

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de farmácia
Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos

Kellen Pereira Bragança

**EFEITO DA LIOFILIZAÇÃO SOBRE PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE
BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS ISOLADAS DO KEFIR E DO POLVILHO AZEDO**

Belo Horizonte

2020

Kellen Pereira Bragança

**EFEITO DA LIOFILIZAÇÃO SOBRE PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE
BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS ISOLADAS DO KEFIR E DO POLVILHO AZEDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção de título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda

Coorientadora: Profa. Dra. Roseane Batitucci Passos de Oliveira

Belo Horizonte

2020

Bragança, Kellen Pereira.

B813e Efeito da liofilização sobre propriedades probióticas de bactérias ácido-lácticas isoladas do kefir e do polvilho azedo [recurso eletrônico] / Kellen Pereira Bragança. – 2020.
1 recurso eletrônico (89 f. : il.) : pdf.

Orientadora: Inayara Cristina Alves Lacerda.

Coorientadora: Roseane Batitucci Passos de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Probióticos – Teses. 2. Bactérias lácticas – Teses. 3. Kefir – Teses. 4. Polvilho azedo – Teses. I. Lacerda, Inayara Cristina Alves. II. Oliveira, Roseane Batitucci Passos de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 637.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PPCCA

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA KELLEN PEREIRA BRAGANÇA

Realizou-se, no dia 19 de fevereiro de 2020, às 13:30 horas, Sala 3060 - Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *EFEITO DA LIOFILIZAÇÃO SOBRE CACACTERÍSTICAS PROBIÓTICAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS ISOLADAS DE KEFIR E POLVILHO AZEDO*, apresentada por KELLEN PEREIRA BRAGANÇA, número de registro 2018650631, graduada no curso de NUTRIÇÃO, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, à seguinte Comissão Examinadora: Profa. Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda (Orientadora e Presidente da Comissão), Profa. Dra. Roseane Batitucci Passos de Oliveira (Coorientadora), Dra. Mariana Wanessa Santana de Souza, ambas da Faculdade de Farmácia – UFMG, Profa. Dra. Elisabeth Neumann, do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG.

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 19 de fevereiro de 2020.

Profa. Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda (Orientadora e Presidente da Comissão)

Profa. Dra. Roseane Batitucci Passos de Oliveira (Coorientadora)

Profa. Dra. Elisabeth Neumann

Dra. Mariana Wanessa Santana de Souza

Dedico este trabalho a Deus, meus pais,
minhas irmãs, meu esposo e a todos que
me ajudaram em oração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo. Sem Ele e sua infinita misericórdia não seria possível concluir essa etapa. Obrigada Senhor por todas as respostas de orações e por sempre me mostrar que está junto de mim.

Porque Dele, por Ele e para ele são todas as coisas.

Um versículo chave que norteou toda essa etapa:

“Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou teu Deus, eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a minha destra fiel.” Isaías 41:10.

Agradeço a minha mãe e meu pai, por todo apoio em oração, emocional, financeiro e motivacional. Obrigada!

Agradeço a minhas irmãs, pela ajuda em oração, apoio emocional e ajuda neste trabalho. Obrigada!

Agradeço a meu esposo, que esteve comigo desde o início, apoiando em oração, com todo apoio emocional, financeiro e todo carinho. Obrigada!

Agradeço as irmãs de oração da igreja.

Agradeço a professora Inayara Lacerda por toda orientação, cuidado, atenção e ter sido acolhedora e sempre acessível quando precisei.

Agradeço a professora Roseane Batitucci que por tantos anos que esteve junto comigo, sempre me incentivando, me dando desafios que foram pontos chaves para meu crescimento profissional, aconselhando, sendo atenciosa, e ajudando nas dúvidas. Obrigada professora por todo carinho e apoio.

RESUMO

Para serem considerados probióticos, os microrganismos devem apresentar diversas características, entre elas, resistirem à passagem pelo trato gastrointestinal simulado, ter efeito antagonista contra patógenos e estar viáveis e estáveis durante o armazenamento. A liofilização é considerada uma das técnicas mais utilizadas e eficientes na preservação de microrganismos, pois mantém alta viabilidade das células, possibilitando uma produção industrial em larga escala. É uma técnica de desidratação e ocorre em condições especiais de pressão e temperatura, possibilitando que a água congelada passe para o estado gasoso, estabilizando o produto. A liofilização pode danificar as células bacterianas, sendo importante avaliar a capacidade de resistência a esse processo de secagem. O objetivo do trabalho foi avaliar o processo de liofilização sobre propriedades probióticas de estirpes isoladas do kefir de leite e de água e do polvilho azedo. Foram avaliadas a atividade antagonista pelo método *spot-on-the-lawn* e teste de sensibilidade às condições do trato gastrointestinal simulado (pH 2,5 e bile 0,45 g/L) das estirpes *Leuconostoc mesenteroides* 9U2, *Lactococcus lactis* 3P, *Lactobacillus satsumensis* 23P3, *Lactobacillus perolens* 11P3, *Lactobacillus perolens* 17P2, *Lactobacillus brevis* A5SC3 e *Lactobacillus plantarum* A95SC2, para as células livres e liofilizadas. Além disso, avaliou-se a viabilidade das estirpes por 60 dias em temperatura ambiente liofilizadas. As estirpes avaliadas apresentaram ação antagônica frente aos patógenos testados na forma livre e liofilizada. A porcentagem de sobrevivência (em log) às condições gastrointestinais das células livres foi de 100% para os gêneros *Leuconostoc* e *Lactobacillus* e entre 95% a 97% para *Lactococcus* e *Lactobacillus* enquanto que para células liofilizadas dos gêneros *Leuconostoc* e *Lactobacillus* foram de 88 a 96%. Avaliando a viabilidade durante 60 dias em temperatura ambiente, as estirpes liofilizadas se mantiveram em concentrações finais de 9 a 10 log₁₀ UFC.mL⁻¹. Todas as estirpes apresentaram ação inibitória frente aos patógenos testados e viabilidade à passagem no trato gastrointestinal simulado antes e após o processo de liofilização. A liofilização não afetou as características probióticas testadas, demonstrando ser um processo de secagem seguro para obtenção de um produto liofilizado proveniente de bactérias ácido-láticas isoladas de kefir e polvilho azedo. O armazenamento não afetou de forma significativa a concentração final das estirpes testadas. As estirpes *Leuconostoc mesenteroides* 9U2, *Lactobacillus perolens* 11P3 e *Lactobacillus brevis* A5SC3, isoladas do kefir de leite, água e polvilho azedo, respectivamente, são potencialmente probióticas, desde que estudos complementares sejam realizados para abarcar todos os critérios.

Palavras-chave: probióticos; bactérias ácido-láticas; kefir; polvilho azedo.

ABSTRACT

To be considered probiotics, microorganisms must have several characteristics, among them, they resist the passage through the simulated gastrointestinal tract, have an antagonistic effect against pathogens and be viable and stable during storage. Lyophilization is considered one of the most used and efficient techniques in the preservation of microorganisms, as it maintains high viability of the cells, enabling large-scale industrial production. It is a dehydration technique and occurs under special conditions of pressure and temperature, allowing the previously frozen water to pass to the gaseous state, stabilizing the product. Lyophilization can damage bacterial cells, and it is important to assess the resistance to this drying process. The objective of this work was to evaluate the lyophilization process on probiotic properties of strains isolated from milk and water kefir and sour starch. Antagonistic activity was evaluated using the spot-on-the-lawn method and sensitivity test to conditions of the simulated gastrointestinal tract (pH 2.5 and 0.45 g / L bile) of *Leuconostoc mesenteroides* 9U2, *Lactococcus lactis* 3P, *Lactobacillus satsumensis* 23P3 strains, *Lactobacillus perolens* 11P3, *Lactobacillus perolens* 17P2, *Lactobacillus brevis* A5SC3 and *Lactobacillus plantarum* A95SC2, for free and lyophilized cells. In addition, the viability of the strains was evaluated for 60 days at lyophilized room temperature. The strains evaluated showed antagonistic action against the pathogens tested in free and lyophilized form. The percentage of survival (in log) to the gastrointestinal conditions of free cells was 100% for the genera *Leuconostoc* and *Lactobacillus* and between 95% to 97% for *Lactococcus* and *Lactobacillus* whereas for lyophilized cells of the genera *Leuconostoc* and *Lactobacillus* they were from 88 to 96 %. Evaluating the viability for 60 days at room temperature, the lyophilized strains were maintained in final concentrations of 9 to 10 \log_{10} UFC.mL⁻¹. All strains showed inhibitory action against the pathogens tested and viability to pass through the simulated gastrointestinal tract before and after the lyophilization process. Lyophilization did not affect the probiotic characteristics tested, demonstrating that it is a safe drying process to obtain a lyophilized product from lactic acid bacteria isolated from kefir and sour starch. Storage did not significantly affect the final concentration of the tested strains. Strains *Leuconostoc mesenteroides* 9U2, *Lactobacillus perolens* 11P3 and *Lactobacillus brevis* A5SC3, isolated from milk, water and sour starch kefir, respectively, are potentially probiotic, provided that complementary studies are carried out to cover all criteria.

Keywords: probiotics; lactic acid bacteria; kefir; sour powder.

LISTA TABELAS

Tabela 1 -	Estirpes de BAL	43
Tabela 2 -	Bactérias patogênicas indicadoras	43
Tabela 3 -	Médias dos halos de inibição (mm) do teste antagonista direto, de BAL, isoladas do kefir de leite, água e do polvilho azedo frente a bactérias patogênicas indicadoras	50
Tabela 4 -	Sobrevivência de BAL livre (Log_{10} UFC.mL ⁻¹) submetidas à solução simulada gástrica (SGS) e intestinal (SIS)	53
Tabela 5 -	Médias dos halos de inibição (mm) de bactérias patogênicas indicadoras, por BAL liofilizadas, isoladas do kefir de leite, água e do polvilho azedo	57
Tabela 6 -	Sobrevivência de BAL selecionadas (Log_{10} UFC.mL ⁻¹) liofilizadas submetidas à solução simulada gástrica (SGS) e intestinal (SIS)	60
Tabela 7 -	Viabilidade de BAL (Log_{10} UFC.mL ⁻¹) liofilizadas durante 60 dias de armazenamento à temperatura ambiente	63

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - (A) Grãos de kefir brasileiro visto a olho nu. (B, C D) – Superfície externa de grão de kefir brasileiro. Seta (1B) – bactérias curtas. Seta (1B) – bactérias longas. Seta (C) – Bactérias. Seta (D) – leveduras **29**
- Figura 2** - (A) grão de kefir de água brasileiro; (B) estrutura externa; (C) estrutura interna. Seta: leveduras **30**
- Figura 3** - Halo de inibição de BAL contra bactérias indicadoras patogênicas. (A) *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 frente a *S. aureus*; (B) *Lactobacillus plantarum* A95SC2 frente a *S. aureus*; (C) *Lactobacillus satsumensis* 23P3 frente *B. cereus*; (D) *Lactococcus lactis* 3P frente a *L. monocytogenes*; (E) *Lactobacillus perolens* 17P2 frente a *L. monocytogenes*; (F) *Lactobacillus brevis* A5SC3 frente a *S. Typhimurium*; e (G) *Lactobacillus perolens* 11P3 frente a *E. coli* **49**
- Figura 4** - Médias dos halos de inibição de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 isolado do kefir de leite, células livres e células liofilizadas **58**
- Figura 5** - Médias dos halos de inibição de *Lactobacillus perolens* 11P3 isolado do kefir de Água, células livres e células liofilizadas **59**
- Figura 6** - Médias dos halos de inibição de *Lactobacillus brevis* A5SC3 isolado do polvilho azedo, células livres e células liofilizadas **59**
- Figura 7** - Resistência as condições simuladas do TGI de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2, isolado do kefir de leite, células livres e células liofilizadas **61**
- Figura 8** - Resistência as condições simuladas do TGI de *Lactobacillus perolens* 11P3, isolado do kefir de água, células livres e células liofilizadas **61**
- Figura 9** - Resistência as condições simuladas do TGI de *Lactobacillus brevis* A5SC3, isolado do polvilho azedo, células livres e células liofilizadas **62**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Grupos microbianos mais encontrados no kefir de leite e de água **31**

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Aa	Atividade de água
AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection (Coleção de Culturas tipo Americana)
ATP	Adenosina tri-fosfato
BAL	Bactérias ácido-lácticas
BHI	Brain Heart Infusion
BLIS	Bacteriocinas
BPW	Água peptonada tamponada
CAGR	Taxa composta de crescimento anual
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CHO	Carboidrato
CNNPA	Comissão nacional de normas e padrões para alimentos
°C	Graus Celsius
EFSA	Autoridade europeia para segurança dos alimentos
FAFAR	Faculdade de Farmácia
FAO	Food and Agriculture Organization (Organização de Agricultura e Alimentação)
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
g	Grama
GRAS	Generally Recognized As Safe (Geralmente reconhecido como seguro)
h	Hora
HCl	Ácido clorídrico
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IgA	Imunoglobulina A
KA	Kefir de água
KACU	Kefir de água de Curitiba
KASA	Kefir de água de Salvador
KL	Kefir de leite
KLCU	Kefir de leite de Curitiba
KLDI	Kefir de leite de Divinópolis
KLSA	Kefir de leite de Salvador
L	Litro
LAMIB	Laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise
LTDA	Limitada
Lb	<i>Lactobacillus brevis</i>
Lp	<i>Lactobacillus plantarum</i>
M	Molar
mm	Milímetro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MICROAL	Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia

mL	Mililitro
MG	Minas Gerais
MRS	de Man, Rogosa & Sharpe
MS	Ministério da Saúde
Nº	Número
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PA	Polvilho azedo
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPGCA	Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos
QPS	Prescrição qualificada de segurança
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
TGI	Trato gastrointestinal
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
µg	Micrograma
µL	Microlítros
WHO/OMS	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. Objetivos específicos.....	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1. Bactérias ácido-lácticas.....	18
3.1.1. Gênero <i>Lactobacillus</i>	19
3.1.2. Gênero <i>Leuconostoc</i>	21
3.1.3. Gênero <i>Lactococcus</i>	21
3.2. Probióticos.....	22
3.3. Alimentos ricos em bactérias ácido-lácticas com características probióticas.....	27
3.3.1. Kefir de leite.....	27
3.3.2. Kefir de água.....	29
3.3.3. Composição microbiana do kefir de leite e de água.....	31
3.3.4. Polvilho azedo.....	32
3.3.5. Composição microbiana do polvilho azedo.....	36
3.4. Preservação de bactérias ácido-lácticas por liofilização (<i>freeze drying</i>).....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1. Microrganismos.....	42
4.2. Bactérias indicadoras.....	43
4.3. Ativação e manutenção das culturas bacterianas.....	44
4.4. Teste de atividade inibitória direta por método <i>Spot-on-the-lawn</i>	45
4.5. Contagem de células livres e liofilizadas.....	45
4.6. Simulação <i>in vitro</i> do processo de digestão gástrica e intestinal..	46
4.7. Liofilização.....	46

4.8.	O efeito da liofilização e viabilidade das BAL.....	47
4.9.	Efeito do armazenamento sobre a viabilidade das BAL.....	48
4.10.	Análise estatística.....	48
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1.	Atividade Inibitória teste de antagonismo <i>in vitro</i> célula livre.....	49
5.2.	Simulação <i>in vitro</i> do processo de digestão gástrica e intestinal célula livre.....	53
5.3.	O efeito da liofilização.....	56
5.3.1.	Atividade Inibitória teste de antagonismo <i>in vitro</i> célula liofilizada	56
5.3.2.	Simulação <i>in vitro</i> do processo de digestão gástrica e intestinal célula liofilizada.....	60
5.4.	Efeito do armazenamento sobre a viabilidade das BAL.....	62
6.	CONCLUSÃO.....	65
7.	REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

O crescente interesse dos consumidores por alimentos benéficos à saúde tem incentivado a comunidade científica a realizar pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novos produtos chamados “alimentos funcionais”. Dentre estes os probióticos vêm se destacando pelos benefícios promovidos na microbiota intestinal (ONZE, PONS & TUR, 2012).

São considerados alimentos probióticos aqueles que contêm microrganismos vivos que, quando ingeridos em quantidades viáveis, promovem alterações e efeitos benéficos no organismo (FAO/WHO, 2001; SAAD, 2006; ARAÚJO, 2007; WESCHENFELDER et al., 2011). Para serem considerados probióticos, os microrganismos dentre outras características, devem resistir à passagem no trato gastrointestinal, sobrevivendo à secreção do suco gástrico e sais biliares; produção de substâncias antagônicas e apresentar viabilidade até o consumo final, com comprovação *in vivo* e *in vitro* (VINDEROLA & REINHEIMER 2003; WENDLING & WESCHENFELDER, 2013).

Bactérias ácido-láticas são microrganismos presentes em diversos alimentos fermentados, como leites, carnes, vegetais e polvilho (CARR, CHILL & MAIDA, 2002; BALLUS, et al., 2010; LAMONT et al., 2017). Nos últimos anos, as BAL vêm sendo utilizadas como probiótico, atuando direta ou indiretamente no organismo, por meio da produção de substâncias com funções biológicas distintas e capazes de modular a fisiologia do organismo (WENDLING & WESCHENFELDER, 2013; BEERMANN & HARTUNG, 2013; SHIBY & MISHRA, 2013; NURIDA, 2015).

Kefir de leite, originário da região do Cáucaso na Ásia Central é considerado uma bebida fermentada (ALTAY et al., 2013; MARSH et al., 2014; YANG et al., 2014; LEITE et al., 2015; DERTLI & ÇON, 2017). Mas, pode ser encontrado como kefir de água e existem relatos que o kefir de água teve sua origem no México trazido após a guerra da Criméia em 1855 (MIGUEL et al., 2011; MARSH et al., 2014; LAUREYS & VUYST, 2014; FIORDA et al., 2017). Os grãos de kefir contêm uma complexa mistura de microrganismos aderidos à essa matriz, composta de gêneros bacterianos e gêneros de leveduras (GARROTE, ABRAHAM & ANTONI,

2001; HSIEH et al., 2012; ŠINKO, ZAMBERLIN & SAMARŽIJA, 2013; ZANIRATI et al., 2014).

