentativas

(produção de ácido lático), mesmo quando expostas a temperaturas de 0 a 5°C (PEREIRA, 2002).

Com o aumento da acidez, era esperado uma queda do pH do meio, apesar disso, foi possível observar um aumento gradativo do pH (figura 11). Pois, em contrapartida a essa produção de ácidos, é possível que tenha ocorrido a formação de compostos alcalinos, provavelmente em uma escala maior que a produção de ácidos, fazendo com que o pH tenha aumentado, ao em vez de reduzir. A hipótese mais provável é que tenha ocorrido proteólise nesse leite, a partir de enzimas presentes no próprio leite ou graças a BAL, as quais são capazes de realizar proteólise naturalmente durante seu processo de fermentação (EL-GHAISH et al., 2011). Essas enzimas clivam proteínas e geram compostos alcalinos. Um achado que fundamenta essa hipótese de proteólise é a redução do teor de proteínas (figura 12) que foi observado durante o período de estocagem do leite fermentado.

Os autores Amani et al. (2017) relataram que culturas com alta atividade proteolítica possuem menor capacidade de acidificação do leite durante sua estocagem, o que pode resultar no aumento do pH e redução da acidez titulável do produto ao longo do período de armazenamento. Ahmed e Razig (2017) também citaram a influência da degradação de aminoácidos pela cultura fermentadora, e do processo de hidrólise de caseínas a peptídeos hidrofóbicos na diminuição da concentração de proteínas ao longo do período de estocagem de iogurte.

Figura 10. Acidez titulável dos leites fermentados por *Lactococcus lactis* (LL) em diferentes dias de estocagem a 7°C

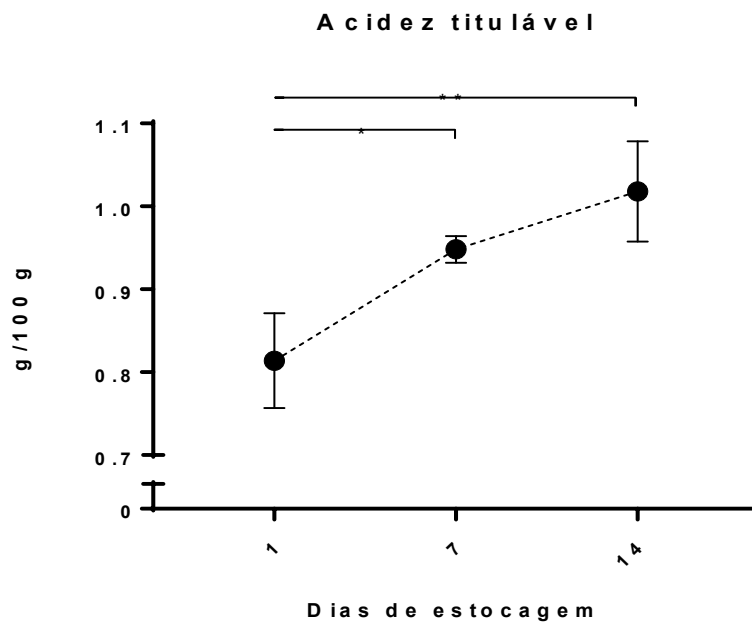


Figura 11. pH dos leites fermentados por *Lactococcus lactis* (LL) em diferentes dias de estocagem a 7°C

