

UNIVERSIDADE FERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Propriedades probióticas *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de Queijo Minas Artesanal da região de Campo das Vertentes, Minas Gerais

Thamiris Carolina Souza Mello

BELO HORIZONTE

2022

Thamiris Carolina Souza Mello

Propriedades probióticas *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de Queijo Minas Artesanal da região de Campo das Vertentes, Minas Gerais

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

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

Orientador: Marcelo Resende de Souza

Co-orientadoras: Bruna Maria Salotti de Souza e Cláudia Freire de Andrade Morais Penna

BELO HORIZONTE

2022

M527p

Mello, Thamiris Carolina Souza, 1994-

Propriedades probióticas *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de Queijo Minas Artesanal da região de Campo das Vertentes, Minas Gerais / Thamiris Carolina Souza Mello. – 2022.

82 f. il

Orientador: Marcelo Resende de Souza

Bibliografias: f. 64 a 82

Dissertação (Mestrado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

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. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III. Título.

CDD – 637

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia 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

THAMIRIS CAROLINA SOUZA MELLO

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 15 de fevereiro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

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

Dr.(a). Elisa Helena Paz Andrade

Dr.(a). Felipe Machado de Sant Anna



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Resende de Souza, Professor do Magistério Superior**, em 15/02/2022, às 17:12, 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 **Felipe Machado de Sant'Anna, Usuário Externo**, em 16/02/2022, às 12:32, 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 **Elisa Helena Paz Andrade, Professora do Magistério Superior**, em 16/02/2022, às 12:36, 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, informando o código verificador **1227097** e o código CRC **663991BB**.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por toda força dada e pelas inúmeras bênçãos concedidas até aqui.

À minha mãe, Zilda, meu maior exemplo de mulher forte e daquilo que eu quero ser, pelos conselhos, carinho e paciência. Ao meu pai, Jair, meu protetor, por não medir esforços para me ajudar quando pedi. Nunca vou me esquecer do amor e cuidado de vocês.

À minha irmã e melhor amiga Renata, pelas opiniões e críticas quando necessário, além dos momentos de descontração.

Ao Victor, por estar ao meu lado em toda e qualquer circunstância, e pelas palavras que me fortaleceram frente às diversidades.

Ao professor Marcelo, pela orientação impecável, conhecimentos compartilhados, e por estar sempre de prontidão para me ajudar.

Às professoras Bruna e Cláudia, pela excelente orientação e por terem demonstrado interesse em contribuir com o projeto.

Ao Gustavo Valente pela paciência em compartilhar conhecimento e auxiliar em todas as etapas desse trabalho.

Aos funcionários do DTIPOA Isabella, Marco Antônio, Laurindo, Viviane e Cosme, pelos auxílios prestados durante a execução do trabalho.

Aos colegas de pós-graduação, Ana Carolina e João Paulo, pela companhia e ajuda fundamental em todas as etapas do trabalho. Aos alunos de IC, Mariana, Lucas e Lucas, pelo auxílio e dedicação.

À professora Elisabeth por possibilitar a realização de análises no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e às alunas de pós-graduação Karen e Gabriela, por ajudar com paciência.

À banca, Elisa e Felipe, pelas valiosas contribuições com o trabalho.

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

RESUMO

A produção de queijo Minas artesanal (QMA) é uma atividade tradicional no estado de Minas Gerais. Esse produto é feito a partir de leite cru e fermento endógeno – rico em bactérias ácido-láticas (BAL), variáveis de acordo com a região de produção e que frequentemente possuem potencial probiótico. Esses microrganismos, quando administrados diariamente em quantidades adequadas, contribuem para a saúde a partir da modulação da resposta imunológica, prevenção de doenças e alterações gastrintestinais, entre outros. O objetivo desse trabalho foi identificar propriedades probióticas nas BAL isoladas de QMA da região de Campo das Vertentes. Pretendeu-se, ainda, elaborar um leite fermentado potencialmente probiótico utilizando-se o microrganismo que apresentou melhores resultados nos testes de potencial probiótico *in vitro*, avaliando sua qualidade físico-química e a viabilidade das BAL ao longo de 14 dias de armazenamento sob refrigeração a 8-10°C. A BAL que melhor atendeu aos critérios para ser considerada potencialmente probiótica foi *Leuconostoc mesenteroides* LM. O microrganismo, além de demonstrar sobrevivência à simulação das barreiras gastrintestinais, apresentou perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos desejável e capacidade de inibir microrganismos patogênicos, como *Listeria monocytogenes*. O leite fermentado por *Ln. mesenteroides* LM apresentou parâmetros físico-químicos e viabilidade das BAL ($> 10^8$ UFC/mL) de acordo com os padrões propostos pela legislação durante o período de estocagem a 8-10°C, por 14 dias. Esses resultados indicam que *Ln. mesenteroides* LM possui potencial probiótico e poderá ser utilizada na elaboração de alimentos funcionais como leite fermentado.

Palavras chave: *Leuconostoc*, probiótico, alimentos funcionais, leite fermentado

ABSTRACT

Minas Gerais is traditional in the production of artisanal *Minas* cheese – a product made from raw milk and endogenous starter culture – rich in lactic acid bacteria (LAB), which vary in accordance to the region of production and which often have probiotic potential. These microorganisms, when administered daily in adequate amounts, contribute to health benefits, such as: modulation of the immune response, prevention of gastrointestinal diseases, among others. The aim of this study was to identify probiotic properties in LAB isolated from artisanal Minas cheeses from the *Campo das Vertentes*. It was also intended to elaborate a potentially probiotic fermented milk using the microorganism that presented the best results in the in vitro probiotic potential tests, evaluating its physical-chemical quality and the viability of LAB over 14 days of refrigerated storage at 8-10°C. The LAB that best met the criteria to be considered potentially probiotic was *Leuconostoc mesenteroides*. This microorganism, in addition to survival of the simulation of gastrointestinal barriers, presented a desirable antimicrobial susceptibility profile and the ability to inhibit pathogenic microorganisms, such as *L. monocytogenes*. The milk fermented by *Ln. mesenteroides* LM presented physicochemical parameters following the standards proposed by the legislation and the viability of LAB ($> 10^8$ CFU/mL) during the 14 days of refrigerated storage at 8-10°C. These results indicate that *Ln. mesenteroides* LM has probiotic potential and can be used in the preparation of functional foods such as fermented milk.

Keywords: *Leuconostoc*, probiotic, functional foods, fermented milk

LISTA DE FIGURAS

Figura 2. Região do Campo das Vertentes e municípios produtores de queijo Minas artesanal.....	19
Figuras 4 e 5. Diferença da absorvância após duas horas de incubação a 37°C em pH 7,0 (controle) e pH 2,0 (ácido gástrico artificial) para <i>Lb. brevis</i> LB e <i>Ln. mesenteroides</i> LM isolados de queijo Minas artesanal de Campo das Vertentes – MG.....	49
Figuras 6 e 7. Diferença da absorvância após 18h de incubação a 37°C em caldo MRS (controle) e caldo MRS com 0.3% (p/v) de sais biliares (Oxgall®) para para <i>Lb. brevis</i> LB e <i>Ln. mesenteroides</i> LM.	50
Figura 8. Média dos halos de inibição (mm) e desvios-padrão do teste de antagonismo <i>in vitro</i> das bactérias ácido-láticas isoladas de queijo Minas artesanal de Campo das Vertentes, MG, contra microrganismos reveladores.....	55
Figura 9. Parâmetros físico-químicos dos leites fermentados por <i>Ln. mesenteroides</i> LM, isolado de queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes, Minas Gerais, nos dias 1, 7 e 14 de estocagem a 8-10°C	63
Figura 10. Médias de três repetições das contagens (log UFC/mL) de <i>Ln. mesenteroides</i> LM durante 1, 7 e 14 dias de estocagem do leite fermentado sob refrigeração de 8-10°C.....	64

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Requisitos físico-químicos para inspeção de leites fermentados.....	25
Tabela 2. Critérios microbiológicos para inspeção de leites fermentados	25
Tabela 3. Critérios de seleção de linhagens probióticas	28
Tabela 4. Principais grupos de antimicrobianos e seus mecanismos de ação	30
Tabela 5. Microrganismos isolados de queijos Minas artesanais de Campo das Vertentes – Minas Gerais	38
Tabela 6. Discos de antimicrobianos utilizados no antibiograma.....	41
Tabela 7. Níveis de sensibilidade de <i>Lactobacillus</i> spp. a antimicrobianos de acordo com a média dos diâmetros dos halos de inibição (mm) no teste de antibiograma	42
Tabela 8. Percentuais de inibição e classificação quanto ao nível de tolerância ao ácido gástrico artificial (pH 2,0) e aos sais biliares de amostras de BAL isoladas de queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes, MG.....	47
Tabela 9. Sensibilidade de BAL isoladas de queijo Minas artesanal de Campo das Vertentes – MG à antimicrobianos de diferentes classes.....	51
Tabela 10. Média dos parâmetros físico-químicos dos leites fermentados por <i>Ln. mesenteroides</i> LM, isolados de queijo Minas artesanal de Campo das Vertentes, Minas Gerais, nos dias 1, 7 e 14 de estocagem a 8-10°C.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA	<i>American Public Health Association</i>
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bactérias do ácido láctico
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BHS	<i>Biliary salt hidrolase</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CPS	Concentrado proteico de soro lácteo
FAO/WHO	Food and Agriculture/World Health Organization
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognized as Safe
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDF	<i>International dairy federation</i>
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
IPHAN	Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRS	<i>Man-Rogosa-Sharpe</i>
NMP	Número mais provável
QMA	Queijo Minas Artesanal
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
UFC	Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVO.....	13
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1. Queijos.....	14
3.2. Queijo Minas Artesanal.....	15
3.2.1. Campo das Vertentes como região produtora de QMA.....	18
3.3. Bactérias ácido-láticas (BAL).....	19
3.3.1. Gênero <i>Lactobacillus</i>	20
3.3.2. Gênero <i>Lactococcus</i>	21
3.3.3. Gênero <i>Leuconostoc</i>	22
3.4. Leites fermentados.....	23
3.4.1. Histórico.....	23
3.4.2. Legislação.....	24
3.4.3. Leites fermentados e as bactérias ácido-láticas.....	25
3.5. Probióticos.....	26
3.5.1. Avaliação <i>in vitro</i> do potencial probiótico de bactérias ácido-láticas	27
3.5.1.1. Resistência das BAL aos antimicrobianos.....	29
3.5.2. Mecanismos de ação e benefícios dos probióticos.....	31
3.5.2.1. Modulação da resposta imunológica.....	32
3.5.2.2. Exclusão competitiva e efeitos associados.....	33
3.5.2.3. Intolerância à lactose.....	34
3.5.2.4. Câncer de cólon.....	35
3.5.2.5. Outros efeitos benéficos associados aos probióticos.....	36
3.5.2.5.1. A COVID-19 e os probióticos.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1. Microrganismos utilizados.....	38
4.1.1. Amostras de bactérias ácido-láticas.....	38
4.2. Avaliação do potencial probiótico <i>in vitro</i>	39
4.2.1. Tolerância ao ácido gástrico artificial.....	39
4.2.2. Tolerância aos sais biliares.....	40
4.2.3. Susceptibilidade aos antimicrobianos.....	41

4.2.4.	Teste de antagonismo – “ <i>spot on the lawn</i> ”	43
4.3.	Elaboração de leite fermentado com BAL isolada de QMA de Campo das Vertentes	44
4.3.1.	Controle de qualidade do leite em pó desnatado reconstituído	44
4.3.2.	Seleção de microrganismo probiótico	44
4.3.3.	Teste de capacidade fermentativa das BAL selecionadas	45
4.3.4.	Elaboração do leite fermentado	45
4.3.5.	Análises físico-químicas dos leites fermentados	46
4.3.6.	Contagem de bactérias ácido-láticas	46
4.4.	Análises estatísticas	46
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1.	Potencial probiótico <i>in vitro</i> das bactérias ácido-láticas	47
5.1.1.	Tolerância ao ácido gástrico e sais biliares	47
5.1.2.	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	51
5.1.3.	Antagonismo – “ <i>Spot on the lawn</i> ”	55
5.2.	Seleção de microrganismo probiótico	58
5.3.	Leite fermentado com <i>Leuconostoc mesenteroides</i> LM isolado de Queijo Minas Artesanal de Campo das Vertentes	59
5.3.1.	Avaliação do leite em pó desnatado reconstituído	59
5.3.2.	Parâmetros físico-químicos durante a estocagem	59
5.3.3.	Enumeração de bactérias ácido-láticas	63
6.	CONCLUSÃO	65
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1. INTRODUÇÃO

O queijo Minas artesanal (QMA) é um dos mais tradicionais produtos comercializados no Brasil. Produzido a partir do leite cru, com adição de “pingo” – um fermento natural obtido a partir do soro do leite, possui etapas de produção semelhantes, mas características sensoriais variadas, que são influenciadas pela diversidade da microbiota de cada região, resultado das características ambientais (EMATER, 2016; Perin *et al.*, 2017).

No processo de elaboração do QMA utiliza-se o pingo, um fermento endógeno obtido a partir da dessoragem dos queijos produzidos anteriormente e coletado durante a salga. Esse fermento natural é rico em microrganismos, como as bactérias ácido-láticas (BAL), que direcionam a fermentação e maturação do queijo, o que determina uma variação das suas características sensoriais, microbiológicas e físico-químicas em cada região produtora (Nóbrega, 2007). As BAL encontradas em sua composição são frequentemente associadas a propriedades probióticas.

Diante do crescente interesse da população por uma alimentação saudável, aumenta também a procura por alimentos funcionais, como aqueles que contêm microrganismos probióticos. Os probióticos são microrganismos que conferem benefícios à saúde de quem os consome quando fornecidos em quantidades adequadas (FAO, 2002). Esses microrganismos possuem mecanismos de atuação bem semelhantes aos microrganismos da microbiota autóctone humana. A utilização de probióticos objetiva potencializar as funções dessa microbiota ou compensá-la, quando esta apresentar falhas (Vieira *et al.*, 2007). Dentre os microrganismos com potencial probiótico identificados, grande parte são BAL. O maior destaque nesse segmento é a indústria láctea, principalmente com a produção de leites fermentados, considerados os principais alimentos comercializados que possuem culturas probióticas, microrganismos que possuem comprovação científica de produção de benefícios à saúde (Da Costa *et al.*, 2013).

Dessa forma, faz-se necessário avaliar o potencial probiótico das BAL utilizadas no presente estudo, uma vez que os resultados podem contribuir para a valorização econômica do QMA de Campo das Vertentes, o que representa

um benefício a diversas famílias de produtores rurais. Além disso, a caracterização da microbiota da região permite a sua preservação, a fim de manter sua tradição e características sensoriais, e contribui para a seleção de linhagens probióticas.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial probiótico *in vitro* de BAL isoladas de QMA da região de Campo das Vertentes, Minas Gerais, além de elaborar leites fermentados utilizando tais microrganismos e avaliá-los com análises físico-químicas e de enumeração de BAL.

2.2. Objetivos específicos

- Estudar o potencial probiótico *in vitro* de BAL isoladas de QMA da região de Campo das Vertentes, Minas Gerais, de acordo com os seguintes testes:
 - verificação da capacidade de inibição *in vitro* das BAL contra microrganismos indicadores indesejáveis (*Staphylococcus* sp., *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e *Listeria* sp.) e contra um microrganismo desejável, isolado de queijo artesanal da Serra Geral, para avaliação de atividade antagonista;
 - avaliação da susceptibilidade *in vitro* das BAL a antimicrobianos de diferentes grupos farmacológicos, a fim de caracterizá-las como “GRAS” ou *Generally Recognized As Safe* (reconhecidamente seguras para o consumo) e;
 - testes de sensibilidade ao ácido gástrico e a sais biliares artificiais *in vitro*, simulando as condições *in vivo* de passagem desses microrganismos pelo trato gastrointestinal.
- Elaborar leites fermentados com as BAL e submetê-los a análises físico-químicas e microbiológicas ao longo de 14 dias de armazenamento sob refrigeração a 8-10°C.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Queijos

O queijo é um dos alimentos consumidos mais antigos registrados pela história. Acredita-se que esse derivado lácteo se originou na região entre os rios Tigre e Eufrates, onde hoje localiza-se o Iraque, há aproximadamente 8.000 anos (Fox e Mcsweeney, 2004). A origem dos queijos, assim como de outros alimentos fermentados, é associada a uma combinação, ao acaso, de temperatura ideal e presença de BAL no leite armazenado em recipientes feitos com estômago de ruminantes. A ação de enzimas gástricas de pequenos ruminantes no leite armazenado sob o sol quente e movimentos, intencionais ou não, teria proporcionado, então, a separação efetiva do soro do leite e, conseqüentemente, formação de uma massa branca – o queijo (Meneses, 2006; SEBRAE, 2008).

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de Queijos (Brasil, 1996), “ entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos”.

O queijo é reconhecido como um dos derivados lácteos mais consumidos no mundo. Os produtos lácteos mais frequentemente consumidos mundialmente são aqueles frescos, o que inclui o leite fluido e iogurte, os quais correspondem a 17% do consumo mundial de lácteos. A manteiga vem em seguida, com 15% do consumo, e os queijos logo depois, com 14% (FIL/IDF, 2020). No Brasil, segundo dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2019), o consumo de queijo é superado apenas pelo leite fluido e representa quase 10% dos produtos lácteos consumidos no país. A região brasileira cuja população mais consome queijos é a Sudeste, com um nível de aquisição do produto 28% acima da média do país.

Os queijos levam vantagem em comparação com outros lácteos devido a sua diversidade. A grande variedade de queijos, com texturas, sabores, odores e características sensoriais distintas, permite a diversificação do consumo e a busca do produto que melhor se adapte não só ao paladar, mas também aos hábitos de consumo de cada consumidor (Siqueira, 2019).

3.2. Queijo Minas Artesanal

O QMA é um dos queijos mais tradicionais produzidos no Brasil. A sua elaboração é realizada principalmente por agricultores familiares em propriedades rurais, utilizando leite cru de vacas recém-ordenhadas, coalho e sal. Além disso, um fermento endógeno é utilizado como coadjuvante à produção. Esse fermento, conhecido como “pingo”, contém diversos grupos microbianos, representativos da região de fabricação, que direcionam a fermentação e maturação do queijo e confere características sensoriais diferenciadas (Nóbrega, 2007; Dores; Ferreira, 2012).

Alguns trabalhos relatam a diversidade de grupos microbianos em QMA, sendo as BAL isoladas pertencentes principalmente às espécies *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus rivorum* e *Enterococcus pseudoavium* (Sales, 2015; Castro *et al.*, 2016; Luiz *et al.*, 2017; Sant’Anna *et al.*, 2017).

De acordo com Meneses (2006), a produção de QMA se originou de técnicas típicas da região da Serra da Estrela, em Portugal, trazidas para o Brasil no século XVI, e que evoluíram ao longo do tempo com o desenvolvimento de técnicas próprias pelos mineiros. Entretanto, para Mergarejo Netto (2011), a técnica de produção do queijo em Minas Gerais se originou do arquipélago dos Açores, trazidas por açorianos – antigamente tratados como portugueses – que se estabeleceram em Caeté (região Metropolitana de Belo Horizonte) e em Medeiros (Centro-Oeste de Minas), no século XVIII. Essas técnicas foram passadas de geração para geração até se transformarem no que se conhece hoje como QMA. Desde então, a produção de QMA se tornou uma importante

atividade geradora de renda para diversas famílias de Minas Gerais, estado que se destaca nessa produção em todo o país.

A produção do QMA é reconhecida como patrimônio cultural imaterial brasileiro pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN, 2019). A sua produção tem sobrevivido às pressões da modernização sobre os processos de produção, não só pelo apego às tradições, mas também pelo isolamento das propriedades rurais (Siqueira, 2019). Com isso, os produtores preservam produtos de características próprias, de imenso valor cultural e econômico (EMATER, 2014).

O QMA apresenta consistência firme, cor e sabor próprios e massa uniforme (Minas Gerais, 2012). As suas características sensoriais, variáveis entre regiões produtoras, são influenciadas por diversos fatores como período de maturação, clima da região, condições de armazenamento, microbiota do fermento endógeno, entre outros (Dores, 2012; Silva, 2019). Atualmente, oito microrregiões são reconhecidas como produtoras de QMA, sendo elas: Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serras de Ibitipoca, Serro e Triângulo Mineiro (Figura 1), que foram reconhecidas a partir da comprovação de tradição histórica e cultural do modo de fazer a partir de levantamentos históricos, agroecológicos e climáticos (EMATER, 2020^a; EMATER, 2020^b).