A mandioca (*Manihot esculenta* CRANTZ) originária da América do Sul, pertencente ao grupo das raízes. É rica em amido, fonte de carboidrato (CARVALHO et al., 1996; AGOSTINI, 2006; SILVA & MURRIETA, 2014). O polvilho azedo é obtido através da fermentação natural do amido extraído da mandioca através de secagem feita ao sol com presença de bactérias ácido-lácticas e leveduras (CARVALHO et al., 1996; AVANCINI, 2007; PENIDO et al., 2018).

Para utilização de culturas probióticas na tecnologia de fabricação de alimentos ou para uso em humanos são necessárias as seguintes características: sobrevivência no produto alimentício, consumo em quantidades que confere efeito fisiológico no hospedeiro e estar viáveis e estáveis durante o armazenamento (CHARTERIS et al., 1998; SAAD, 2006; GALLINA et al., 2011).

A viabilidade e estabilidade das estirpes com potencial probiótico é um parâmetro importante para indústria e técnicas como a liofilização vem sendo utilizada para essa finalidade (MORGAN et al., 2006; CHAMPAGNE & FUSTIER, 2007). A liofilização é considerada uma das técnicas mais utilizadas e eficientes na preservação de microrganismos, pois mantém alta viabilidade das células, possibilitando uma produção industrial em larga escala (CHAMPAGNE & FUSTIER, 2007).

Muitas pesquisas voltadas para obtenção de probióticos têm como principais fontes produtos fermentados (STANTON et al., 2003; SILVA, 2015). Estudos realizados já mostraram efeito antagonista de estirpes isoladas do kefir e de polvilho azedo frente a bactérias patogênicas (CHARLIER et al., 2009; DIAS, 2011; PENIDO, 2013; AUAD, 2014; MORAIS, 2015; PENIDO et al., 2018), mas são poucos os estudos que avaliam a viabilidade destas estirpes em relação a parâmetros para alegação de função probiótica após processo de liofilização (ZANIRATI et al., 2014). Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi selecionar estirpes isoladas de kefir e de polvilho azedo que apresentaram ação inibitória frente a microrganismos patogênicos e resistência a passagem simulada no TGI e avaliando o efeito da liofilização sobre essas propriedades probióticas.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Avaliar o efeito da liofilização sobre a capacidade antagonista contra patógenos e a sensibilidade a passagem no trato gastrointestinal simulado de bactérias ácido-lácticas isoladas do kefir de leite, de água e do polvilho azedo *in vitro*.

2.2. ESPECÍFICOS

- I. Avaliar o efeito inibitório de bactérias ácido-lácticas provenientes do kefir de leite e de água e do polvilho azedo frente a microrganismos patogênicos Gram-positivos e Gram-negativos;
- II. Avaliar a sobrevivência das estirpes de bactérias ácido-lácticas frente ao suco gástrico e intestinal simulados;
- III. Avaliar o efeito da liofilização na viabilidade das estirpes de bactérias ácido-lácticas selecionadas após parâmetros avaliados anteriormente;
- IV. Avaliar a viabilidade das estirpes de bactérias ácido-lácticas selecionadas e liofilizadas por 60 dias de estocagem à temperatura ambiente.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Bactérias ácido-lácticas

Bactérias ácido-lácticas (BAL) são microrganismos que estão presentes em diversos alimentos fermentados, como leites, carnes, vegetais, mandioca, cacau, na cavidade oral, intestino e vagina de mamíferos. Podem promover modificações desejáveis na textura, sabor, aroma, cor e qualidades nutricionais dos produtos. Possuem status GRAS (GRAS – “Generally Recognized as Safe” - geralmente considerado seguro) (CARR, CHILL & MAIDA, 2002; CHARLIER et al., 2009; RAMOS et al., 2013; NURAI DA, 2015; LAMONT et al., 2017).

BAL são bactérias fermentativas Gram-positivas, catalase e oxidase-negativas, não formadores de esporos, anaeróbicos, aerotolerantes, fastidiosas, ácido tolerantes, com temperatura de crescimento variando entre 35°C e 40°C (dependendo da espécie) (ALI, 2010; KHALID, 2011; NURAI DA, 2015; DIANAWATI, MISHRA & SHAH, 2016). São encontrados nas formas de cocos, bacilos imóveis e coco-bacilos, com formação de tétrades devido sua divisão celular em dois planos. Podem ser divididos em dois grupos devido à forma de fermentar a glicose, em homofermentativas ou homoláctica pela via glicolítica (resulta em ácido láctico pela conversão de açúcares) e heterofermentativa (produção de ácido láctico, etanol, acetato, dióxido de carbono) pela via 6- fosfogluconato/fosfoquetolase (AXELSSON et al., 2004; CHARLIER et al., 2009; ILANGO, PANDEY & ANTONY, 2016).

A denominação bactérias ácido-lácticas é devido à formação de energia em forma de ATP (adenosina tri-fosfato) através da fermentação de carboidrato (CHO) produzindo ácido láctico como principal produto (AXELSSON et al., 2004).

São capazes de reduzir o pH para cerca de 4,0, um valor baixo que inibe crescimento de outras bactérias, incluindo patógenos (REDDY et al., 2008). A eficácia e espectro de ação contra os microrganismos patogênicos também ocorrem devido aos metabólitos produzidos durante a fermentação, que incluem ácidos orgânicos (láctico e acético), dióxido de carbono, alcoóis, aldeídos, acetaldeídos, peróxidos de hidrogênio e bacteriocinas, com ação antioxidante nas células bacterianas ou destruição da estrutura dos ácidos nucleicos e proteínas celulares

(TAGG et al., 1976; ALEXANDRE et al., 2002; CARR, CHILL & MAIDA, 2002; POFFO et al., 2011).

Efeitos benéficos causados por essas bactérias foram observados durante o tratamento de infecções intestinais, incluindo a estabilização da barreira da mucosa intestinal, prevenção da diarreia e melhora da diarreia infantil e da associada ao uso de antibióticos (LEE et al., 1999).

Iraporda e colaboradores (2017), avaliando a fração não microbiana do kefir, que são os produtos de fermentação gerados pelas BAL, contra patógenos intestinais (*E. coli*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *B. cereus*) atribuíram o efeito antagônico a presença de ácido láctico.

Além da demanda tecnológica a demanda está aumentada atualmente para novos candidatos a probióticos de linhagens BAL (LEITE et al., 2015). Embora produtos lácteos fermentados sejam as matrizes mais usadas para extração de BAL com potencial probiótico, é possível obter estirpes probióticas de várias matrizes, o que possibilita uma vasta gama de alimentos que ainda podem ser estudados (RAMOS et al., 2013; NURANDA, 2015).

Algumas estirpes de BAL foram reconhecidas como probióticas, devido a capacidade de adesão a mucosa intestinal animal e humana e promovendo melhorias na saúde (DIANAWATI, MISHRA & SHAH, 2016).

Os principais representantes de BAL são do gênero *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Carrobacterium*, *Vagococcus*, *Weissella* e *Streptococcus*. (JAY, 2000; CARR, CHILL & MAIDA, 2002; FRANK et al., 2002; AVANCINI, 2007; ARCHACKA et al., 2019).

3.1.1. Gênero *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* faz parte da família *Lactobacillaceae*, pertencente ao filo Firmicutes, classe Bacilli e apresentam colônias pequenas, apigmentadas e arredondadas. São Gram-positivos, incapazes de formar esporos, desprovidos de flagelos, apresentam forma bacilar ou cocobacilar podendo ser anaeróbio ou aerotolerantes, com crescimento em temperaturas ótimas de 35°C-40°C e pH de 5,5-6,0 (GOMES & MALCATA, 1999; SANTOS, BARBOSA & BARBOSA, 2011). Foi

isolado pela primeira vez por Moro em 1900 a partir das fezes de neonatos amamentados por leite materno, nomeando-as de *Bacillus acidophilus*, designação genérica dos *Lactobacillus* intestinais (GOMES & MALCATA, 1999; AXELSSON et al., 2004; BECKER, 2009). Utilizam como nutrientes para multiplicação carboidratos, proteínas e respectivos produtos de degradação, vitaminas do complexo B e minerais (GOMES & MALCATA, 1999).

Como microrganismos heterofermentativos, produzem ácido láctico, acetoaldeído, dióxido de carbono, ácido acético, pela fermentação de glicose. Reduzem o pH do meio e inibem bactérias patogênicas e deteriorantes além de auxiliarem na produção de vitaminas do complexo B (GOMES & MALCATA, 1999; CARR, CHILL & MAIDA, 2002). Todas as espécies de *Lactobacillus* já possuem uma patente arquivada, com alegação de produção de bacteriocina (SALVETTI & O'TOOLE, 2017).

As bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são frequentemente consideradas seguras ou reconhecidamente seguras (GRAS) (OLIVEIRA et al., 2002). São muito usadas em alimentos, pois, são mais resistentes ao pH baixo e com adaptações a diferentes matrizes (FREIRE et al., 2017). Mas, nos últimos anos ganhou importância maior devido as suas propriedades probióticas encontradas em diversas estirpes pertencentes ao gênero *Lactobacillus* (SABIR et al., 2010; ARCHACKA et al., 2019).

São 36 espécies de *Lactobacillus* que receberam o status de Prescrição Qualificada de Segurança (QPS) pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) e 12 espécies receberam o título de GRAS (EFSA, 2016; SALVETTI & O'TOOLE, 2017), dentre essas espécies, destaca-se as estirpes *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus brevis* usadas no presente trabalho.

3.1.2. Gênero *Leuconostoc*

As espécies de *Leuconostoc* são Gram-positiva, em forma de cocos, pertencentes ao grupo das bactérias ácido-láticas, catalase-negativos, sem formação de esporos e produtora de ácido lático. Pertence ao filo Firmicutes, classe Bacilli da família *Leuconostocaceae*, apresentam-se sob forma esférica e lenticular, ocorrem em pares ou em cadeias (CARR, CHILL & MAIDA, 2002; JAY, 2005; EUZÉBY, 2020; PARK et al., 2016).

Estudos demonstraram que as espécies do gênero *Leuconostoc* e *Lactococcus* isoladas de produtos à base de carne são capazes de produzir bacteriocinas contra *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. perfringens*, *E. faecalis* e *B. cereus* (HASTINGS, STILES & HOLY, 1994; BROMBERG et al., 2006; XIRAPHI et al., 2008; WORAPRAYOTE et al., 2016).

Espécies de *Leuconostoc* são aplicadas principalmente em produtos lácteos fermentados, como culturas iniciais (PARK et al., 2016). Também considerado heterofermentativa pela produção de diversos metabólitos (CARR, CHILL & MAIDA, 2002). Este gênero é composto atualmente por 22 espécies (EUZÉBY, 2020). Quatro espécies de *Leuconostoc* receberam o status QPS pela EFSA (EFSA, 2016), sendo a estirpe *Leuconostoc mesenteroides*, uma delas, e foi usada no presente trabalho.

3.1.3. Gênero *Lactococcus*

São Gram-positivos e não formam esporos, classificados como bactérias homofermentativas sendo o ácido-lático como principal produto. Pertence ao filo Firmicutes, classe Bacilli da família *Streptococcaceae*, fermenta lactose, sacarose, glicose, maltose, galactose e frutose, também produz nisina e citocinas que influenciam no sistema imunológico. Estão presentes em diversos ecossistemas como plantas, peles de animais e alimentos (BRAVO, RODRÍGUEZ & MEDINA, 2009; ELMARZUGI et al., 2010; DIANAWATI, MISHRA & SHAH, 2016).

Alguns estudos demonstram seu potencial probiótico por meio da sobrevivência às condições do TGI e colonização a mucosa intestinal (KIMOTO et al., 2003; SABIR et al., 2010; DIANAWATI, MISHRA & SHAH, 2016).

As aplicações industriais do gênero *Lactococcus* são baseadas principalmente em seu metabolismo energético que leva a produção de ácido-láctico, mas também explora sua capacidade de formar produtos de fermentação como o lactato (fermentação com ácido misto), etanol e produção de polissacarídeos extracelulares que afetam a textura dos produtos fermentados (BOLOTIN et al., 2001; MONTEAGUDO-MERA et al., 2011).

Nos últimos anos as estirpes do gênero *Lactococcus*, especificamente *Lactococcus lactis* ganhou importância em função de suas propriedades probióticas e papel na fabricação de produtos lácteos (SABIR et al., 2010; ARCHACKA et al., 2019). Outros estudos sobre *Lactococcus lactis* isoladas de leite cru de ovelhas e de queijo lighvan apresentou ação inibitória contra patógenos pela produção de bacteriocinas (nisina e lacticina e lactococcin) (BRAVO, RODRÍGUEZ & MEDINA, 2009; ATTAR et al., 2018).

Lactococcus lactis recebeu o status QPS pela EFSA (EFSA, 2016), sendo esta estirpe usada no presente trabalho.

3.2. Probióticos

A palavra probiótico teve sua origem mais precisa e definição mais clara nos anos 90, é derivada do grego e significa “pra vida” (SANTOS, BARBOSA & BARBOSA, 2011; WENDLING & WESCHENFELDER, 2013). O uso de microrganismos probióticos surgiu no Oriente Médio, onde médicos prescreviam para terapias, alimentos como iogurte e outros fermentados com intuito de melhorar as infecções do TGI e como estimulante para o apetite (CARLI, 2006; WENDLING & WESCHENFELDER, 2013).

Historicamente, em 1910 Elie Metchnikoff foi o primeiro a lançar a ideia do consumo regular de leites fermentados com a finalidade de oferecer benefícios à saúde, e desenvolveu uma dieta com leite fermentado com bactérias que denominou de “bacilo búlgaro” (SANTOS, BARBOSA & BARBOSA, 2011; NURANDA, 2015; GUARNER et al., 2017; BARRETO, 2018). Mais tarde no Japão, em 1935, o Dr.

Minoru Shirota isolou a estirpe Shirota, da espécie *Lactobacillus casei*, com intuito de uso em casos de diarreia (GUARNER et al., 2017).

O termo probiótico foi introduzido pela primeira vez por Lilly & Stillwel em 1965 para descrever microrganismos que desempenham atividades benéficas e produção de substâncias que estimulavam o crescimento de outros (GOLDIN, 1998; OLIVEIRA et al., 2002; SANTOS, BARBOSA & BARBOSA, 2011). Diversas definições de probióticos foram descritas ao longo dos anos. Fuller (1983) foi o primeiro a definir o termo probiótico como “organismos vivos que ingeridos exercem efeito benéfico no balanço da flora bacteriana intestinal do hospedeiro”. Mais tarde em 1989, Fuller definiu novamente probióticos como “suplemento de microrganismos vivos que beneficiam a saúde do hospedeiro, através do equilíbrio da microbiota intestinal”. Em 1992, Havenaar e colaboradores completaram a definição descrita por Fuller (1989) definindo assim o termo probiótico como “cultura pura ou composta de microrganismos vivos que, fornecidos ao homem ou aos animais, beneficiam ao hospedeiro pelo estímulo das propriedades existentes na microbiota natural”. A definição atual é que probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidade adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2001; GUARNER et al., 2017), que também foi aderida pela legislação brasileira vigente (RDC nº 241/2018) publicada pela ANVISA (BRASIL, 2018).

Entre os diversos gêneros que fazem parte deste grupo, os principais são *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, utilizados na indústria alimentícia com alegação de propriedades funcionais, farmacêutica com produção de medicamentos, e suplementos ou novos produtos adicionados de probióticos como, por exemplo, cremes dentais e cosméticos (SANTOS, BARBOSA & BARBOSA, 2011; MCFARLAND, 2010; HOFFMAN et al., 2014; SALVETTI & O'TOOLE, 2017). O desenvolvimento de novos produtos alimentícios e de produtos no mercado contendo probióticos torna-se cada vez mais abrangente e desafiador, na tentativa de atender às exigências dos consumidores por produtos saudáveis e atrativos.

De acordo com um relatório recente, o mercado global de probióticos deve saltar de cerca de US\$ 39,2 bilhões em 2017 para US\$ 57,2 bilhões em 2022, sendo uma CAGR de 7,8% de 2017 até 2022 (BCC Research, 2018).

A seleção de microrganismos com potencial probiótico exige observações em três categorias: segurança, características funcionais e tecnológicas, que são em detalhes: serem seguras para consumo humano com descrição minuciosa da origem; ausência de patogenicidade; capacidade de resistir a enzimas salivares, ao suco gástrico, aos sais biliares e enzimas digestivas; capacidade de adesão e colonização na mucosa epitelial intestinal mesmo que temporariamente; produção de substâncias antimicrobianas; ausência de genes da resistência a antibióticos; resistência a temperaturas de processamento e ter viabilidade por longos períodos quando estocados. Características que são atribuídas a cada estirpe de forma individual e não pode ser extrapolado inclusive para outras estirpes da mesma espécie (LEE et al., 1999; OLIVEIRA, et al., 2002; VINDEROLA, 2003; SAAD, 2006; GIRAFFA, CHANISHVILI & WIDYASTUTI, 2010; SABIR et al., 2010; GALLINA et al., 2011; WENDLING & WESCHENFELDER, 2013; MIQUEL et al., 2015; BRASIL, 2018).

A secreção de ácidos gástricos e o trânsito intestinal constituem um mecanismo primário de defesa que os microrganismos probióticos devem superar (LEITE et al., 2015).

A simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* vem sendo empregada nas áreas de ciências alimentícias, farmacêuticas e nutricionais, como alternativa frente a testes em humanos. Isso possibilita a criação de novas hipóteses, redução de gastos e respostas mais rápidas, levando em conta a presença de enzimas digestivas, valores de pH, tempo de digestão e concentrações de sal (MINEKUS et al., 2014).

O ácido clorídrico (HCl) secretado no estômago apresenta pH 0,9, mas com a presença de alimentos esse valor aumenta para em torno de 3,0, sendo que o alimento permanece de 2 a 4 horas no estomago. A ação do pH baixo constitui-se uma barreira eficiente contra organismos invasores, impedindo sua colonização no intestino (ALVES, 2013). Além disso, o HCl se difunde através da membrana celular e depois no citoplasma liberando prótons interferindo no funcionamento da membrana e levando a apoptose (COSTA et al., 2013).