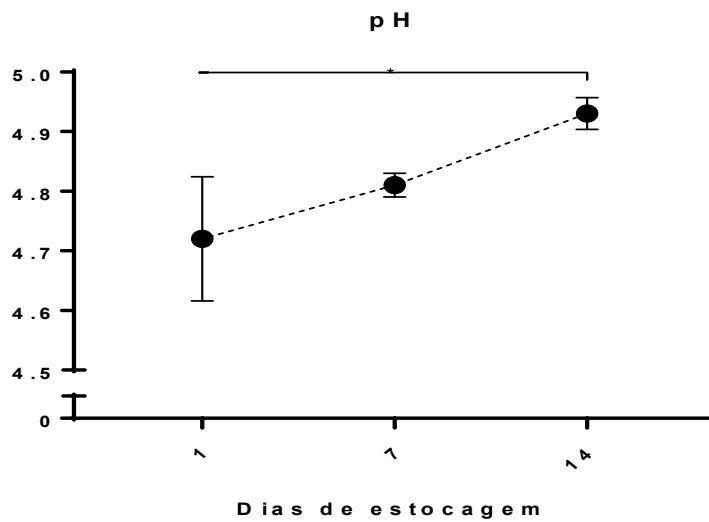
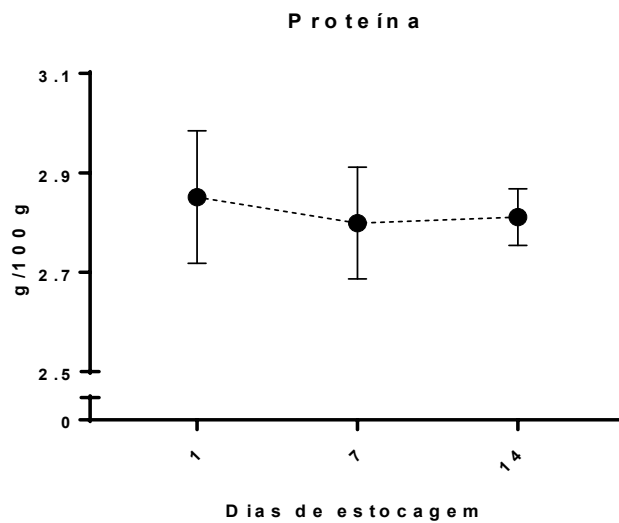
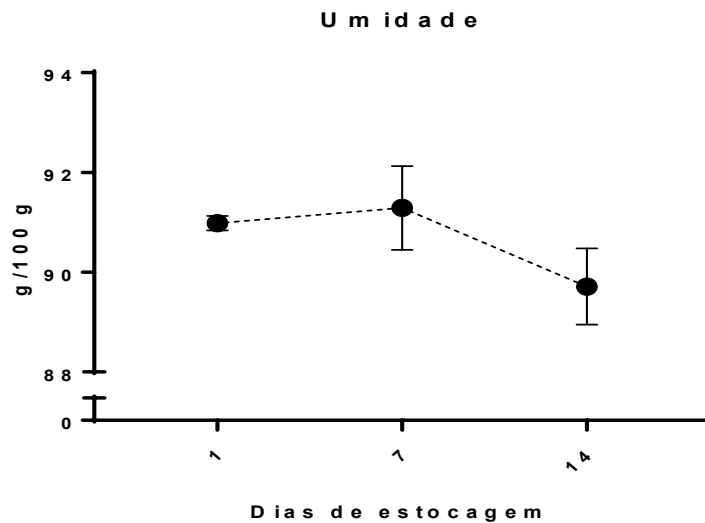


Figura 12. Teor de proteína dos leites fermentados por *Lactococcus lactis* (LL) em diferentes dias de estocagem a 7°C



Foi observado um alto teor de umidade no leite fermentado, o qual variou entre 90,98 e 89,71 durante seu armazenamento (figura 13). Diferentes resultados foram encontrados Mendes (2011), que ao avaliar as características físico-químicas de leites fermentados com *L. fermentum*, observou um teor de umidade que variou entre 81,84 a 83,19 durante seu período de estocagem. A legislação vigente (BRASIL, 2007) não estabelece padrões para as análises de teor de umidade de leite fermentado, com isso, não foi possível, comparar os resultados.

Figura 13. Teor de umidade dos leites fermentados por *Lactococcus lactis* (LL) em diferentes dias de estocagem a 7°C



Foi possível avaliar que, em relação à acidez, o leite fermentado se apresentou conforme a legislação vigente (quadro 10) e o teor de proteína se apresentou um pouco abaixo do mínimo preconizado (2,9g/100g) nos dias 1 e 14 de estocagem. Em relação ao teor de gordura, foi observado valores indetectáveis durante todo o tempo de armazenamento sob refrigeração, pois foi utilizado leite em pó desnatado para a elaboração do leite fermentado. Esse valor se encontra de acordo com os padrões estabelecidos na legislação brasileira (quadro 10). Resultados semelhantes foram encontrados por Viegas et al. (2010), que ao avaliarem as características físico-químicas de leite em pó desnatado reconstituído fermentado com cultivos de *Lactobacillus*, observaram que todos os leites apresentaram valores indetectáveis de teor de gordura durante todo o tempo de estocagem sob refrigeração.

Apesar de não existir um padrão estabelecido para pH de leites fermentados em legislações, os valores encontrados podem ser comparados com os determinados por estudos como o de Farias et al. (2012), no qual foram mensurados pH de leites fermentados comerciais brasileiros. Os valores encontrados pelos pesquisadores alternaram entre 3,61 e 4,11. Valores de pH dentro dessa faixa não foram encontrados em nenhum período de estocagem do presente trabalho, no qual o pH do leite fermentado variou de 4,72 a 4,93, possivelmente devido a produção de compostos alcalinos nesse leite.

Quadro 10. Requisitos físico-químicos para leites fermentados segundo a IN nº 46 de 2007 do MAPA

<b>Matéria gorda láctea (g/100g)</b> <b>Norma FIL 116<sup>a</sup>:1987</b>				<b>Acidez (g de ácido láctico/100g) Norma FIL 150:1991</b>	<b>Proteínas lácteas (g/100g)</b>
<b>Com creme</b>	<b>Integral</b>	<b>Parcialmente desnatado</b>	<b>Desnatado</b>		
Mín. 6,0	3,0 a 3,9	0,6 a 2,9	Máx. 0,5	0,6 a 2,0	Mín. 2,9

Fonte: BRASIL (2007)

#### 5.4.2. Análises microbiológicas em leite em pó e leite fermentado

A pesquisa de patógenos no leite em pó reconstituído demonstrou a ausência coliformes totais e fecais (NMP/mL), *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp., bolores e leveduras, demonstrando que esse produto se apresenta livre de contaminantes.