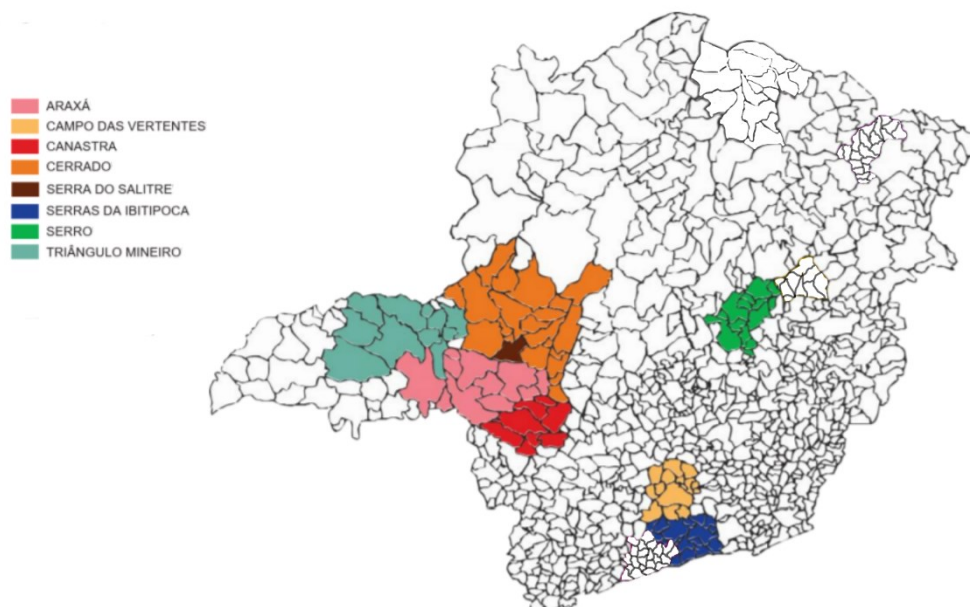


Figura 1. Mapa do estado de Minas Gerais com destaque para as 8 regiões produtoras de queijo Minas artesanal. Adaptado de EMATER (2014) e Rocha (2021)

A maturação é uma etapa importante no processo de produção do QMA, pois é uma das formas de auxiliar na melhoria da qualidade microbiológica do produto. O processo deve ser realizado em temperatura ambiente, que irá direcionar a fermentação desejável e favorecer a fermentação láctica (Martins, 2006; Dores, 2007). Atualmente, a Portaria nº 2051, de abril de 2021, estabelece como mínimo o período de 14 dias de maturação à temperatura ambiente para os queijos produzidos nas microrregiões de Araxá, Canastra e Serra do Salitre, mínimo de 17 dias para a microrregião do Serro, e para as demais regiões, caracterizadas ou não como produtoras de QMA, o período mínimo de 22 dias de maturação (Minas Gerais, 2021).

Atualmente, a Lei Estadual nº 23.157, de 18 de dezembro de 2018, dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais, oficializa a produção artesanal de queijo como uma agroindústria de pequeno porte e possibilita a criação de variedades diferentes de queijos artesanais em Minas Gerais (Minas Gerais, 2018).

O soro fermento endógeno é considerado a unidade identitária do produto, rico em BAL, que, em sua maioria, apresentam atividades probióticas (Chalita *et al.*, 2009). Quanto à composição da microbiota endógena, influenciada pela região, Sant'Anna *et al.*, (2017) verificaram a presença de *Lactobacillus* e *Pediococcus* no fermento endógeno da região de Campo das Vertentes, e a prevalência da espécie *L. plantarum*. Essa microbiota também influencia na maturação, promovendo maior extensão de proteólise (Silva *et al.*, 2011) e resultando, como produto final, em um queijo com sabor e textura peculiares, com características próprias.

3.2.1. Campo das Vertentes como região produtora de QMA

Em novembro de 2009, a região Campo das Vertentes passou a ser oficialmente considerada como microrregião produtora de queijo Minas artesanal, com a publicação da Portaria nº 1.022 pelo Instituto Mineiro de Agropecuária – IMA (Minas Gerais, 2009). A ocupação da região de Campo das Vertentes, no estado de Minas Gerais, data do período colonial. A produção agropecuária se consolidou como a principal atividade econômica da região em 1780 e, atualmente, mantém seu destaque, representando cerca de 5,8% do Produto Interno Bruto (PIB) do estado (Pereira Júnior; Reis, 2020). A microrregião inclui 14 municípios, dentre eles: Lagoa Dourada, Tiradentes, São João Del-Rei e Baracena, dentre outros, demonstrados na figura 2.

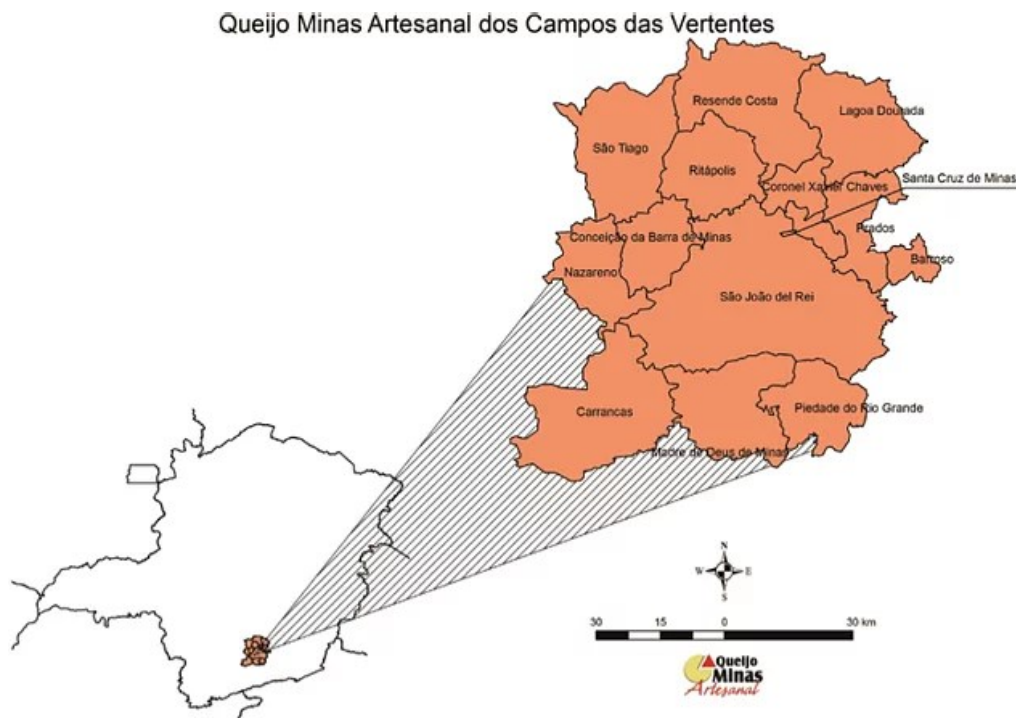


Figura 2. Região do Campo das Vertentes e municípios produtores de queijo Minas artesanal (EMATER, 2016)

Quanto aos microrganismos presentes no QMA da região de Campo das Vertentes, ainda há poucos estudos. Castro *et al.*, (2016) relataram, de um total de 50 amostras de BAL isoladas de água, leite cru, fermento endógeno e queijos frescos de queijarias não registradas dessa região, a identificação mais frequente de *Enterococcus faecalis* (42,86%), *Lactococcus lactis* (28,57%) e *Lactobacillus plantarum* (14,29%).

3.3. Bactérias ácido-láticas (BAL)

As BAL foram inicialmente caracterizadas a partir de uma amostra de leite por Joseph Lister em 1973, sendo classificadas como *Bacterium lactis* (Salminen e Wrigth, 1993). Elas são anaeróbias, anaeróbias facultativas ou microaerófilas, Gram-positivo, quase sempre catalase negativo, sem motilidade e podem ser cocos ou bacilos não esporulados. Essas bactérias possuem a capacidade de crescer em pH de 3,8 e produzir diversas enzimas glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas, responsáveis por transformar os nutrientes em compostos com propriedades sensoriais desejáveis. Além disso, esses microrganismos

produzem fatores antimicrobianos, como ácidos orgânicos, bacteriocinas, diacetil e acetaldeído, que podem atuar benéficamente nos alimentos (Forsythe, 2002; Lima *et al.*, 2009). O leite é um bom meio de crescimento para bactérias ácido lácticas por conter proteínas, açúcares fermentáveis, fatores de crescimento e por serem bem tamponados por proteínas e fosfatos (Botelho, 2005; Oliveira; Silva, 2011).

Considerados benéficos, esses microrganismos contribuem com alterações bioquímicas envolvidas no processo de maturação do queijo, como a transformação da lactose em ácido láctico. Além disso, as BAL possuem enzimas que contribuem para a proteólise e conversão de aminoácidos em substâncias voláteis responsáveis pelas características sensoriais finais. A adição dessas bactérias pode ocorrer deliberadamente no início da produção de queijos, ou com a utilização dos microrganismos naturalmente presentes no leite, como no caso dos queijos artesanais feitos com leite cru (Beresford *et al.*, 2001).

As BAL são constituídas por gêneros como: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Jay *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2014; Fusco *et al.*, 2015; Ringø *et al.*, 2018).

3.3.1. Gênero *Lactobacillus*

Lactobacillus foram isolados e identificados pela primeira vez em 1990 por Moro, a partir de fezes de lactentes amamentados, e são considerados como os principais representantes do grupo de BAL. Esses microrganismos são frequentemente encontrados na natureza e podem estar em diferentes nichos ecológicos, como plantas (cereais, frutas e vegetais), silagem, alimentos fermentados, e no próprio corpo humano, nas mucosas intestinal, oral e vaginal (Pithva *et al.*, 2012).

Os *Lactobacillus* possuem características das eubactérias pertencentes ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales* e família *Lactobacillaceae* (Felis, Dellaglio, 2007).

Esse gênero, altamente heterogêneo, tem sido utilizado para oferecer benefícios à saúde de quem os consome por meio de alimentos fermentados (Bernardeau *et al.*, 2008; Raizel *et al.*, 2011). Algumas espécies de *Lactobacillus* são capazes de estimular o espessamento da barreira intestinal a partir da produção de mucina, contribuindo na proteção a infecções e alergias (Nogueira; Golçalves, 2011).

As espécies de *Lactobacillus* spp. que são mais usualmente utilizadas como probióticos são: *L. brevis*, *L. acidophilus*, *L. casei* ssp. *paracasei* e ssp. *tolerans*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. delbreuckii* subsp. *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. johnsonii* e *L. salivarius* (Saad, 2006; Azad *et al.*, 2018; Muhammad e Shah, 2018).

Dentre os *Lactobacillus*, a espécie *L. casei* é a mais estudada. Esse microrganismo, além de possuir algumas linhagens com capacidade de produzir bacteriocinas termoestáveis que possuem aplicação como biopreservativo na conservação de alimentos, possuem maior habilidade de sobrevivência após choques térmicos e, por isso, têm sido utilizadas com sucesso em alimentos, sobretudo na fermentação (Sharma; Saharan, 2014; Reale *et al.*, 2015; Dimitrellou *et al.*, 2016).

3.3.2. Gênero *Lactococcus*

Lactococcus podem ser encontrados em leite e produtos lácteos, materiais vegetais e intestino de peixes ou insetos. Bactérias do gênero têm sido utilizadas por séculos na produção de fermentados derivados do leite, sendo geralmente reconhecidas como, em tradução livre, seguras – *Generally Recognized as Safe (GRAS)*, pela Food and Drug Administration (FDA) (Kimoto *et al.*, 2004).

Os *Lactococcus* são cocos Gram-positivo, imóveis e homofermentativos (Casalta e Montel, 2008). Esses microrganismos geralmente não são considerados nocivos para humanos ou animais, e têm sido utilizados para a prevenção e tratamento de doenças (Mofredj *et al.*, 2007; Furtado *et al.*, 2014; Bouchard *et al.*, 2015).

Lactococcus lactis é o principal constituinte de culturas iniciadoras artesanais utilizadas em muitas indústrias para a fabricação de produtos lácteos fermentados, incluindo soro de queijo, queijos frescos e macios e, vários queijos duros e semi-curados (González Revello et al., 2016). Devido à sua importância na indústria, esse microrganismo tem sido objeto de diversos estudos que elucidam a fisiologia e biologia molecular de traços relevantes para aplicação industrial, como produção de compostos aromatizantes e fatores que influenciam no crescimento celular e estabilidade (Leroy e Vuyst, 2004; Cavanagh, Fitzgerald e McAuliffe, 2015).

Haghshenas *et al.* (2014) demonstraram *in vitro* que metabólitos secretados por *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 44Lac têm altas atividades anticarcinogênicas em diferentes linhagens celulares carcinogênicas de origem epitelial, porém, não há estudos que comprovem seus reais efeitos anticarcinogênicos *in vivo*.

3.3.3. Gênero *Leuconostoc*

O gênero *Leuconostoc* é frequentemente encontrado em plantas frescas, e, a partir do seu habitat natural, se disseminaram para outros nichos, como leite e produtos alimentares refrigerados. Possuem um importante papel em processos industriais e na fermentação de alimentos, tais como embutidos, produtos vegetais, cereais e lácteos (Ogier *et al.*, 2008; Jeon *et al.*, 2017).

Leuconostoc pertence ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales*. Anteriormente, o gênero pertencia à família *Leuconostocaceae*, entretanto, a partir de abril de 2020, passou a pertencer à família *Lactobacillaceae*, pois Zheng *et al.* (2020) sugeriram a união das famílias *Lactobacillaceae* e *Leuconostocaceae*. Os microrganismos do gênero são Gram-positivo, geralmente cocos ovoides – muitas vezes em formato de cadeias – e heterofermentativos (Björkroth *et al.*, 2003).

As espécies *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc lactis* possuem relevância na formação de aroma, sabor e textura de produtos lácteos, por produzirem compostos aromáticos como diacetil e cetonas. O metabolismo da lactose e do citrato por esses microrganismos contribui para as propriedades sensoriais do soro de leite, creme de leite, queijos frescos e manteiga (Ogier *et*

al., 2008; Kot *et al.*, 2014). Por isso, *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* e *Ln. mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Ln. mesenteroides* ssp. *dextranicum* e *Ln. mesenteroides* ssp. *suionicum* têm importante papel na produção de vários produtos fermentados, como queijos e kimchi, uma tradicional comida coreana (Jeon *et al.*, 2017).

Ln. mesenteroides ssp. *mesenteroides* SJRP55 foi caracterizado quanto à capacidade de produção de CO₂ a partir do uso da glicose, habilidade de crescimento em diferentes temperaturas (10, 30 e 45°C), pH (4,5, 7,0 e 9,6), além de capacidade de assimilar citrato. Os resultados obtidos *in vitro* evidenciam potencial para aplicação desse microrganismo em produtos fermentados (Silva, 2010). Além disso, em testes *in vitro*, essa bactéria demonstrou capacidade de produzir bacteriocinas (Paula *et al.*, 2014) e de possuir potencial probiótico, pois apresentou bons resultados na simulação de sobrevivência ao trato gastrointestinal e adesão a células epiteliais (Paula *et al.*, 2015).

3.4. Leites fermentados

3.4.1. Histórico

O leite fermentado é um dos mais antigos produtos lácteos consumidos pela população, sendo relatado o seu consumo até mesmo na bíblia. Historiadores atribuem a longevidade de Abraão ao consumo de leite fermentado e Moisés o considerava um presente de Deus, assim como o vinho e o mel. Alguns filósofos, como Hipócrates, consideravam o leite fermentado não apenas um alimento, mas um medicamento, prescrevendo-o para tratar distúrbios estomacais e intestinais (Oberman; Libudzisz, 1998; Saccaro, 2008).

No início do século XX, o bacteriologista russo Metchnikoff foi o primeiro cientista a explicar os efeitos benéficos das BAL presentes em leites fermentados, intrigado pela longevidade dos búlgaros (Hughes; Hoover, 1995). O cientista ganhou o prêmio Nobel em 1908, ao isolar um bastonete nomeado de *Bacillus bulgaricus* e analisar seus efeitos benéficos no leite fermentado, baseando-se no fato de que as BAL estavam naturalmente presentes no intestino e no leite e produziam substâncias que inibiam o crescimento de microrganismos patogênicos (Saccaro, 2008).

O leite fermentado começou a ser produzido industrialmente em 1917, por Isaac Carasso, em Barcelona, quando então, esse alimento passou a ser consumido em massa (Luquet; Corrieu, 2005). Atualmente, com o aumento da demanda de produtos alimentícios saudáveis e a popularização dos alimentos funcionais, os leites fermentados são largamente difundidos entre a população e comercializados mundialmente.

De acordo com Siqueira *et al.* (2021), em 2003, a população brasileira, estimada em 180 milhões, consumiu cerca de 50 milhões de quilos de leites fermentados. Em 2018, com cerca de 210 milhões de brasileiros, o consumo desse produto foi de quase 200 milhões de quilos. Dessa forma, durante esses 15 anos, o consumo de leites fermentados teve um aumento de aproximadamente 400%, diante do aumento populacional de 16,5%. Assim, o consumo de leites fermentados *per capita* no país, que em 2003 era de 0,27kg, atingiu, em 2018, quase 1kg.

3.4.2. Legislação

De acordo com a Instrução Normativa nº 46 de 2007 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que trata do RTIQ de Leites Fermentados, o leite fermentado pode ser definido como “o produto adicionado ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite ou do leite reconstituído por fermentação láctica, mediante ação de cultivos de microrganismos específicos. Esses microrganismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante todo o seu prazo de validade”. Essa definição inclui o iogurte, o leite fermentado ou cultivado, o leite acidófilo, o *kefir*, o *kumys* e a coalhada, que são diferenciados, dentre outros fatores, pelo tipo de microrganismo que é utilizado na fermentação do leite (Brasil, 2007). Os requisitos físico-químicos e microbiológicos para o leite fermentado encontram-se especificados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Requisitos físico-químicos para inspeção de leites fermentados

Matéria gorda láctea (g/100g) Norma FIL 116 A:1987				Acidez (g de ácido lático/100g) Norma FIL 150:1991	Proteínas lácteas (g/100g)
Com creme	Integral	Parcialmente desnatado	Desnatado		
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)

Tabela 2. Critérios microbiológicos para inspeção de leites fermentados

Microrganismos	Critério de aceitação	Norma
Coliformes/g (30°C)	N=5 c=2 m=10 M=100	FIL 73A:1985
Coliformes/g (45°C)	N=5 c=2 m<3 M=10	APHA 1992c.24
Bolores e leveduras/g	N=5 c=2 m=50 M=200	FIL 94B:1990

Fonte: Brasil (2007)

Segundo o RTIQ, os leites fermentados devem apresentar uma contagem mínima de bactérias lácticas viáveis de 10^6 UFC/mL durante toda sua vida de prateleira e serem conservados e comercializados à temperatura de no máximo 10°C, o que irá possibilitar a viabilidade dessas células (Brasil, 2007). Deve-se salientar que é fundamental a manutenção dos produtos em temperatura adequada para que estes mantenham os microrganismos viáveis e abundantes por toda sua vida de prateleira.

3.4.3. Leites fermentados e as bactérias ácido-láticas

Para produção do leite fermentado, o leite é pasteurizado e, em seguida, é inoculado o cultivo iniciador selecionado, dependendo do produto em questão. Os microrganismos provocam a acidificação e, em muitos casos, a coagulação do produto, com o desenvolvimento de características sensoriais típicas. Após a fermentação, o alimento é refrigerado para comercialização (Oliveira; Silva, 2011). O processo de fermentação é importante para a indústria láctea, pois associa-se com o aparecimento de características como aroma e sabor (Wendling; Weschenfelder, 2013).

Considera-se que alguns leites fermentados possuem propriedades terapêuticas devido à sua elaboração a partir de BAL como *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* e bactérias ácido-acéticas como *Bifidobacterium*, que normalmente estão presentes no trato gastrintestinal humano e apresentam efeitos bioquímicos e biológicos sobre os nutrientes do leite e terapêuticos ao consumidor (Faria *et al.*, 2006).

Viegas *et al.* (2010) observaram que *L. acidophilus* e *Weissella confusa* isoladas de queijo coalho possuem potencial para serem utilizadas na produção industrial de leites fermentados funcionais. Acurcio *et al.* (2017) verificaram que linhagens de *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1 mostraram adaptação promissora à matriz do leite para uma possível elaboração de leites fermentados com propriedades terapêuticas. Valente *et al.* (2021) produziram leites fermentados de cabra fermentados com *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1. Os produtos apresentaram resultados de parâmetros físico-químicos e microbiológicos adequados durante 30 dias de estocagem a 7°C.

3.5. Probióticos

Probióticos são microrganismos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidade adequada (FAO, 2002). Seu uso surgiu no Oriente Médio, onde médicos prescreviam iogurtes e outros leites fermentados para uso terapêutico com finalidade de estimular o apetite e tratar afecções do trato gastrointestinal (Carli, 2006).

A fabricação de produtos contendo microrganismos probióticos tem como base a seleção destes de acordo com a estabilidade frente ao ácido gástrico e à bile; o gênero ao qual pertence a bactéria – devendo ser preferencialmente de origem humana; a capacidade de sobreviver no trato gastrointestinal humano e a capacidade de produzir compostos antimicrobianos no intestino (Freire *et al.*, 2021). Além disso, necessitam, de acordo com FDA, serem reconhecidas como seguras (GRAS), ou seja, não ser patogênicas e não causar doenças, tais como endocardite (Saarela *et al.*, 2000), e não apresentarem genes que transmitam a resistência a antimicrobianos (Nagpal *et al.*, 2012).

No Brasil, o uso de probióticos em alimentos requer a prévia avaliação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de acordo com os requisitos da Resolução RDC nº 241, de 27 de Julho de 2018. Esta avaliação inclui elementos como a comprovação da identidade da linhagem do microrganismo, da sua segurança e do seu efeito benéfico (Brasil, 2018).

A ANVISA publicou, em maio de 2021, o Guia nº 21 – versão 2, com instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos. O guia serve de referência ao cumprimento legislativo, já que

expressa o entendimento da ANVISA sobre as melhores práticas e métodos considerados adequados ao cumprimento dos requisitos exigidos pela legislação quanto aos probióticos (ANVISA, 2021).

Dentre os microrganismos utilizados como probióticos estão bactérias e leveduras dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Enterococcus* e *Saccharomyces* (Ballardin *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2018). Estudos têm demonstrado que as principais espécies com potencial probiótico são algumas linhagens de *Bifidobacterium* spp., *L. acidophilus* e *L. casei* (Da Costa *et al.*, 2013; Monteiro *et al.*, 2019; Yunes *et al.*, 2019). Esses microrganismos apresentam efeitos bioquímicos aos nutrientes do leite a partir das alterações ocasionadas pela fermentação e por enzimas, e fisiológicos sobre o consumidor (Wendling; Weschenfelder, 2013).