O pH estomacal em geral encontra-se entre 2,5 e 3,0 em decorrência da liberação de HCl com uma junção de muco + pepsina (precursor pepsinogênio) + NaCl e lipase. O pH baixo e a ação antimicrobiana da pepsina são barreiras para a

passagem de bactérias no TGI, onde ocorre desnaturação e hidrólise de proteínas e polipeptídeos (HOLZAPFEL et al., 1998; HALL e GUYTON, 2011; BARRETT et al., 2012). Ainda hoje, mesmo com avanços na pesquisa, não existe uma regra padronizada de forma a estabelecer um pH limite ou específico para os testes de resistência ácida de estirpes probióticas sendo que diversos estudos usam pH entre 1 a 5 para análise *in vitro* (RAMOS, THORSEN, SCHWAN & JESPERSEN, 2013; LEITE et al., 2015; ILANGO, PANDEY & ANTONY, 2016; SANDES et al., 2017; GUIMARÃES et al., 2018) e o tempo recomendado é de 2 h a 37 °C em um consenso científico (MINEKUS et al., 2014).

O efeito do estresse ácido na fisiologia bacteriana não é totalmente elucidado, mas, sabe-se que os ácidos passam por difusão passiva através da membrana celular entrando nas células e no citoplasma se dissociando e liberando prótons, reduzindo o pH interno afetando processos de transporte via membrana, redução de atividades enzimáticas, danos em sistemas protéicos e no DNA (VAN DE GUCHTE et al., 2002; BEALES, 2004; ARAÚJO, 2007; COSTA et al., 2013).

Seguindo o processo de digestão no intestino delgado, o duodeno também atua como barreira a passagem de células bacterianas devido a presença de sais biliares e enzimas digestivas, como a pancreatina. A bile (sais biliares) é secretada pelo fígado exercendo função de emulsificação e solubilização de gorduras para facilitar a digestão e absorção de lipídeos. A pancreatina atua na digestão de carboidratos, lipídeos e proteínas. Nesta fase da digestão o pH é maior (pH 6-8), neutralizando o ácido gástrico pela junção de compostos NaH_2PO_4 + pancreatina (tripsina) + sais biliares. A ação dos sais biliares e da pancreatina afeta os fosfolipídios e proteínas das membranas das células microbianas ocasionando extravasamento do conteúdo celular e morte (VAN DE GUCHTE et al., 2002; BEGLEY, GAHAN & HILL, 2005; DEVLIN & MICHELACCI, 2007; BALLUS et al., 2010; BARRETT et al., 2012).

Mesmo com vários estudos já realizados e estudos em andamento, a concentração de sais biliares não foi padronizada (ZAGO et al., 2011), sendo usadas quantidades variadas até 2%, em um consenso científico o tempo de digestão nesta etapa também é de 2 h a 37 °C (KRASAEKOOPT & WATCHARAPOKA, 2014; MINEKUS et al., 2014; LEITE et al., 2015; PINTO et al., 2015; HANDA & SHARMA,

2016; SABIR et al., 2010; SILVA et al., 2013; ZANIRATI et al., 2015; SANDES et al., 2017).

A adesão das estirpes probióticas na superfície intestinal e colonização temporária no TGI é um importante requisito de ação benéfica. Essa capacidade de interação e adesão facilita o contato com a superfície da mucosa (muco) e aderência a células epiteliais com o mesentério associado com o tecido linfóide estimulando o sistema imune e tendem a persistir por mais tempo no TGI (SAARELA et al., 2000; BALLUS et al., 2010).

A produção de metabólitos durante o processo de fermentação possibilita aos microrganismos probióticos uma ação antagônica a células patogênicas. São vários metabólitos secretados, sendo ácidos orgânicos (lático e acético), peróxido de hidrogênio, bacteriocinas, compostos aromáticos, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), dióxido de carbono, alcoóis, aldeídos, expolissacarídeos e acetaldeídos (SAARELA, et al., 2000; ALEXANDRE et al., 2002; BALLUS et al., 2010; POFFO et al., 2011; ILANGO, PANDEY & ANTONY, 2016).

A modulação da microbiota intestinal ocorre através de um mecanismo conhecido como “exclusão competitiva”, que consiste na competição pelo sítio de adesão e nutrientes, redução ou aumento de atividades enzimáticas e/ou por produção de substâncias antagônicas, e através destes mecanismos inibem a colonização e proliferação de bactérias patogênicas (LEE et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2002; SAAD, 2006; SANTOS, BARBOSA & BARBOSA, 2011; BASTOS, PAULO & CHIARADIA, 2014).

A influência dos probióticos no organismo humano inclui mecanismos como: exercem influência em reações bioquímicas; produzem enzimas importantes para o funcionamento do organismo; auxiliam na digestão de alimentos e motilidade intestinal; estimulam o sistema imune pela sinalização para produção de anticorpos como imunoglobulina A (IgA) e da atividade fagocítica contra patógenos; aumenta a absorção de minerais; modulação da absorção de cálcio; produção de vitaminas; auxiliam na digestão da lactose pela produção da enzima β -D-galactosidase e reduzem a incidência de diarreia e produção de AGCC. Pode-se resumir o espectro de atividade dos probióticos em efeitos nutricionais, efeitos fisiológicos e efeitos antimicrobianos (LEE et al., 1999; GOMES & MALCATA, 1999; OLIVEIRA et al., 2002; SAAD, 2006; BALLUS et al., 2010; LAZADO et al., 2011; BASTOS, PAULO &

CHIARADIA, 2014; NURADA, 2015; ILANGO, PANDEY & ANTONY, 2016; GUARNER et al., 2017).

Diferentes formas de produção/uso ou comercialização do probiótico, tem se expandido o interesse de formulações secas (JALALI et al., 2012). As culturas probióticas, além da seleção criteriosa para definição do seu potencial probiótico, deve apresentar capacidade de ser produzido em condições industriais, mantendo suas características probióticas, em concentrações viáveis, resistir às condições de processamento como liofilização, secagem por *spray drying* e encapsulação, sem perder sua viabilidade ao longo do tempo, mas são características dependentes de cada estirpe (SAAD, 2006; BASTOS, PAULO & CHIARADIA, 2014).

3.3. Alimentos ricos em bactérias ácido-lácticas com características probióticas

3.3.1. Kefir de leite

O Kefir, originário da região do Cáucaso e Anatólia na Ásia Central e, atualmente, seu consumo está presente em várias partes do mundo (ALTAY et al., 2013; MARSH et al., 2014; YANG et al., 2014). O nome do kefir é derivado da palavra turca “Keyif” que significa “Boa sensação” ou “Bem-estar” ou “se sentir bem” que remete aos bons sentimentos vivenciados após o consumo da bebida (OTLES & CAGINDI, 2003; SABIR et al., 2010; SCHNEEDORF, 2012; LEITE et al., 2013, 2015). É também conhecido por Kefyr, Kephir, Kefer, Kiaphur, Knapon, Kepi e Kippi (SARKAR, 2007).

Existem relatos que o kefir se originou com pastores nas montanhas caucasianas (MARSH et al., 2014; YANG et al., 2014). É uma bebida fermentada tradicional, com aspecto viscoso semelhante ao iogurte e refrescante, com um sabor levemente ácido contendo uma baixa percentagem de álcool (menor que 2% (v/v)) (MARSH et al., 2014; WALSH et al., 2016; DERTLI & ÇON, 2017).

De acordo com a legislação brasileira vigente, o kefir é definido como leite fermentado, por meio da adição de grão de kefir no leite, produzindo uma característica de bebida viscosa com sabor ligeiramente ácido. Os microrganismos

específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade com a contagem mínima de 10^7 log UFC.g⁻¹ de bactérias lácticas totais e de 10^4 log UFC.g⁻¹ de leveduras específicas e de 0,5 a 1,5 de Etanol (% v/m) (BRASIL, 2007).

O desenvolvimento e uso de kefir no Brasil ainda é baixo, restringindo-se apenas a algumas famílias e por alguns profissionais da área de saúde, que, a partir do cultivo artesanal, tem como resultado um produto fermentado de qualidade e características variáveis (AUAD, 2014).

A bebida é produzida a partir de grãos de kefir composto de BAL e leveduras com funções bioquímicas que são responsáveis pela fermentação e sabor (compostos voláteis) (ZANIRATI et al., 2015; WALSH et al., 2016; DERTLI & ÇON, 2017). O kefir também possui uma concentração de proteínas de fácil digestão, vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais (MAGALHÃES et al., 2011).

Os grãos de kefir são compostos de proteínas (13%) e uma matriz de polissacarídeos gelatinosa chamada kefiran (24%) que é um glucogalactano ramificado solúvel em água e contém uma complexa mistura de microrganismos aderidos, constituída em parte de dextrano (polímero de glicose) contendo quantidades iguais de D-glicose e D-galactose (LA RIVIERE, KOOIMAN, & SCHMIDT, 1967; GARROTE et al., 2001; OTLES & CAGINDI, 2003; MEDRANO, PÉREZ & ABRAHAM, 2008; SINKO et al., 2013; IRAPORDA et al., 2017). Suas características macroscópicas são definidas pela aparência de grânulos pequenos de formato irregular com coloração branca a amarelada, variando de 0,3 a 35 mm ou 0,5 a 3,5 cm de diâmetro, semelhantes a uma couve-flor e solúveis em água (Figura 1) (GÜZEL-SEYDIM et al., 2000; ANSELMO et al., 2010; SABIR et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2011; LEITE et al., 2012, 2013; DERTLI & ÇON, 2017).

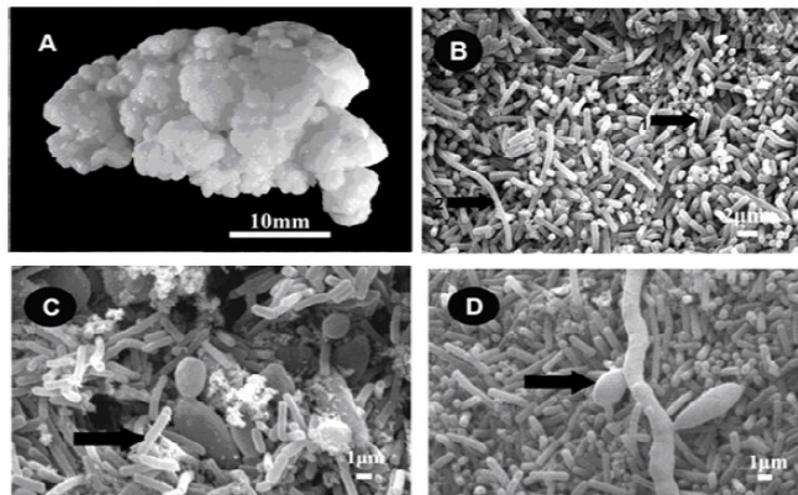


Figura 1 (A) Grãos de kefir brasileiro visto a olho nu. (B, C, D) – Superfície externa de grão de kefir brasileiro. Seta (1B) – Bactérias curtas. Seta (1B) – Bactérias longas. Seta (C) – Bactérias. Seta (D) – leveduras

Fonte: MAGALHÃES et al., 2011

Os grãos de kefir podem ser cultivados usando leite de qualquer tipo, vaca, cabra, ovelha, camelo, e extratos vegetais como leite de coco, arroz e soja, mas geralmente é usado leite de vaca como substrato para fermentação (MAGALHÃES et al., 2011; MARSH et al., 2014).

3.3.2. Kefir de água

Os grãos de kefir podem ser cultivados em água açucarada (adição de açúcar mascavo ou sacarose), frutas secas (tipicamente figos) ou suco de frutas com fatias de limão, na proporção de 3-10% de grãos, consumida principalmente no México e no Brasil (MAGALHÃES et al., 2010; GULITZ et al., 2011; MIGUEL et al., 2011; LAUREYS & VUYST, 2014). Existem relatos que sua origem veio do México trazido após a guerra da Criméia em 1855, onde se formaram grânulos duros fermentado de seiva nas almofadas do cacto *Opuntia*, e podem ser chamados de “Tibico” ou “Tibi” (PIDOUX, 1989; PIDOUX et al., 1990; GULITZ et al., 2011; MIGUEL et al., 2011; MARSH et al., 2014; LAUREYS & VUYST, 2014).

Os grãos de kefir açucarado são semelhantes aos grãos de kefir de leite em relação a sua estrutura, microrganismos e produtos formados durante o processo de fermentação, variando de 5 a 9 mm de diâmetro (Figura 2) (PIDOUX et al., 1990; MAGALHÃES et al., 2010; MIGUEL et al., 2011).

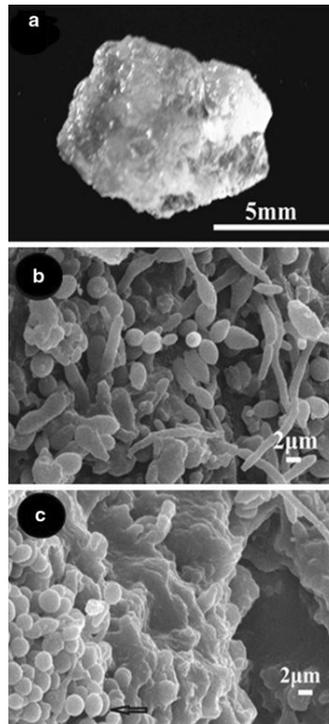


Figura 2 (A) grão de kefir de água brasileiro; (B) estrutura externa; (C) estrutura interna. Seta: leveduras

Fonte: MAGALHÃES et al., 2010

No Brasil ainda não tem uma legislação que defina o kefir de água, sendo uma prática relacionada à cultura. Mas em comum na América latina, os grãos de kefir de água são cultivados em água com a adição de açúcar mascavo ou suco de frutas, possibilitando um meio contendo principalmente carboidrato como substrato de fermentação e obtenção de energia, além de lipídios que também são usados na fermentação (MAGALHÃES et al., 2010; MIGUEL et al., 2011; HSIEH et al., 2012; ZANIRATI et al., 2015).

3.3.3. Composição microbiana do kefir de leite e de água

Embora as BAL serem predominantes a composição da microbiota pode variar conforme a origem dos grãos, condições ambientais de cultura e armazenamento, região geográfica, tempo de uso, matriz dos grãos, substrato e fonte usado para fermentação, tratamento térmico do leite, recipiente utilizado e manipulação (WITTHUHN et al., 2004; SINKO et al., 2013; DERTLI & ÇON, 2017).

Vários estudos determinaram composição microbiana dos grãos de kefir de água e de leite. Em geral estão presentes os gêneros bacterianos que incluem *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter*, dentre outros. Os gêneros de leveduras incluem *Kluyveromyces*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Torulaspota* e outros (GARROTE et al., 2001; SINKO et al., 2013; ZANIRATI et al., 2015; WALSH et al., 2016; DERTLI & ÇON, 2017). De um modo geral as BAL ocorrem em maior número (10^8 - 10^9 UFC.g) do que as bactérias acéticas (10^5 - 10^6 UFC.g) e leveduras (10^5 - 10^6 UFC.g) (GARROTE et al., 2001).

Estudos demonstraram que a composição microbiológica e físico-química é dependente da cultura inicial dos grãos de kefir na qual foi usada para fermentação (BESHKOVA et al., 2003; SIMOVA et al., 2002; GULITZ et al., 2011).

Em uma revisão, Marsh e colaboradores (2014) identificaram os grupos microbianos mais encontrados no kefir, descritos no quadro abaixo:

Quadro 1 grupos microbianos mais encontrados no kefir de leite e de água

Produto	Substrato	Região	Microflora
Kefir de leite	Milk (cow, various) - Leite	Eastern Europe (Caucasian region)	Bactérias: <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Acetobacter</i> Leveduras: <i>Naumovozyma</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Kazachstania</i>
Kefir de água	Water/sucrose - Água	Mexico, Worldwide	Bactérias: <i>Lactobacillus</i> (<i>L. casei</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i>), <i>Lactococcus. lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Zymomonas</i> Leveduras: <i>Dekkera</i> (<i>D. anomola</i> , <i>D. bruxellensis</i>), <i>Hanseniaspora</i> (<i>H. valbyensis</i> , <i>H. vineae</i>) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Lachancea fermentati</i> , <i>Zygosaccharomyces</i> (<i>Z. lentus</i> , <i>Z.</i>

<i>florentina</i>)

Fonte: adaptado de MARSH et al., 2014.

Os grãos de kefir açucarados são semelhantes aos grãos de kefir de leite. Em sua composição encontram-se gêneros bacterianos *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Gluconobacter* e *Streptococcus*, como também gêneros bacterianos do ácido acético *Acetobacter* e *Bacillus* e leveduras *Candida*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspota*, *Pichia*, *Kazachstania*, *Zygosaccharomyces* e *Kloekera* (produzem etanol) (PIDOUX et al., 1990; GULITZ et al., 2011; LAUREYS & DE VUYST, 2014). As BAL do kefir de água são encontradas em maiores concentrações (57,65%) depois leveduras (30,86%) e bactérias acéticas (11,48%) (MAGALHÃES et al., 2010). Outro estudo também encontrou um número maior de bactérias (70%) que leveduras (30%) (MIGUEL et al., 2011).

Usando kefir de leite brasileiro, Magalhães e colaboradores (2011) identificaram que as BAL são as que estão em maiores concentrações (60,5%) depois leveduras (30,6%) e bactérias acéticas (8,9%) e os gêneros bacterianos identificados foram *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Acetobacter* e gêneros de leveduras *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Lachancea* e *Kazachstania*. Outro estudo também identificou que as BAL são encontradas em maiores concentrações (83-90%) seguido de leveduras (10-17%) (SIMOVA et al., 2002).

O uso do kefir já está disponível comercialmente, mas, em sua maioria o consumo deste produto é mais restrito apenas a algumas pessoas que cultivam de forma artesanal, podendo-se diferenciar em suas características de qualidade e composição (MAGALHÃES et al., 2010).

3.3.4. Polvilho azedo

A mandioca (*Manihot esculenta* CRANTZ), planta da família *Euphorbiaceae*, é originária da América do Sul, pertencente ao grupo das raízes, conhecida também como aipim em alguns estados brasileiros. Desenvolve-se em regiões com temperaturas em torno de 25°C, baixas altitudes e locais com chuva ao longo do ano, mas consegue se adaptar a condições mais extremas e solo com poucos recursos (CARVALHO et al., 1996; AGOSTINI, 2006; SILVA & MURRIETA, 2014; PENIDO, 2013; PEREIRA, 2016).

Raízes e tubérculos (raízes subterrâneas) referem-se à parte da planta que armazena material comestível. Alimentos, como batata, inhame são exemplos do mesmo grupo que a mandioca, e são ricos em diversos nutrientes e fonte energética (CHO) a mandioca contém cerca de 85% de amido, que tornam a base alimentar de países em desenvolvimento pela facilidade de manuseio e plantio (UGWU, 2009; PEREIRA, 2016; PENIDO et al., 2018).