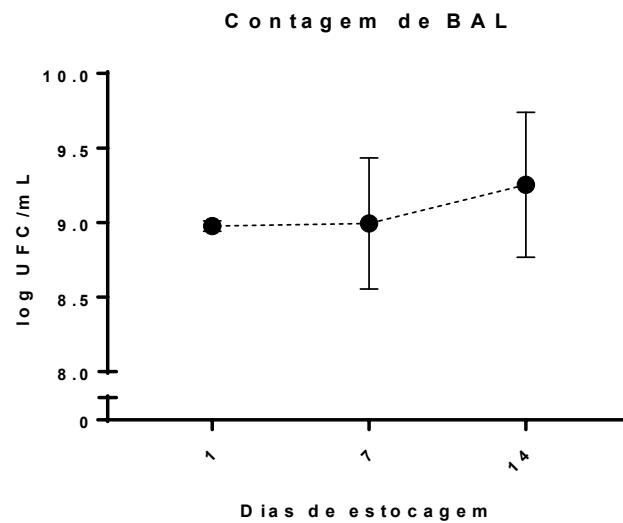
Foi observado uma contagem inicial de inócuos de  $2 \times 10^8$  UFC/g de BAL (figura 14). Essa contagem se manteve viável e de acordo com a legislação vigente (quadro 11) durante todo período de estocagem do leite fermentado.

Quadro 11. Requisitos microbiológicos para leites fermentados segundo a IN nº 46 de 2007 do MAPA

<b>Produto</b>	<b>Contagem de bactérias lácticas totais (UFC/g) Norma FIL 117<sup>a</sup>: 1988</b>	<b>Contagem de leveduras específicas (UFC/g) Norma FIL 94 B: 1990</b>
Leite fermentado ou cultivado	mín. $10^6$	-

Fonte: BRASIL (2007)

Figura 14. Contagem de BAL de leite fermentado com *Lactococcus lactis* (LL) em diferentes dias de estocagem a 7°C



A partir dos resultados encontrados foi possível avaliar que a amostra *Lactococcus lactis* (LL) demonstrou eficiente potencial tecnológico para fermentação de leite, sendo capaz de atingir os parâmetros físico-químicos e microbiológicos exigidos pela legislação vigente (BRASIL, 2007), exceto para proteína, a qual se apresentou um pouco abaixo do padrão mínimo aceitável em alguns dias de estocagem.

Além disso, existe a possibilidade do uso dessa cepa como cultura fermento para fabricação de queijos, devido a sua eficiente produção de ácidos, eficiente antagonismo e possível ação de proteólise (característica desejável em queijos).

## 6. Conclusão

As amostras *Lactobacillus brevis* (LB) e *Lactococcus lactis* (LL) apresentaram melhores resultados nas avaliações *in vitro* de potencial probiótico, com base nos resultados obtidos nos testes de antibiograma, tolerância a sais biliares e antagonismo indireto, sendo então selecionadas para a produção de leite fermentado.

Foi observado, como resultado insatisfatório, um perfil de multirresistência por grande parte das amostras aos antimicrobianos avaliados, sendo necessário mais estudos sobre o perfil de sensibilidade a antimicrobianos e transferência de genes de resistência.

Todas as bactérias avaliadas foram capazes de produzir halos de inibição frente aos patógenos avaliados, de grande importância de saúde pública, sem inibir a BAL isolada de QMA.

Também foi observado que nenhuma amostra avaliada foi considerada tolerante ao suco gástrico artificial. Apesar disso, existem métodos como a veiculação dessas bactérias à produtos lácteos (capazes de gerar certa proteção a esses micro-organismos) e a microencapsulação. Somado a isso, os testes *in vitro* não simulam totalmente a realidade do trato gastrointestinal humano, sendo necessário estudos *in vivo*, a fim de avaliar, de fato, a viabilidade dessas bactérias ao suco gástrico. Todas as amostras, exceto *Lacticaseibacillus rhamnosus* (LR), apresentaram tolerância aos sais biliares.

Apenas a amostra *L. lactis* (LL) foi capaz de fermentar o leite em pó reconstituído. Ela atingiu os padrões microbiológicos e físico-químicos adequados, exceto para os teores de proteína, segundo a legislação vigente para leites fermentados. Demonstrando um bom potencial tecnológico. Além disso, essa cepa também pode ser utilizada como cultura fermento para elaboração de queijos, devido a sua eficiente produção de ácidos, eficiente antagonismo e possível ação de proteólise.