3.5.1. Avaliação *in vitro* do potencial probiótico de bactérias ácido-láticas

Para que uma cultura seja considerada probiótica ela deve possuir algumas características, tanto funcionais e tecnológicas, quanto de segurança. Dentre os critérios para seleção de microrganismos probióticos estão: a origem e inocuidade das linhagens e a capacidade de resistência no organismo. A segurança de uma linhagem relaciona-se à sua origem, à ausência de associação a microrganismos patogênicos e ao seu perfil de resistência a antimicrobianos (Markowiak; Slizewska, 2017; Romão, 2019).

A tabela 3 demonstra alguns dos principais critérios quanto à seleção de microrganismos probióticos.

Tabela 3. Critérios de seleção de linhagens probióticas

Critério	Propriedades requeridas
Segurança	Origem humana ou animal
	Isolado preferencialmente do trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis
	Histórico de uso seguro
	Diagnóstico de identificação preciso
	Ausência de dados associados a doenças infecciosas
	Ausência de efeitos adversos
Funcionais	Ausência de genes responsáveis por resistência à antimicrobianos
	Competitividade em relação à microbiota autóctone intestinal e a espécies microbianas que habitam esse ecossistema
	Capacidade de sobreviver, manter atividade metabólica e de crescer no local de destino
	Resistência a sais biliares e enzimas
	Resistência ao baixo pH estomacal
	Antagonismo contra microrganismos patogênicos, como <i>Salmonella</i> spp. e <i>Listeria</i> spp.
Tecnológicos	Resistência a bacteriocinas e ácidos produzidos pela microbiota intestinal endógena
	Adesão e capacidade de colonizar o sistema gastrointestinal
	Viabilidade e estabilidade das propriedades desejáveis dos microrganismos durante o processo de fixação (congelamento, liofilização), preparação e distribuição dos produtos probióticos
	Alta taxa de armazenamento em produtos acabados (em condições aeróbias e microaerofílicas)
	Garantia das propriedades sensoriais desejadas no produto final

Fonte: Adaptado de Markowiak; Slizewska (2017)

A realização de testes *in vitro* é fundamental para a avaliação da segurança de microrganismos probióticos e eles são úteis para obter conhecimentos sobre as culturas e os mecanismos do efeito probiótico (FAO, 2002). Dentre os testes que podem ser realizados estão: tolerância à acidez gástrica e aos sais biliares; metabolismo da bile; propriedades de adesão no muco e/ou epitélio intestinal; produção de substâncias antimicrobianas contra microrganismos potencialmente patogênicos; resistência aos antimicrobianos; e capacidade de inibir a adesão de patógenos intestinais (Tuomola *et al.*, 2001; FAO, 2002), entre outros. Dessa forma, os testes *in vitro* possibilitam identificar os microrganismos mais resistentes, seguros e melhor adaptados, tanto ao consumo quanto às tecnologias de produção empregadas.

Costa *et al.* (2013), a partir de microrganismos isolados de QMA da Serra da Canastra, evidenciaram que *L. rhamnosus* B4, *W. paramesenteroides* C10 e *L. rhamnosus* D1 seriam boas candidatas à elaboração de novas culturas para

produção de produtos lácteos fermentados potencialmente funcionais. Andrade *et al.* (2014) analisaram amostras de *Lactobacillus* spp. isoladas de QMA da Serra da Canastra e verificaram que, dentre todos os microrganismos analisados, *L. plantarum* (B17) demonstrou melhor potencial probiótico *in vitro*, pois obteve resultados satisfatórios em todas as propriedades avaliadas. Valente *et al.*, (2019) observaram que culturas de *L. plantarum* B7 e *L. rhamnosus* D1, isoladas de QMA da Serra da Canastra, apresentaram potencial probiótico *in vitro*.

Quanto ao QMA da região de Araxá, Silva *et al.* (2019) evidenciaram que bactérias do gênero *Lactobacillus* são as mais frequentemente isoladas desse queijo maturado por até 60 dias, tanto na época de seca quanto na chuvosa, e que *L. plantarum* e *L. rhamnosus* foram mais frequentemente identificadas.

3.5.1.1. Resistência das BAL aos antimicrobianos

A resistência antimicrobiana é um problema crescente em todo o mundo e compromete o tratamento de diversas infecções bacterianas. O uso indiscriminado de antimicrobianos se tornou uma ameaça à saúde única, pois pode comprometer tanto a saúde humana quanto animal, além de aumentar o risco de disseminação de genes que causam a diminuição da efetividade das moléculas desses compostos (Agyare *et al.*, 2019).

A tabela 4 apresenta alguns dos principais grupos de antimicrobianos e seus mecanismos de ação.

Tabela 4. Principais grupos de antimicrobianos e seus mecanismos de ação

Grupo	Nome
Inibidores da síntese de parede celular	
Penicilinas	Penicilina G
	Oxacilina
Cefalosporinas	Ceftazidima
	Cefalexina
Glicopeptídeos	Vancomicina
Inibidores da síntese proteica	
Tetraciclina	Tetraciclina
	Doxiciclina
Aminoglicosídeos	Gentamicina
	Amicacina
Macrolídeos	Eritromicina
Lincosamidas	Clindamicina
	Cloranfenicol
Inibidores da síntese de ácido nucléico	
Sulfanomidas + Trimetoprim	Sulfametoxazol-trimetoprima
Quinolonas	Ciprofloxacina

Fonte: Melo, Duarte e Soares (2012)

Os principais antimicrobianos utilizados em animais são as penicilinas, as cefalosporinas e as tetraciclina (Margarido *et al.*, 2009). Embora o uso de alguns aminoglicosídeos (gentamicina, amicacina), cefalosporinas e fluorquinolonas (enrofloxacina, entre outros) deva ser evitado na medicina veterinária sempre que possível devido à sua grande importância na medicina humana, esses fármacos têm sido utilizados com cada vez mais frequência para animais (Guardabassi *et al.*, 2010).

A resistência a antimicrobianos pode ser intrínseca, como resultado de uma característica estrutural ou funcional, inerente de cada espécie (Blair *et al.*, 2015). Ela também pode ser adquirida como resultado de mutações, induzidas por radiações ionizantes e não ionizantes (Baptista, 2013), ou pela aquisição de material genético exógeno anteriormente presente em outro microrganismo por meio de transferência horizontal (Costa, 2016).

Assim como a resistência intrínseca ou natural ocorre em todas as linhagens de um determinado gênero ou espécie e é cromossômica e não transferível para outras bactérias, a resistência adquirida devido a mutações também é não transferível. Já na resistência por aquisição de genes de resistência de outra bactéria por transferência lateral, o gene adquirido pode ser transferido novamente para outra bactéria, tornando-a resistente (Courvalin, 2006).

As BAL têm sido amplamente utilizadas com segurança na produção de alimentos durante séculos. Entretanto, questionamentos a respeito da segurança do uso desses microrganismos têm sido levantados, principalmente quanto à aquisição de genes de resistência por esses microrganismos (Álvarez-Cisneros *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). Dessa forma, é de extrema importância que sejam realizados estudos de segurança das linhagens de BAL antes da sua utilização no setor alimentício.

3.5.2. Mecanismos de ação e benefícios dos probióticos

Os efeitos dos probióticos podem ser classificados em três categorias: capacidade de modulação da defesa do hospedeiro; efeito direto sobre outros microrganismos, tanto comensais quanto patogênicos – o que os tornam importantes na prevenção e tratamento de infecções e na restauração do equilíbrio da mucosa intestinal; e efeito baseado na eliminação de produtos resultantes do metabolismo microbiano, como toxinas, resultando na desintoxicação do intestino de quem os consomem (Oelschlaege, 2010).

Os probióticos são capazes de exercer sua atividade através de diversos mecanismos, e os principais incluem o aumento da barreira epitelial, adesão à mucosa intestinal com inibição concomitante de patógenos, exclusão competitiva de microrganismos patogênicos, produção de substâncias com efeito antimicrobiano e modulação do sistema imune (Bermudez-Brito *et al.*, 2012; Sanders *et al.*, 2018).

O mecanismo de ação exercido pelas bactérias probióticas é demonstrado abaixo na figura 3.

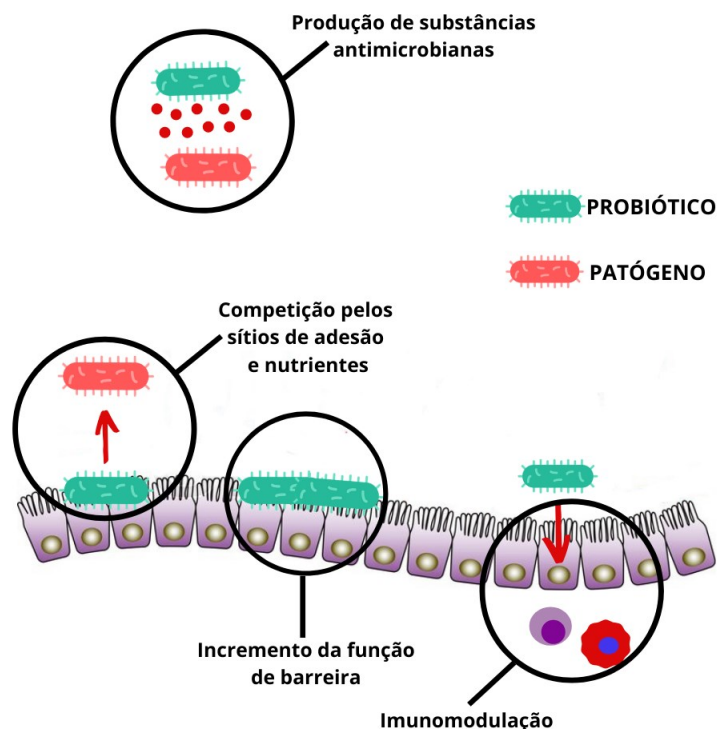


Figura 3. Mecanismos das bactérias probióticas. Adaptado de Hessissen (2016)

3.5.2.1. Modulação da resposta imunológica

Os probióticos são capazes de estimular tanto a resposta imune não-específica quanto a específica. Esses microrganismos interagem com as placas de *Peyer* e com as células epiteliais intestinais, estimulando as células B produtoras de IgA e a migração de células T do intestino. Além disso, são responsáveis por favorecer a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, o que sugere uma ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune, como citocinas e imunoglobulinas (Coppola; Turnes, 2004). Estudos demonstram a capacidade dos probióticos de estimular a produção de anticorpos e, desta forma, melhorar as defesas do hospedeiro contra agentes patogênicos e aumentar a resposta a vacinas (Sanders *et al.*, 2019).

A fermentação das bactérias produz substâncias de natureza proteica, denominadas bacteriocinas, capazes de exercer ação local, semelhante aos antimicrobianos contra microrganismos patogênicos. Essas bacteriocinas são responsáveis ainda, pela diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como interferon gama, fator de necrose tumoral alfa e interleucina 2 e pelo

estímulo à produção de imunoglobulinas, contribuindo para a modulação do sistema imune (Denipote *et al.*, 2010). Essas atividades estão relacionadas ao fato de determinadas espécies probióticas expressarem na superfície da sua parede celular, estruturas como fímbrias, cápsula, componentes proteicos, peptídeoglicanos, entre outras (Sanders *et al.*, 2019).

Oliveira e Silva (2011) mencionam que o uso de probióticos pode melhorar a constituição da microbiota intestinal e, assim, aumentar e manter a barreira imunológica local, amenizando as respostas inflamatórias. Os efeitos positivos dos probióticos sobre o sistema imunológico ocorrem sem o desencadeamento de respostas inflamatórias prejudiciais. Para que a resposta imune do indivíduo aumente adequadamente, recomenda-se o consumo de um ou mais probióticos de forma concomitante para que atuem em sinergismo, à exemplo da associação de *Lactobacillus* com *Bifidobacterium* (Saad, 2006).

3.5.2.2. Exclusão competitiva e efeitos associados

A influência positiva dos probióticos no equilíbrio da microbiota intestinal ocorre pela sua restauração. A restauração da microbiota intestinal ocorre a partir da sua colonização por bactérias benéficas, impossibilitando a ocupação de células epiteliais por bactérias patogênicas e a produção de toxinas. Haverá, então, uma competição por sítios de adesão e nutrientes com as bactérias indesejáveis. Esse mecanismo é denominado exclusão competitiva. Além disso, há a produção de compostos antimicrobianos pelos probióticos, como peróxido de hidrogênio, ácido lático, ácido acético e bacteriocinas, que aumentam os mecanismos de defesa do hospedeiro (Oliveira; Silva, 2011; Lima, 2017).

Os probióticos favorecem a manutenção da integridade da barreira epitelial intestinal, prevenindo a disbiose pelo aumento da expressão de genes que codificam as proteínas de junção, do aumento do estímulo à produção de muco, defensinas, IgA e pela diminuição de processos inflamatórios (Cerdo *et al.*, 2019; Plaza-Díaz *et al.*, 2019; Sanders *et al.*, 2019). Além disso, os probióticos possuem capacidade de se co-agregarem, reforçando a barreira, e, desta forma, impedindo a colonização do epitélio por bactérias patogênicas (Markowiak and Śliżewska, 2017).

Molin (2001) relatou que, quando voluntários saudáveis consomem *Lactobacillus plantarum* 299v, eles se estabelecem na mucosa intestinal e a sua concentração tende a aumentar, enquanto a concentração de microrganismos Gram-negativo anaeróbicos como *Enterobacteriaceae* e *Clostridium* sulfito redutores tende a diminuir. Os microrganismos anaeróbios Gram-negativo são considerados nocivos, pois estão frequentemente associados às infecções secundárias após cirurgias abdominais, liberam endotoxinas e iniciam, mesmo em números pequenos, reações inflamatórias exacerbadas. Já os clostrídios possuem algumas linhagens que produzem toxinas e substâncias cancerígenas no intestino (Molin, 2001).

Os probióticos possuem grande utilidade nos distúrbios gastrintestinais, principalmente quando utilizados como auxiliares na prevenção. Eles possuem benefícios frente à ocorrência de diarreias, pois produzem substâncias como ácido láctico, acético, peróxido de hidrogênio e diacetil que inibem a atividade de alguns microrganismos patogênicos, apresentando em alguns casos, ação bactericida (Wendling; Weschenfelder, 2013).

Outro benefício dos probióticos em relação ao trato gastrintestinal é no auxílio dos sintomas das cólicas abdominais, relacionadas com a motilidade intestinal anormal e a síndrome do intestino irritável. Os probióticos interferem na regulação dos receptores opióides e canabióides das células epiteliais intestinais, regulando a dor visceral (Wendling; Weschenfelder, 2013).

3.5.2.3. Intolerância à lactose

A lactose é um dissacarídeo redutor sintetizado nas células alveolares das glândulas mamárias e presente na composição natural do leite. A hidrólise enzimática desse carboidrato ocorre principalmente por ação da β -galactosidase ou lactase. Trata-se de uma oxidase que hidrolisa a ligação β -1,4-glicosídica com liberação de glicose e galactose, monossacarídeos mais facilmente absorvidos pelo homem (Oliveira; Silva, 2011; Bacelar Júnior *et al.*, 2013).

A intolerância à lactose consiste na deficiência da produção de lactase, diminuindo a capacidade de hidrolisar o carboidrato. A lactose não hidrolisada não é absorvida pelo intestino delgado e passa rapidamente para o cólon, onde é fermentada por microrganismos produtores de gases com formação de

metano, dióxido de carbono e hidrogênio, responsáveis por flatulência, distensão e dores abdominais (Bacelar Júnior *et al.*, 2013). Dessa forma, é desejável o desenvolvimento de tecnologias que permitam aos intolerantes à lactose o consumo de leite e derivados, alimentos de alto valor nutritivo.

Os leites fermentados são mais bem aceitos por pessoas intolerantes à lactose, pois a lactose presente no leite é hidrolisada durante a fermentação pelos lactobacilos e pelas bifidobactérias (Wendling; Weschenfelder, 2013). As bactérias lácticas produzem a enzima β -D-galactosidase, que auxiliam na quebra da lactose no intestino. *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. produzem mais de 20 enzimas diferentes, sendo a β -galactosidase a mais comum (Plaza-Diaz *et al.*, 2019). A β -galactosidase é capaz de passar pelo estômago, após o consumo do alimento, e clivar a lactose no intestino, possibilitando a digestão desse alimento (Oliveira; Silva, 2011). Deste modo, é recomendável a suplementação da alimentação de intolerantes com probióticos.

3.5.2.4. Câncer de cólon

O câncer de cólon é a terceira causa mais comum de neoplasias no mundo em ambos os sexos. A multiplicação de bactérias e alteração da microbiota intestinal contribui para a sua patogenicidade por facilitar o desenvolvimento de processos inflamatórios (Denipote *et al.*, 2010).

O mecanismo de ação para inibição do desenvolvimento de câncer de cólon pelo uso de probióticos ainda é desconhecido. Entretanto, alguns mecanismos de atuação são sugeridos, como o estímulo da resposta imune do hospedeiro, ligação e degradação aos compostos com potencial carcinogênico, alterações qualitativas e quantitativas na microbiota intestinal que contribui na produção de carcinógenos e de promotores, alterações na atividade metabólica intestinal e produção de compostos antitumorígenos ou antimutagênicos no cólon (Saad, 2016).

O consumo de *L. acidophilus* diminuiu a atividade das enzimas fecais β -glucuronidase, azorredutase e nitrorredutase – que formam produtos mutagênicos – em modelos animais experimentais. As bifidobactérias, que quando administradas colonizam o cólon em substituição aos microrganismos

patogênicos, podem se ligar ao carcinógeno final, promovendo sua remoção pelas fezes (Saad, 2006; Calaça *et al.*, 2017).

Além disso, as espécies probióticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. produzem lactato e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como produto primário do metabolismo dos hidratos de carbono. A produção desses compostos, como acetato e propionato, além de constituir uma fonte de energia, diminui o pH do lúmen intestinal, dificulta o desenvolvimento de agentes patogênicos, influencia a motilidade intestinal e estimula a apoptose de células cancerígenas (Ríos-covián *et al.*, 2016; Tsai *et al.*, 2019).

3.5.2.5. Outros efeitos benéficos associados aos probióticos

Os probióticos têm demonstrado conferir, além de atividades imunorregulatórias, atividades antiangiogênicas, antialérgicas, anticolite, antidérmicas, entre outras. Assim, a pesquisa de probióticos representa um campo em rápida evolução que se expandiu do conforto digestivo tradicional para diversos benefícios para a saúde (Patel *et al.*, 2015).

O consumo de probióticos possui outros diversos benefícios à saúde, como: aumento da eficácia do tratamento de *Helicobacter pylori* (Vieira, 2007); prevenção de infecções urinárias e dos tratos reprodutivo e respiratório (Falagas *et al.*, 2006; Hojsak *et al.*, 2010); redução dos níveis de colesterol (Liang *et al.*, 2020) modulação de reações alérgicas (Saad, 2006) e de transtornos comportamentais e psiquiátricos – sendo esses microrganismos conhecidos como psicobióticos (Anderson *et al.*, 2017); prevenção de cáries e auxílio no tratamento de candidíase oral, halitose e promoção da saúde periodontal (Vanderplas, Huys e Daube, 2015); redução de infecções intestinais por parasitas como *Giardia* (Silva *et al.*, 2020); prevenção de dermatite atópica e demais manifestações alérgicas (Salgado, 2012); e melhoria da imunidade da mucosa vaginal, com diminuição de infecções vaginais por *Candida albicans* (Liao *et al.*, 2019).

3.5.2.5.1. A COVID-19 e os probióticos

Em dezembro de 2019, um novo tipo de Coronavírus ocasionou um surto viral conhecido como COVID-19, na cidade de Wuhan na China. O agente viral

foi identificado como um betacoronavírus zoonótico, denominado Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 – SARS-CoV-2 (Liu *et al.*, 2020).

Alguns pacientes com COVID-19 mostraram disbiose da microbiota intestinal, com diminuição no número de microrganismos intestinais probióticos, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Xu *et al.*, 2020). De acordo com Wu *et al.* (2020) e Xiao *et al.* (2020), amostras fecais de alguns pacientes infectados demonstraram a presença de RNA de SARS-CoV-2, enquanto suas amostras respiratórias testaram negativo para a presença do vírus. Além disso, no cenário da COVID-19, é importante considerar que drogas antimicrobianas, incluindo antivirais, são frequentemente administrados a pacientes acometidos pela doença, o que pode resultar em mais disbiose da microbiota intestinal (Santacroce *et al.*, 2020). A disbiose da microbiota intestinal tem sido associada a várias condições de saúde, incluindo infecções do trato respiratório por meio do eixo intestino-pulmão (Chan *et al.*, 2020).

O eixo intestino-pulmão é bidirecional e, por isso, uma infecção por SARS-CoV-2 nos pulmões desencadeia uma resposta imune no trato gastrointestinal (Gohil *et al.*, 2020). Segundo Santacroce *et al.* (2020), em pacientes com COVID-19, os probióticos podem ajudar a restaurar a microbiota intestinal, contribuindo para um eixo intestino-pulmão saudável, além de reduzirem a translocação de patógenos através da mucosa intestinal, evitando infecções sobrepostas. Recentemente, Anwar *et al.* (2020) demonstraram que três metabólitos de *Lactobacillus plantarum* (Plantaricina W, Plantaricina JLA-9 e Plantaricina D) bloquearam significativamente a ligação de SARS-CoV-2 a receptores ACE2 – proteína transmembrana expressa na superfície de diversas células do corpo, bloqueando a entrada viral nas células, sugerindo uma propriedade antiviral de *Lactobacillus plantarum* contra SARS-CoV-2.