É um alimento fonte de CHO (36,2 g em 100 g) com presença de minerais, principalmente, potássio (208 mg em 100 g) e fósforo (29 mg em 100 g), fibra alimentar (1,9 g em 100 g), baixo conteúdo de proteínas (1,1 g em 100 g) e algumas vitaminas como vitamina C (16,5 mg em 100 g) (TACO, 2011). É usada industrialmente para obtenção de amido (fécula), produção de álcool, fabricação de farinhas, incorporação em pães e usado para produção de ração animal (AGOSTINI, 2006; ESPM/SEBRAE, 2008; SILVA & MURRIETA, 2014).

Historicamente, no século XV, quando os europeus chegaram ao continente americano descobriram que o consumo da mandioca pelos índios já era uma prática há pelo menos 8.000 anos, e com o passar dos anos foi disseminada nas Américas (PIPERNO, 2011). No Brasil, o cultivo da mandioca de forma histórica está relacionado aos camponeses (agricultores), e que ainda hoje são responsáveis por grande parte da produção agrícola deste produto (FREITAS, FARIAS & VILPOUX, 2011; SILVA & MURRIETA, 2014). De acordo com o portal da EMBRAPA em 2017, as áreas de plantio de mandioca na região sudeste eram aproximadamente de 200.000 hectares, correspondendo 8,7%. Em Minas gerais a área plantada teve um declínio desde 1990, e em 2017 correspondia a 56.851 hectares. A região sudeste representa a 4ª região produtora de mandioca com 10,9% da produção nacional, cerca de 2.000.000 toneladas (EMBRAPA - IBGE, 2017).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), a planta que dá origem à mandioca é uma raiz tropical, originalmente da Amazônia. Em 2012 a produção global estimada deste alimento foi de 262.585.741 toneladas (FAO, 2013), e, em 2014 a estimativa da produção brasileira era de 23 milhões de toneladas (IBGE, 2014), em 2016 21.084 toneladas, correspondendo cerca de 10% da produção mundial e em 2017, 18.876 toneladas de mandioca (FAOSTAT, 2017).

No mercado mundial é possível encontrar alimentos fermentados a base de mandioca, como exemplo, o lafun (Nigéria), gari (Oeste da África), agbelima (Gana, Benin e Togo), attieke (Gana), fufu (África), chikwangeu (Nigéria oriental e no Zaire), kokonte, cauim (Kawi) bebida alcoólica fermentada de mandioca ou milho de povos indígenas brasileiros, yakupa; e outros (AVANCINI, 2007; PADONOU et al., 2009; EDWARD et al., 2011; RAMOS et al., 2013; ANYOGU et al., 2014; FREIRE et al., 2015; FREIRE et al., 2017; BARGHINI, 2018).

A mandioca geralmente é processada de várias formas antes do consumo, e o objetivo da fermentação é torná-la mais digerível e palatável, reduzindo as perdas pós-colheita. A fermentação pode aumentar o valor nutritivo e comercial, reduzir a toxicidade em função da presença de glicosídeos cianogênicos, melhorando a segurança do consumo. Também confere propriedades como redução da temperatura e pico de colagem, viscosidade, e aumento no conteúdo de proteínas (AGOSTINI, 2006; AVANCINI, 2007; PADONOU et al., 2009 e 2010; PENIDO et al., 2019).

A fécula da mandioca e o polvilho doce são produtos derivados da mandioca que se diferem pelo processo de fermentação. A fécula não é fermentada e o amido extraído é seco em fornos, já o polvilho doce é fermentado e seco ao sol por um período curto (CARVALHO et al., 1996; LACERDA, 2006). A diferença para o polvilho azedo se dá pelo tempo de fermentação mais prolongado gerando um teor de acidez mais alto (LACERDA, 2006; PENIDO, 2013).

De acordo com a legislação brasileira a fécula é o produto amiláceo extraído das partes subterrâneas comestíveis dos vegetais, como exemplo, a mandioca. O polvilho é derivado da fécula da mandioca e é definido de acordo com seu teor de acidez titulável em polvilho azedo e polvilho doce (BRASIL, 1978a). Para o polvilho azedo, a acidez titulável deve ser de no máximo 5,0 mL NaOH 1N/100g de matéria seca (BRASIL, 1978b). As resoluções 12 da CNNPA (Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos) (BRASIL, 1978a) e RDC 263 da ANVISA (BRASIL, 2005) definem parâmetros físico-químicos para determinar a qualidade do polvilho doce e azedo, que são umidade (14%), resíduo mineral (0,50%), acidez para o polvilho doce de 1 mL de solução N% (p/v) no máximo e 5 mL de solução N% (p/v) para polvilho azedo e amido (80%).

O polvilho azedo é um produto típico brasileiro de grande consumo, principalmente nos estados de Minas Gerais, Santa Catarina, Paraná e São Paulo, sendo geralmente produzido em indústrias rurais de pequeno e médio porte (LACERDA, 2006). O polvilho azedo é um alimento fermentado tradicional, usado na fabricação de diversos produtos, como exemplo, biscoito de polvilho azedo, pão de queijo, rosquinha de queijo, pão de milho, e alimentos intencionalmente sem glúten, devido a sua capacidade de expansão, viscosidade e ausência de glúten (PUTRI et al., 2012; PENIDO et al., 2018).

A fermentação do amido extraído da mandioca para produção de polvilho azedo é usada em muitos locais no Brasil. A fermentação é um importante processo técnico da mandioca. O processo de obtenção do polvilho azedo começa pela extração do amido, em que ocorre a lavagem e processo mecânico de descascar e ralar a mandioca na água formando uma pasta, liberando assim os grânulos de amido, processo que dura de 2 a 6 dias. Essa pasta é, então, colocada em tanques onde ocorre a fermentação por uma média de 20 a 70 dias. Passado o período de fermentação nos tanques, é colocado sob a luz solar para secar e chegar ao aspecto de farinha, com geração de açúcares e alterações no teor de acidez, por 8 a 14h dependendo das condições climáticas (LACERDA et al., 2005; AVANCINI, 2007; PUTRI et al., 2012; PEREIRA, 2016; ROSA et al., 2016; PENIDO et al., 2018). O processo de obtenção do polvilho azedo se torna dependente do clima e temperatura para ser realizado (AVIARA et al., 2010).

Esse processo de fermentação é considerado empírico, um processo misto com fases semi-sólida e submersa, pois depende da cultura de cada região em relação ao tempo de fermentação (CARVALHO et al., 1996; GOMES, SILVA & RICARDO, 2005; AVANCINI, 2007; PENIDO, 2013).

3.3.5. Composição microbiana do polvilho azedo

Durante a fermentação espontânea, as alterações que ocorrem na fécula são atribuídas aos microrganismos provenientes das matérias-primas da água, dos taques de fermentação, utensílios utilizados e em decorrência de uma sucessão de microrganismos que ocorre naturalmente durante o processo de produção do polvilho. Que resulta em uma microbiota contendo bactérias com prevalência de BAL e leveduras (CEREDA, 1973; CARVALHO et al., 1996; AVANCINI, 2007; LACERDA et al., 2005 e 2011; PENIDO et al., 2018).

Estudos descreveram a composição microbiana encontrada após a fermentação da mandioca. Foram relatadas a presença de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, e leveduras como *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, *Pichia scutulata*, *Kazachstania exigua*, *Candida humilis*, *Geotrichum fragrans* e *Candida ethanolica* (CEREDA, 1973; CARVALHO et al., 1996 e 1999; LACERDA et al., 2005 e 2011; KOSTINEK et al., 2007; PUTRI et al., 2012; PENIDO et al., 2018). *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus brevis*, se destacam e são usadas no presente trabalho.

Um estudo realizado recentemente identificou a composição microbiana da mandioca extraída e processada em Minas Gerais, com predominância de BAL, sendo 79 isolados (5,8 a 7,9 log₁₀ UFC.g) e 23 isolados de leveduras (1,7 a 7,8 log₁₀ UFC.g). Dentre BAL, *Lactobacillus brevis* (n=17 que corresponde a 21,5%), *Lactobacillus fermentum* (n=12 que corresponde a 15,2%) e *Lactobacillus plantarum* (n=11 que corresponde a 13,9%) se destacaram como sendo as principais espécies encontradas do total pertencentes ao gênero *Lactobacillus*. As demais espécies identificadas foram *Enterococcus faecium* (16,46%); *Weissella cibaria* (3,80%); *Lactococcus garvieae* (3,80%) e *Leuconostoc mesenteroides* (1,27%) (PENIDO, 2013; PENIDO et al., 2018).

A presença de BAL na fermentação que produzem ácidos orgânicos, proporciona ao polvilho azedo uma característica de alimentos com pH mais baixo, em todo de 3,46 a 4,01, favorecendo o crescimento de leveduras e inibindo o crescimento de bactérias patogênicas e deteriorantes (PENIDO et al., 2018) pela ação antagonista mediante a produção de compostos antimicrobianos, como ácido láctico, bacteriocinas, etanol, metanol, ácido acético e ácido butírico (ANYOGU et

al., 2014; ROSA et al., 2016). O principal ácido resultante da fermentação é o ácido láctico que tem um papel importante nas características físico-químicas do polvilho azedo (KOSTINEK et al., 2007; PUTRI et al., 2012; FREIRE et al., 2015).

3.4. Preservação de bactérias ácido-lácticas por liofilização (*freeze drying*)

Para a utilização de culturas probióticas na tecnologia de fabricação de produtos alimentícios, culturas iniciadoras e indústria farmacêutica, as mesmas devem ser empregadas com base nas suas características tecnológicas e critérios para seleção de estirpes probióticas (SAARELA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2002).

Alguns fatores interferem na viabilidade dos microrganismos probióticos, como exemplo, a presença de nutrientes como promotores de crescimento, concentração de açúcares que está relacionado à pressão osmótica, o teor de oxigênio dissolvido e disponibilidade do mesmo através do uso de embalagens, temperatura de armazenamento, números de células viáveis no produto final, o meio de secagem e temperatura do processo (BALLUS et al., 2010; PINTO et al., 2015).

A liofilização é considerada uma das técnicas mais utilizadas e eficientes na preservação de microrganismos, pois, mantém alta viabilidade das células, possibilitando uma produção industrial em larga escala, tornando um produto mais competitivo comercialmente pela praticidade (MORGAN et al., 2006; CHAMPAGNE & FUSTIER, 2007; BOLLA et al., 2010; EDWARD et al., 2011; PERDANA et al., 2013). Além disso, as atividades enzimáticas estão inativas, em função da retirada de água no meio, e as reações químicas de oxidação ocorrem em pequena quantidade (YAMAGUCHI et al., 2017).

A liofilização é um dos métodos preferidos para transportar e armazenar culturas de microrganismos probióticos em longo prazo, o que viabiliza sua estabilidade e transporte à temperatura ambiente, dispensando câmaras frias, ocupando menos espaço (MORGAN et al., 2006).

É uma técnica de desidratação que ocorre em condições especiais de pressão e temperatura, possibilitando que a água previamente congelada passe diretamente para o estado gasoso, estabilizando o produto através da redução da atividade de água (Aa) (GARCIA, 2009; YAMAGUCHI et al., 2017; ARCHACKA et

al., 2019). Por ser uma técnica de desidratação por sublimação, tem como vantagem a preservação das características primárias comparando com processos que utilizam calor para a retirada da água, o que justifica o uso em BAL por serem sensíveis ao calor (YAMAGUCHI et al., 2017).

O produto obtido após o processo de secagem por liofilização tem aspecto seco, poroso e apresenta avidez pela água facilitando a reidratação, e pode ser transportado sem a necessidade de refrigeração, desde que devidamente armazenado em embalagem que garanta a inexistência de oxigênio e umidade atmosférica (YAMAGUCHI et al., 2017).

As etapas do processo de liofilização compreendem 3 fases:

- 1) Congelamento: o produto é previamente congelado a temperaturas abaixo de 0°C, normalmente se utiliza nitrogênio para congelar, chegando a aproximadamente 18°C negativos, de modo que a água total presente no alimento fique no estado sólido (GONÇALVEZ, 2015; FORSSTEN, SINDELAR & OUWEHAND, 2011; YAMAGUCHI et al., 2017). O modo de congelamento também influencia no resultado pós-liofilização.

Congelamentos rápidos formam pequenos cristais e conseqüentemente poros pequenos e mais numerosos, já o congelamento lento forma cristais maiores com poros maiores. A formação de grandes cristais de gelo pode causar danos na membrana celular das bactérias e são danos irreparáveis causando redução do número de células sobreviventes ao processo de liofilização. Portanto o congelamento rápido com formação de pequenos cristais é mais favorável neste processo (MORGAN et al., 2006; BROECKX et al., 2016).

- 2) Secagem primária (sublimação): dentro do equipamento agora devidamente vedado á vácuo o processo de sublimação consiste em transformar a água congelada não ligada em estado gasoso, devido a queda de pressão e aumento da temperatura (MORGAN et al., 2006; FORSSTEN, SINDELAR & OUWEHAND, 2011; JALALI et al., 2012; BROECKX et al., 2016; YAMAGUCHI et al., 2017).
- 3) Secagem secundária (dessorção): é a etapa secundária da eliminação do restante da água residual da etapa anterior, ou seja, retira a água combinada (fortemente ligada ao substrato) do produto, reduzindo os

valores para menos de 2% do teor de umidade (MORGAN et al., 2006; JALALI et al., 2012; BROECKX et al., 2016; YAMAGUCHI et al., 2017).

O procedimento de liofilização impõe estresse ambiental sobre as células bacterianas, em função do congelamento e formação de cristais de gelo, secagem, exposição prolongada a baixa Aa e reidratação. Alguns aspectos influenciam no produto final liofilizado, como, a resistência intrínseca, concentração inicial (UFC.g ou mL), condições de crescimento, meio de secagem, tipos de crioprotetores usados, taxa de congelamento, armazenamento (tempo, temperatura, embalagem, oxigênio, umidade) e reidratação, sendo que todos estes parâmetros são dependentes da estirpe (MORGAN et al., 2006; EDWARD et al., 2011; MARTÍN et al., 2015).

Todo processo tem vantagens e desvantagens. As desvantagens da liofilização são os custos para compra dos equipamentos e materiais, gastos de energia, óleos para a bomba, câmara de resfriamento ou nitrogênio líquido e tempo. As vantagens da liofilização sobressaem às desvantagens em relação ao produto final gerado é a qualidade, redução do espaço de armazenamento, a inexistência de restrição do produto a que pode passar pelo processo, e ajuda a reter as propriedades biológicas por mais tempo preservando a coloração, odor e sabor (FELLOEWS, 2000; BURGAIN et al., 2011; ILANGO, PANDEY & ANTONY, 2016).

Devido os possíveis danos que o processo de liofilização pode vir a causar na membrana celular dos microrganismos, o uso de crioprotetores pode ser uma alternativa para minimizar esses efeitos (FORSSTEN, SINDELAR & OUWEHAND, 2011; KANMANI et al., 2011; MARTÍN et al., 2015). Os crioprotetores podem melhorar a viabilidade das bactérias durante o processo de liofilização, congelamento e armazenamento, evitando a redução do número de células viáveis e prazo de validade do produto liofilizado (MORGAN et al., 2006; ANAL & SINGH, 2007; STRASSER et al., 2009; ASTESANA et al., 2018).

Além da ação sobre as bactérias durante os processos de secagem, os crioprotetores também influenciam na condição de sobrevivência das bactérias probióticas no TGI, aumentando a resistência à ação de enzimas ácidas, bile e HCl e alterar a capacidade de adesão à mucosa intestinal (BROECKX et al., 2016; HUANG et al., 2017; LIAO et al., 2017; ARCHACKA et al., 2019).

A adição previamente destes crioprotetores vem sendo estudada ao longo dos anos e diversos autores avaliaram diferentes tipos de crioprotetores de fontes protéicas e carboidratos, como, soro de leite, glicose e sacarose, glicerol, leite em pó desnatado, extrato de levedura, maltodextrina, leite UHT e trealose (STRASSER et al., 2009; SILVA et al., 2014; BOLLA et al., 2011; EDWARD et al., 2011; JALALI et al., 2012; MARTÍN et al., 2015; ILANGO, PANDEY & ANTONY, 2016; ASTESANA et al., 2018; ARCHACKA et al., 2019).

Leite em pó e soro de leite exercem efeitos de crioproteção pela formação de uma camada de revestimento na superfície celular por interações hidrofóbicas entre as células e as proteínas do leite, estabilizando a membrana (KHEM, SMALL & MAY, 2016; ARCHACKA et al., 2019). Muitos autores relatam o papel protetor das proteínas do leite nas células probióticas durante a digestão *in vitro* simulada (DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012; WURTH et al., 2015). Relatam que esse efeito protetor se dá pelas propriedades de “buffer” (capacidade tamponante) que reveste as células bacterianas e protege da desnaturação e hidrólise enzimática do suco estomacal, descobrindo a superfície bacteriana para interação com a mucosa intestinal e favorece o trânsito de bactérias até o cólon (PIMENTEL-GONZÁLES et al., 2009; COOK et al., 2012; ARCHACKA et al., 2019).

Dentre os diversos tipos de crioprotetores usados em pesquisas, o leite em pó desnatado se destaca pelas condições favoráveis de preservação microbiana apresentadas após o processo de liofilização e, portanto, foi o mesmo utilizado no trabalho (MORGAN et al., 2006; JALALI et al., 2012; PINTO et al., 2015; ARCHACKA et al., 2019).

A temperatura de armazenamento do material liofilizado também é um ponto importante a ser analisado. O armazenamento em temperaturas de refrigeração ou congelamento geralmente são economicamente desfavoráveis devido aos altos custos de manutenção, assim, soluções e comprovação da viabilidade que garantem a estabilidade em temperatura ambiente é um campo promissor de estudo (HUANG et al., 2017).

Numerosos estudos *in vitro* estão focados na avaliação de propriedades probióticas de células livres em vez de células que passam por processo para obtenção de um produto comercial e são poucos os que avaliam na forma liofilizada

(BOLLA et al., 2011; CARASI et al., 2014; VALERIANO, PARUNGAO-BALOLONG & KANG, 2014; ILANGO, PANDEY & ANTONY, 2016).