A partir dos resultados apresentados, sugere-se que a amostra *L. lactis* (LL) seja o micro-organismo mais adequado a ser utilizado como probiótico e cultura para obtenção de leite fermentado e queijos. Sendo necessários mais estudos para a utilização da mesma.

## 7. Referências

ABRIOUEL, H.; MUÑOZ, M.D.C.C.; LERMA, L.L.; MONTORO, B.P.; BOCKELMANN, W.; PICHNER, R.; KABISCH, J.; CHO, G.S.; FRANZ, C.M.A.P.; GÁLVEZ, A.; BENOMAR, N. New insights in antibiotic resistance of *Lactobacillus* species from fermented foods. **Food Research International**, v. 78, p. 465-481, 2015.

ACURCIO, L.B.; SOUZA, M.R.; NUNES, A.C.; OLIVEIRA, D.L.S; SANDES, S.H.C.; ALVIM, L.B. Isolation, enumeration, molecular identification and probiotic potential evaluation of lactic acid bacteria isolated from sheep milk. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 66, n. 3, p. 940-948, 2014, 2014.

ACURCIO, L.B. *Efeito protetor de lactobacilos isolados de queijo Minas artesanal na infecção experimental com Salmonella enterica subsp. enterica sorovar Typhimurium*. 2016. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais.

ACURCIO, L.B; WUYTS, S.; DE CICCO, S., SÁVIO, H.; SANT'ANNA, F.M.; PEDROSO, S.H.S.P.; BASTOS, R.W.; DOS REIS, D.C.; VIEIRA, A.F.; CASSALI, G.D.; LEBEER, S.; DE SOUZA, M.R.; NICOLI, J.R. Milk Fermented by *Lactobacillus paracasei* NCC 2461 (ST11) Modulates the Immune Response and Microbiota to Exert its Protective Effects Against *Salmonella typhimurium* Infection in Mice. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 2, 2020.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Módulo 3 **Resistência Microbiana** - mecanismo e impacto clínico. Brasília, Ministério da Saúde, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde**. Brasília, Ministério da Saúde, 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **RDC nº 241, de 27 de julho de 2018**. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos, 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos**. Guia nº 21, versão 2, 2021.

AHMED, J.A.O.; RAZIG, K.A.A. Effect of Levels of Buttermilk on Quality of Set Yoghurt. **Journal of Nutrition & Food Sciences**, v. 7, n. 634, p. 2, 2017.

AIBA, Y.; ISHIKAWA, H.; TOKUNAGA, M.; KOMATSU, Y. Anti-*Helicobacter pylori* activity of non-living, heat-killed form of lactobacilli including *Lactobacillus johnsonii* No. 1088. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 11, 2017.

AKIN, Z.; OZCAN, T. Functional properties of fermented milk produced with plant proteins. **Food Science and Technology**, v. 86, 2017.

ALI, Y.; KOT, W.; ATAMER, Z.; HINRICHS, J.; VOGENSEN, F. K.; HELLER, K. J.; NEVE, H. Classification of lytic bacteriophages attacking dairy *Leuconostoc* starter strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 12, 2013.

AMANI, E.; ESKANDARI, M.H.; SHEKARFOROUSH, S. The effect of proteolytic activity of starter cultures on technologically important properties of yogurt. **Food Scienci & Nutrition**, v. 5, n. 3, 2017.

ANDERSON, C.S; CRYAN, F.J; DINAN, T.M.D. The psychobiotic revolution – Mood, Food, and the New Science of the Gut-Brain Connection. **National Geographic**, Washington, D.C, 2017.

ANDRADE, C.R.G.; SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M.; ACURCIO, L.B.; SANT'ANNA, F.M.; CASTRO, R.D.; OLIVEIRA, D.L.S. Propriedades probióticas *in vitro* de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra – MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 5, 2014.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington, 2002.

ASSIS, G.B.N.; PEREIRA, F.L.; ZEGARRA, A.U.; TAVARES, G.C.; LEAL, C.A.G.; FIGUEIREDO, H.C.P. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for the fast identification of gram-positive fish pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 1492, 2017.

BELHADJ, H.; HARZALLAH, D.; BOUAMRA, D.; KHENNOUF, S.; DAHAMNA, S.; GHADBANE, M. Phenotypic and Genotypic Characterization of Some Lactic Acid Bacteria Isolated from Bee Pollen: A Preliminary Study. *Bioscience of Microbiota*. **Food and Health**, v. 33, n. 1, 2014.

BIBEL, D.J. Elie Metchnikoff's Bacillus of Long Life – Sour milk products were the rage of Europe for 20 years, meanwhile confusion surrounded a controversial hypothesis about longevity. **Features**, v. 52, n. 12, p. 661-665, 1988.

BOLOTIN, A.; WINCKER, P.; MAUGER, S.; JAILLON, O.; MALARME, K.; WEISSENBACH, J.; EHRLICH, S. D.; SOROKIN, A. The Complete Genome Sequence of the Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. **Genome research**, v. 11, 2001.