Embora as justificativas para o uso de probióticos no tratamento da COVID-19 ainda venham de evidências indiretas, os probióticos podem ajudar na prevenção e/ou alívio dos sintomas relacionados a COVID-19 e na diminuição da ocorrência de complicações (Angurana e Bansal, 2020). Entretanto, é importante que sejam realizados estudos complementares *in vivo*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Análises Físico-químicas e Análises Microbiológicas do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG e no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, no período de julho a dezembro de 2021. A pesquisa foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN (A56D9A9), em cumprimento à legislação em vigor (Lei Federal 13.123 de 20 de maio de 2015).

4.1. Microrganismos utilizados

4.1.1. Amostras de bactérias ácido-láticas

Foram utilizadas oito BAL previamente isoladas de soro-fermento, *swab* de bancada e QMA da região de Campo das Vertentes – Minas Gerais (Valente, 2021) e identificadas por proteômica pela técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF (Singhal *et al.*, 2015). Os queijos eram oriundos de queijarias registradas no IMA e possuíam um período de maturação 7, 14 e 22 dias. Os microrganismos utilizados e suas abreviações podem ser observados na tabela 5.

Tabela 5. Microrganismos isolados de queijos Minas artesanais de Campo das Vertentes – Minas Gerais

Microrganismo	Abreviatura	Origem
<i>Lactobacillus plantarum</i>	LPL	Queijo (14 dias de maturação)
<i>Lactobacillus brevis</i>	LB	Queijo (22 dias de maturação)
<i>Lactobacillus curvatus</i>	LC	Queijo (22 dias de maturação)
<i>Lactobacillus paracasei</i>	LPR	Queijo (7 dias de maturação)
<i>Lactococcus garvieae</i>	LG	Queijo (14 dias de maturação)
<i>Lactococcus lactis</i>	LL	Queijo (14 dias de maturação)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	LM	Queijo (14 dias de maturação)
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	LPS	Queijo (14 dias de maturação)

A conservação dos microrganismos foi realizada pelo congelamento a -20°C em criotubos contendo caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Merck, Darmstadt, Germany), adicionado de 20% de glicerol esterilizado. As ativações foram feitas em caldo MRS, incubado a 37°C, em aerobiose e em intervalos de 24 horas.

4.2. Avaliação do potencial probiótico *in vitro*

4.2.1. Tolerância ao ácido gástrico artificial

Para avaliação da tolerância dos microrganismos ao ácido gástrico *in vitro* foi utilizada a técnica adaptada, descrita por Neumann (1991) e Silva *et al.* (2013). A análise foi realizada em duplicata com três repetições.

As BAL foram ativadas duas vezes em caldo MRS (Merck) e, então, centrifugadas (13.000G) por cinco minutos para retirada do meio de cultivo e obtenção dos *pellets* das bactérias. Estes foram lavados com solução salina 0,9% três vezes e transferidos para tubos com 1 mL de suco gástrico artificial constituído de salina 0,9% com pH 2,0 e pepsina 3 g/L e tubos com solução salina 0,9% com pH 7,0 (controle). Os tubos foram incubados a 37°C por duas horas e, então, centrifugados (13.000 G/5 minutos) para retirada do suco gástrico artificial e da salina. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e os *pellets* resultantes da centrifugação foram suspensos em caldo MRS (Merck).

Para análise da viabilidade das células, foram aplicados 200 µL/poço dos inóculos do controle e das amostras tratadas com suco gástrico artificial em uma microplaca de 96 poços que, posteriormente, foi incubada em espectrofotômetro (Microplate, Spectrophotometer System 47 SpectraMax 340 – Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, USA), a 37°C. A absorbância do cultivo foi determinada pela leitura de OD_{620NM} a cada uma hora, durante 24 horas de incubação no aparelho de espectrofotometria.

A porcentagem de inibição de crescimento foi calculada utilizando o programa Graphpad Prism 5.0 pela fórmula $(1-SG/CT) \times 100$, sendo que SG e CT correspondem a área sob a curva de crescimento das bactérias tratadas com suco gástrico artificial e do controle, respectivamente.

A interpretação dos resultados foi realizada a partir da porcentagem de inibição, de acordo com o critério proposto por Acurcio *et al.* (2014), sendo que as amostras foram consideradas tolerantes quando apresentaram porcentagem de inibição <40%, moderadamente tolerantes quando a porcentagem ficou entre 40-80% e sensíveis, quando superior a 80%.

4.2.2. Tolerância aos sais biliares

As amostras de BAL foram submetidas à análise de resistência aos sais biliares *in vitro* de acordo com técnicas adaptadas, descritas por Silva *et al.* (2013). A análise foi realizada em duplicata e três repetições.

As culturas foram ativadas duas vezes em caldo MRS (Merck) e, então, centrifugadas (13.000G) por 5 minutos para retirada do meio de cultivo e obtenção dos *pellets* das bactérias. Estes foram lavados com solução salina 0,9% três vezes e transferidos para tubos com 1 mL de Oxgall 0,3% (sais biliares artificiais) e tubos com solução salina 0,9% com pH 7,0 (controle). Posteriormente, foram transferidos 200 µL/poço dos inóculos do controle e das amostras tratadas com Oxgall 0,3% para uma microplaca com 96 poços. Na sequência, a microplaca foi incubada em espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 – Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, USA) a 37°C. A absorbância do cultivo foi determinada pela leitura de OD_{620NM}, a cada uma hora, durante 24 horas de incubação.

A porcentagem de inibição de crescimento foi calculada utilizando o programa Graphpad Prism 5.0 pela fórmula $(1-SB/CT) \times 100$, sendo que SB e CT correspondem a área sob a curva de crescimento das bactérias tratadas com sais biliares e do controle, respectivamente.

A interpretação dos resultados foi realizada a partir da porcentagem de inibição, de acordo com o critério proposto por Arcúcio *et al.* (2014), sendo que as amostras foram consideradas tolerantes quando apresentaram porcentagem de inibição <40%, moderadamente tolerantes quando a porcentagem ficou entre 40-80% e sensíveis, quando superior a 80%.

4.2.3. Susceptibilidade aos antimicrobianos

O antibiograma foi conduzido em duplicata, com três repetições para cada amostra, de acordo com a técnica adaptada de Charteris *et al.* (1998).

As BAL selecionadas foram ativadas em tubos de ensaio com rosca contendo caldo MRS (Merck), e incubadas a 37°C por 24h sob aerobiose. Depois, uma alíquota de 10 microlitros foi inoculada em placas contendo ágar MRS (Merck), que foram incubadas a 37°C por 24h, sob aerobiose.

Após a incubação, as colônias foram transferidas, com uso de alças, para tubos de ensaio com rosca contendo 3,5 mL de salina 0,9% até que a turbidez atingisse 0,5 na escala de *McFarland*, o que equivale a uma concentração de aproximadamente 10^8 UFC/mL. Posteriormente, *swabs* estéreis foram imersos nos tubos e o líquido foi distribuído por toda a superfície de placas de Petri de 14 cm de diâmetro contendo ágar MRS (Merck).

Após a secagem da solução salina contendo o inóculo nas placas, foram distribuídos doze discos contendo doses conhecidas de antimicrobianos de diferentes classes (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra) sobre o ágar MRS (Merck) de cada placa. As drogas utilizadas com suas correspondentes concentrações, abreviações e grupos farmacológicos podem ser observados na tabela 6:

Tabela 6. Discos de antimicrobianos utilizados no antibiograma

Antimicrobiano	Concentração	Abreviação	Grupo
Amicacina	30 µg	AMI30	Aminoglicosídeos
Ceftazidima	30 µg	CAZ30	Cefalosporinas de 3ª geração
Ciprofloxacina	5 µg	CIP5	Quinolonas de 3ª geração
Clindamicina	2 µg	CLI2	Lincosamidas
Cloranfenicol	30 µg	CLO30	Anfencóis
Eritromicina	15 µg	ERI15	Macrolídeos
Gentamicina	10 µg	GEN10	Aminoglicosídeos
Oxacilina	1 µg	OXA1	β-lactâmicos: penicilínicos
Penicilina G	10 µg	PEN10	β-lactâmicos: penicilínicos
Sulfa/Trimetoprim	25 µg	SUT25	Sulfonamidas
Tetraciclina	30 µg	TET30	Tetraciclinas
Vancomicina	30 µg	VAN30	Glicopeptídeos

As placas foram incubadas sob aerobiose a 37°C por 48h. O controle de qualidade dos discos foi realizado utilizando amostras de *Escherichia coli* ATCC 25922, de acordo com a técnica descrita por Charteris *et al.* (1998). Por fim, os halos de inibição ao redor dos discos formados após a incubação foram medidos por paquímetro digital Mitutoyo Digimatic Caliper® (Mitutoyo Sul Americana Ltda., São Paulo, Brasil). A classificação das amostras como sensíveis (S), moderadamente sensíveis (MS) ou resistentes (R) aos antimicrobianos foi feita, de acordo com o diâmetro médio do halo de inibição, conforme o padrão proposto por Charteris *et al.* (1998), apresentado na tabela 7. Os pontos de corte para oxacilina foram feitos de acordo com informações reportadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* para *Streptococcus pneumoniae*, pois a classificação para *Lactobacillus* não foi encontrada na literatura.

Tabela 7. Níveis de sensibilidade de *Lactobacillus* spp. a antimicrobianos de acordo com a média dos diâmetros dos halos de inibição (mm) no teste de antibiograma

Nível de susceptibilidade (mm)				
Antimicrobiano	Concentração	Resistente	Moderadamente sensível	Sensível
Amicacina	30 µg	≤ 15	16-17	≥ 18
Ceftazidima	30 µg	≤ 15	16-18	≥ 19
Ciprofloxacina	5 µg	≤ 13	14-18	≥ 19
Clindamicina	2 µg	≤ 8	9-11	≥ 12
Cloranfenicol	30 µg	≤ 13	14-17	≥ 18
Eritromicina	15 µg	≤ 13	14-17	≥ 18
Gentamicina	10 µg	≤ 12	-	≥ 13
Oxacilina	1 µg	≤ 19	-	≥ 20
Penicilina	10 µg	≤ 19	20-27	≥ 28
Sulfa/Trimetoprim	25 µg	≤ 11	12-16	≥ 17
Tetraciclina	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19
Vancomicina	30 µg	≤ 14	15-16	≥ 17

Fonte: Charteris *et al.* (1998), CLSI (2017)

4.2.4. Teste de antagonismo – “*spot on the lawn*”

A avaliação da relação de antagonismo entre os oito microrganismos potencialmente probióticos (produtores) e cinco indicadores (reveladores) foi realizada por meio da técnica *spot on the lawn* descrita por Tagg *et al.* (1976), em duplicata com três repetições.

Como bactérias reveladoras foram utilizadas quatro culturas patogênicas provenientes da *American Type Culture Collection* – ATCC: *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Salmonella enterica* var. Typhimurium ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 e *Escherichia coli* ATCC 25922, além de uma BAL isolada por Rocha (2021) de queijo artesanal da região de Serra Geral: *Lactobacillus rhamnosus* Q221.

As BAL foram ativadas em tubos de ensaio contendo caldo MRS (Merck) duas vezes e, então, depositadas no centro de placas de Petri contendo ágar MRS (Merck) para formação dos “spots”. Possíveis substâncias com características antagonistas seriam produzidas pelas BAL testadas. As placas foram incubadas a 37°C por 48h sob aerobiose. Em seguida, foi adicionado 1 mL de clorofórmio nas tampas das placas para eliminação das bactérias produtoras e manutenção somente as substâncias inibidoras produzidas. As placas foram mantidas invertidas em fluxo laminar por 30 minutos. Para complementar a inativação das BAL, as placas foram expostas à luz ultravioleta por 30 minutos.

As amostras reveladoras foram submetidas a duas ativações. As bactérias patogênicas foram incubadas em caldo BHI (*Difco*®, Detroit, Michigan, USA) e *Lactobacillus rhamnosus* Q221 isolado de queijo artesanal da região de Serra Geral em caldo MRS (Merck). A avaliação do antagonismo entre as BAL e *L. rhamnosus* é importante para verificar se a utilização das bactérias em conjunto, durante a fermentação de leites, seria possível ou se uma interferiria na atividade da outra.

Após a eliminação das BAL produtoras, 10 µL das culturas reveladoras ativadas foram transferidos para tubos contendo 3,5 mL de BHI (*Difco*®) no estado semissólido (0,75% de ágar bacteriológico – *Difco*®). O conteúdo do tubo, após homogeneização, foi vertido sobre as placas contendo os “spots”

inativados. Após a solidificação do ágar BHI semissólido, as placas foram novamente incubadas em estufas a 37°C, por 48h, em aerobiose.

Após o período de incubação, foi realizada a medição dos halos formados ao redor dos “spots”, que demonstram a inibição do crescimento dos microrganismos reveladores pelas substâncias produzidas pelas BAL. A leitura dos halos de inibição foi feita utilizando paquímetro digital Mitutoyo Digimatic Caliper® (Mitutoyo Sul Americana Ltda., São Paulo, Brasil).

4.3. Elaboração de leite fermentado com BAL isolada de QMA de Campo das Vertentes

4.3.1. Controle de qualidade do leite em pó desnatado reconstituído

Para realização dos experimentos, foi utilizado leite em pó desnatado da marca Molico (Nestlé®, Araçatuba, São Paulo, Brasil), de três lotes diferentes. Os leites fermentados foram elaborados a partir de leite em pó desnatado para melhor associação dos benefícios dos microrganismos probióticos à imagem positiva do consumo de leite desnatado pelos consumidores, pois há um crescente interesse da população por uma alimentação mais saudável.

O leite em pó desnatado foi reconstituído a 10% em água destilada e submetido a tratamento térmico a 110°C por 10 minutos. Posteriormente, a avaliação da qualidade microbiológica dos leites reconstituídos foi realizada com o objetivo de assegurar eficiência do tratamento térmico. Para isso, foram feitas, em duplicata, contagens de microrganismos mesófilos aeróbios (UFC/mL), coliformes 30/35°C e a 45°C (NMP/mL), *Staphylococcus* spp. e pesquisa da presença de *Salmonella* spp. (APHA, 1992) preconizadas no RTIQ de leite em pó (Brasil, 1996), além de contagem de bolores e leveduras (Tournas *et al.*, 2001).

4.3.2. Seleção de microrganismo probiótico

De acordo com os resultados dos testes *in vitro* de resistência ao suco gástrico, aos sais biliares artificiais, resistência aos antimicrobianos e antagonismo, foi realizada a seleção de BAL para preparo dos leites fermentados.

4.3.3. Teste de capacidade fermentativa das BAL selecionadas

Para avaliar a capacidade de fermentação dos microrganismos pré-selecionados, foi realizada a ativação em caldo MRS (Merck, Darmstadt, Germany), a 37°C, em aerobiose e em intervalos de 24 horas. Posteriormente, 2,5% (v/v) das culturas ativadas foram inoculados em tubos de 10 mL contendo leite desnatado reconstituído a 10%, tratado termicamente a 110°C por 10 minutos. Os tubos foram, então, incubados a 37°C até a coagulação (cerca de 24 horas ou mais, especificamente, até o desprendimento do coágulo da parede do tubo).

4.3.4. Elaboração do leite fermentado

Foram produzidos, em três repetições, três lotes de leites fermentados utilizando os diferentes lotes do leite em pó desnatado. Cada recipiente possuía 100 mL, que foram destinados a análises físico-químicas e de enumeração de BAL nos tempos 1, 7 e 14 dias de estocagem a 8-10°C.

Para elaboração dos leites fermentados foram transferidos 100 µL da cultura congelada de BAL para tubos de ensaio com tampa contendo 5 mL de caldo MRS (Merck, Darmstadt, Germany). Os tubos contendo a cultura selecionada foram, então, incubados a 37°C ± 2°C por 24 horas. Este procedimento foi repetido mais uma vez para garantir a ativação das culturas.

Após esse período, 2,5% (v/v) da cultura ativada, com contagem das BAL realizada por plaqueamento (IDF, 1997), foram inoculados em três recipientes de 10 mL contendo leite desnatado reconstituído a 10%, elaborado a partir de três lotes de leite em pó desnatado. Os recipientes foram incubados a 37°C ± 2°C por tempo necessário até a coagulação do leite, constituindo-se os inóculos para elaboração dos leites fermentados.

Os três inóculos foram adicionados, em três repetições cada, a uma concentração de 2,5% (v/v) em recipientes de 100 mL contendo leite desnatado reconstituído a 10% tratado termicamente.

Após a fermentação, os produtos fermentados foram armazenados sob refrigeração a 8-10°C, sendo retirados posteriormente apenas para a realização de análises físico-químicas e contagem de BAL.

4.3.5. Análises físico-químicas dos leites fermentados

Para avaliação da qualidade físico-química dos leites fermentados, foi realizada a coleta de amostras com 1, 7 e 14 dias de estocagem a 8-10°C para realização das seguintes determinações, em triplicata:

- acidez titulável (Official Methods of Analysis, 2019a);
- pH em pHmetro digital (Gehaka PG1800, São Paulo, Brasil);
- umidade pelo método da desidratação em estufa (Gehaka G4023D, São Paulo, Brasil) e balança (Shimadzu AY220, São Paulo, Brasil);
- proteínas pelo método de Micro-Kjedahl (Official Methods of Analysis, 2019c) e
- gordura pelo método de Gerber (Official Methods of Analysis, 2019d).

4.3.6. Contagem de bactérias ácido-láticas

Para a realização das contagens de BAL foram realizadas diluições decimais seriadas de (10^{-1} a 10^{-7}) dos leites fermentados produzidos, em salina peptonada (0,9% de NaCl e 0,1% de peptona). Em seguida, duas microgotas de 10 μ L das diluições selecionadas foram adicionadas ao ágar MRS (Merck, Darmstadt, Germany) e incubadas sob aerobiose em 37°C \pm 2°C por 48 horas. Após esse período, a enumeração dos microrganismos foi feita pela 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

O software Graphpad Prism 7.0 (Graphpad Software, San Diego, Califórnia, EUA) foi utilizado para realização de todas as análises estatísticas.

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 -Wällis em nível de significância de 5%.

Os resultados de 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. Potencial probiótico *in vitro* das bactérias ácido-láticas

5.1.1. Tolerância ao ácido gástrico e sais biliares

Os percentuais de inibição ao ácido gástrico artificial e aos sais biliares e as classificações quanto à sensibilidade das BAL a esses compostos são apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Percentuais de inibição e classificação quanto ao nível de tolerância ao ácido gástrico artificial (pH 2,0) e aos sais biliares de amostras de BAL isoladas de queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes, MG

Amostra	Percentual de inibição (%)	
	Ácido gástrico artificial (pH = 2,0)	Sais biliares (0,3% Oxgall)
<i>Lb. plantarum</i> (LPL)	69,77 (MT)	4,71 (T)
<i>Lb. brevis</i> (LB)	60,62 (MT)	-10,47 (T)
<i>Lb. curvatus</i> (LC)	27,70 (T)	34,22 (T)
<i>Lb. paracasei</i> (LPR)	68,88 (MT)	22,87 (T)
<i>L. garvieae</i> (LG)	81,96 (S)	7,04 (T)
<i>L. lactis</i> (LL)	71,68 (MT)	5,70 (T)
<i>Ln. mesenteroides</i> (LM)	29,91 (T)	28,50 (T)
<i>Ln. pseudomesenteroides</i> (LPS)	74,85 (MT)	18,66 (T)

Legenda: Tolerante – T (<40%), moderadamente tolerante – (40-80%) e sensível – S (>80%), de acordo com a classificação proposta por Acúrcio *et al.*, (2014).

Um dos critérios para classificação de um microrganismo como probiótico é a tolerância a compostos como o ácido gástrico e sais biliares para que sobrevivam à passagem pelo trato gastrintestinal.

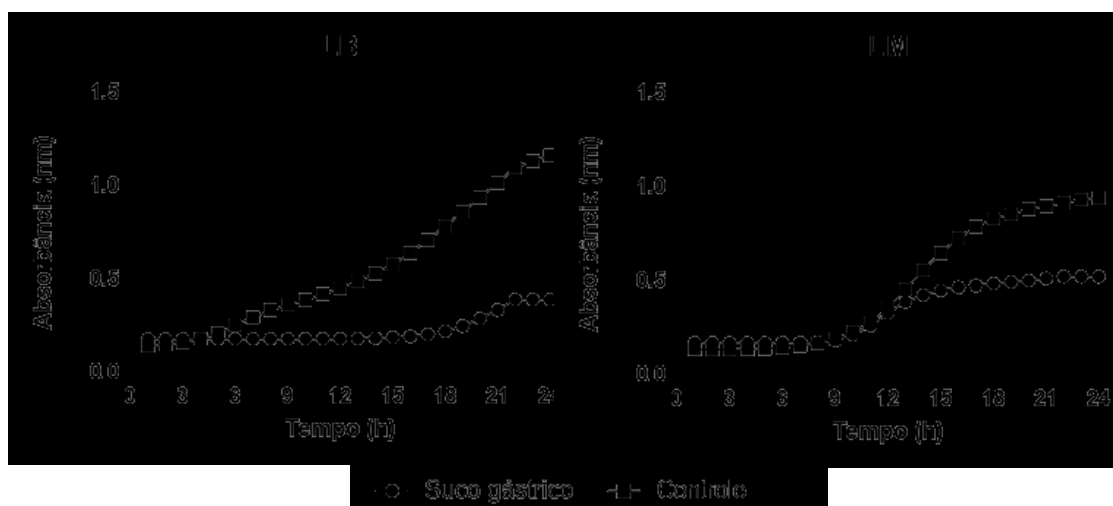
A partir dos resultados apresentados na tabela 8 é possível perceber que 25% (2/8) das amostras foram tolerantes, 62,5% (5/8) foram moderadamente tolerantes e apenas uma (12,5%) foi sensível ao suco gástrico artificial. Assim, a maioria das BAL testadas foram moderadamente sensíveis ao ácido gástrico artificial. Os percentuais de inibição ao ácido gástrico variaram entre 27,70% e 81,96%.