Em virtude da industrialização e evolução, a necessidade de estudos que avaliam a capacidade probiótica de BAL na sua forma liofilizada é de suma importância. Estirpes probióticas são estudadas e exploradas comercialmente em diferentes produtos ao redor do mundo, mas, são pouquíssimos os estudos que avaliam o processo de liofilização e suas interferências na capacidade de manter essas propriedades probióticas mesmo após processo de secagem. Até onde foi possível encontrar, não se teve conhecimento de outro estudo que avaliou o processo de liofilização sobre as propriedades probióticas de estirpes isoladas utilizadas no presente trabalho do kefir de leite e de água e do polvilho azedo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (MICROAL) e Microbiologia Industrial e Biocatálise (LAMIB) do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Este projeto é cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) - A2FDC80.

4.1. Microrganismo

As estirpes de BAL isoladas de grãos do kefir de leite *Leuconostoc mesenteroides* 9U2, *Lactococcus lactis* 3P, *Lactobacillus satsumensis* 23P3, e kefir de água, *Lactobacillus perolens* 11P3 e *Lactobacillus perolens* 17P2, foram cedidas pela professora Elisabeth Neumann, previamente isoladas e identificadas molecularmente ao nível da espécie por 16S-23S rRNA ARDRA no Departamento de Biologia geral do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, como biomassa celular concentrada em 20% de glicerol a -24 °C (Tabela 1).

As estirpes de BAL, isoladas do polvilho azedo, provenientes da fermentação da mandioca coletado em Formiga, Minas Gerais (MG), Brasil, das espécies: *Lactobacillus brevis* A5SC3 e *Lactobacillus plantarum* A95SC2, foram cedidas pela doutora Fernanda Penido previamente isoladas e identificadas molecularmente por sequenciamento parcial da região 16S do gene do rRNA, no Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG, como biomassa celular concentrada em 10% de glicerol a -24 °C (Tabela 1).

Tabela 1 Estirpes de BAL

Estirpes	Classificação ^a	Código
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KLDI	9U2
<i>Lactococcus lactis</i>	KLCU	3P
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	KLSA	23P3
<i>Lactobacillus perolens</i>	KASA	11P3
<i>Lactobacillus perolens</i>	KACU	17P2
<i>Lactobacillus brevis</i>	PA	A5SC3
<i>Lactobacillus plantarum</i>	PA	A95SC2

a: KLDI: kefir de leite de Divinópolis; KLCU: kefir de leite de Curitiba; KLSA: kefir de leite de Salvador; KASA: kefir de água de Salvador; KACU: kefir de água de Curitiba; PA: Polvilho azedo de Formiga/MG.

Fonte: ICB/UFMG – Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais (MG, Brasil); LAMIB/UFMG – Laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise/Universidade Federal de Minas Gerais (MG, Brasil).

4.2. Bactérias indicadoras

As bactérias patogênicas indicadoras de efeito inibitório *Bacillus cereus* CCCD-B001, *Escherichia coli* ATCC®-25922™, *Listeria monocytogenes* ATCC®-19115™, *Salmonella* Typhimurium CCCb-5004 e *Staphylococcus aureus* CCCb- 5007 foram utilizadas para avaliação da atividade inibitória (Tabela 2).

Tabela 2 Bactérias patogênicas indicadoras

Estirpes	Código	Sorotipo	Fonte ^a
<i>Bacillus cereus</i>	CCCD-B001	-	ICB/UFMG
<i>Escherichia coli</i>	ATCC®-25922™	-	ATCC®
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC®-19115™	4b	Fiocruz
<i>Salmonella</i> Typhimurium	CCCb-5004	-	ICB/UFMG
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCCb- 5007	-	ICB/UFMG

a: ICB/UFMG – Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais (Minas Gerais, Brasil); Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil).

4.3. Ativação e manutenção das culturas bacterianas

As estirpes de BAL foram inoculadas em caldo MRS (Man, Rogosa & Sharpe, LAB™) e incubadas em aerobiose a 37 °C, por 24 h. Após crescimento obtido com a primeira ativação, foram realizadas mais duas ativações nas mesmas condições.

Para verificação da pureza, da morfologia das células e da confirmação das colônias típicas, as culturas obtidas da terceira ativação foram estriadas por esgotamento em placas contendo MRS ágar (solidificado com 1,5% de ágar) (Ágar bacteriológico Ágar-Ágar, Alphatec®, Paraná) incubadas em aerobiose, 37 °C, por 24 h e realizada a coloração de Gram.

Para a manutenção das culturas puras, foram inoculadas em caldo MRS e incubadas a 37 °C, por 24 h. Posteriormente, alíquotas de 1500µ L foram transferidas para microtubos *Eppendorfs*, adicionadas de 20% de glicerol e armazenadas em freezer (Modelo GSD 32, BOSCH, BHS comercial LTDA, Gerlingen, Alemanha), a 18 °C negativos.

As estirpes das bactérias indicadoras foram inoculadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid™) e incubados em aerobiose a 37 °C, por 24 h. Após crescimento obtido com a primeira ativação, foram realizadas mais duas ativações.

Para verificação da pureza, da morfologia das células e da confirmação das colônias típicas, as culturas obtidas da terceira ativação foram estriadas por esgotamento em placas contendo meios de cultura específicos: PALCAM (Listeria identification ágar base, Himedia®, Índia); BPA (Baird Parker ágar, Acumedia®, Baltimore, Maryland, EUA); RAMBACH® ágar (Meio Cromogênico para *Salmonella*, Merck®, Darmstadt, Alemanha); Ágar MYP base (Mannitol-Egg YolkPolymyxin ágar, Difco®, Maryland, EUA) e EMB ágar (ágar Levine eosina azul de metileno, Biobrás®, Montes Claros, Brasil), incubadas em aerobiose a 37 °C, por 24 h. Posteriormente foi realizada a coloração de Gram.

Para a manutenção, as culturas puras foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 37 °C, por 24 h. Posteriormente, alíquotas de 1500 µL foram transferidas para microtubos *Eppendorfs* adicionadas de 20% glicerol e armazenados em freezer, a 18 °C negativos.

4.4. Teste de atividade inibitória direta por método *Spot-on-the-lawn*

O teste de antagonismo *in vitro* foi realizado utilizando o método *Spot-on-the-lawn* (TAGG et al., 1976), com algumas alterações.

As culturas BAL livres e liofilizadas foram inoculadas por picada, com auxílio de palitos de madeira esterilizados em placas contendo meio MRS ágar 1,5%. Os pontos de inoculação foram posteriormente selados com MRS ágar semi-sólido 1,3%. As placas foram incubadas em aerobiose a 37 °C por 24 h, para formação de botões de crescimento. Em seguida, foi adicionada uma sobrecamada de BHI agar semi-sólido 1,3% inoculado com as estirpes de *B. cereus* CCCD-B001 na proporção de 15 µL em 15 ml, *E. coli* ATCC®-25922™, *L. monocytogenes* ATCC®-19115™, *S. Typhimurium* CCCb-5004 e *S. aureus* CCCb- 5007, na proporção de 75 µL em 15 mL de meio de cultura. As placas foram mantidas em geladeira (Electrolux®, modelo DF52, Paraná, Brasil) por aproximadamente 1 h para completa solidificação e posteriormente incubadas em aerobiose a 37 °C por 24 h.

Os testes foram realizados em duplicata com quatro repetições para as células de BAL livres e duplicata com oito repetições para as BAL liofilizadas. A atividade inibitória das colônias de BAL nos pontos de inoculação foi observada pela presença de halos de inibição medidos com auxílio de paquímetro digital (KingTools® 502.150BL, Minas Gerais, Brasil).

4.5. Contagem de células livres e liofilizadas

Foram realizadas diluições seriadas em 9 mL de BPW (Água Peptonada Tamponada, Micro Med, Isofar©, Rio de Janeiro, Brasil) das estirpes de BAL para células livres (1 mL) e liofilizadas (1 g). Posteriormente, foram transferidas alíquotas de 100 µL de cada diluição para placas contendo MRS ágar 1,5% pelo método *spread plate* (semeadura em superfície) e incubadas em aerobiose a 37 °C por 48 h. Foram realizadas contagens das colônias. Os resultados foram expressos em log UFC.mL⁻¹. Os testes foram realizados em duplicata.

4.6. Simulação *in vitro* do processo de digestão gástrica e intestinal

Para avaliar a sobrevivência de BAL frente a condições fisiológicas similares às encontradas no estômago e intestino humano adaptou-se a metodologia de Annan e colaboradores (2008) e Krasaekoopt & Watcharapoka (2014).

Foi adicionado 1 mL das células livres (10^{10} UFC.mL⁻¹) ou 1 g de BAL liofilizada (10^{10} a 10^{11} UFC.g⁻¹) em 10 mL da solução gástrica (HCl 0,08 mol/L, NaCl 0,2% (p/v) e pepsina 0,3% p/v e pH ajustado para 2,5). Esta mistura foi agitada em vórtex por 10 segundos e incubada por 120 minutos a 37 °C em banho-maria, com posterior coleta de alíquotas nos tempos 0, 60 e 120 minutos. Após o período de incubação, a solução gástrica contendo a cultura de BAL foi centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos. O *pellet* foi recolhido e foi adicionado à 10 mL da solução intestinal simulada (NaH₂PO₄ 0,05 mol/L, sais biliares 0,45 g/L e pancreatina 1 g/L e pH ajustado para 8,0). Essa solução intestinal permaneceu incubada nas mesmas condições anteriores durante 120 minutos, com posterior coleta das alíquotas nos tempos 60 e 120 minutos. Ambas as soluções foram preparadas no dia do uso e esterilizadas com membrana de poro 0,45µm (MILLEX®-HV-PVDF, Irlanda). Ao final de cada período de incubação, realizou-se a contagem das células livres ou liofilizadas seguindo a metodologia *spread plate* descrita no item 4.5.

O experimento foi conduzido em dois ensaios independentes e em duplicata para as células livres e quatro ensaios em duplicata para as células liofilizadas.

4.7. Liofilização

Para a liofilização, das sete estirpes testadas foram selecionadas três estirpes, que apresentaram melhor espectro de ação pelo teste de antagonismo direto e que apresentaram melhor taxa de sobrevivência à passagem no TGI simulado, após analisar estatisticamente ambos os testes. As estirpes selecionadas foram: *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 (kefir de leite), *Lactobacillus perolens* 11P3 (kefir de água) e *Lactobacillus brevis* A5SC3 (polvilho azedo).

A ativação das BAL selecionadas previamente congeladas foi realizada em tubos contendo 10 mL de caldo MRS, que foram incubados em aerobiose a 37 °C

por 24 h. Em seguida foram feitos repiques sucessivos no intervalo de 24 h de incubação em 20 mL e 300 mL caldo MRS. Esses volumes foram distribuídos em tubos de polipropileno de 50 mL e centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi adicionado de 5 mL de BPW e centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos. Descartou-se novamente o sobrenadante e sobre o *pellet* foram adicionados 3 mL de BPW.

O agente crioprotetor utilizado foi uma solução de leite em pó desnatado 10% p/p (Molico, Nestle®, São Paulo, Brasil) de acordo com Archacka e colaboradores (2019). O volume adicionado foi de 20 mL de solução crioprotetora.

Para o processo de liofilização, os tubos de polipropileno foram congelados em nitrogênio líquido e as amostras colocadas em liofilizador (Liotop L101, Liobras, Brasil) sob vácuo, à -50 °C, por 96 horas. Os tubos de polipropileno contendo as amostras liofilizadas foram vedados e estocados em dessecador à temperatura ambiente.

O teste foi realizado com três repetições. Antes e após o processo de liofilização foram feitas contagem do número de células viáveis de acordo com o método descrito no item 4.5.

4.8. O efeito da liofilização e a viabilidade das BAL

Após o processo de liofilização a ação antagonista e a resistência a passagem no TGI simulado das estirpes selecionadas foram novamente avaliadas. Avaliou-se também a viabilidade ao longo do tempo de armazenamento, a fim de observar o comportamento e avaliar se o processo de liofilização, se de fato, influência ou não nos parâmetros analisados, utilizando-se os mesmos testes descritos em 4.4 e 4.6.

Para melhor andamento dos experimentos, toda a dinâmica do trabalho foi focada somente nas estirpes *Lactobacillus perolens* 11P3, *Lactobacillus brevis* A5SC3 e *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 das matrizes kefir de água, polvilho azedo e kefir de leite, respectivamente.

4.9. Efeito do armazenamento sobre a viabilidade das BAL

Em relação à estabilidade durante o armazenamento, foram realizadas contagens do número de células viáveis das estirpes liofilizadas nos tempos de 1, 7, 15, 30 e 60 dias, utilizando-se a metodologia descrita em 4.5. As contagens foram realizadas em três repetições e em duplicata.

4.10. Análise estatística

Para análise estatística realizou-se teste de normalidade como ponto de partida para as demais análises. Após, empregou-se testes de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey-HSD ($p < 0,05$) para o teste antagonista direto e simulação *in vitro* do TGI, célula livre e liofilizada.

Para critério de comparação entre os resultados obtidos antes e após a liofilização simulando o TGI e teste de antagonismo foi feito teste ANOVA para medidas repetidas ($p < 0,05$) e teste T-pareado para teste de antagonismo antes e depois da liofilização e viabilidade, usando o programa SPSS 15.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Atividade Inibitória teste de antagonismo *in vitro* célula livre

Todas as estirpes de BAL isoladas do kefir de leite e de água e do polvilho azedo apresentaram efeito antagônico frente a bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas, através da visualização de halos ao redor das colônias (Figura 3).

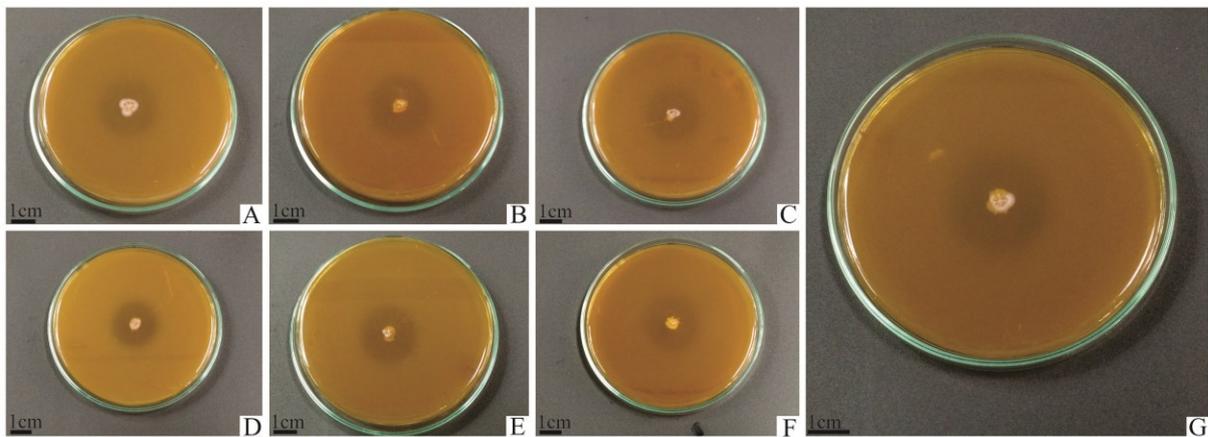


Figura 3 Halo de inibição de BAL contra bactérias indicadoras patogênicas. (A) *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 frente a *S. aureus*; (B) *Lactobacillus plantarum* A95SC2 frente a *S. aureus*; (C) *Lactobacillus satsumensis* 23P3 frente a *B. cereus*; (D) *Lactococcus lactis* 3P frente a *L. monocytogenes*; (E) *Lactobacillus perolens* 17P2 frente a *L. monocytogenes*; (F) *Lactobacillus brevis* A5SC3 frente a *S. Typhimurium*; e (G) *Lactobacillus perolens* 11P3 frente a *E. coli*

Os valores médios dos halos de inibição são apresentados na tabela 3. Foram feitas análises estatísticas entre as estirpes de cada matriz de isolamento, entre as matrizes de isolamento e de avaliando de forma individual cada estirpe frente as bactérias indicadoras testadas. Não foram observadas diferenças significativas ($p \geq 0,05$) em nenhum dos parâmetros avaliados. Esses resultados demonstram que, de igual modo, todas exercem efeito antagônico.

Tabela 3 Médias dos halos de inibição (mm) do teste antagonista direto, de BAL, isoladas do kefir de leite, água e do polvilho azedo frente a bactérias patogênicas indicadoras

BAL	Bactérias indicadoras*				
	SA	BC	LM	ST	EC
Kefir de Leite					
<i>L. mesenteroides</i> 9U2	21,50 ± 2,65 ^{aA}	23,13 ± 1,51 ^{aA}	21,81 ± 2,33 ^{aA}	19,94 ± 3,91 ^{aA}	21,13 ± 1,31 ^{aA}
<i>L.c. lactis</i> 3P	20,82 ± 1,57 ^{aA}	20,92 ± 3,12 ^{aA}	23,27 ± 0,60 ^{aA}	21,08 ± 1,38 ^{aA}	18,45 ± 1,50 ^{aA}
<i>L. satsumensis</i> 23P3	19,44 ± 0,73 ^{aA}	19,85 ± 2,83 ^{aA}	21,09 ± 1,31 ^{aA}	20,43 ± 2,07 ^{aA}	17,89 ± 1,71 ^{aA}
Kefir de Água					
<i>L. perolens</i> 11P3	18,10 ± 1,01 ^{aA}	22,89 ± 2,79 ^{aA}	22,46 ± 1,52 ^{aA}	19,09 ± 1,65 ^{aA}	18,29 ± 1,00 ^{aA}
<i>L. perolens</i> 17P2	19,78 ± 3,54 ^{aA}	21,95 ± 3,90 ^{aA}	21,96 ± 2,27 ^{aA}	19,71 ± 1,74 ^{aA}	18,03 ± 1,20 ^{aA}
Polvilho Azedo					
<i>L. brevis</i> A5SC3	20,19 ± 1,10 ^{aA}	21,57 ± 2,31 ^{aA}	20,54 ± 2,11 ^{aA}	20,11 ± 2,20 ^{aA}	20,27 ± 2,16 ^{aA}
<i>L. plantarum</i> A95SC2	18,56 ± 2,07 ^{aA}	18,99 ± 2,42 ^{aA}	20,02 ± 2,62 ^{aA}	18,88 ± 2,83 ^{aA}	20,93 ± 3,64 ^{aA}

Atividade antagonica em termos de halo de inibição (mm) e desvio padrão de quatro repetições em duplicata pelo método *spot-on-the-lawn*.