BORGOGNA, M.; BELLICH, B.; ZORZIN, L.; LAPASIN, R.; CESÀRO, A. Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. **Food Chemistry**, v. 122, n. 2, 2010.

BURGAIN, J.; SCHER, J.; FRANCIUS, G.; BORGES, F.; CORGNEAU, M.; REVOL-JUNELLES, A.M.; CAILLIEZ-GRIMAL, C.; GAIANI, C. Lactic acid bacteria in dairy food: surface characterization and interactions with food matrix components. **Advances in colloid and interface science**, v. 213, 2014.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Brasília, 2007.

CAMPION, A.; MORRISSEY, R.; FIELD, D.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Use of enhanced nisin derivatives in combination with food-grade oils or citric acid to control *Cronobacter sakazakii* and *Escherichia coli* O157: H7. **Food Microbiology**, v. 65, 2017.

CANDELA, M.; PERNA, F.; CARNEVALI, P.; VITALI, B.; CIATI, R.; GIONCETTI, P.; RIZELLO, F.; CAMPIERI, M.; BRIGIDI, P. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 3, 2008.

CAVANAGH, D., FITZGERALD, G.F.; MCAULIFFE, O. From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. **Food Microbiology**, n. 47, 2015.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 12, 1998a.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, 1998b.

COUDEYRAS, S.; MARCHANDIN, H.; FAJON, C.; FORESTIER, C. Taxonomic and strain-specific identification of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* 35 within the *Lactobacillus casei* group. **Applied and Environment Microbiology**, v. 74, n. 9, 2008.

COSTA, H.H.S.; SOUZA, M.R.; ACURCIO, L.B.; CUNHA, A.F.; RESENDE, M.S.F.; NUNES, A.C. Potencial probiótico *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, 2013.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, 2005.

CUNHA, S.F.A.L. *Potencial probiótico in vitro de Lactobacillus spp. isolados de queijo Minas artesanal da Serra do Salitre – MG*. Dissertação (mestrado em Produção Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.

DE LA ROSA-ALCARAZ, M.A.; ORTIZ-ESTRADA, A.M.; HEREDIA-CASTRO, P.Y.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A.; REYES-DÍAZ, R.; VALLEJO-CORDOBA, B.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A.F. Poro de Tabasco cheese: Chemical composition and microbiological quality during its artisanal manufacturing process. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 4, p. 3025-3037, 2020.

DE VRESE, M; LAUE, C; OFFICK, B; SOETH, E; REPENNING, F; THOB, A.; SCHREZENMEIR, J. A combination of acid lactase from *Aspergillus oryzae* and yogurt bacteria improves lactose digestion in lactose maldigesters synergistically: A randomized, controlled, double-blind crossover trial. **Clinical Nutrition**, v. 14, n. 1, 2014.

DICKS, L. M.; BOTHA, M.; LOOS, B.; SMITH, C. Adhesion of *Lactobacillus reuteri* strain Lr1 to equine epithelial cells and competitive exclusion of *Clostridium difficile* from the gastro-intestinal tract of horses. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 2, 2015.

DO CARMO, M.S.; SANTOS, C.I.D.; ARAUJO, M.C.; GIRÓN, A.J.A.; FERNANDES, E.S.; MONTEIRO-NETO, V. Probiotics, mechanisms of action, and clinical perspectives for diarrhea management in children. **Food Funct**, v. 9, n. 10, 2018.

DORES, M.T; FERREIRA, C.L.L.F. Queijo Minas Artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v. 2, n. 2, 2012.

EL-GHAISH, S.; AHMADOVA, A.; HADJI-SFAZI, I.; MECHRFI, K.; BAZUKYAN, I.; CHOISET, Y.; RABESONA, Y.C.H.; SITOHY, POPOV, Y.G.; KULIEV, A.A.; MOZZI, F.; CHOBERT, J.M.; HAERTLÉ, T. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. **Trends in Food Science & Technology**, 2011.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS (EMATER). **Estudo identifica municípios da Serra Geral como produtores tradicionais de queijo artesanal**, 2018.

FARIAS A.G.M.M.; OZELAME, S.B.; SCHMITT, B.H.E.; CAPRISTANO, D.F.; SILVEIRA, E.G. Avaliação da acidez de diversas marcas de leite fermentado disponíveis comercialmente. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 12, n. 4, 2012.

FARVIN, K. S.; BARON, C. P.; NIELSEN, N. S.; OTTE, J.; JACOBSEN, C. Antioxidant activity of yoghurt peptides: Part 2—Characterisation of peptide fractions. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: **Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Cordoba, Argentina, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. London Ontario, Canadá, 2002.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365-378, Oxford, 1989.

GAHRUIE, H.H.; ESKANDARI, M.H.; MESBAHI, G.; HANIFPOUR, M. A. Scientific and technical aspects of yogurt fortification: A review. **Food Science and Human Wellness**, v. 4, n. 1, 2017.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 6, 2010.