Segundo Resende *et al.* (2011), espera-se que as BAL possuam adaptação às condições de estresse geradas por uma alta acidez a fim de permanecerem viáveis, pois no processo de fabricação de queijos o baixo pH é frequente. A tolerância a ambientes ácidos apresentada por *Lactobacillus* spp. ocorre por meio da manutenção da homeostase do pH intracelular, da funcionalidade da membrana celular e da regulação positiva das proteínas de resposta ao estresse (Lebeer *et al.*, 2008).

Costa *et al.* (2013) encontraram percentuais de inibição ao ácido gástrico artificial entre 0% e 19,68% para BAL isoladas de QMA da Canastra. Para *Lactobacillus* spp. isolados de QMA da região de Araxá, os valores encontrados ficaram entre -0,38% a 97% (Silva *et al.*, 2019). Sant'Anna *et al.* (2017) observaram uma variação nos percentuais de inibição de -24% a 11% ao analisar amostras de BAL isoladas de QMA de Campo das Vertentes.

Neves (2017) encontrou valores percentuais de inibição mais altos que os relatados acima para BAL isoladas de queijos artesanais do norte de Minas Gerais, variando entre 28% a 87%, bem próximo a faixa de variação encontrada no presente trabalho. Embora os valores percentuais de inibição ao ácido gástrico artificial do presente estudo também tenham sido, em geral, aparentemente mais elevados que aqueles relatados na literatura, os resultados ainda são satisfatórios, já que apenas *L. garvieae* (LG) demonstrou sensibilidade ao ácido gástrico.

As figuras abaixo ilustram a diferença da absorvância apresentada pelos microrganismos pré-selecionados para fabricação do leite fermentado (*Ln. mesenteroides* LM e *Lb. brevis* LB), após duas horas de incubação a 37°C em pH 7,0 (controle) e pH 2,0 (ácido gástrico artificial).



Figuras 4 e 5. Diferença da absorbância após duas horas de incubação a 37°C em pH 7,0 (controle) e pH 2,0 (ácido gástrico artificial) para *Lb. brevis* LB e *Ln. mesenteroides* LM isolados de queijo Minas artesanal de Campo das Vertentes – MG

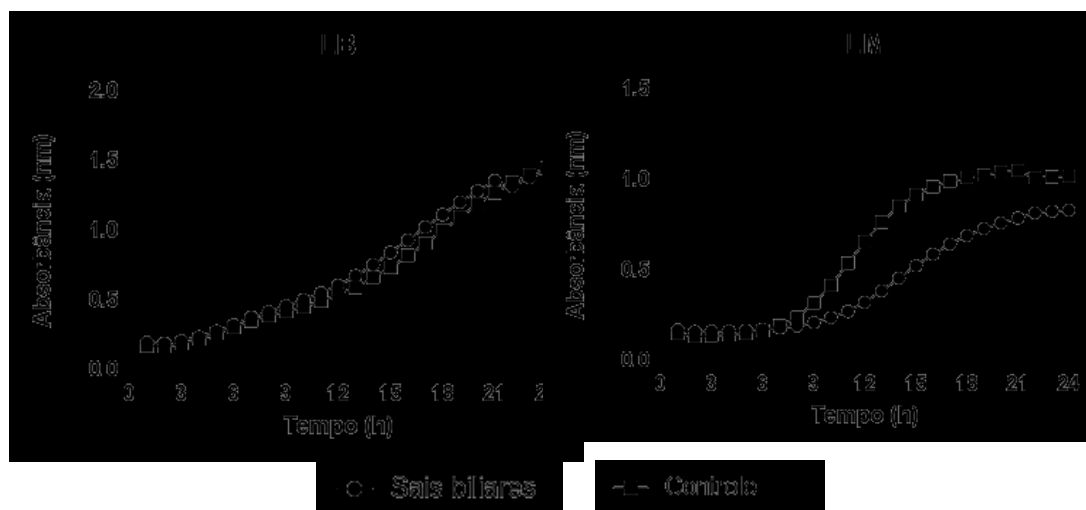
Em relação à resistência aos sais biliares, todas as amostras (100%) foram tolerantes, como pode ser observado na tabela 8, com valores de inibição variando entre -10,47% e 34,22%. Andrade *et al.* (2014), ao avaliarem amostras de BAL isoladas de QMA da Canastra e Sant’Anna *et al.* (2017), de Campo das Vertentes, também verificaram que 100% das amostras foram resistentes aos sais biliares. Os valores percentuais de inibição nos estudos mencionados variaram entre -11,85% a 37,61% e -1% a 34%, respectivamente.

É possível observar uma grande variedade de valores de inibição das BAL aos sais biliares na literatura. Silva *et al.* (2019) encontraram valores entre 20,69% a 79,95%. Neves (2017) observou valores que variaram entre 13% a 47%. Alguns trabalhos indicam que as diferenças nas curvas de crescimento das BAL desafiadas com Oxgall depende da linhagem desses microrganismos, e não da sua espécie (Jacobsen *et al.*, 1999; Mirlohi *et al.*, 2009; Ruiz-Moyano *et al.*, 2008). Entretanto, Sant’Anna *et al.* (2017) verificaram que até mesmo linhagens semelhantes podem manifestar potencial diferente de resposta nesse teste, o que explicaria tal variação na literatura.

Os sais biliares são capazes de eliminar microrganismos a partir da sua ação detergente sobre a membrana plasmática. Entretanto, *Lactobacillus* spp.

podem adotar estratégias de sobrevivência como a presença de uma enzima hidrolase de sais biliares – denominada *biliary salts hidrolase*, BSH – que desconjuga os sais biliares e impede sua ação detergente (Vinderola e Reinheimer, 2003). Além disso, esses microrganismos podem realizar o efluxo ativo de bile e mudanças na arquitetura e composição das membranas celulares (Ruiz *et al.*, 2013).

As figuras a seguir ilustram a diferença da absorbância apresentada pelos microrganismos pré-selecionados para elaboração de leites fermentados (*Ln. mesenteroides* LM e *Lb. brevis* LB), após 18h de incubação a 37°C em caldo MRS (controle) e caldo MRS 0,3% (p/v) de sais biliares (Oxgall®).



Figuras 6 e 7. Diferença da absorbância após 18h de incubação a 37°C em caldo MRS (controle) e caldo MRS com 0.3% (p/v) de sais biliares (Oxgall®) para para *Lb. brevis* LB e *Ln. mesenteroides* LM.

A administração oral da maioria das bactérias resulta em uma grande perda de viabilidade associada à passagem pelo trato gastrintestinal, que é atribuída às altas concentrações de ácido e sais biliares presentes (Cook *et al.*, 2012). A microencapsulação de probióticos pode ser usada para aumentar a resistência desses microrganismos a essas condições desfavoráveis (Yao *et al.*, 2020). Dessa forma, essa prática poderia possibilitar uma menor perda de células das BAL classificadas como moderadamente tolerantes e sensíveis ao ácido gástrico e sais biliares pelo teste *in vitro* durante a passagem pelo trato gastrintestinal e aumentar a quantidade desses microrganismos no intestino.

A formulação desses probióticos em microcápsulas é um método emergente para reduzir a morte celular durante a passagem gastrintestinal, bem como uma oportunidade para controlar a liberação dessas células ao longo do trato intestinal. A maior parte dessa tecnologia é baseada na imobilização de bactérias em uma matriz polimérica – não citotóxica e não antimicrobiana, garantindo que o hospedeiro, assim como a bactéria, não seja prejudicado por essa matriz –, que mantém sua estrutura no estômago antes de se degradar e se dissolver no intestino (Cook *et al.*, 2012).

5.1.2. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de BAL isoladas de QMA de Campo das Vertentes, Minas Gerais, estão expostos na tabela 9. Conforme mencionado no item 4.2.3. dessa dissertação, de acordo com a média dos halos de inibição, os microrganismos foram classificados como sensíveis (S), moderadamente sensíveis (MS) ou resistentes (R) aos antimicrobianos, considerando-se os padrões propostos por Charteris *et al.*, (1998) e *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (2017).

Tabela 9. Sensibilidade de BAL isoladas de queijo Minas artesanal de Campo das Vertentes – MG à antimicrobianos de diferentes classes

Antimicrobiano	Concentração	Amostras							
		LPL	LB	LC	LPR	LG	LL	LM	LPS
Amicacina	30 µg	R	R	R	R	R	R	R	R
Ceftazidima	30 µg	S	S	S	MS	S	S	S	S
Ciprofloxacina	5 µg	R	R	R	R	R	R	MS	R
Clindamicina	2 µg	S	MS	S	S	S	S	S	S
Cloranfenicol	30 µg	S	S	S	S	S	S	S	S
Eritromicina	15 µg	S	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicina	10 µg	R	S	R	R	R	S	R	S
Oxacilina	1 µg	R	R	R	R	S	S	S	S
Penicilina	10 µg	S	S	S	S	S	S	S	S
Sulfa/Trimetoprim	25 µg	S	S	S	S	S	S	S	R
Tetraciclina	30 µg	S	S	S	S	MS	S	MS	S
Vancomicina	30 µg	R	R	R	R	S	S	S	R

Legenda: R – resistente ao antimicrobiano, S – sensível ao antimicrobiano e MS – moderadamente sensível ao antimicrobiano. LPL – *Lb. plantarum*, LG – *L. garvieae*, LM – *Ln. mesenteroides*, LL – *L. lactis*, LB – *Lb. brevis*, LC – *Lb. curvatus*, LPS – *Ln. pseudomesenteroides*, LPR – *Lb. paracasei*.

De acordo com a média dos diâmetros dos halos de inibição formados, todas as amostras (100%) testadas foram sensíveis à cloranfenicol, eritromicina e penicilina. Em concordância com os resultados apresentados, Charteris *et al.* (1998) observaram sensibilidade de todas as amostras de *Lactobacillus* spp. ao cloranfenicol. Esse resultado é esperado, pois seu uso em animais de produção é proibido devido aos efeitos colaterais sobre a medula óssea da espécie humana (Paes *et al.*, 2009). No Brasil, a Instrução Normativa nº 9 de 2003 do MAPA, proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso de cloranfenicol e nitrofuranos e de produtos que contenham esses princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos (Brasil, 2003).

Cueto-Vigil *et al.* (2010) demonstraram resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo para eritromicina e penicilina, evidenciando que a maioria das BAL isoladas de soro de leite eram sensíveis a essas drogas.

Segundo Katla *et al.* (2001), a resistência a antimicrobianos inibidores da síntese de ácido nucleico, como trimetropim e sulfonamidas, tem sido reportada como uma característica intrínseca às BAL. De acordo com os resultados apresentados na tabela 9, apenas *Ln. pseudomesenteroides* LPS apresentou resistência a esse composto. Os resultados encontrados para sulfa/trimetropim diferem dos relatados na literatura, podendo ser um novo achado para bactérias dessa região devido a características intrínsecas desses microrganismos. De qualquer forma, esses resultados são satisfatórios, pois é desejável que BAL apresentem sensibilidade aos antimicrobianos.

Das BAL analisadas, 87,5% (7/8) foram sensíveis à ceftazidima e clindamicina, sendo que aquelas que não foram sensíveis se apresentaram moderadamente sensíveis à essas drogas, semelhante ao encontrado por Sant'Anna *et al.* (2017) em culturas de *Lactobacillus* e *Pediococcus* de silagem, água, leite, soro fermento endógeno e QMA de Campo das Vertentes. Altos

percentuais de sensibilidade (75%) também foram verificados em relação à tetraciclina, assim como relatado por Andrade *et al.* (2014), Silva *et al.* (2019) e Sant'Anna *et al.* (2017) em BAL isoladas de QMA da Canastra, Araxá e Campo das Vertentes, respectivamente. Assim, a maioria das BAL apresentaram sensibilidade a essas drogas, o que sugere que esses microrganismos não são capazes de transmitir genes de resistência a essas drogas para outros microrganismos.

Em contrapartida, todas as amostras (100%) foram resistentes à amicacina, droga pertencente ao grupo dos aminoglicosídeos e indicada ao tratamento de infecções graves causadas por microrganismos Gram-negativo (Dalle *et al.*, 1992). A resistência bacteriana aos aminoglicosídeos pode resultar de mutações afetando os ribossomos e de mudanças na permeabilidade celular, mas a mais importante causa de resistência é a inativação dos antimicrobianos catalisada por enzimas (Franklin and Snow, 2005). Esse resultado é semelhante ao encontrado na literatura (Termerman *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2005; Liasi *et al.*, 2009). A resistência a essa droga é geralmente intrínseca – o que significa que há menor probabilidade de transferência de genes para a microbiota patogênica (Ammor *et al.*, 2007).

A ausência de resistência adquirida aos antimicrobianos é um dos primeiros critérios de segurança a serem observados em potenciais microrganismos probióticos. As BAL têm sido descritas como portadoras de resistência intrínseca a amicacina, oxacilina e vancomicina (May-Torruco *et al.*, 2020).

Diversos estudos reportaram a resistência de *Lactobacillus* spp. à vancomicina (Cherteris *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2013; Sant'Anna 2017; Valente *et al.*, 2019). Dos *Lactobacillus* analisados no presente estudo, todos (100%) apresentaram resistência à essa droga. Embora microrganismos de outros gêneros de BAL também tenham sido descritos como portadores dessa resistência intrínseca à vancomicina (Mathur e Singh, 2005), 75% (3/4) das BAL analisadas e pertencentes aos gêneros *Lactococcus* e *Leuconostoc* apresentaram sensibilidade ao antimicrobiano. Achados semelhantes quanto a outros gêneros de BAL também foram relatados por Perin *et al.* (2014) e Acúrcio *et al.* (2014).

Segundo Delcour *et al.* (1999), em algumas espécies de BAL, o aminoácido terminal do pentapeptídeo muramil presente na parede celular, que normalmente é a d-alanina, é substituído por d-lactato ou d-serina. Isso impede a ligação da vancomicina ao microrganismo e, assim, a ocorrência do mecanismo de ação dessa droga.

Observa-se que 50% (4/8) das BAL foram resistentes à oxacilina. Entretanto, todos os microrganismos que demonstraram essa resistência são do gênero *Lactobacillus* spp., considerado intrinsicamente resistente a esse antimicrobiano, já essa resistência não é citada na literatura como sendo transmitida via plasmídeo por BAL (Mathur e Singh, 2005). Dessa forma, trata-se de um resultado esperado, e há uma menor probabilidade de transferência de genes de resistência por esses microrganismos.

Das amostras analisadas, 87,5% (7/8) foram resistentes à ciprofloxacina – grupo das quinolonas de 3ª geração. Há indícios de que *Lactobacillus* spp. apresentem resistência intrínseca a esse composto, devido a características relacionadas à estrutura da parede celular, permeabilidade de membranas e mecanismos de efluxo (Nawaz *et al.*, 2011, Abriouel *et al.*, 2015).

Quanto à gentamicina, 62,5% (5/8) das BAL apresentaram resistência no teste. Alguns trabalhos verificaram altos níveis de resistência das BAL isoladas de QMA da Canastra (Andrade *et al.*, 2014) e de Campo das Vertentes (Sant’Anna *et al.*, 2017) a esse antimicrobiano.

As BAL podem agir como reservatórios de genes de resistência antimicrobiana que podem ser transferidos para patógenos, seja pela da cadeia alimentar ou, mais importante, no trato gastrointestinal humano e animal (Belén Flórez *et al.*, 2005). Em vista disso, a distinção entre resistência intrínseca, inespecífica e adquirida é difícil, pois requer o conhecimento de padrões de resistência antimicrobiana de muitas espécies de BAL (Teuber *et al.*, 1999), porém, de extrema importância na verificação do atendimento aos critérios de segurança para probióticos.

5.1.3. Antagonismo – “Spot on the lawn”

As médias e desvios-padrão dos halos de inibição formados pelo antagonismo exercido pelas BAL contra os microrganismos reveladores *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Salmonella enterica* var. Typhimurium ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 e *Escherichia coli* ATCC 25922 são apresentados abaixo na figura 8.

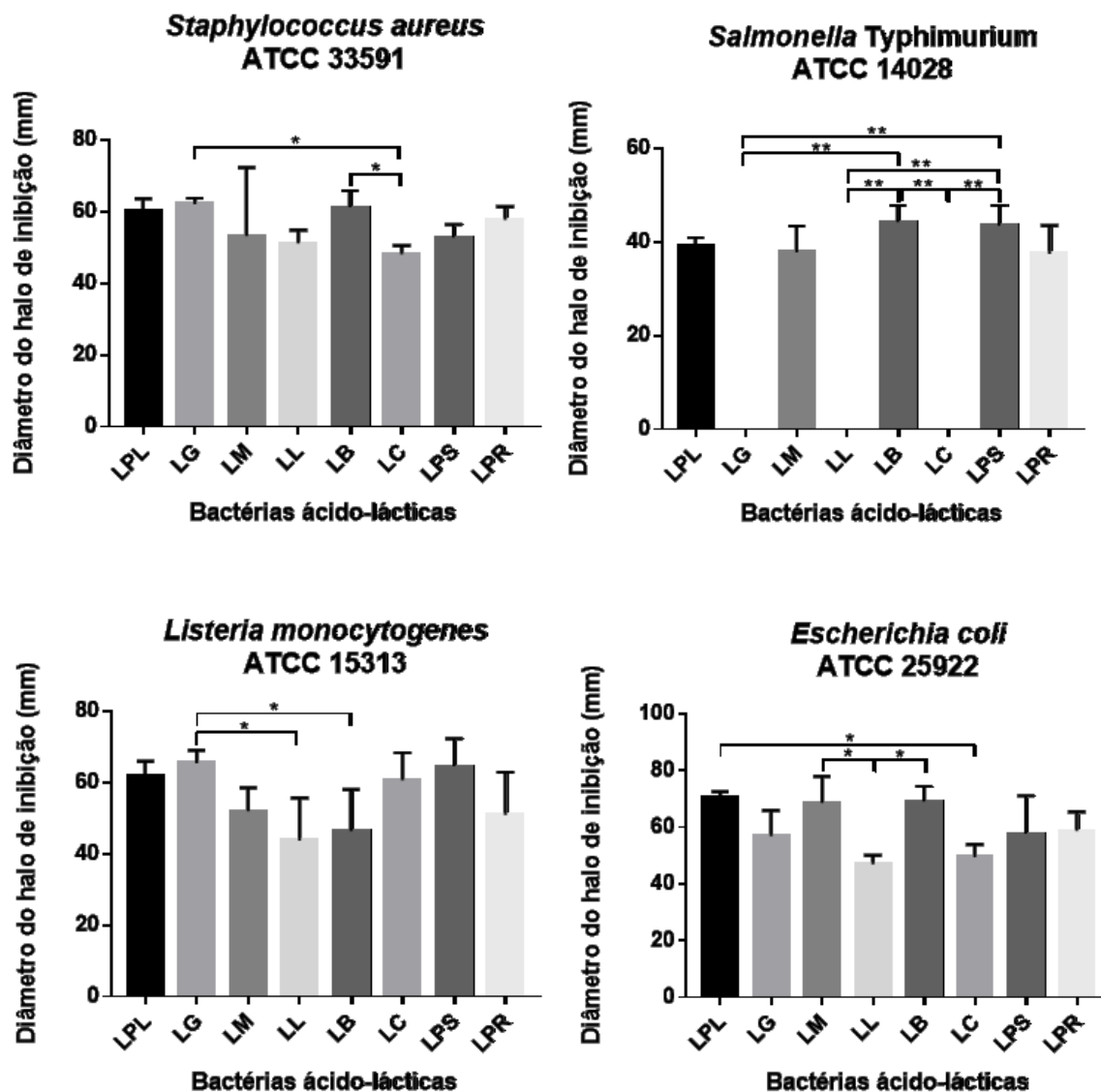


Figura 8. Média dos halos de inibição (mm) e desvios-padrão do teste de antagonismo *in vitro* das bactérias ácido-láticas isoladas de queijo Minas artesanal de Campo das Vertentes, MG, contra microrganismos reveladores. Legenda: LPL – *Lb. plantarum*, LG – *L. garvieae*, LM – *Ln. mesenteroides*, LL – *L. lactis*, LB – *Lb. brevis*, LC – *Lb. curvatus*, LPS – *Ln. pseudomesenteroides*,

LPR – *Lb. paracasei*. As barras com * indicam diferenças pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

Os resultados demonstram que todas (100%) as BAL analisadas são capazes de formar halos de inibição no teste de antagonismo *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Esses resultados são importantes, pois essas bactérias são, frequentemente, associadas a problemas de saúde pública pela ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (Forsythe, 2002).