*Bactérias indicadoras SA – *Staphylococcus aureus* CCCb- 5007, BC – *Bacillus cereus* CCCD-B001, LM – *Listeria monocytogenes* ATCC®-19115™, ST- *Salmonella* Typhimurium CCCb-5004 e EC- *Escherichia coli* ATCC®-25922™.

a, b, c Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas são diferentes (Tukey $p < 0,05$).

A,B,C Médias na mesma linha seguidas por letras distintas são diferentes (Tukey $p < 0,05$).

Esses resultados podem indicar que, independente da matriz de origem, as bactérias ácido-lácticas analisadas no estudo exercem de forma semelhante efeito antagonico frente a bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas.

Um estudo avaliando as BAL do gênero *Lactobacillus* isolados de grãos de kefir de leite demonstraram efeito inibitório para *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* e *E. coli* com valores de halos de inibição de 4,7 mm, 3,9 mm, 3,6 mm e 4,1 mm respectivamente, usando 2 µL de BAL e 200 µL de cultura indicadora (DIAS, SILVA & TIMM, 2018). No presente estudo também foi encontrado efeito inibitório usando estirpes do mesmo gênero, com valores médios dos halos de inibição de 19,44 mm para *S. aureus*, 21,09 mm para *L. monocytogenes*, 20,43 mm para *S. Typhimurium* e 17,89 mm para *E. coli*. A possível explicação para a diferença nos valores dos halos encontrados pode ser devido à concentração mais baixa (75 µL) inoculada das bactérias indicadoras para mensuração dos resultados utilizada no presente trabalho. Ostrosky e colaboradores (2008) avaliando métodos

que demonstram capacidade antagônica e concentração mínima inibitória de plantas medicinais relatam que as concentrações usadas podem ser atribuídas a vários fatores, dentre eles, o teste antagônico utilizado, a estirpe utilizada e a quantidade de inóculo testado.

A diversidade de resultados encontrados na literatura e comparados com o presente estudo é explicada pela existência de fatores que interferem diretamente na capacidade antagonista de BAL como a dose do inóculo indicador, a quantidade e o tipo de BAL utilizada, a composição do meio, entre outros (DUARTE et al., 2013).

Outro estudo avaliando as mesmas estirpes de BAL usadas no presente estudo isoladas do kefir de leite e de água (*L. satsumensis* 23P3, *L. perolens* 11P3 e *L. perolens* 17P2, respectivamente) demonstrou efeito antagônico contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os valores de halos de inibição apresentados foram superiores à 25 mm para *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* e *E. coli*, usando 5 µL das estirpes de BAL e 200µL das bactérias indicadoras, valores próximos dos halos de inibição apresentados pelos autores foram encontrados no presente estudo, entre 17,89 a 22,89 mm (Tabela 3), usando concentrações mais baixas de BAL e bactérias indicadoras. Podemos inferir que mesmo com os valores de halos próximos, os resultados são proporcionais às quantidades usadas de inóculo (ZANIRATI et al., 2014).

Até o presente momento são escassos os trabalhos que avaliam o efeito antagonista de BAL isoladas do polvilho azedo (ADEBAYO, ADERIYE & AKPOR, 2013; ANYOGU et al., 2014; PENIDO et al., 2019). Com os resultados obtidos no presente trabalho é possível demonstrar que a obtenção de BAL com potencial antimicrobiano pode ser feita a partir de diversas matrizes, o que abre um leque de possibilidades para a indústria farmacêutica e/ou alimentícia.

Penido e colaboradores (2019), usando as mesmas estirpes de BAL isoladas do polvilho azedo, *L. brevis* A5SC3 e *L. plantarum* A95SC2, observou efeito antagônico frente a bactérias patogênicas (*B. cereus*, *E. coli* e *S. Typhimurium*) pelo mesmo método direto *spot-on-the-lawn*. *L. plantarum* A95SC2 apresentou halos de inibição para *B. cereus* (de 3 a 10 mm); *E. coli* (de 23 a 33 mm); e *S. Typhimurium* (de 43 a 53 mm). *L. brevis* A5SC3 apresentou halos para *B. cereus* (de 14 mm); *E. coli* (de 6 a 42 mm) e *S. Typhimurium* (de 20 a 39 mm). Os valores de halos de

inibição obtidos por este estudo foram superiores para *B. cereus*, com valores de 18,99 mm e 21,57 mm (*L. plantarum* A95SC2 e *L. brevis* A5SC3, respectivamente) e valores aproximados ou dentro da faixa acima citada para as bactérias patogênicas *E. coli* e *S. Typhimurium*.

Outro estudo investigou o efeito antagonista de BAL isoladas da mandioca, dentre eles, *L. brevis* e *L. plantarum*, usando o método de ensaio de poço contra *Shigella flexi*, *Bacillus subtilis* e *E. coli* sendo observado atividade inibitória contra estes patógenos. *L. plantarum* apresentou halo de inibição frente a *E. coli* de 7,3 mm e *L. brevis* de 10 mm. Os autores atribuíram esse efeito à presença de bacteriocinas produzidas durante a fermentação e por meio de competição (ADEBAYO, ADERIYE & AKPOR, 2013). Anyogu et al. (2014) também avaliaram isolados de BAL obtidos da fermentação submersa de mandioca, usando o método de difusão em ágar, para quatro estirpes de *L. plantarum* frente a *B. cereus*, *E. coli*, *S. Typhimurium* e *S. aureus*, e obtiveram resultados apresentando valores para *B. cereus* (2 a 4 mm); *E. coli* e *S. Typhimurium* (0,5 a 1 mm) e *S. aureus* (1 a 2 mm). Para este efeito antagônico os autores atribuíram à presença de ácidos produzidos durante o processo de fermentação. No presente estudo também foi observado ação inibitória das duas estirpes de BAL isoladas do polvilho azedo, com valores de halo de 20,27 mm e 20,93 mm para *L. brevis* A5SC3 e *L. plantarum* A95SC2, respectivamente, usando método antagônico direto. No teste realizado no presente trabalho, os valores de inóculo de BAL não foram quantificados em função da metodologia usada e a concentração de bactérias indicadoras foram menores (75 µL e 15 µL). É possível inferir que o tipo de método usado não interfere nos resultados referentes à capacidade antagonista das estirpes de BAL isoladas do polvilho em relação às bactérias patogênicas testadas, mas, pode interferir nos valores dos halos em função da quantidade de inóculo usado (OSTROSKY et al., 2008; DUARTE et al., 2013).

Em concordância com os resultados encontrados neste trabalho, estudos anteriores demonstraram efeito antagonista de BAL (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus* ssp) isoladas do kefir e de diferentes alimentos fermentados como cacau, salsicha, caium, bebidas fermentadas, condimentos para comidas e isoladas de fezes de crianças, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, atribuindo o efeito antagonista a presença de metabólitos produzidos

pelas BAL, indicando também que a matriz não interfere nos efeitos antagonistas apresentados (MEDRANO, PÉREZ & ABRAHAM, 2008; GOLOWCZYC et al., 2008; ANSELMO et al., 2010; COSTA et al., 2012; RAMOS et al., 2013; GAUTAM, SHARMA & AHLAWAT, 2014; HANDA & SHARMA, 2016).

5.2. Simulação *in vitro* do processo de digestão gástrica e intestinal célula livre

Todas as estirpes de BAL isoladas do kefir de leite e de água e do polvilho azedo foram resistentes às condições simuladas do trato gastrointestinal (Tabela 4).

Tabela 4 Sobrevivência de BAL livre (\log_{10} UFC.mL⁻¹) submetidas à solução simulada gástrica (SGS) e intestinal (SIS)

BAL	SGS			SIS		% de Sobrevivência em log
	0min	60min	120min	60min	120min	
Kefir de Leite						
<i>L. mesenteroides</i> 9U2	10,19 ±0,07 ^{aA}	10,36 ±0,03 ^{aA}	10,19 ±0,05 ^{aA}	10,25 ±0,11 ^{aA}	10,37 ±0,25 ^{aA}	100%
<i>Lc. lactis</i> 3P3	10,42 ±0,05 ^{aA}	10,24 ±0,10 ^{aA}	10,29 ±0,27 ^{aA}	10,28 ±0,33 ^{aA}	9,86 ±0,40 ^{aA}	95%
<i>L. satsumensis</i> 23P3	10,24 ±0,03 ^{aA}	10,19 ±0,07 ^{aA}	10,25 ±0,42 ^{aA}	10,30 ±0,28 ^{aA}	10,26 ±0,33 ^{aA}	100%
Kefir de Água						
<i>L. perolens</i> 11P3	10,04 ±0,57 ^{aA}	9,84 ±0,67 ^{aA}	9,85 ±0,74 ^{aA}	9,92 ±1,02 ^{aA}	10,14 ±0,73 ^{aA}	100%
<i>L. perolens</i> 17P2	10,30 ±0,16 ^{aA}	10,29 ±0,01 ^{aA}	10,02 ±0,24 ^{aA}	9,85 ±0,32 ^{aA}	9,91 ±0,20 ^{aA}	96%
Polvilho Azedo						
<i>L. brevis</i> A5SC3	10,31 ±0,06 ^{aA}	10,37 ±0,10 ^{aA}	10,28 ±0,06 ^{aA}	10,42 ±0,13 ^{aA}	9,97 ±0,50 ^{aA}	97%
<i>L. plantarum</i> A95SC2	10,13 ±0,08 ^{aAB}	10,25 ±0,08 ^{aA}	10,13 ±0,18 ^{aAB}	10,33 ±0,14 ^{aAB}	10,34 ±0,08 ^{aB}	100%

Sensibilidade a passagem em condições gastrointestinais simuladas em Log₁₀ e desvio padrão de determinações de duas repetições em duplicata.

a, b, c Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas são diferentes (Tukey p<0,05).

A,B,C Médias na mesma linha seguidas por letras distintas são diferentes (Tukey p<0,05).

As estirpes de BAL do kefir e do polvilho azedo apresentaram resistência às condições gastrointestinais simuladas, demonstrando capacidade de se manterem viáveis com concentrações finais de 9 a 10 UFC.mL⁻¹. Não houve diferença estatística entre as matrizes de isolamento testadas. Estudos avaliando BAL

isoladas de outras matrizes alimentares, usando outros métodos de análise, também encontraram resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo em relação às condições de passagem no TGI, e demonstram que a matriz alimentar pode não interferir na capacidade de sobrevivência (SANTOS et al., 2003; GOLOWCZYC et al., 2008; ZAGO et al., 2011; COSTA et al., 2013; RAMOS et al., 2013; HANDA & SHARMA, 2016; ILANGO, PANDEY & ANTONY, 2016; GUIMARÃES et al., 2018).

Nos resultados apresentados, houve diferença estatística nos tempos 60min da SGS e 120min da SIS para a estirpe *L. plantarum* A95SC2. Apesar da diferença estatística a variação dos dados foi mínima, sendo possível observar pelo mesmo valor do DP ($\pm 0,08$) nos dois tempos que demonstra que estão mais próximos da média, não refletindo a realidade do processo de sensibilidade visto que obteve 100% de sobrevivência ao final do teste realizado.

Algumas estirpes apresentaram 100% de sobrevivência nas condições expostas (*L. mesenteroides* 9U2, *L. satsumensis* 23P3, *L. perolens* 11P3 e *L. plantarum* A95SC2) (Tabela 4), o que indica que essas, apresentaram resultados promissores e podem ser empregadas como potenciais microrganismos probióticos. Não houve diferença significativa entre as matrizes de isolamento testadas, demonstrando que não há influência da matriz alimentar de origem das estirpes sobre a resistência às condições simuladas do TGI.

É possível observar que BAL do gênero *Lactobacillus* obtiveram melhores resultados em relação a resistiram às condições simuladas do TGI no presente estudo, demonstrando novamente, o que já vem sendo descrito, que esse gênero é normalmente o mais promissor com características probióticas (AGALIYA & JEEVARATNAM, 2013). *Lc. lactis* 3P, *L. perolens* 17P2 e *L. brevis* A5SC3 se mantiveram na faixa de 95% a 97% de sobrevivência, o que demonstra que, mesmo com uma redução do número de células viáveis, chegam ao intestino em concentrações desejáveis (10^9 UFC.g ou mL).

BAL usadas no presente estudo foram isoladas de ambientes ácidos devido à fermentação. Após 24h do processo fermentativo do kefir os valores de pH podem chegar a 4,4 para kefir de leite, 4,1 para kefir de água e para o polvilho azedo pH na faixa de 4,0 até 3,4 (BALLUS et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2011; PENIDO et al., 2019) o que pode explicar a capacidade de

sobrevivência as condições expostas no processo de digestão. As BAL com características probióticas sobrevivem melhor na presença de sais biliares secretado no TGI, comparados às BAL que não possuem essas características, mas podem sofrer algum percentual de inibição (Vinderola e Reinheimer, 2003). Um dos mecanismos para explicar a sobrevivência de BAL a presença de sais biliares é que as bactérias com características probióticas apresentam enzimas do grupo das hidrolases que catalisam a reação de desconjugação do sal biliar, hidrolisando a ligação amida entre o ácido biliar e o aminoácido (BALLUS et al., 2010).

Um estudo avaliando BAL isoladas de queijo-de-Minas artesanal (COSTA et al., 2013), sendo também um produto com pH baixo, mostrou que *L. plantarum* possui capacidade de sobreviver a condições expostas pelo TGI (presença de elevada acidez). Os resultados encontrados no presente trabalho referentes à *L. plantarum* A95SC2 corroboram as afirmações feitas por Vinderola e Reinheimer (2003) e com os resultados apresentados por Costa e colaboradores (2013) em relação a capacidade de sobrevivência a um pH simulado do TGI.

Sabir e colaboradores (2010) avaliaram o potencial probiótico de BAL isoladas do kefir turco, *Lactobacillus* ssp. e *Lactococcus lactis* frente a resistência a sais biliares (0,15%, 0,30%, 0,5%) (100µL em 900µL de solução) e pH (1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 e 6,2) (100µL em 10mL de solução). Os autores observaram uma redução do número de células viáveis na faixa de 1-5 log, com 89 a 73% de sobrevivência e com relação aos sais biliares, obtiveram uma faixa de 94 a 60% com perda de 1-4 log. Esses valores são inferiores aos encontrados nesse estudo quando se compara espécies pertencentes aos mesmos gêneros, o que indica que as estirpes desse trabalho apresentam um maior potencial para serem consideradas probióticas.

Leite e colaboradores (2015), utilizando 150 estirpes de BAL isoladas de grãos de kefir brasileiro, avaliaram a capacidade de tolerar a pH 3,0 e diferentes concentrações de sais biliares (0,3, 0,5, 1 e 2%). Os resultados encontrados pelos autores, demonstraram que BAL dos gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc* foram capazes de crescer na presença de até 1% a 2% de sais biliares, e 37 dos isolados resistiram a concentrações de pH mais baixos durante 3h de incubação, com redução de 2 unidades logarítmicas. Espécies dos mesmos gêneros também foram testadas neste trabalho e os resultados foram semelhantes ao encontrado no estudo

acima, mas com uma redução de 1 unidade logarítmica para teste de resistência ao pH (2,5) e com capacidade de sobrevivência a presença de sais biliares.

Estudos avaliando BAL isoladas de outras matrizes alimentares usando outros métodos de análise também demonstraram resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo em relação às condições de passagem no TGI. Não houve diferença estatística entre as matrizes de isolamento observado no presente trabalho, indicando que a matriz não interfere na capacidade de sobrevivência em ambientes com pH mais baixos e presença de sais biliares (SANTOS et al., 2003; GOLOWCZYC et al., 2008; ZAGO et al., 2011; COSTA et al., 2013; RAMOS et al., 2013; HANDA & SHARMA, 2016; ILANGO, PANDEY & ANTONY, 2016; GUIMARÃES et al., 2018).

Não houve diferença significativa entre as estirpes e entre as matrizes de origem em nenhum dos parâmetros avaliados. As estirpes de BAL isoladas do kefir de leite, água e polvilho azedo avaliadas no presente trabalho, apresentaram características probióticas promissoras com os resultados obtidos dos testes de capacidade antagônica e capacidade de sobrevivência as condições simuladas do TGI, na forma livre.

5.3. O efeito da liofilização sobre as características probióticas

5.3.1. Atividade Inibitória teste de antagonismo *in vitro* célula liofilizada

Foram selecionadas BAL que mediante avaliação estatística, que obtiveram os melhores resultados na forma livre, frente ao teste antagonista e teste de sensibilidade ao TGI simulado. Das sete estirpes avaliadas, as estirpes de BAL selecionadas de cada matriz foram *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 do kefir de leite, *Lactobacillus perolens* 11P3 do kefir de água e *Lactobacillus brevis* A5SC3 do polvilho azedo.

As estirpes de BAL liofilizadas apresentaram efeito antagônico frente a bactérias patogênicas, através da visualização de halos ao redor das colônias. Os valores médios dos halos de inibição estão descritos na tabela 5.

Tabela 5 Médias dos halos de inibição (mm) de bactérias patogênicas indicadoras, por BAL liofilizadas, isoladas do kefir de leite, água e do polvilho azedo

BAL	Bactérias indicadoras ^D				
	SA	BC	LM	ST	EC
Kefir de Leite					
<i>L. mesenteroides</i> 9U2	32,43±1,99 ^{aA} *	30,24±5,35 ^{aA}	33,28±2,66 ^{aA}	31,34±2,53 ^{aA}	29,38±2,98 ^{aA}
Kefir de Água					
<i>L. perolens</i> 11P3	26,87±3,75 ^{aB}	32,10±3,83 ^{aA}	31,22±4,04 ^{aA}	31,67±2,75 ^{aA}	27,25±2,13 ^{aA}
Polvilho Azedo					
<i>L. brevis</i> A5SC3	28,02±3,17 ^{aB}	30,59±3,10 ^{aA}	31,84±4,57 ^{aA}	31,09±2,61 ^{aA}	29,03±2,53 ^{aA}

*- Atividade antagonista em termos de halo de inibição (mm) e desvio padrão de determinações de oito repetições em duplicata pelo método *spot-on-the-lawn*.