GONZÁLEZ REVELLO, Á.; CARRO, S.; CAL, K.; GIACAMAN, S.; ALDROVANDI, A. Lactococcus lactis autóctono: evaluación del efecto antilisterial y de propiedades sensoriales en quesos tipo Cuartirolo. **Innotec**, n. 12, 2016.

HERMANN, G.; FUNCK, G.D.; SCHMIDT, J.T.; PEREIRA, J.Q.; BRANDELLI, A.; RICHARDS, N.S.P.S. Evaluation of probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from artisan cheese. **Journal of Food Safety**, 2014.

HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, M. J.H. Probiotics: a general view. In: WOOD, B.J.B. Lactic acid bacteria in health and disease 1. **Elsevier Applied Science**, p.151-170, 1992.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (IDF). **Yogurt: enumeration of characteristic microorganisms colony count technique at 37°C**. IDF Standard 117A. Brussels: IDF, 1988.

JAMES, L.; BEENA, A.K.; ANUPA, A.; SREESHMA, N. Antibioqram of Lactobacilli Isolated from Four Different Niches. **Journal of Microbiology & Microbial Technology**, v. 1, n. 1, p. 4, 2016.

JERÔNIMO-CENEVIVA, A.B.O. *Avaliação do potencial probiótico de bactérias acidoláticas produtoras de substância antimicrobiana isoladas de mussarela de búfala*. 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP.

JEON, H.H.; KIM, K.H.; CHUN, B.H.; RYU, B.H.; HAN, N.S.; JEON, C.O. A proposal of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *jonggajibkimchii* subsp. *nov.* and reclassification of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *suionicum* (Gu et al., 2012) as *Leuconostoc suionicum* sp. *nov.* based on complete genome sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 7, 2017.

KLEIN, G.; HALLMANN, C.; CASAS, I.A.; ABAD, J.; LOUWERS, J.; REUTER, G. Exclusion of *vanA*, *vanB* and *vanC* type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. **Journal off Applied Microbiology**, v. 89, n. 5, 2000.

KIMOTO, H.; NOMURA, M.; KOBAYASHI, M.; OKAMOTO, T.; OHMOMO, S. Identification and Probiotic Characteristics of Lactococcus Strains from lant Materials. **Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ**, v. 38, n. 2, 2004.

KÖNIG, H.; FROHLICH, J.; UNDEN, G. (Eds.). Lactic Acid Bacteria. In: KONIG, H.; UNDEN, G.; FROHLICH, J. (Eds.). *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. **Springer Nature**, 2017.

KOT, W.; HANSEN, L.H.; NEVE, H.; HAMMER, K.; JACOBSEN, S.; PEDERSEN, P. D.; SORENSEN, S.J.; HELLER, K.J.; VOGENSEN, F.K. Sequence and comparative analysis of *Leuconostoc* dairy bacteriophages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 176, n. 17, 2014.

LA FATA, G.; WEBER, P.; MOHAJERI, M.H. Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation. **Probiotics Antimicrob Proteins**, v. 10, 2018.

LÄHTEINEN, T; LINDHOLMA, A; RINTTILÄ, T; JUNNIKKALAA, S; KANTA, R; PIETILÄ, T.A; LEVONENC, K; OSSOWSKIA, I; SOLANO-AGUILARB, G; JAKAVA-VILJANENC, M; PALVA, A. Effect of *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 as a feeding supplement on the performance and immune function of piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 158, n. 1-2, 2014.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 4, 2008.

LEWUS, C.B.; MONTVILLE, T.J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacterias. **Journal of Microbiology Methods**, n. 13, 1991.

LIMA, C.D.L.C.; LIMA, L.A.; CERQUEIRO, M.M.O.P.; FERREIRA, E.G.; ROSA, C.A. Bactérias ácido lácticas e leveduras associadas com queijo-Minas-artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n.1, 2009.

LILLY, D.M.; STILLWEL, R.H. Probiotics: Growth-promoting factors produced by micro-organisms. **Science**, Washington, v. 147, n. 3659, 1965.

LISTER, J. A further contribution to the natural history of bacteria and the germ theory of fermentative changes. **Quart. Microbiol. Sci.**, v. 13, 1873.

LV, L.X.; HU, X.J.; QIAN, G.R.; ZHANG, H.; LU, HF.; ZHENG, B.W.; JIANG, L.; LI, L.J. Administration of *Lactobacillus salivarius* LI01 or *Pediococcus pentosaceus* LI05 improves acute liver injury induced by D-galactosamine in rats. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, 2014.

MASUDA, T.; KIMURA, M.; OKADA, S.; YASUI, H. *Pediococcus pentosaceus* Sn26 inhibits IgE production and the occurrence of ovalbumin-induced allergic diarrhea in mice. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 74, n. 2, 2010.