Resultados semelhantes que demonstraram significativa atividade antagonista de BAL foram relatados na literatura. Rotta *et al.* (2020) evidenciaram atividade antagonista de BAL isoladas de leite cru bovino, com destaque para *L. casei* 2.11, que inibiu cinco das seis bactérias indicadoras testadas, incluindo *Escherichia coli* ATCC 35218 e *Staphylococcus aureus* 25923. Alguns trabalhos também verificaram potencial antagonista de BAL isoladas de QMA frente a microrganismos reveladores (Sant'Anna *et al.*, 2017; Cunha, 2018; Silva *et al.*, 2019)

Entretanto, para *Salmonella enterica* var. Typhimurium ATCC 14028, não houve formação de halo de inibição para *L. garvieae* LG, *L. lactis* LL e *Lb. curvatus* LC. Mahmoudi *et al.* (2021) demonstraram atividade inibitória de *Lb. curvatus* KMJC3 contra diversos microrganismos patogênicos, inclusive *S. enterica* var. Typhimurium. Segundo Haraguchi *et al.* (2019), a atividade antagonista de *L. lactis* contra *S. enterica* var. Typhimurium variou de acordo com as linhagens, e várias destas apresentaram pequeno efeito antagonista contra esse microrganismo. Até a realização do presente estudo, não foram encontrados na literatura dados a respeito da atividade inibitória de *L. garvieae* contra *S. enterica* var. Typhimurium.

A figura 8 mostra que houve diferença significativa ($p < 0,05$) na atividade inibitória entre alguns microrganismos contra *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 e *Escherichia coli* ATCC 25922.

Diferenças entre os diâmetros dos halos de inibição podem ocorrer devido à uma menor capacidade de produção de compostos antimicrobianos e/ou pela produção de metabólitos com maiores pesos moleculares, o que dificulta sua difusão através do ágar (Savino *et al.*, 2011).

Na avaliação do antagonismo *in vitro* utilizando-se como microrganismo revelador *Lactobacillus rhamnosus* Q221 isolada de queijo artesanal da Serra Geral (Rocha, 2021), foi observado que não houve formação de halos de inibição para as BAL analisadas. A ausência de formação de halo sugere que as BAL poderiam atuar em harmonia na produção de leites fermentados e no desenvolvimento das características do produto, sem auto inibição. Segundo Costa *et al.* (2013), o uso conjunto dessas bactérias poderia até mesmo aumentar a atividade inibitória contra microrganismos indesejáveis.

A inibição de outros microrganismos pelas BAL está relacionada à produção de ácido láctico pela fermentação dos carboidratos realizada por essas bactérias, o que contribui para sua sobrevivência em queijos e produtos lácteos. Entretanto, esses microrganismos também são capazes de produzir outros compostos com atividade inibitória como bacteriocinas e H₂O₂, entre outros. (Gómez-Gil *et al.*, 2000; Guedes Neto *et al.*, 2005).

O ácido láctico possui capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana externa de bactérias Gram-negativo, além da sua presença no meio ocasionar a queda de pH (Alakomi *et al.*, 2000). Já o peróxido de hidrogênio possui toxicidade atribuída à sua capacidade de oxidar componentes celulares como DNA, lipídeos de membrana e proteínas, e seu mecanismo de ação mais importante envolve a formação de radicais OH⁻ a partir do H₂O₂ (Pehrson, 2013).

O mecanismo de ação das bacteriocinas pode ocorrer de duas formas: bactericida, possivelmente resultando em lise celular com inibição da síntese de compostos importantes para a sobrevivência da célula, ou bacteriostática, em que apenas há a inibição da multiplicação celular (Sabo *et al.*, 2014; Costa, 2017). A maioria das bacteriocinas interagem com lipídeos aniônicos presentes na membrana plasmática das bactérias-alvo, fazendo com que ocorra inibição da síntese de peptidoglicano. Essas substâncias podem ainda, formar poros na

membrana, que irão ocasionar a inibição ou a morte de bactérias-alvo devido a essa alteração da sua conformação (Machado, 2015; Ogaki *et al.*, 2015).

5.2. Seleção de microrganismo probiótico

Os microrganismos pré-selecionados, de acordo com os resultados das análises *in vitro* de resistência ao ácido gástrico e aos sais biliares artificiais, sensibilidade aos antimicrobianos e antagonismo, foram *Ln. mesenteroides* LM e *Lb. brevis* LB.

Ln. mesenteroides LM apresentou tolerância tanto ao ácido gástrico artificial quanto aos sais biliares. Já *Lb. brevis* LB se mostrou moderadamente tolerante ao ácido gástrico e tolerante aos sais biliares (tabela 8). Esses resultados demonstram que ambos microrganismos são capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal.

Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos mostram que *Ln. mesenteroides* LM apresentou resistência apenas à amicacina e gentamicina, enquanto *Lb. brevis* LB demonstrou resistência à amicacina, ciprofloxacina, oxacilina e vancomicina. Embora *Lb. brevis* LB tenha apresentado resistência à uma maior quantidade de compostos em comparação à *Ln. mesenteroides* LM, tem sido reportado na literatura que a resistência de BAL a esses compostos – amicacina, oxacilina, ciprofloxacina e vancomicina – é intrínseca (Abriouel *et al.*, 2015; May-Torruco *et al.*, 2020). Dessa forma, os resultados encontrados são satisfatórios, pois apenas a resistência à gentamicina apresentada por *Ln. mesenteroides* LM não é relatada na literatura como uma característica inerente às BAL. Entretanto, são necessários mais testes para avaliar a capacidade de transmissão de genes de resistência aos antimicrobianos para uma caracterização probiótica mais completa (Andrade *et al.*, 2014).

Ambos os microrganismos foram capazes de formar halos de inibição contra todos os microrganismos reveladores (*Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Salmonella enterica* var. Typhimurium ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 e *Escherichia coli* ATCC 25922), e não formaram halos contra *Lb. rhamnosus* Q221, demonstrando a capacidade das BAL em

inibir patógenos e de atuar em harmonia com outras culturas na elaboração de produtos lácteos.

Embora *Ln. mesenteroides* LM e *Lb. brevis* LB tenham apresentado resultados satisfatórios em todos os testes *in vitro* realizados, no teste de capacidade fermentativa o único que fermentou o leite após cerca de 24 horas foi *Ln. mesenteroides* LM, que, por isso, foi selecionado para a elaboração dos leites fermentados.

5.3. Leite fermentado com *Leuconostoc mesenteroides* LM isolado de Queijo Minas Artesanal de Campo das Vertentes

5.3.1. Avaliação do leite em pó desnatado reconstituído

Todas as análises para o controle microbiológico após o tratamento térmico dos três lotes de leite em pó desnatados reconstituídos evidenciaram ausência de microrganismos mesófilos aeróbios, coliformes totais e a 45°, *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp. e bolores e leveduras.

Dessa forma, todos os leites em pó desnatados reconstituídos apresentaram qualidade microbiológica satisfatória após o tratamento térmico e atenderam aos requisitos estabelecidos pela legislação (Brasil, 1996).

5.3.2. Parâmetros físico-químicos durante a estocagem

Os leites fermentados foram avaliados nos tempos 1, 7 e 14 dias de estocagem refrigerada a 8-10°C. De acordo com pesquisa realizada pelo LabConsS – Laboratório de Vida Urbana, Consumo & Saúde, do grupo PET-SESu/Farmácia & Saúde Pública da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, ao avaliar o prazo de validade de leites fermentados de diferentes marcas observou-se que o número de dias para consumo dos produtos a partir da data de fabricação não obedeceu um padrão, existindo grandes variações, de mais de 100% (de 31 a 70 dias), entre os produtos (Rocha, 2011). Dessa forma, verifica-se que não há um padrão na determinação do prazo de validade dos leites fermentados.

Além disso, alguns autores verificaram a perda de viabilidade de algumas bactérias probióticas ao longo do tempo no armazenamento refrigerado. Gallina *et al.* (2011), ao realizarem a caracterização de leites fermentados com e sem

adição de probióticos e prebióticos e a viabilidade de BAL durante a vida-de-prateleira dos produtos, observaram que, em leites fermentados contendo culturas probióticas, a contagem dos microrganismos se manteve adequada até 15 dias. Mani-López *et al.* (2014) observaram que o leite fermentado por *Lactobacillus casei* manteve os níveis populacionais recomendados por três semanas. Damin *et al.* (2008) demonstraram que em leite fermentado com *Lactobacillus acidophilus* (LA) em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* (ST), enquanto as contagens de ST se mantiveram estáveis durante todo período de armazenamento, LA se manteve estável apenas até as três primeiras semanas.

Por isso, para garantir a manutenção das características físico-químicas e da contagem de microrganismos adequada, o presente estudo avaliou os produtos até os 14 dias de estocagem.

As médias dos parâmetros físico-químicos (acidez titulável, pH, umidade, proteína e gordura) dos leites fermentados são apresentados na tabela 10.

Tabela 10. Média dos parâmetros físico-químicos dos leites fermentados por *Ln. mesenteroides* LM, isolados de queijo Minas artesanal de Campo das Vertentes, Minas Gerais, nos dias 1, 7 e 14 de estocagem a 8-10°C

Parâmetro	Período de estocagem (dias)		
	1	7	14
Acidez (g/100g de ácido láctico)	1,08	1,16	1,04
pH	4,77	4,70	4,76
Umidade (%)	91,83	91,81	91,98
Proteína (g/100g)	2,76	2,82	3,33
Gordura (g/100g)	0	0	0

Os resultados exibidos na Tabela 10 mostram que não há diferenças significativas entre os resultados ($p > 0,05$).

A acidez titulável observada nos leites fermentados atendeu os padrões estabelecidos pelo RTIQ de leites fermentados em todos os tempos de estocagem, mantendo-se entre os valores estabelecidos de 0,6 a 2,0g de ácido

lático/100g (Brasil, 2007). A acidez de produtos refrigerados pode apresentar alterações em maior ou menor grau, dependendo do valor inicial da acidez, da temperatura de refrigeração, do tempo de armazenamento e do poder de pós-acidificação das culturas (Dualdo *et al.*, 2010). Os microrganismos do gênero *Leuconostoc* são heterofermentadores de glicose, com produção de ácido lático, D-lactato, além de CO₂ e etanol como produtos da fermentação (Ogier *et al.*, 2008).

Quanto aos valores de pH, não há padrões estabelecidos no RTIQ de leites fermentados (Brasil, 2007), o que impossibilita a comparação dos resultados com base na legislação brasileira. A partir dos resultados, percebe-se que houve uma pequena diminuição do pH entre os tempos 1 e 7 dias de estocagem (4,77 para 4,70) – embora essa diferença não seja estatisticamente significativa. De acordo com Beal *et al.* (1999), a redução do pH nos primeiros sete dias de armazenamento pode ser relacionada ao consumo de lactose e produção de ácido lático e galactose, evidenciando a existência de atividade metabólica da bactéria láctica.

Os elevados valores para acidez titulável, assim como de pH superiores a 4,6, estão de acordo com valores encontrados por outros autores (Donkor *et al.*, 2006; Viegas *et al.*, 2010). Donkor *et al.* (2006) também não encontraram diferença na diminuição do pH entre diferentes iogurtes adicionados de microrganismos probióticos durante 28 dias de estocagem ($p > 0,05$) e, segundo os autores, as variações de pH observadas provavelmente não foram capazes de interferir na viabilidade das culturas probióticas utilizadas. Da mesma forma, a diminuição de pH observada no presente experimento não comprometeu a viabilidade de *Ln. mesenteroides* LM, pois não foi observada diferença significativa nas contagens totais de BAL durante todo o período de estocagem (figura 9).

Os produtos apresentaram elevados valores de umidade (91,83% a 91,98%). Entretanto, também não foi possível realizar a comparação desses resultados com base na legislação brasileira devido à falta de valores de referência, pois o RTIQ de leites fermentados não possui padrões estabelecidos para os percentuais de umidade (Brasil, 2007). Leite *et al.* (2016) também encontraram altos valores percentuais de umidade para leites fermentados nos

tempos 1 e 7 dias de estocagem, variando entre 88,44% a 88,13% no tempo 1 dia e 78,76% a 78,31% no tempo 7 dias.

Os resultados percentuais dos teores de proteínas dos leites fermentados em todos os tempos de estocagem analisados não apresentaram interação significativa com os dias de estocagem sob refrigeração a 8-10°C ($p>0,05$) e, portanto, não variaram de forma significativa. Nos tempos 1 e 7 dias de estocagem, os leites fermentados não alcançaram os valores de referência propostos pela legislação brasileira de no mínimo 2,9g de proteína/100g (Brasil, 2007). Entretanto, após 14 dias de estocagem, o leite fermentado apresentou um teor de 3,33% de proteína, se adequando aos padrões propostos. Resultado semelhante foi relatado na literatura para leite fermentado elaborado com leite em pó desnatado (Viegas *et al.*, 2010).

Uma alternativa para os leites fermentados que não atenderam aos requisitos exigidos pela legislação é a elaboração com adição de CPS – concentrado proteico de soro lácteo. De acordo com Dave e Shah (1998), algumas culturas iniciadoras de leites fermentados necessitam da adição de alguns micronutrientes (peptídeos e aminoácidos), como por exemplo, o CPS, que reduz o tempo de fermentação e aumenta a viabilidade das bactérias probióticas. Além disso, Viegas *et al.* (2010) verificaram um aumento dos valores percentuais de proteína dos leites fermentados adicionados de CPS a 2% em todos os tempos de estocagem.

Em todos os leites fermentados verificou-se zero por cento de gordura durante todo o tempo de estocagem sob refrigeração. Esse resultado era esperado, pois o leite em pó utilizado na elaboração dos produtos era desnatado. Os resultados apresentados estão de acordo com os padrões estabelecidos na legislação brasileira para leite fermentado desnatado, que devem apresentar no máximo 0,5% de gordura (Brasil, 2007).

A representação gráfica dos resultados físico-químicos apresentados estão ilustrados na figura 9.

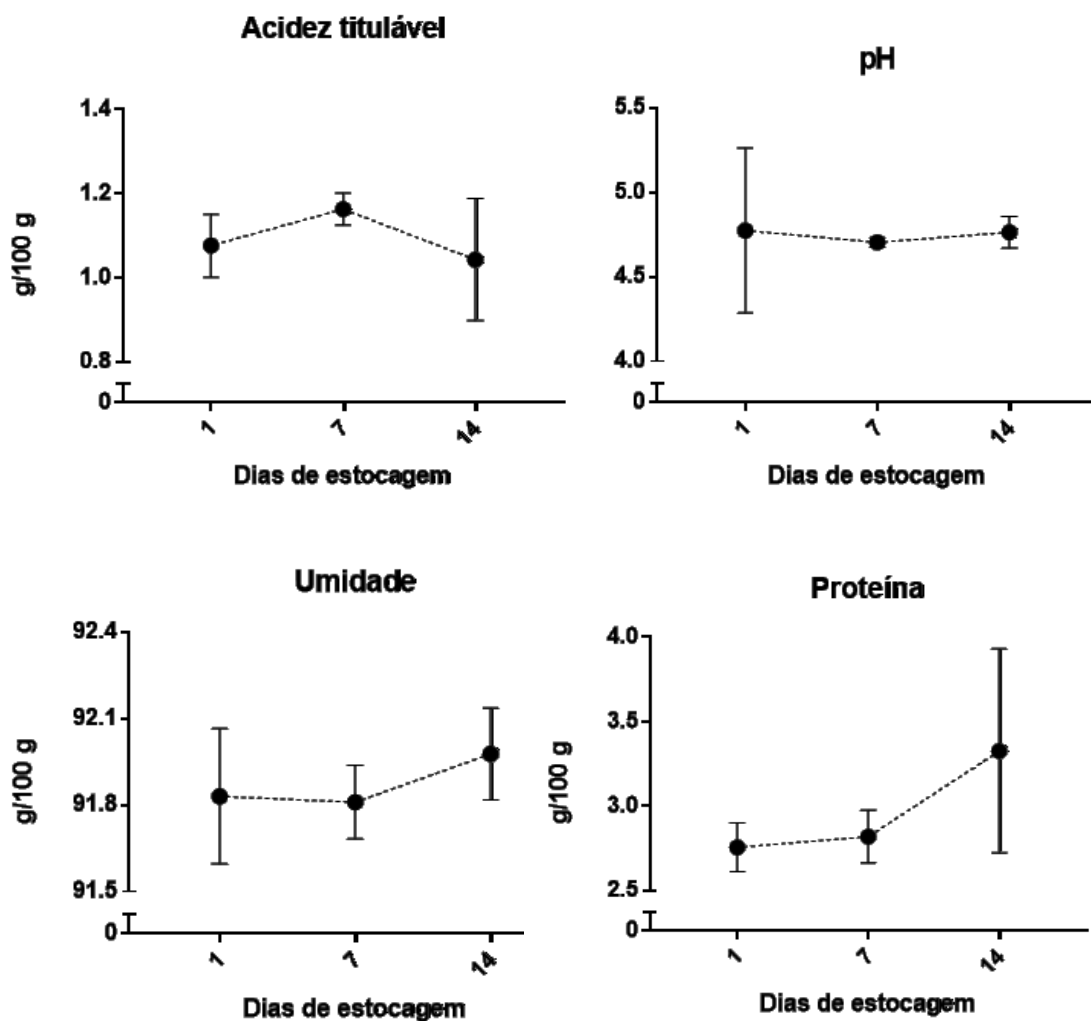


Figura 9. Parâmetros físico-químicos dos leites fermentados por *Ln. mesenteroides* LM, isolado de queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes, Minas Gerais, nos dias 1, 7 e 14 de estocagem a 8-10°C

5.3.3. Enumeração de bactérias ácido-láticas

O inóculo de *Ln. mesenteroides* LM utilizado na elaboração dos leites fermentados apresentou $1,3 \times 10^9$ UFC/mL. A enumeração de *Ln. mesenteroides* LM no leite fermentado durante 1, 7 e 14 dias de armazenamento a 8-10°C é apresentada na figura 10.

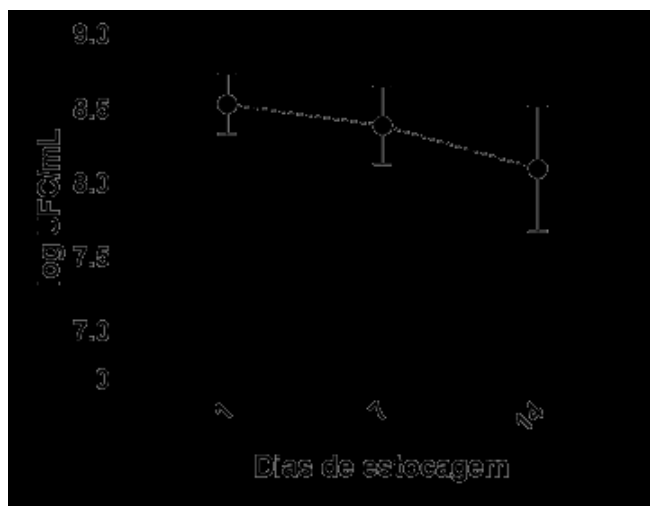


Figura 10. Médias de três repetições das contagens (log UFC/mL) de *Ln. mesenteroides* LM durante 1, 7 e 14 dias de estocagem do leite fermentado sob refrigeração de 8-10°C

Nas médias das três repetições de todos os períodos de estocagem dos produtos, observa-se uma contagem de *Ln. mesenteroides* LM superior a 10^8 UFC/mL. Dessa forma, os leites fermentados mantiveram a viabilidade até os 14 dias de estocagem, alcançando a contagem mínima de bactérias lácticas viáveis de 10^6 UFC/mL durante toda vida de prateleira estabelecida para leite fermentado pela legislação brasileira (Brasil, 2007).

Além de atender às contagens previstas na legislação, de acordo com Lima (2017), para garantir os benefícios funcionais dos probióticos de forma contínua, a sua ingestão deve ser diária e em quantidades adequadas. Alterações favoráveis na microbiota intestinal foram observadas com doses de 100g de produto com 10^8 - 10^9 UFC de microrganismos probióticos – equivalentes a 10^6 a 10^7 UFC/g de produto, administrados por 15 dias. Entretanto, o recomendado pela ANVISA, é uma porção diária de no mínimo 10^8 a 10^9 UFC/dia de microrganismos viáveis (Brasil, 2008).

Não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os valores médios de três repetições das contagens (log UFC/mL) de *Ln. mesenteroides* LM utilizada na fermentação dos produtos, dessa forma, os microrganismos demonstraram viabilidade constante ao longo de todo o período.

6. CONCLUSÃO

As BAL isoladas de QMA da região de Campo das Vertentes, Minas Gerais, apresentaram potencial probiótico *in vitro* com base nas análises de tolerância ao ácido gástrico artificial, aos sais biliares, sensibilidade aos antimicrobianos e antagonismo, sugerindo que esses microrganismos são capazes de resistir aos desafios naturais do trato gastrintestinal.

Além disso, todas as BAL foram capazes de inibir microrganismos indesejáveis como *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 e *Escherichia coli* ATCC 25922, sugerindo uma possível contribuição na conservação de produtos e sua indicação na elaboração de alimentos funcionais. Todas as BAL não inibiram *Lactobacillus rhamnosus* Q221, indicando a capacidade dessas bactérias de atuar em harmonia com outros microrganismos produtores de ácido-lático. Apenas *Lactococcus garvieae* LG, *Lactococcus lactis* LL e *Lactobacillus curvatus* LC não foram capazes de inibir *Salmonella enterica* var. Typhimurium ATCC 14028 no teste de antagonismo *in vitro*, necessitando de maiores estudos.

Dentre as bactérias analisadas, a que apresentou melhores resultados nos testes de potencial probiótico *in vitro* e, portanto, foi utilizada na elaboração de leite fermentado, foi *Leuconostoc mesenteroides* LM. A bactéria se mostrou viável e a qualidade físico-química do produto foi mantida até 14 dias de armazenamento refrigerado a 8-10°C.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIOUEL, H.; MUÑOZ, M. D. C. C.; LERMA, L. L. et al. New insights in antibiotic resistance of *Lactobacillus* species from fermented foods. *Food Research International.*, v. 78, p. 465-481, 2015. doi: 10.1016/j.foodres.2015.09.016.