^DBactérias indicadoras: SA – *Staphylococcus aureus* CCCb- 5007, BC – *Bacillus cereus* CCCD-B001, LM – *Listeria monocytogenes* ATCC®-19115™, ST- *Salmonella* Typhimurium CCCb-5004 e EC- *Escherichia coli* ATCC®-25922™.

A,B,C Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas são diferentes (Tukey $p < 0,05$).

a, b, c Médias na mesma linha seguidas por letras distintas são diferentes (Tukey $p < 0,05$).

Não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre as três estirpes de BAL em relação à inibição de BC, LM, ST e EC. *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 apresentou valores de halos de inibição superiores ($p \leq 0,05$) quando comparados aos valores das espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus* em relação a *S. aureus*. Porém, para os outros microrganismos indicadores esse fato não foi observado. Outros autores também identificaram que a ação antagonista de BAL pode se diferir entre os isolados e até mesmo entre os da mesma espécie (SAAD, 2006; GOLOWCZYC et al., 2008; SABIR et al., 2010; ZANIRATI et al., 2015).

Pereira e Gómez (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana de uma cultura probiótica comercial liofilizada, *Lactobacillus acidophilus* frente a *S. aureus* e *E. coli*. Os resultados demonstraram halos de inibição com valores de 11,0mm para *E. coli* e 10,12mm para *S. aureus*. Os resultados apresentados no presente estudo de espécies diferentes, *L. perolens* e *L. brevis* foram superiores, com uma média de 27,45mm para *S. aureus* e 28,14mm para *E. coli*.

Para avaliar a influência da liofilização nas características de inibição feitas as comparações entre os resultados apresentados para células livres e liofilizadas (Figuras de 4 a 9).

Analisando-se as Figuras 4, 5 e 6, não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) antes e após o processo de liofilização. Observa-se que a liofilização não alterou a

atividade antagônica de BAL testadas do gênero *Lactobacillus* isolados do kefir de água e polvilho azedo e do gênero *Leuconostoc* isolado do kefir de leite.

Em decorrência da concentração celular para realização do processo de liofilização, que gera um aumento na concentração em números de células de BAL, os valores médios de halos observados em comparação com as células livres foram superiores, e se mantiveram com diâmetros maiores de inibição em todas as bactérias indicadoras.

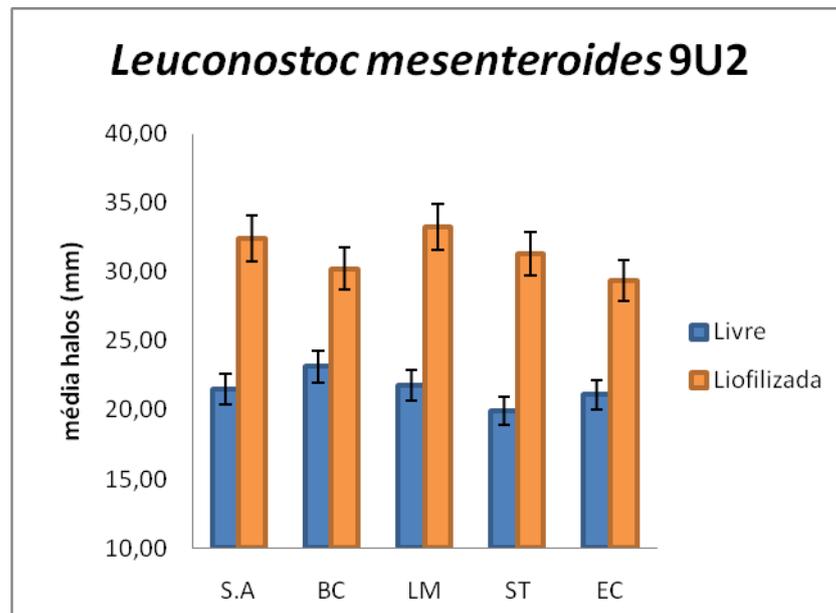


Figura 4 Médias dos halos de inibição de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2 isolado do kefir de Leite, células livres e células liofilizadas. Bactérias indicadoras: S.A – *Staphylococcus aureus* CCCb- 5007, BC – *Bacillus cereus* CCCD-B001, LM – *Listeria monocytogenes* ATCC®-19115™, ST- *Salmonella* Typhimurium CCCb-5004 e EC- *Escherichia coli* ATCC®-25922™

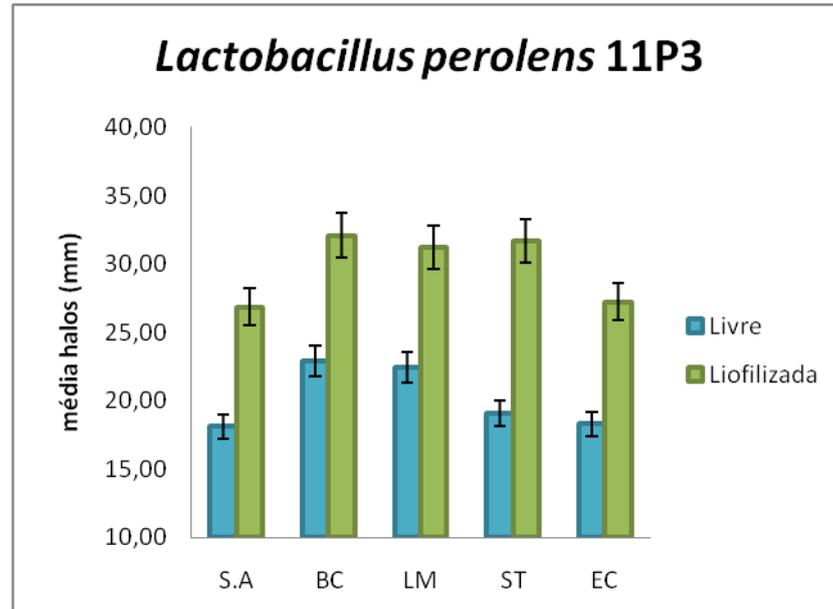


Figura 5 Médias dos halos de inibição de *Lactobacillus perolens* 11P3 isolado do kefir de Água, células livres e células liofilizadas. Bactérias indicadoras: S.A – *Staphylococcus aureus* CCCb- 5007, BC – *Bacillus cereus* CCCD-B001, LM – *Listeria monocytogenes* ATCC®-19115™, ST- *Salmonella* Typhimurium CCCb-5004 e EC- *Escherichia coli* ATCC®-25922™

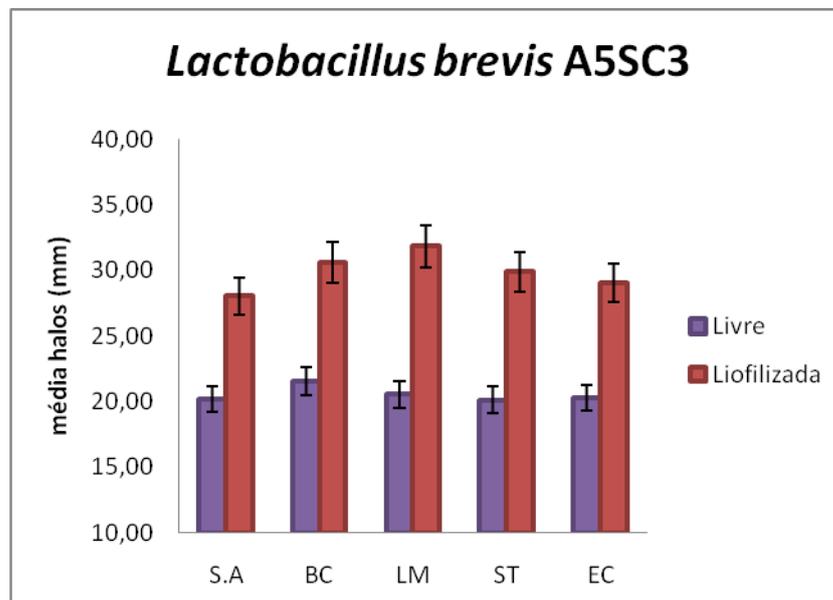


Figura 6 Médias dos halos de inibição de *Lactobacillus brevis* A5SC3 isolado do Polvilho azedo, células livres e células liofilizadas. Bactérias indicadoras: S.A – *Staphylococcus aureus* CCCb- 5007, BC – *Bacillus cereus* CCCD-B001, LM – *Listeria monocytogenes* ATCC®-19115™, ST- *Salmonella* Typhimurium CCCb-5004 e EC- *Escherichia coli* ATCC®-25922™

5.3.2. Simulação *in vitro* do processo de digestão gástrica e intestinal célula liofilizada

Tabela 6 Sobrevivência de BAL selecionadas (Log_{10} UFC.mL⁻¹) liofilizadas submetidas à solução simulada gástrica (SGS) e intestinal (SIS)

BAL	SGS			SIS		% Sobrevivência em log
	0min	60min	120min	60min	120min	
Kefir de leite <i>L. mesenteroides</i> 9U2	10,57±0,64 ^{aA}	10,76±0,56 ^{aA}	10,28±0,52 ^{aA}	10,26±0,21 ^{aA}	10,20±0,81 ^{aA}	96%
Kefir de água <i>L. perolens</i> 11P3	11,19±0,19 ^{aA}	10,51±0,33 ^{aA}	10,61±0,38 ^{aA}	10,51±0,07 ^{aA}	9,30±0,96 ^{aA}	88%
Polvilho Azedo <i>L. brevis</i> A5SC3	10,66±0,49 ^{aA}	10,75±0,39 ^{aA}	10,02±1,16 ^{aA}	10,19±0,82 ^{aA}	9,98±0,85 ^{aA}	94%

Sensibilidade a passagem em condições gastrointestinais simuladas em Log_{10} e desvio padrão de determinações de quatro repetições em duplicata

A,B,C Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas são diferentes (Tukey $p < 0,05$).

a, b, c Médias na mesma linha seguidas por letras distintas são diferentes (Tukey $p < 0,05$).

As estirpes de BAL selecionadas e liofilizadas apresentaram resistência à passagem nas condições gastrointestinais simuladas após liofilização (tabela 6), com concentrações finais de 9 a 10 log UFC.mL⁻¹.

Não foi observada diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre as estirpes independentes de serem de origem do kefir de leite ou de água e do polvilho azedo e entre as estirpes. Outros autores demonstraram que é possível obter estirpes probióticas de várias outras matrizes (MOLINA et al., 2012; BIANCHI et al., 2014; SANTOS et al., 2014; FREIRE et al., 2015; PRADO et al., 2015; FREIRE et al., 2017).

Comparando os resultados referentes à capacidade de sobrevivência em condições simuladas do TGI de células livres e células liofilizadas, foi possível observar que são semelhantes (Figura 7, 8 e 9).

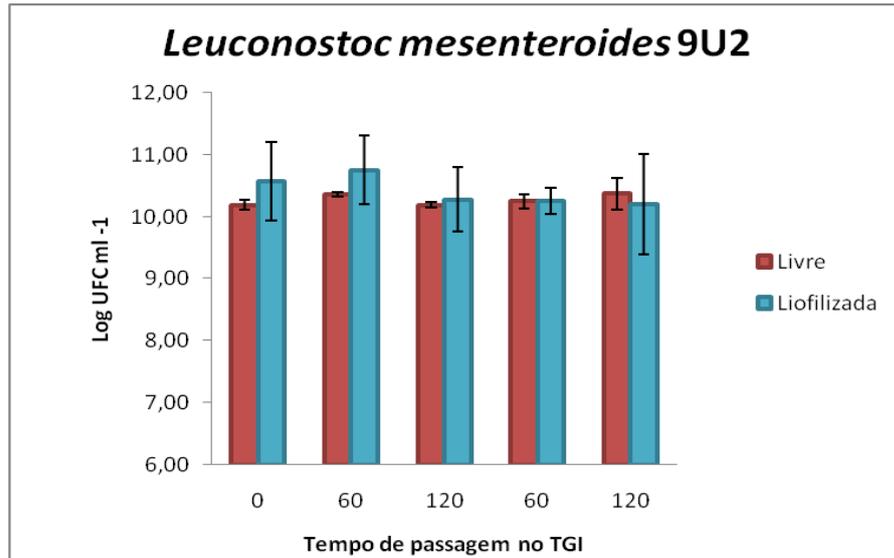


Figura 7 Resistência as condições simuladas do trato gastrointestinal de *Leuconostoc mesenteroides* 9U2, isolado do kefir de Leite, células livres e células liofilizadas

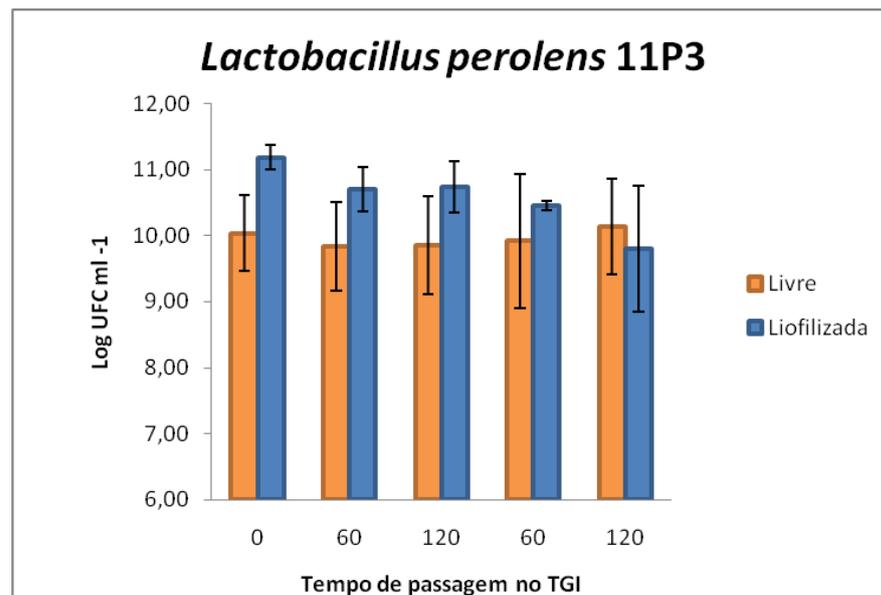


Figura 8 Resistência as condições simuladas do trato gastrointestinal de *Lactobacillus perolens* 11P3, isolado do kefir de água, células livres e células liofilizadas

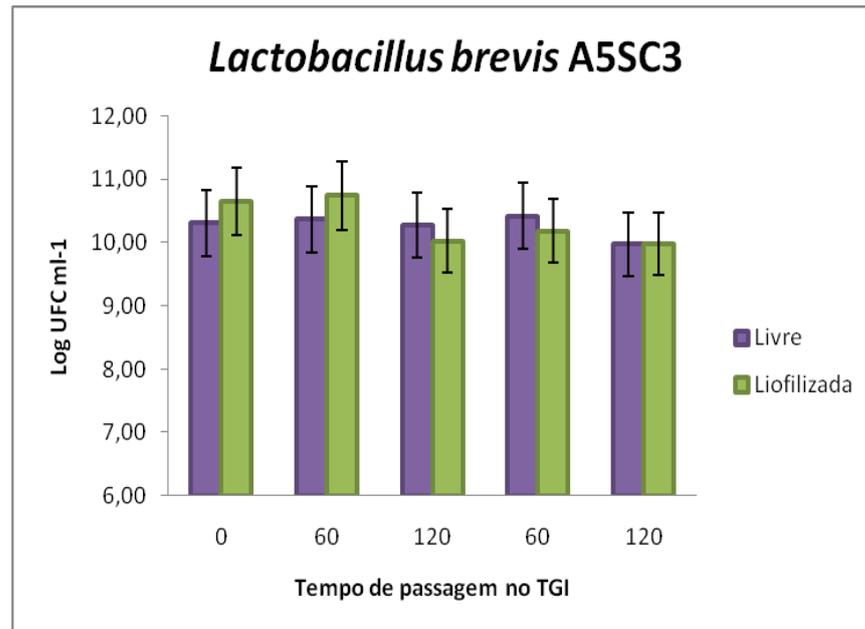


Figura 9 Resistência as condições simuladas do trato gastrointestinal de *Lactobacillus brevis* A5SC3, isolado do polvilho azedo, células livres e células liofilizadas

Não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) na sobrevivência das BAL a passagem no TGI antes e depois da liofilização, o que demonstra que o processo de liofilização não interfere de forma significativa na capacidade de sobrevivência as condições simuladas do TGI.

5.4. Efeito do armazenamento sobre a viabilidade das BAL liofilizadas

A viabilidade das estirpes de BAL liofilizadas durante o tempo de armazenamento à temperatura ambiente está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 Viabilidade de BAL (Log_{10} UFC.mL⁻¹) liofilizadas durante 60 dias de armazenamento à temperatura ambiente

BAL	1º DIA	7º DIA	15º DIA	30º DIA	60º DIA
Kefir de Leite					
<i>L. mesenteroides</i> 9U2	11,33±0,34 ^a	10,95±0,51 ^a	10,89±0,57 ^a	10,80±0,39 ^a	9,91±0,85 ^a
Kefir de Água					
<i>L. perolens</i> 11P3	11,47±0,08 ^a	11,49±0,24 ^a	10,81±0,36 ^a	10,70±0,85 ^a	10,26±1,42 ^a
Polvilho Azedo					
<i>L. brevis</i> A5SC3	11,44±0,10 ^a	10,65±0,21 ^a	10,80±0,43 ^a	10,36±0,60	10,17±0,74 ^a

Viabilidade durante armazenamento a temperatura ambiente e desvio padrão de determinações de três repetições em duplicata

A,B,C Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas são diferentes (Teste T-pareado $p < 0,05$).

a, b, c Médias na mesma linha seguidas por letras distintas são diferentes (Teste T-pareado $p < 0,05$).

Não houve diferença ($p \geq 0,05$) para os resultados encontrados referentes ao armazenamento das BAL liofilizadas em temperatura ambiente por 60 dias, como também entre os grupos de matrizes de isolamento utilizadas. A capacidade de as células permanecerem viáveis e ativas durante o armazenamento é um importante parâmetro de estirpes com potencial probiótico (SANDERS & KLAENHAMMER, 2001).

A sobrevivência após o processo de liofilização e armazenamento pode ser dependente da estirpe (EDWARD et al., 2011). Numericamente as espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus* apresentaram menores reduções decimais quando comparado a espécie pertencente ao gênero *Leuconostoc* em estudo ao final do teste.