MELLO, H.D.; MORAES, J.R.; NIZA, I.G.; MORAES, F.R.; OZÓRIO, R.O.A.; SHIMADA, M.T.; FILHO, J.R.E.; CLAUDIANO, G.S. Beneficial effects of probiotics on the intestine of juvenile Nile tilapia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 6, 2013.

MENDES, D.P.G. *Características físico-químicas e microbiológicas e aceitação sensorial de leites fermentados por bactérias produtoras de ácido láctico isoladas de queijo coalho de Pernambuco*. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais.

MINAS GERAIS. Estado de Minas Gerais. **Lei nº 23.157 de 18 de dezembro de 2018**. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2018.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). **Portaria nº 1825 de 19 de junho de 2018**. Identifica a região da Serra Geral do Norte de Minas como produtora de queijo artesanal. Belo Horizonte, 2018.

MOKOENA, M.P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. **Molecules**, v. 22, n. 8, 2017.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF AOAC INTERNATIONAL, 21 ed., v.1, 2019.

OELSCHLAEGER, T.A. Mechanisms of probiotic actions – a review. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, 2010.

OJALA, T.; KANKAINEN, M.; CASTRO, J.; CERCA, N.; EDELMAN, S.; WESTERLUND-WIKSTRON, B.; PAULIN, L.; HOLM, L.; ALVINEN, P. Comparative genomics of *Lactobacillus crispatus* suggests novel mechanisms for the competitive exclusion of *Gardnerella vaginalis*. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, 2014.

OLIVEIRA, M.N., SIVIERI, K., ALEGRO, J.H.A., SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, 2002.

OLIVEIRA, P.P.C.M. *Efeito protetor de Lactobacillus plantarum (B7) e L. rhamnosus (D1) de queijo Minas artesanal na infecção experimental por Escherichia coli EHEC e EIEC e o desenvolvimento de leite de búfala fermentado*. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, 2016.

OLIVEIRA, C.D. Avaliação físico-química de leites fermentados comercializados em Diamantina–MG/Physicochemical evaluation of fermented milks marketed in Diamantina–MG. **Brazilian Applied Science Review**, v. 3, n. 1, 2018.

ÖZOGUL, F.; HAMED, I. The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amine formation: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 58, n. 10, 2018.

PAES, A.C.; MANGIA, S.H.; FLAMÍNIO, A.P.; LARA, G.H.B.; LISTONI, F.J.P. Perfil de sensibilidade de bactérias isoladas de animais domésticos na região de Botucatu frente ao cloranfenicol e florfenicol. **Veterinária e Zootecnia**, v.16, n.1, mar., 2009.

PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition Health**, n. 29, 1974.

PAULA, A.T.; JERÔNIMO-CENEVIVA, A.B.; SILVA, L.F.; TODOROV, S.D.; FRANCO, B.D.G.M. CHOISSET, Y.; HAERTLÉ, T.; CHOBERT, J.M.; DOUSSET, X.; PENNA, A.L.B. *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: A bacteriocinogenic strain isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 6, n. 3-4, 2014.

PEREIRA, M.A.G. *Efeito do teor de lactose e do tipo de cultura no processo de acidificação e pós-acidificação de iogurte*. 2002. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

PERES, C.M.; ALVES, M.; MENDOZA, A.H.; MOREIRA, L.; SILVA, S.; BRONZE, M.R.; VILAS-BOAS, L.; PERES, C.; MALCATA, X. Novel isolates of lactobacilli from fermented Portuguese olive as potential probiotics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, 2014.

PESCUMA, M.; ELVIRA, M.H.; HAERTLÉ, T.; CHOBERT, J.M.; MOZZI, F.; VALDEZ, G.F. Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus CRL 454 cleaves allergenic peptides of b-lactoglobulin. **Food Chemistry**, v. 170, n. 1, 2015.

PLAZA-DIAZ, J.; RUIZ-OJEDA, F.J.; GIL-CAMPOS, M.; GIL, A. Mechanisms of Action of Probiotics. **Advances in Nutrition**, v. 10, 2019.

PORTO, M.C.W.; KUNIYOSHI, T.M.; AZEVEDO, P.V.D.; VITOLO, M.; OLIVEIRA, R.P.S. *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 3, 2017.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A.M.; FILHO, A.D.R. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde, Porto Alegre**, v. 4, n. 2, 2011.

RESENDE, M.F.S.; COSTA, H.H.S.; ANDRADE, E.H.P.; ACÚRCIO, L.B.; DRUMMOND, A.F.; NUNES, A.F.C.A.C.; MOREIRA, J.L.S.; PENNA, C.F.A.M.; SOUZA, M.R. Queijo de Minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidoláticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, 2011.

ROCHA, L.A.C. *Caracterização físico-química, microbiológica e de perfis de aminoácidos e de amins bioativas livres do queijo artesanal da Serra Geral-MG*. 2021. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.