ACURCIO, L. B., SANDES, S. H. C., BASTOS, R. W., SANT'ANNA, F. M., PEDROSO, S. H. S. P., REIS, D. C., ... NICOLI, J. R. (2017). Milk fermented by *Lactobacillus* species from Brazilian artisanal cheese protect germ-free-mice against *Salmonella* Typhimurium infection. *Beneficial Microbes*, v. 8, n. 4, 579–588. doi:10.3920/bm2016.0163

ACURCIO, L. B.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C. et al. 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. doi: 10.1590/1678-41625796 .

AGYARE, C., ETSIAPA BOAMAH, V., NGOFI ZUMBI, C., & BOATENG OSEI, F. (2019). Antibiotic Use in Poultry Production and Its Effects on Bacterial Resistance. *Antimicrobial Resistance - A Global Threat*. doi:10.5772/intechopen.79371

ALAKOMI, H.L; SKYTÄ, E.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; LATVA-KALA, K.; HELANDER, I.M. Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 66, n. 5, p.2001-2005, 2000. doi: 10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000.

ÁLVAREZ-CISNEROS, Y. M, & PONCE-ALQUICIRA, E. (2019). Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria. *Antimicrobial Resistance - A Global Threat*. doi:10.5772/intechopen.80624

AMMOR, M. S., BELÉN FLÓREZ, A. AND MAYO, B. (2007). Antibiotic resistance in non- enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24, 559-570. doi: 10.1016/j.fm.2006.11.001.

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. (2014). 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, 1592–1600. doi:10.1590/1678-6781

ANGURANA, S. K., & BANSAL, A. (2020). Probiotics and COVID-19: Think about the link. *British Journal of Nutrition*, 1–26. doi:10.1017/s000711452000361x

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Guia nº 21, versão 2, de 05 de maio de 2021. *Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos*. Ministério da Saúde, Brasília, 2021.

ANWAR F, ALTAYB HN, AL-ABBASI FA, AL-MALKI AL, KAMAL MA, KUMAR V. Antiviral effects of probiotic metabolites on COVID-19. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. 2020:1-10.

AZAD, M. A. K., SARKER, M., LI, T., & YIN, J. (2018). Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *BioMed Research International*, 2018, 1–8. doi:10.1155/2018/9478630

BACELAR JÚNIOR, A. J; KASHIWABARA, T.G.B; SILVA, V.Y.N.E. Intolerância à lactose - revisão de literatura. *Brazilian Journal Of Surgery And Clinical Research*. Ipatinga, v. 4, n. 4, p. 38-42, Setembro-Novembro 2013.

BALLARDIN, A. C. *et al.* Análise de microrganismos presentes em amostras de leite fermentado durante a vida de prateleira do produto. *Congresso de Pesquisa e Extensão da Faculdade da Serra Gaúcha*. v. 2, n. 2, p. 388-399, 2014.

BAPTISTA, M. G. F. M. 2013. *Mecanismos de Resistência aos Antibióticos*, (Dissertação de Mestrado) Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa. 42.

BEAL, C.; SKOKANOVA, J.; LATRILLE, E.; MARTIN, N.; CORRIEU, G. Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. *Journal of Dairy Science*, v. 82, n. 4, p. 673-681, 1999. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(99)75283-5

BELÉN FLÓREZ, A., DELGADO,S. AND MAYO, B. (2005). Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Canadian Journal of Microbiology* 51, 51-58. doi: 10.1139/w04-114.

BERMUDEZ-BRITO, M; PLAZA-DÍAZ, J; MUNÓZ-QUEZADA, S; GÓMEZLLORENTE, C; GIL, A. Probiotic Mechanisms of Action. *Nutrition & Metabolism.*, University of Granada, 2012. doi: 10.1159/000342079.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J.P.; HENRI-DUBERNET, S; GUÉGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, v. 126, p. 278-285. 2008. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.015.

BJÖRKROTH, J. ; HOLZAPFEL, W. *Genera Leuconostoc, Oenococcus and Weissella*. The Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community. editor / M. Dworkin. 3. ed. New York, USA : Springer-Verlag, 2003.

BOTELHO, L. Isolamento e identificação de lactobacilos e bifidobactérias em alimentos probióticos disponíveis no mercado Brasileiro. Campinas, 2005. 227f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

BOUCHARD, D. S., SERIDAN, B., SARAQUI, T., RAULT, L., GERMON, P., GONZALEZ-MORENO, C., EVEN, S. (2015). Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Mammary Microbiota: Potential Allies against Bovine Mastitis. *PLOS ONE*, v. 10, n. 12, e0144831. doi:10.1371/journal.pone.0144831

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9 de 27 de junho de 2003 – Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos: cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos. São Paulo. Diário Oficial da União, São Paulo, 27 de junho de 2003.

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. São Paulo. Diário Oficial da União, São Paulo, 23 de outubro de 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Brasília: Anvisa, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.html>. Acesso em 10 de janeiro de 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 30 de 26/06/2018. Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal. Brasília, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68 de 12/12/2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Brasília, 2006

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 146 de 07 mar. 1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade de produtos lácteos. Brasília, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instituto Adolfo Lutz. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. Brasília, 2005. 1018 p.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 241, DE 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Diário Oficial da União nº 144, de 27 de julho de 2018, 2018.

BROMATOLOGIA EM SAÚDE. ROCHA, C. Prazo de Validade de Leite Fermentado. Bromatologia em Saúde, Rio de Janeiro, 20 de dezembro de 2011

CALAÇA, P.R.A.; BEZERRA, R.P.; PORTO, A.L.F.; CAVALCANTI, M.T.H. Podem as bactérias ácido lácticas probióticas apresentarem efeito antitumoral em modelo animal de câncer de cólon? Uma revisão da literatura. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 37, n. 6, p. 587-592, Junho de 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100736X2017000600587&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 03 de dez. de 2021.

CARLI, E. M. Utilização de *Lactobacillus paracasei* como probiótico para o controle de *Salmonella* spp. em frangos de corte. 2006. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de

Santa Maria, Santa Maria, 2006. Disponível em: <<https://repositorio.ufsm.br/handle/1/5812>> Acesso em: 03 de dez. de 2021.

CASALTA, E., & MONTEL, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus☆. *International Journal of Food Microbiology*, v. 126, n. 3, 271–273. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.

CASTRO, R.D.; OLIVEIRA, L.G.; SANT'ANNA, F.M.; LUIZ, L.M.P.; SANDES, S.H.C.; SILVA, C.I.F.; SILVA, A.M.; NUNES, A.C.; PENNA, C.F.A.M.; SOUZA, M.R. Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. *Journal of Dairy Science*. 2016, 99, 6086–6096. doi: 10.3168/jds.2015-10579.

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*, v. 47, p. 45-61, 2015. doi: 10.1016/j.fm.2014.11.001.

CERDO, T., GARCIA-SANTOS, J. A., M, G. B., *et al.* 2019. The Role of Probiotics and Prebiotics in the Prevention and Treatment of Obesity, *Nutrients*, 11.

CHALITA, M.A.N.; SILVA, R.O.P.; PETTI, R.H.V.; SILVA, C.R.L. Algumas Considerações sobre a fragilidade de concepções de qualidade no mercado de queijos no Brasil. *Inf. Econ. s*, v.39, n.6, 2009.

CHARTERIS, A. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*, v. 61, n. 12, p. 1636-1643, 1998.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017

COOK, M. T., TZORTZIS, G., CHARALAMPOPOULOS, D., & KHUTORYANSKIY, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 162, n. 1, 56–67. doi:10.1016/j.jconrel.2012.06.003

COPPOLA, M.M.; TURNES, C.G. Probióticos e resposta imune. *Revista Ciência Rural*, Santa Maria, v.34, n. 4, p.1298-1299, 2004. doi: 10.1590/S0103-84782004000400056

COSTA, H. H. S., SOUZA, M. R., ACÚRCIO, L. B., CUNHA, A. F., RESENDE, M. F. S., & NUNES, Á. C. (2013). 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, n. 6, 1858–1866. doi:10.1590/s0102-09352013000600038

COSTA, S. L.C. Caracterização parcial de termoresistência e estabilidade a compostos químicos de bacteriocinas produzidas por *Enterococcus* sp. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2017.

COSTA, A. L., SILVA JUNIOR, A. C. S. 2016. *Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura*. Estação Científica (UNIFAP), Macapá. 7(2),45-57.

COURVALIN, P. Antibiotic resistance: the pros and cons of probiotics. *Digestive and Liver Disease*, v. 38, n. 2, p. 261-265, 2006. doi: 10.1016/S1590-8658(07)60006-1.

CUETO-VIGIL, M.C.; ACUNÃ-MONSALVE, Y.; VALENZUELA-RIAÑO, J. Evaluación in vitro del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas del suero costeño. *Actualidades Biológicas.*, v.32, p.129-138, 2010.

CUNHA, A.L.F. *Potencial probiótico in vitro de Lactobacillus spp. isolados de queijo Minas artesanal da Serra do Salitre – MG*. 2018. 48f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte

DA COSTA, M; BALTHAZAR, C. F.; MOREIRA, R. Leite fermentado: Potencial alimento funcional. *Revista Enciclopédia Biosfera*. v. 9, n. Out. 2014, p. 1387–1408, 2013.

DALLE, L.; DO NASCIMENTO, L. B.; VIEGER, R. Amicacina: Níveis Séricos e Eficácia Terapêutica. *Salão de Iniciação Científica (04.: 1992: Porto Alegre, RS). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS/PROPESQ, 1992., 1992.*

DAMIN, M. R., MINOWA, E., ALCÂNTARA, M. R., & OLIVEIRA, M. N. (2008). Effect of cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented milk prepared with yogurt and probiotic bacteria. *Journal of Texture Studies*, v. 39, n.1, 40–55. doi:10.1111/j.1745-4603.2007.00129.x

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *Journal of Dairy Science*. v.81, p.2804-2816, 1998. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75839-4

DEL FIO, F. S.; DE MATTOS FILHO, T. R.; GROppo, F. C. Resistência bacteriana. *Revista Brasileira de Medicina* (Rio de Janeiro) 1140, 2000

DELCOUR, J.; FERAIN, T.; DEGHORAIN, M. *et al.* The biosynthesis and functionality of the cellwall of lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*, v. 76, n. 1-4, p. 159-184, 1999.

DENIPOTE, F.G.; TRINDADE, E.B.S.M.; BURINI, R.C. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. *Arquivos de Gastroenterologia*, São Paulo, v.47, n.1, p.93-98, 2010. doi: 10.1590/S0004-28032010000100016

DONKOR, O.N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, v.16, p.1181-1189, 2006. doi: 10.1016/j.idairyj.2005.10.008

DORES, M.T. *Queijos artesanais da Canastra maturado a temperatura ambiente e sob refrigeração*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Viçosa, MG: UFV, 2007. 106p.

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, p.26-34, 2012. doi: 10.21206/rbas.v2i2.163

DUALDO, L. C. S.; CASAROTTI, S. N.; PAULA, A. T.; MELO, R. T.; ROSSI, D. A. Avaliação da pós-acidificação e viabilidade de bactérias lácticas utilizando o método convencional e o sistema CompactDry® tc durante estocagem refrigerada de iogurtes. *Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes*, v. 65, n. 374, p. 33-40, 2010.

EMATER. Queijo Minas Artesanal: tradição e qualidade que revelam Minas. *Revista da EMATER – MG*, v. 22, n. 80, p. 8-9, Agosto de 2004

EMATER. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. Mais um município aguarda o registro de indicação geográfica e procedência na região produtora do queijo minas artesanal da canastra, 2016. Disponível em: <<http://www.emater.mg.gov.br>>. Acesso em: 13 jan. 2022

EMATER. Governador assina decreto que regulamenta produção e comercialização de queijos artesanais. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais, 2020a. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/portal.do/sitenoticias/governador-assina-decreto-que-regulamenta-producao-e-comercializacao-dequeijos-artesanais/?flagweb=novosite_pagina_interna&id=25119>. Acesso em: 09 dez. 2021

EMATER. Serras da Ibitipoca é identificada como a 8ª região produtora de queijo Minas artesanal. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais, 2020b. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/portal.do/sitenoticias/serras-da-ibitipoca-e-identificada-como-a-8-regiao-produtora-de-queijo-minasartesanal/?flagweb=novosite_pagina_interna&id=25333>. Acesso em: 09 dez. 2021

FALAGAS ME, BETSI GI, TOKAS T, ATHANASIOU S. Probiotics for prevention of recurrent urinary tract infections in women: a review of the evidence from microbiological and clinical studies. *Drugs*. 2006; v. 66:1253---61. doi: 10.2165/00003495-200666090-00007.

FAO/WHO 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report (Documento Internet) http://who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.Pdf. Acesso em 03 de dez. de 2021.

FARIA, C. P.; BENEDET, H. D.; LE GUERROUE JL. Parametros de produção de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, n.3, 2006. doi: 10.1590/S0100-204X2006000300019.

FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Research in Microbial Sciences*. v. 8, p 44 - 61, 2007.

FORSYTHE, S.J. 2002. Microbiologia da Segurança Alimentar. A Flora Microbiana dos Alimentos: Alimentos fermentados. Artmed Editora. 132-147.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. Cheese: An overview. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M *et al* (Ed.) Cheese: chemistry, physics, and microbiology. 3 ed. London: *Elsevier Academic Press*, 2004. v.1, Cap. 1, p. 1–18.

FREIRE, T.T., SILVA, A.L.T., FERREIRA, B.K.O., SANTOS T.M., Bactérias ácido lácticas, suas características e importância: revisão. *Research, Society and Development*. V. 10, n. 11. doi: 10.33448/rsd-v10i11.19964

FRANKLIN, T. J. AND SNOW, G. A. (2005). *Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Action*. Springer. New York, USA.

FURTADO, D. N., TODOROV, S. D., LANDGRAF, M., DESTRO, M. T., & FRANCO, B. D. G. M. (2014). Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DF04Mi isolated from goat milk: characterization of the bacteriocin. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 45, n.4, 1541–1550. doi:10.1590/s1517-83822014000400052

FUSCO, V., QUERO, G. M., CHO, G.-S., KABISCH, J., MESKE, D., NEVE, H., et al. (2015). The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*. v.155, n.6. doi: 10.3389/fmicb.2015.00155

GALLINA, D. A.; ALVESA, A. T. S. A.; TRENTOA, F, K. H. S.; CARUSIA, J. Caracterização de Leites Fermentados Com e Sem Adição de Probióticos e Prebióticos e Avaliação da Viabilidade de Bactérias Lácticas e Probióticas Durante a Vida-de-Prateleira. *UNOPAR Científica. Ciências biológicas e da saúde*. v. 13, n. 4, p. 239-44, 2011.

GDP – Global Dairy Platform. Annual Review 2016. Rosemont, IL, (2017). Disponível em: <<https://www.globaldairyplatform.com/wp-content/uploads/2018/04/2016-annual-review-final.pdf>>. Acesso em: 24 nov. 2021.

GOHIL K *et al*. Probiotics in the prophylaxis of COVID-19 : something is better than nothing. *3 Bioth* (2021)11:1. doi: 10.1007/s13205-020-02554-1.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J.F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, v.191, p.259-270, 2000. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00431-2

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. doi: 10.26461/12.02.

GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. Guia de antimicrobianos em veterinária. Artmed, Porto Alegre. 268 p, 2010.

GUEDES NETO, L.G.; SOUZA, M.R.; NUNES, A.C. *et al*. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, n. 2, p. 245-250, 2005. doi: 10.1590/S0102-09352005000800017.

HAGHSHENAS, B., ABDULLAH, N., NAMI, Y., RADIAH, D., ROSLI, R., KHOSROUSHAHI, A.Y. Different effects of two newly-isolated probiotic

Lactobacillus plantarum 15HN and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 44Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines. *Anaerobe*, v. 30, p. 51-59, 2014.

HARAGUCHI, Y., GOTO, M., KUDA, T., FUKUNAGA, M., SHIKANO, A., TAKAHASHI, H., & KIMURA, B. 2019. Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* Tennozu-SU2 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BF1 on *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* during and post fermentation of soymilk. *LWT – Food Science and Technology*, 102, 379–384. doi:10.1016/j.lwt.2018.12.042

HESSISSEN, Nada. Prebióticos, Probióticos y Sistema inmune. 2016. 23 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidad Complutense, Madrid, 2016. Disponível em: <<http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/NADA%20HESSISSEN.pdf>> Acesso em: 08 de dez. 2021.

HOJSAK I, ABDOVIĆ S, SZAJEWSKA H, MILOSEVIĆ M, KRZNARIĆ Z, KOLACEK S. *Lactobacillus* G.G. in the prevention of nosocomial gastrointestinal and respiratory tract infections. *Pediatrics*. 2010;125:e1171---7. doi: 10.1542/peds.2009-2568.

HUGHES, D. B.; HOOVER, D. G. Viability and enzymatic activity of bifidobacteria in milk. *Journal of Dairy Science*, v. 78, n. 2, p. 268–276, 1995. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(95)76634-6.

IBGE. Brasília, DF, 2019. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 24 nov. 2021.

IDF. INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Yogurt: Enumeration of characteristic microorganisms colony count technique at 37°. *Bulletin of the International Dairy Federation.*, n.117B, p.1 - 4, 1997.

IPHAN. O Modo Artesanal de Fazer Queijo de Minas. 2008. Disponível em: <http://portal.iphan.gov.br/uploads/publicacao/Dossie_Queijo_de_Minas_web.pdf>. Acesso em: 30 de nov. de 2021.

JACOBSEN, C. N., ROSENFELDT NIELSEN, V., HAYFORD, A.E., MOLLER, P.L., MICHAELSEN, K.F., PAERREGAARD, A., SANDSTROM, B., TVEDE, M., JAKOBSEN, M. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. v. 65, n. 11, p. 4949 - 4956,1999. doi: 10.1128/AEM.65.11.4949-4956.1999.

JAY, J. M. Modern Food Microbiology. 7. ed. New York: Springer, p. 39-790. 2005.

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 subsp. *suionicum* as *Leuconostoc suionicum* sp. *nov.* based on complete genome sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary*, v. 67, n. 7, p. 2225-2230, 2017. doi: 10.1099/ijsem.0.001930.

KIMOTO, H., NOMURA, M., KOBAYASHI, M., OKAMOTO, T., & OHMOMO, S. (2004). Identification and Probiotic Characteristics of *Lactococcus* Strains from Plant Materials. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, v. 38, n. 2, 111–117. doi:10.6090/jarq.38.111

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, p. 29-37, 2014. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.019

LEBEER, S., VANDERLEYDEN, J.; de KEERSMAECKER, S.C.J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology*. n.72, v.4, p728-764, 2008. doi: 10.1128/MMBR.00017-08.

LEITE, K.F., Elaboração de leite fermentado a partir dos probióticos *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus thermophilus* adicionado mel de *Apis mellifera*. In: Encontro Internacional de Ciências Agrárias e Tecnológicas, 1º, 2016, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas – Unesp dracena, 2016. p. 431-439.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004. doi: 10.1016/j.tifs.2003.09.004.

LIANG, XI; ZHANG, Z.; ZHOU, X.; LU, Y.; LI, R.; YU, Z.; TONG, L.; GONG, P.; YI, H.; LIU, T. Probiotics improved hyperlipidemia in mice induced by a high cholesterol diet via downregulating FXR. *Food & Function journal.*, [S.L.], p. 1-10, 2020. Royal Society of Chemistry (RSC). doi: 10.1039/d0fo02255a.

LIAO, H., *et al.* Aumento da atividade antifúngica da produção de lactoferrina bovinaprobótico *Lactobacillus casei* no modelo murino de candidíase vulvovaginal. *BMC Microbiology*, v. 19, n. 1, <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1370-x>, 2019.

LIASI S.A., AZMI T.I., HASSAN M.D., SHUHAIMI M., ROSFARIZAN M., ARIFF A.B. 2009. Antimicrobial activity and antibiotic sensitivity of three isolates of lactic acid bacteria from fermented fish product, Budu. *Malaysian Journal of Microbiology*, 5: 33–37. doi: 10.21161/mjm.15008.

LIMA, C., LIMA, L., CERQUEIRA, M., FERREIRA, E., & ROSA, C. 2009. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*. 1, 266-272. doi: 10.1590/S0102-09352009000100037.

LIMA, T. C. C. *Benefícios dos probióticos para a saúde humana*. 2017. 40 f. TCC (Graduação) - Curso de Nutrição, Centro Universitário Ibmr – Laureate International Universities, Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <https://www.ibmr.br/files/tcc/beneficios-dos-probioticos-para-a-saude-humana-tais-cristina-cunha-de-lima.pdf>. Acesso em: 09 dez. 2021.

LIU Y., GAYLE A. A., WILDER-SMITH A., ROCKLOV J. 2020. The reproductive number of COVID-19 is higher compared to SARS coronavirus. *Journal of Travel Medicine*. 27:1–4. doi: 10.1093/jtm/taaa021.

LOPES, W. M. C.; NASCIMENTO, J. E. A; NASCIMENTO, D. D.; SILVA, M. H. G. G.; SILVA, V. A. T. Associação de glutamina e probióticos no trofismo mucoso do cólon na peritonite experimental. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões.*, v. 34, n. 1, 2007. doi: 10.1590/S0100-69912007000100011.

LUIZ, L.; CASTRO, R.; SANDES, S. H. C.; SILVA, G. J.; OLIVEIRA, L. G.; SALES, G. A.; SOUZA, M. R. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Brazilian Minas artisanal cheese. *CyTA - Journal of Food*, v. 15, n. 1, p. 125128, 2017. doi: 10.1080/19476337.2016.1219392.

LUQUET, F.M. ET CORRIEU, G. (2005). Bactéries lactiques et probiotiques. Edition Lavoisier, Paris. 307 pag.