RODRÍGUEZ-ALONSO, P.; FERNÁNDEZ-OTERO, C.; CENTENO, J.A.; GARABAL, J.I. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria *and Micrococcaceae/Staphylococcaceae* isolates from artisanal raw milk cheeses, and potential implications on cheese making. **Journal Food Science**, v. 74, 2009.

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

RUTAVA, S.; WALKER, W. Probiotics. In: Probiotics in Pediatric Medicine. **Nutrition and Health**, 2009.

SANT'ANNA, F. M; ACURCIO, L. B; ALVIM, L. B; CASTRO, D.R; OLIVEIRA, G.L; SILVA, M.A; NUNES, C.A; NICOLI, R.J; SOUZA, M.R. Assessment of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Minas artisanal cheese produced in the Campo das Vertentes region, Brazil. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, n. 4, 2017.

SCHLEIFER, K.H.; KRAUS, J.; DVORAK, C.; KILPPER-BÄLZ, R.; COLLINS, M.D.; FISCHER, W. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 6, n. 2, 1985.

SILVA, B.C.; JUNG, L.C.R.; SANDES, S.H.C.; ALVIM, L.B.; BOMFIM, M.R.; NICOLI, J.R.; NEUMANN, E.; NUNES, A.C. *In vitro* assessment of functional properties of lactic acid bacteria isolated from faecal microbiota of healthy dogs for potential use as probiotics. **Beneficial Microbes**, v. 4, n. 3, 2013.

SILVA, G.J. *Identificação molecular de bactérias ácido lácticas e propriedades probióticas in vitro de Lactobacillus spp. isolados de queijo minas artesanal de Araxá, Minas Gerais*. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG.

SILVA, J.G.; CASTRO, R.D.; SANT'ANNA, F.M.; BARQUETE, R.M.; OLIVEIRA, L.G.; ACURCIO, L.B.; LUIZ, L.P.M.; SALES, G.A.; NICOLI, J.R.; SOUZA, M.R. *In vitro* assessment of the probiotic potential of lactobacilli isolated from Minas artisanal cheese produced in the Araxá region, Minas Gerais state, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 2, 2019.

SMID, E.J.; KLEEREBEZEM, M. Production of aroma compounds in lactic fermentations. **Food Science and Technology**, v. 5, 2014.

SOUZA, B.M.S.; BRUNARI, N. Bactérias probióticas e sua aplicação em leites fermentados. **Revista Científica de Medicina Veterinária-UNORP**, v. 1, n. 1, 2017.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 40, n. 3, 1976.

TOURNAS, V.; STACK, M.E.; MISLIVEC, P.V.; KOCH, H.A.; BANDLER, R. Bacteriological Analytical Manual Online. **US Food & Drug Administration**, 2001.

VALENTE, G.L.C.; ACURCIO, L.B.; FREITAS, L.P.V.; NICOLI, J.R.; SILVA, A.M.; SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M. Short communication: In vitro and in vivo probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* B7 and *Lactobacillus rhamnosus* D1 isolated from Minas artisanal cheese. **Journal of Dairy Science**, v.102, p.5957 - 5961, 2019.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics - from Metchnikoff to bioactives. International. **Dairy Journal**, v. 18, n. 7, 2008.

VIEGAS, R.P.; SOUZA, M. R.; FIGUEIREDO, T. C.; RESENDE, M.F.S.; PENNA, C. F.A.M.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Qualidade de leites fermentados funcionais elaborados a partir de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, 2010.

VINDEROLA, G.; OUWEHAND, A.; SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2019.

VON WRIGHT, A. Genus *Lactococcus*. In: Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 4th ed., **CRC Press**, Boca Raton, 2012.

WALKER, D.K.; GILLILAND, S.E. Relationships among bile tolerance, bile salt desconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 4, 1993.

WONG, A.; SAINT NGU, D.Y.; DAN, L.A.; OOI, A.; LIM, R.L.H. Detection of antibiotic resistance in probiotics of dietary supplements. **Nutrition Journal**, v. 14, n. 1, 2015.

ZHANG, Y.; TONG, H.; DONG, X. *Pediococcus cellicola* sp., a novel lactic and coccus isolated from a distilled-spirit-fermenting cellular. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, 2005.

ZHENG, P.X.; FANG, H.Y.; YANG, H.B.; TIEN, N.Y.; WANG, M.C.; WU, J.J. *Lactobacillus pentosus* strain LPS16 produces lactic acid, inhibiting multidrug-resistant *Helicobacter pylori*. **Journal of microbiology, immunology, and infection**, v. 14, 2014.

ZHENG, J.; WITTOUCK S.; SALVETTI E.; FRANZ, C.M.A.P.; HARRIS, H.M.B.; MATTARELLI, P.; O'TOOLE, P.W.; POT, B.; VANDAMME, P.; WALTER, J.; WATANABE, K.; WUYTS, S.; FELIS, G.E.; GANZLE, M.G.; LEBEER, S. *A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae*, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, 2020.