MACHADO, S. I. G.: *Estudo de atividades antimicrobianas em bactérias do género Bacillus isoladas nos Açores: otimização das condições de produção, identificação e caracterização de bacteriocinas*. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências Biomédicas da Universidade de Açores. Departamento de Biologia, Ponta Delgada, 2015.

MAHMOUDI M, KHOMEIRI M, SAEIDI M, DAVOODI H. *Lactobacillus* Species from Iranian Jug Cheese: Identification and Selection of Probiotic Based on Safety and Functional Properties. *Applied Food Biotechnology*. 2021; v. 8, n. 1 p. 47-56. doi: 10.22037/afb.v8i1.29253

MANI-LÓPEZ, E., PALOU, E., & LÓPEZ-MALO, A. (2014). Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, v. 97, n. 5, 2578–2590. doi:10.3168/jds.2013-7551

MARGARIDO, R. S.; ALMEIDA, F.; SOUZA, A. O.; *et al.* Associação de antibióticos nos animais domésticos. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, Ano VII, n.12, janeiro, 2009.

MARKOWIAK, P.; SLIZEWSKA, K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health (2017). *Nutrients*. doi: 10.3390/nu9091021.

MARTINS, J.M. *Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da Região do Serro*. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Viçosa, MG: UFV, 2006. 158p.

MASUKAWA, *et al.* Plano de contenção de disseminação de bactérias multirresistentes e unidade de isolamento. *Serviço público federal: Universidade Federal de Santa Catarina*, 2018.

MATHUR, S., SINGH, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 105, n. 3, p. 281–295. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.

MAY-TORRUCO, A. L., CORONA-CRUZ, A. I., JIMÉNEZ, A. L. L., CORTÉS, N. G., & VERA, R. J. (2020). Sensibilidad y Resistencia a Antibióticos de Cepas

Probióticas Empleadas en Productos Comerciales. *European Scientific Journal*, ESJ, v. 16, n. 18, p. 43. doi: 10.19044/esj.2020.v16n18p43

MELO, V. V.; DUARTE, I. P.; SOARES, A. Q. Guia Antimicrobianos. Guia (Coordenação de Farmácia) – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC-UFG) 1.ed. - Goiânia, 2012.

MENESES, J. N. C. Queijo artesanal de Minas: Patrimônio cultural do Brasil. Dossiê interpretativo, v.1 Belo Horizonte, 2006.

MERGAREJO NETTO, M. A geografia do queijo minas artesanal. 2011. 420 f. Tese (Doutorado em Geografia) – Universidade Estadual Paulista - Instituto de Geociências e Ciências Exatas, Rio Claro – São Paulo, 2011

MINAS GERAIS – IMA – Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria nº 1022, de 03 de novembro de 2009. Identifica a Microrregião do Campo das Vertentes. Belo Horizonte, 03 de novembro de 2009. Disponível em: <<http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/legis/legislacao.htm>>. Acesso em 30 de nov. de 2021.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Lei 20.549 de 18 dez. 2012. Disponível em: <http://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=14185&comp=&ano=2002&aba=js_textoAtualizado#texto>. Acesso em: 30 de nov. de 2021.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria 2051 de 07 abr. 2021. Disponível em: <http://ima.mg.gov.br/index.php?preview=1&option=com_dropfiles&format=&task=frontfile.download&catid=1739&id=18551&Itemid=1000000000000#:~:t>. Acesso em: 14 de jan. de 2022.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do 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: Instituto Mineiro de Agropecuária, 2018

MIRLOHI, M., SOLEYMANIANZAD, S., DOKHANI, S.H., SHEYKH ZEYN ALDIN, M., ABGHARI, A. Investigation of acid and bile tolerance of native lactobacilli isolated from fecal samples and commercial probiotics by growth and survival studies. *Iranian Journal of Biotechnology*. v. 7, n. 4, p. 233 - 240, 2009

MOFREDJ, A., BAHLOUL, H., & CHANUT, C. (2007). *Lactococcus lactis*: un pathogène opportuniste? *Médecine et Maladies Infectieuses*, 37(4), 200–207. doi:10.1016/j.medmal.2007.01.005

MOLIN, G. Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.73, p. 380-385, 2001. doi: 10.1093/ajcn/73.2.380s.

MONTEIRO, C., DO CARMO, M., MELO, B., ALVES, M., DOS SANTOS, C., MONTEIRO, S., MONTEIRO-NETO, V. (2019). In Vitro Antimicrobial Activity and Probiotic Potential of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* against Species of *Clostridium*. *Nutrients*, v.11, n. 2, p.448. doi:10.3390/nu11020448

MUHAMMAD I, AHMAD AA, SHAH T (2018) Health Promoting and Disease Preventing Properties of Probiotics with Special Reference to *Lactobacillus*: A Review. *Journal of Probiotics & Health*. v. 6, p. 202-210. doi:10.4172/2329-8901.1000202

NAGPAL, R.; KUMAR, A.; KUMAR, M. *et al.* Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiology Letters*, v.334, p.1-15, 2012. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02593.x.

NAWAZ, M.; WANG, J.; ZHOU, A. *et al.* Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. *Current Microbiology*., v. 62, n. 3, p. 1081-1089, 2011. doi: 10.1007/s00284-010-9856-2.

NEUMANN, E. *Comportamento "in vitro" de estirpes de Lactobacillus acidophilus sensível e resistente à bacteriocina sob condições do trato digestivo*. 1991. 86f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG

NEVES, L.F. *Propriedades Probióticas in vitro de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos artesanais do norte de Minas Gerais e qualidade físico-química dos queijos*. 2017. 63f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte

NÓBREGA, J.E. *Caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra no município de Medeiros, Minas Gerais, com ênfase em leveduras*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Viçosa, MG: UFV, 2007. 82p

NOGUEIRA, J.C.R.; GONÇALVES, M.C.R. Probióticos – Revisão da Literatura. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v. 15, n. 4, p. 487-492. 2011.

OBERMANN, H.; LIBUDZISZ, Z. Fermented milks. In: WOOD, B.J.B. (ED.) *Microbiology of Fermented Foods*, p. 308-350, Blackie Academic & Professional, London, 1988.

OELSCHLAEGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions – A review. *International Journal of Medical Microbiology*., v.300, p.57–62, 2010. doi: 10.1016/j.ijmm.2009.08.005.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. (2019a). INTERNATIONAL 21th Ed., Gaithersburg, MD, USA, Official Method 905.02-1973.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. (2019b). INTERNATIONAL 21th Ed., Gaithersburg, MD, USA, Official Method 945.46-1945.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. (2019c). INTERNATIONAL 21th Ed., Gaithersburg, MD, USA, Official Method 947.05-1947.

OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS. (2019d). INTERNATIONAL 21th Ed., Gaithersburg, MD, USA, Official Method 960.52-1961.

OGAKI, M. B; FURLANETO, M. C.; MAIA, L. F.: Review: General aspects of bacteriocins. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 18, n. 4, p. 267-276, 2015. doi: 10.1590/1981-6723.2215.

OGIER, J. C.; CASALTA, E.; FARROKH, C.; SAÏHI, A. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *International Journal of Food Microbiology*, v.126, p. 286–290, 2008.

OGIER, J. C.; CASALTA, E.; FARROKH, C.; SAÏHI, A. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *International Journal of Food Microbiology*, v.126, p. 286–290, 2008. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.012.

OLIVEIRA, C. P.; SILVA, J.A. Leite fermentado probiótico e suas implicações na saúde, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v.6, n.3, p. 25-31, julho/setembro de 2011.

OLIVEIRA, E. A. M *et al.* Contagem de bactérias lácticas viáveis em leites fermentados. *Revista Univasp*. v. 24, n. 46, p. 94-104, 2018. doi: 10.18066/revistaunivap.v24i46.1943

PAES, A.C *et al.* Perfil de sensibilidade de bactérias isoladas de animais domésticos na região de Botucatu frente ao cloranfenicol e florfenicol. *Vet. E Zootec.*, p.161-172, v.16, n.1, mar., 2009. doi: 10.35172/rvz.2009.v16.388.

PATEL, S., SHUKLA, R., & GOYAL, A. 2015. Probiotics in valorization of innate immunity across various animal models. *Journal of Functional Foods* 14, 549–561. doi: 10.1016/j.jff.2015.02.022.

PAULA, A. T.; JERÔNIMO-CENEVIVA, A. B.; SILVA, L. F.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G.; PENNA, A. L. B. *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: A potential probiotic strain isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. *Annals of Microbiology*, v. 65, n. 2, p. 899-910, 2015. doi: 10.1007/s13213-014-0933-9.

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, p. 1-13, 2014. doi: 10.1007/s12602-014-9163-5.

PEHRSON, M.E.S.F. Avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias sintetizadas por cepas de *Lactobacillus* sp. que apresentam propriedades probióticas. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia industrial da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena – SP, 2013.

PEREIRA JUNIOR, E. R.; REIS, R. S. A universidade vai ao campo: relato da construção participativa de um espaço de memória do queijo tipo minas artesanal do Campo das Vertentes, estado de Minas Gerais, Brasil. *Research, Society and Development*, São João del Rei, v. 9, n. 10, p.1-22, 8 out. 2020. doi: 10.33448/rsd-v9i10.8967.

PERIN, L. M., MIRANDA, R. O., TODOROV, S. D., FRANCO, B. D. G. DE M., & NERO, L. A. (2014). Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk. *International Journal of Food Microbiology*, 185, 121–126. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.

PERIN, L. M.; SARDARO, M. L. S.; NERO, L. A.; NEVIANI, E.; GATTI, M. Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture dependent and independent methods. *Food Microbiology*, v. 65, p. 160-169, 2017. doi: 10.1016/j.fm.2017.02.005.

PITHVA, Sheetal *et al.* Potential of probiotic *Lactobacillus* strains as food additives. *INTECH Open Access Publisher*, 2012.

PLAZA-DIAZ, J., RUIZ-OJEDA, F. J., GIL-CAMPOS, M., *et al.* 2019. Mechanisms of Action of Probiotics, *Advances in Nutrition*. 10, pp.S49-S66. doi: 10.1093/advances/nmy063.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A.M.; REIS FILHO, A.D. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. *Revista Ciência & Saúde*, v. 4, n. 2, p. 66-74, jul./dez. 2011. doi: 10.15448/1983-652X.2011.2.8352.

RESENDE, M.F.S.; COSTA, H.H.S.; ANDRADE, E.H.P. *et al.* Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidolácticas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.63, p.1563-1573, 2011. doi: 10.1590/S0102-09352011000600039.

RÍOS-COVIÁN, D., RUAS-MADIEDO, P., MARGOLLES, A., *et al.* 2016. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health, *Frontiers in Microbiology*, 7, pp.185. doi: 10.3389/fmicb.2016.00185.

RINGØ, E., HOSEINIFAR, S. H., GHOSH, K., DOAN, H. V., BECK, B. R., & SONG, S. K. (2018). Lactic Acid Bacteria in Finfish—An Update. *Frontiers in Microbiology*, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01818

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. Tese. (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2021. 149 p.

ROŁKAR, Irena; I-VIGELJ, Karmen; I-TEMPELJ, Mateja; VOLFAND, Jasna; I-TABUC, Borut; MALOVRH, Špela; ROGELJ, Irena. Effects of a probiotic product containing *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* IM386 and *Lactobacillus plantarum* MP2026 in lactose intolerant individuals: randomized, placebo-controlled clinical trial. *Journal of Functional Foods*, [S.L.], v. 35, p. 1-8, ago. 2017. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.jff.2017.05.020.

ROMÃO, F. C. *As bactérias e seus produtos como agentes terapêuticos*. 2019. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Instituto Universitário Ega Moniz, Caparica, 2019.

ROTTA, I.S *et al.* Bactérias do ácido láctico potencialmente probióticas isoladas de leite não pasteurizado. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*. v.75, n.3, p.178-189, 2020. doi: 10.14295/2238-6416.v75i3.820.

RUIZ, L.; MARGOLLES, A.; SÁNCHEZ, B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Frontiers in Microbiology*, v. 4, p. 396, 2013. doi: 10.3389/fmicb.2013.00396.

RUIZ-MOYANO, S., MARTÍN, A., BENITO, M.J., NEVADO, F.P., DE GUÍA CÓRDOBA, M. Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science.*, v. 80, p. 715 - 721, 2008. doi: 10.1016/j.meatsci.2008.03.011.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. São Paulo, v. 42, n. 1, p. 1-16, Mar. 2006. doi: 10.1590/S1516-93322006000100002.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDE, R. *et al.* Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology.*, v.84, p.197–215, 2000. doi: 10.1016/s0168-1656(00)00375-8.

SABO, S.; VITOLLO, M.; GONZÁLEZ, J. M. D.; DE SOUZA OLIVEIRA, R. P.: Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, v. 64, p. 527-536, 2014. doi: 10.1016/j.foodres.2014.07.041.

SACCARO, D. M. *Efeito da associação de culturas iniciadoras e probióticas na acidificação textura e viabilidade em leite fermentado*. São Paulo, 2008. 119f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9133/tde-01102008161512/publico/Daniela.pdf>> Acesso em: 03 de dez. de 2021.

SALES, G. A. *Caracterização Microbiológica e Físico-Química de Queijo Minas Artesanal da Microrregião de Araxá-MG Durante a Maturação em Diferentes Épocas do Ano*. Dissertação 2. Caracterização e qualidade do queijo minas artesanal (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2015. 107 p.

SALGADO, J. M. O uso dos probióticos nas desordens intestinais na infância. *Pediatria Moderna*, v. 48, n. 9, p. 350-354, 2012.

SALMINEN, S., WRIGHT, V. A. (1993). *Lactic Acid Bacteria*, Marcel Dekker.

SANDERS, M. E., MERENSTEIN, D. J., REID, G., *et al.* 2019. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 16, pp.605-616. doi: 10.1038/s41575-019-0173-3.

SANDERS, M. E., MERENSTEIN, D., MERRIFIELD, C. A., *et al.* 2018. Probiotics for human use, *Nutrition Bulletin*, 43, pp.212-225. doi: 10.1111/nbu.12334.

SANTACROCE, L., INCHINGOLO, F., TOPI, S., DEL PRETE, R., DI COSOLA, M., CHARITOS, I. A., & MONTAGNANI, M. (2021). Potential beneficial role of probiotics on the outcome of COVID-19 patients: An evolving perspective. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, v. 15, n. 1, p. 295–301. doi:10.1016/j.dsx.2020.12.040

SANT'ANNA, F. M., ACURCIO, L.B., ALVIM, L.B., CASTRO, R.D., OLIVEIRA, L.G. 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, p. 592-601, 2017. doi: 10.1111/1471-0307.12422.

SAVINO, F.; CORDISCO, L.; TARASCO, V. *et al.* Antagonistic effect of *Lactobacillus* strains against gas-producing coliforms isolated from colicky infants. *BMC Microbiol.*, v. 11, n. 1, p. 157, 2011

SEBRAE- Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Queijos Nacionais: estudos de mercado. SEBRAE/ESPM. SEBRAE, 2008. 34p

SILVA, B. C.; JUNG, L. C. R.; SANDES, S. H. C. *et al.* 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, p. 267-275, 2013. doi: 10.3920/BM2012.0048.

SILVA, D. R.; SARDI, J. C. O.; PITANGUI, N. S.; ROQUE, S. M.; SILVA, A. C. B.; ROSALEN, P. L.. Probiotics as an alternative antimicrobial therapy: current reality and future directions. *Journal Of Functional Foods*, [S.L.], v. 73, p. 4-12, out. 2020. Elsevier BV. doi: 10.1016/j.jff.2020.104080.

SILVA, J. G., CASTRO, R. D., SANT'ANNA, F. M., BARQUETE, R. M., OLIVEIRA, L. G., ACURCIO, L. B., ... SOUZA, M. R. (2019). 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, p. 647–657. doi:10.1590/1678-4162-10188.

SILVA, J.G. *et al.* Características físico-químicas do queijo Minas artesanal da Canastra. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, v.66, n.380, p.16-22, 2011.

SILVA, L. F. *Identificação e caracterização da microbiota láctica isolada de queijo mussarela de búfala*. 2010. 153 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

SINGHAL, N.; KUMAR, M.; KANAUIA, P. K. *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology.*, v. 6 p. 791, 2015. doi: 10.3389/fmicb.2015.00791.

SIQUEIRA, K. B . O mercado consumidor de leite e derivados. Circular técnico, Juiz de Fora, 2019.

SIQUEIRA, K. B.; DE FIGUEIREDO, M. N.. A popularização dos leites fermentados no Brasil. *Embrapa Gado de Leite-Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E)*, 2021.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*. v. 40, n. 3, p. 722-756, 1976. doi:10.1128/br.40.3.722-756.1976

TEMMERMAN, R., POT, B., HUYS, G. AND SWINGS, J. (2003). Identification and Antibiotic Susceptibility Of Bacterial Isolates From Probiotic Products. *International Journal of Food Microbiology* 81, 1-10. doi: 10.1016/s0168-1605(02)00162-9.

TEUBER M., MEILE L. & SCHWARZ F. (1999). Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 115-137. doi: 10.1023/A:1002035622988.

TEUBER, M. GEIS, A., NEVE, H. (1992). The genus *Lactococcus*. In *The Prokaryotes*, vol. II, 2nd ed., eds. Balows, A. *et al.*, Springer Verlag. New York, 1482-1501.

TOOMEY, N.; MONAGHAN, Á.; FANNING, S.; BOLTON, D. Transfer of antibiotic resistance marker genes between lactic acid bacteria in model rumen and plant environments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 10, p. 3146-3152, 2009. doi: 10.1128/AEM.02471-08.

TSAI, Y. L., LIN, T. L., CHANG, C. J., *et al.* 2019. Probiotics, prebiotics and amelioration of diseases, *Journal of Biomedical Science*, 26, pp.3. doi: 10.1186/s12929-018-0493-6.

TUOMOLA, E.; CRITTENDEN, R.; PLAYNE, M. *et al.* Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition.*, v.73, n. 2, 393-398, 2001. doi: 10.1093/ajcn/73.2.393s.

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. (2019). 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*. doi:10.3168/jds.2018-15938

VALENTE, G.L.C.; ACURCIO, L.B.; FIGUEIREDO, R.C.; SANT'ANNA, F.M.; BRITO, R.F; FREITAS, L.P.V; SILVA, A.M; SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M. Effect of Storage on Physico-Chemical, Microbiological and Sensory Characteristics of Goat Milk Fermented by *Lactobacillus* Strains Isolated from Minas Artisanal Cheeses. *International Journal of Food Studies*, v. 10, p. 398-410. 2021. doi: 10.7455/ijfs/10.2.2021.a10.

VANKERCKHOVEN V, AUTGAERDEN T, VAN VAEL C, LAMMENS C, CHAPELLE S, ROSSI R, GOOSSENS H (2004). Development of a multiplex PCR for the Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* Genes in Enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 42, 4473-4479. doi: 10.1128/JCM.42.10.4473-4479.2004.

VIEGAS, R.P. *Leites fermentados probióticos produzidos a partir de bactérias ácido-lácticas e adicionados de concentrado protéico de soro lácteo: características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais*. 2008. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte

VIEIRA, L. Q.; PENNA, F. J.; PÉRET FILHO, L. A.; NICOLI, J. R. Uso de probióticos na prevenção e tratamento de infecções e inflamações gastrintestinais. *Revista Médica de Minas Gerais*, Belo Horizonte, v. 17, n. 1/2, p. 45–53, 2007

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International.*, v.36, p.895– 904, 2003. doi: 10.1016/S0963-9969(03)00098

WENDLING, L.K; WESCHENFELDER, S. probióticos e alimentos lácteos fermentados – uma revisão. *Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes*, 68, 395, p. 49-57, 2013.

WU Y., GUO C., TANG L. *et al* (2020) Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*. v. 5, p.434–435. doi: 10.1016/S2468-1253(20)30083-2.

XIAO F., TANG M., ZHENG X. *et al* (2020) Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology* v. 158, p. 1831-1833.e3. doi: 10.1053/j.gastro.2020.02.055

XU Z., SHI L., WANG Y. *et al* (2020). Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *The Lancet Respiratory Medicine*. v. 8, p. 420–422. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30076-X

YAO, M., XIE, J., DU, H., MCCLEMENTS, D. J., XIAO, H., & LI, L. (2020). Progress in microencapsulation of probiotics: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. doi:10.1111/1541-4337.12532

YUNES, R. A., POLUEKTOVA, E. U., VASILEVA, E. V., ODORSKAYA, M. V., MARSOVA, M. V., KOVALEV, G. I., & DANILENKO, V. N. (2019). A Multi-strain Potential Probiotic Formulation of GABA-Producing *Lactobacillus plantarum* 90sk and *Bifidobacterium adolescentis* 150 with Antidepressant Effects. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. doi:10.1007/s12602-019-09601-1

WANG, K., ZHANG, H., FENG, J., MA, L., FUENTE-NÚÑEZ, C. DE LA, WANG, S., & LU, X. (2019). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Tianjin, China. *Journal of Agriculture and Food Research*, v.1. doi:10.1016/j.jafr.2019.100006

ZHANG, H., & CAI, Y. (2014). Lactic Acid Bacteria. In: Zhang H., Cai Y. (eds) *Lactic Acid Bacteria*. Springer, Dordrecht. doi:10.1007/978-94-017-8841-0

ZHENG J, WITTOUCK S, SALVETTI E, FRANZ CMAP, HARRIS HMB, MATTARELLI P, *et al*. 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*. 2020; v. 70, n. 4, 2782–858. doi: 10.1099/ijsem.0.004107.

ZHOU, J. S., PILLIDGE, C. J., GOPAL, P. K. AND GILL, H. S. (2005). Antibiotic Susceptibility Profiles of New Probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology* 98, 211217. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.05.011.