O armazenamento das culturas bacterianas liofilizadas em temperatura ambiente possibilita uma redução nos custos de manutenção, e tem se tornado um dos campos promissores de estudo (SAVINI et al., 2010; DIANAWATI, MISHRA & SHAH, 2016).

Os resultados descritos na tabela 7 demonstram que as estirpes isoladas do kefir de leite (*L. mesenteroides* 9U2), kefir de água (*L. perolens* 11P3) e polvilho azedo (*L. bevis* A5SC3) se mantiveram em concentrações desejáveis até 60 dias.

Os trabalhos que avaliam as condições de armazenamento em sua maioria apresentam os resultados na forma microencapsulada, em congelamento ou

resfriamento, em embalagens de polietileno e usando crioprotetores diferentes do utilizado no presente trabalho (SAVINI et al., 2010; YING et al., 2010; DIANAWATI, MISHRA & SHAH, 2016; ARCHACKA et al., 2019) o que dificulta a discussão dos resultados aqui apresentados.

6. CONCLUSÃO

Todas as estirpes de BAL utilizadas neste estudo isoladas de kefir e polvilho azedo apresentaram ação antagônica frente a bactérias patogênicas veiculadas por alimentos. A matriz de isolamento das estirpes de BAL não interfere na inibição dos patógenos. Portanto, essas estirpes podem ser usadas em alimentos como conservantes naturais potenciais.

As estirpes de BAL usadas no presente estudo foram capazes de resistir a concentrações baixas de pH e presença de sais biliares simulando as condições fisiológicas do TGI humano. Novamente, foi possível observar que a matriz de isolamento não interferiu nos resultados. Portanto, mediante os resultados apresentados, essas estirpes de bactérias ácido-lácticas demonstram que possuem uma das características estabelecidas pela FAO/OMS como desejáveis para potenciais probióticos.

A liofilização não afetou as características testadas, demonstrando ser um processo de secagem seguro para obtenção de um produto liofilizado proveniente de bactérias ácido-lácticas isoladas de kefir e polvilho azedo.

O armazenamento não afetou de forma significativa a concentração final das estirpes de BAL liofilizadas testadas. A possibilidade de armazenamento em condições de baixo custo é promissora, portanto, este trabalho demonstra que foi possível armazenar estas estirpes liofilizadas por 60 dias em temperatura ambiente.

As estirpes *Leuconostoc mesenteroides* 9U2, *Lactobacillus perolens* 11P3 e *Lactobacillus brevis* A5SC3, isoladas do kefir de leite, água e polvilho azedo, respectivamente, são potencialmente probióticas, desde que estudos complementares sejam realizados para abarcar todos os critérios propostos pela FAO/WHO.

7. REFERÊNCIAS

ADEBAYO, C.O.; ADERIYE, B.I.; AKPOR, O.B. Occurrence and antimicrobial properties of lactic acid bacteria during the fermentation of cassava mash, maize and sorghum grains. *Microbiology Research International*, v. 1, n. 2, p. 27-32, 2013.

AGALIYA, P.J.; JEEVARATNAM, K. Characterisation of the bacteriocins produced by two probiotic *Lactobacillus* isolates from idli batter. *Annals of microbiology*, v. 63, n. 4, p. 1525-1535, 2013.

AGOSTINI, Mariângela Rosário. *Produção e utilização de farinha de mandioca comum enriquecida com adição das próprias folhas desidratadas para consumo alimentar*. 2006. 84f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

ALEXANDRE, D.P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina veterinária e Zootecnia*, v.54, n. 4, p. 424-428, 2002.

ALI, A.A. Beneficial role of lactic acid bacteria in food preservation and human health: A review. *Research Journal of Microbiology*, v.5, p. 1213-1221, 2010.

ALTAY, F.; KARBANCIUGLU-GULER, F.; DASKAYA-DIKMEN, C.; HEPERKAN, D. A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. *Journal of Food Microbiology*, v. 167, p. 44-56, 2013.

ALVES, Marta Sofia. *Microencapsulação de bactérias lácticas com potencial probiótico para produção de pasta de azeitona*. 2013. 85f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança alimentar/Qualidade Alimentar) – Faculdade de Ciência e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa, 2013.

ANAL, A.K.; SINGH, H. Recent advances in Microencapsulation of probiotics for Industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, v. 18, p. 240-251, 2007.

ANNAN, N.T.; BORZA, A.D.; HANSEN, L.T. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Research International*, v. 41, p.184–193, 2008.

ANSELMO, R.J.; VIORA, S.S.; OJEDA, P.A.; LAUSADA, L.I. Efecto antagónico del kefir sobre endosporas y células vegetativas de *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens*. *Información Tecnológica*, v. 21, n. 4, p.131- 138, 2010.

ANYOGU, A.; AWAMARIA, B.; SUTHERLAND, J.P.; OUOBA, L.I.I. Molecular characterisation and antimicrobial activity of bacteria associated with submerged lactic acid cassava fermentation. *Food Control*, v. 39, p. 119-127, 2014.

ARAÚJO, Emiliane Andrade. *Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de Lactobacillus del breuckii UFV H2b20 e de inulina*. 2007. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

ARCHACKA, M.; BIAŁAS, W.; DEMBCZYŃSKI, R.; OLEJNIK, A.; SIP, A.; SZYMANOWSKA, D.; CELIŃSKA, E.; JANKOWSKI, T.; OLEJNIK, A.; ROGODZIŃSKA, M. Method of preservation and type of protective agent strongly influence probiotic properties of *Lactococcus lactis*: A complete process of probiotic preparation manufacture and use. *Food Chemistry*, v. 274, p. 733-742, 2019.

ASTESANA, D.M.; ZIMMERMANN, J.A.; FRIZZO, L.S.; ZBRUN, M.V.; BLAJMAN, J.E.; BERISVIL, A.P.; ROMERO-SHARPEN, A.; SIGNORINI, M.L.; ROSMINI, M.R.; SOTO, L.P. Development and storage studies of high density macrocapsules containing *Lactobacillus* spp. Strains as nutritional supplement in young calves. *Revista Argentina de Microbiología*, 2018.

ATTAR, M.A.; YAVARMANESH, M.; MORTAZAVI, A.; EDALATIAN DOVOM, M.R.; HABIBI NAJAFI, M.B. Antibacterial effects of *Lactococcus lactis* isolated from Lighvan cheese regarding the recognition of Nisin, Lacticin and Lactococcin structural genes. *LWT - Food Science and Technology*, v. 89, p. 186-191, 2018.

AUAD, Lígia Isoni. *Seleção de bactérias lácticas do kefir como produtoras de substâncias inibitórias de Listeria monocytogenes*. 2014. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2014.

AVANCINI, Sandra Regina Paulo. *Caracterização química, microbiológica e toxicológica da água da fermentação do amido de mandioca*. 2007. 102f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

AVIARA, N. A.; IGBEKA, J. C.; NWOKOCHA, L. M. Effect of drying temperature on physicochemical properties of cassava starch. *International Agrophysics*, v. 24, p. 219-225, 2010.

AXELSSON, L.T.L.; SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. Lactic acid bacteria: classification and physiology. (eds.) *Lactic acid bacteria*. New York: Marcel Dekker, p.1-66, 2004.

BALLUS, C.A.; KLAJN, V.M.; CUNHA, M.F.; OLIVEIRA, M.L.; FIORENTINI, A.M. Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: revisão. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 28, n. 1, p. 85-96, 2010.

BARGHINI, A. Cauim: entre comida e ebriedade. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi Ciências Humanas*, v. 13, n. 3, p. 561-571, 2018.

BARRETO, B.A.P. Microbioma and probiotics: from gut to Mars. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, v. 84, n. 1, p. 1-2, 2018.

BARRETT, K.E. *et al.* *Fisiologia Médica de Ganong* (Ganong's review of medical physiology). 24. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014. 752p.

BASTOS, G.A.; PAULO, E.M.; CHIARADIA, A.C.N. Aceitabilidade de barra de cereais potencialmente probiótica. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 17, n. 2, p. 113-120, 2014.

BCC Research. The probiotics market: Ingredients, supplements, foods. BCC Research, FOD035F, 2018. Disponível em: < <https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/probiotics-market-ingredients-supplements-foods-report.html>>. Acesso em: 12 dez, 2019.

BEALES, N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 3, p. 1-20, 2004.

BECKER, Larissa Vargas. *logurte probiótico com teor reduzido de lactose adicionado de óleo de linhaça*. 2009. 110p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

BEGLEY, M.; GAHAN, C.G.M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 29, p. 625-651, 2005.

BERNUCCI, Beatriz Silva Pereira. *Microencapsulação de Bifidobacterium longum 51A incorporada em farinha de aveia*. 2017. 137f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

BEERMANN, C.; HARTUNG, J. Physiological properties of milk ingredients released by fermentation. *Food & Function*, v. 4, n. 2, p. 185-199, 2013.

BESHKOVA, D. M.; SIMOVA, E. D.; FRENGOVA, G. I.; SIMOV, Z. I.; DIMITROV, ZH. P. Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. *International Dairy Journal*, v. 13, p. 529–535, 2003.

BIANCHI, F., ROSSI, E.A., GOMES, R.G., SIVIERI, K. Potentially synbiotic fermented beverage with aqueous extracts of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) and soy. *Food Science and Technology International*. v. 0, p. 1–13, 2014.

BOLLA, P.A.; SERRADELL, M.A.; URRAZA, P.J.; DE ANTONI, G.L. Effect of freeze-drying on viability and in vitro probiotic properties of a mixture of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir. *Journal of Dairy Research*, v. 78, p. 15-22, 2011.

BOLOTIN, A.; WINCKER, P.; MAUGER, S.; JAILLON, O.; MALARME, K.; WEISSENBACH, J.; EHRlich, S.D.; SOROKIN, A. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* IL1403. *Genome Research*, v. 11, p. 731-753, 2001.

BOZOGLU, T.F.; OZILGEN, M.; BAKIR, U. Cinética de Sobrevivência de Culturas Iniciais de Ácido Láctico durante e Liofilização. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 9, n. 9, p. 531-537, 1987.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 12.486, de 1978. Aprova Normas Técnicas Especiais relativas a Alimentos e Bebidas. *Diário Oficial da União*, Brasília, 21 de outubro de 1978, seção 1, n. 200. Disponível em: <<https://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/decreto/1978/decreto-12486-20.10.1978.html>>. Acesso em 16 dez. 2019, 1978a.

BRASIL. Decreto n. 12.486, de 20 de outubro de 1978. Normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. *Diário Oficial do Estado de São Paulo*, São Paulo, 21 out. 1978b.

BRASIL. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria. *Diário Oficial da União*; Poder Executivo, de 03 de maio de 1999a. Disponível em: <<https://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=Mjl0OQ%2C%2C>>. Acesso em: 28 jan, 2020.

BRASIL. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 03 mai. 1999b. Disponível em:<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/727a7f004745792d8641d63fbc4c6735/RESOLUCAO_19_1999.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 08 mar, 2018.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº 263, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, 23 set. 2005. Seção I, p. 368-369.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 46, de 23 de outubro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. *Diário Oficial da União*, Brasília, 24 outubro 2007, seção 1, p. 5. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/INSTRU%C3%87%C3%83O-NORMATIVA-N%C2%BA-46-DE-23-DE-OUTUBRO-DE-2007.pdf>>. Acesso em: 13 nov, 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para comprovação de Segurança de alimentos e ingredientes. Brasília, fevereiro de 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/395734/Guia+para+Comprova%C3%A7>

%C3%A3o+da+Seguran%C3%A7a+de+Alimentos+e+Ingredientes/f3429948-03db-4c02-ae9c-ee60a593ad9c>. Acesso em: 28 jan, 2020.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 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, Brasília, 27 de julho de 2018, seção 1, n. 144, p. 97 ISSN 1677-7042. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC_241_2018_.pdf/941cda52-0657-46dd-af4b-47b4ee4335b7>. Acesso em: 10 dez, 2019.

BRAVO D.; RODRIGUEZ E.; MEDINA M. Nisin and lacticin 481 coproduction by *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk. *Journal of Dairy Science*. v. 92, p. 4805–481, 2009.

BROECKX, G.; VANDENHEUVEL, D.; CLAES, I.J.J.; LEBEER, S.; KIEKENS, F. Drying techniques of probiotic bacteria as an important step towards the development of novel pharmabiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 505, p. 303-318, 2016.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R.R.; CINTRA, H.C. Características da bacteriocinas produzida por *Lactococcus lactis* ssp. Hordniace CTC484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. *Ciência e tecnologia de alimentos, Campinas*, v. 26, n.1, p. 135-144, 2006.

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; CAILLIEZ-GRIMAL, C.; JEANDEL, C.; SCHER, J. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in microparticles: Influence of casein to whey protein ratio bacterial survival during digestion. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 19, p. 233-242, 2013.

CARASI, P.; AMBROSIS, N. M.; DE ANTONI, G. L.; BRESSOLLIER, P.; URDACI, M. C.; DE LOS ANGELES SERRADELL, M. Adhesion properties of potentially probiotic *Lactobacillus kefir* to gastrointestinal mucus. *Journal of Dairy Research*, v. 81, n.1, p. 16–23, 2014.

CARLI, Eliane Maria De. Utilização de *Lactobacillus paracasei* como probiótico para o controle de Salmonella spp em frangos de corte. 2006. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. RS, 2006.

CARR, F.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 28, n.4, p. 281-370, 2002.

CARVALHO, E.P.; CANHOS, V.P.; RIBEIRO, V.E.; CARVALHO, H.P. Polvilho azedo: aspectos físicos, químicos e microbiológicos. *Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.31, n.2, p.129-137, 1996.

CARVALHO, E.P.; CANHOS, V.P.; ASQUIER, I.; VILELA, E.R.; CARVALHO, E.R. Determinacion de la flora microbiana de la fecula de yuca fermentada (Polvilho Azedo) durante las diferentes etapas de procesamiento. *Alimentaria*, v. 8, p. 97–103, 1999.

- CEREDA, Marney Pascoli. *Alguns aspectos sobre a fermentação de mandioca*. 1973. 89f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas, São Paulo, 1973.
- CHAMPAGNE, C.P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, v.18, n. 2, p.184-190, 2007.
- CHARLIER, C.; CRETENET, M.; EVEN, S.; LE LOIR, Y. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *Journal of food microbiology*, v. 131, p. 30-39, 2009.
- CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *International Journal of Dairy Technology*, v. 51, n. 4, p. 123-136, 1998.
- CHARTERIS W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L. & COLLINS, J.K. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, v. 84, p. 759 – 768, 1998.
- CHIFIRIUC, M.C.; CIOACA, A.B.; LAZAR, V. In vitro assay of the antimicrobial activity of kefir against bacterial and fungal strains. *Anaerobe*, v.17, p.433-435, 2011.
- COOK, M. T.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KHUTORYANSKIY, V. V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 162, n. 1, p. 56–67, 2012.
- COSTA, G.N.; SUGUIMOTO, H.H.; MIGLIORANZA, L.H.S.; GÓMEZ, R.J.H.C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* frente a microrganismos patogênicos “in vitro”. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n. 5, p.1839-1846, 2012.
- COSTA, H.H.S.; SOUZA, M.R.; ACÚRCIO, L.B.; CUNHA, A.F.; RESENDE, M.F.S.; NUNES, Á.C. Potencial probiótico in vitro de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 65, n. 6, p. 1858-1866, 2013.
- DE CASTRO-CISLAGHI, F. P.; CARINA DOS REIS, E. S.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; LORENZ, J. G.; SANT'ANNA, E. S. *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. *Journal of Food Engineering*, v. 113, n. 2, p. 186–193, 2012.
- DERTLI, E.; ÇON, A. H. Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma. *LWT - Food Science and Technology*, v. 85, p. 151-157, 2017.

DEVLIN; MICHELACCI. *Manual de bioquímica com correlações clínicas* (Textbook of biochemistry with clinical correlations). 6. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2007. p.1010-1038.

DIANAWATI, D.; MISHRA, V.; SHAH, N.P. Survival of Microencapsulated Probiotic Bacteria after Processing and during Storage: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 56, n. 10, p. 1685-1716, 2016.

DIAS, Priscila Alves. *Atividade antimicrobiana de microrganismos presentes em grãos do kefir*. 2011. 44f. Dissertação de mestrado (Mestrado em Veterinária) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, p. 26-41, 2011.

DIAS, P.A.; SILVA, D.T.; TIMM, C.D. Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de grãos de kefir. *Ciência Animal Brasileira*, v.19, p.1-8, 2018.

DUARTE, M.C.K.H.; CORTEZ, N.M.S.; CORTEZ, M.A.S.; FRANCO, R.M. Ação antagonista de bactérias lácticas frente ao crescimento de estirpes patogênicas. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*, v. 9, n. 16, p. 25-36, 2013.

EDWARD, V.A.; HUCH, M.; DORTU, C.; THONART, P.; EGOUNLETY, M.; VAN ZYL, P.J.; SINGH, S.; HOLZAPFEL, W.H.; FRANZ, C.M.A.P. Biomass production and small-scale testing of freeze-dried lactic acid bacteria starter strains for cassava fermentations. *Food Control*, v. 22, p. 389-395, 2011.

ELMARZUGI, N.; ENSHASY, H.E.; MALEK, R.A.; OTHMAN, Z.; SARMI, M.R.; AZIZ, R. A. Optimization of cell mass production of the probiotic strain *Lactococcus lactis* in batch and fed-batch culture in pilot scale levels. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*, p. 873–879, 2010.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS microorganisms intentionally added to food of feed. *EFSA Journal*, v.7, n.12, p. 33, 2009.

EFSA - European Food Safety Authority. Update of the list of QPS recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 4: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2016. *EFSA Journal*, v. 14, n. 7, p. 4522, 2016.

EDWARD, V.A.; HUCH, M.; DORTU, C.; THONART, P.; EGOUNLETY, M.; VAN ZYL, P.J.; SINGH, S.; HOLZAPFEL, W.H.; FRANZ, C.M.A.P. Biomass production and small-scale testing of freeze-dried lactic acid bacteria starter strains for cassava fermentations. *Food Control*, v. 22, p. 389-395, 2011.

ESPM/SEBRAE (Estudos de Mercado/Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas). Estudo de Mercado sobre a Mandioca: Farinha e Fécula. 2008. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/>>. Acesso em: 26 dez, 2019.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Genus *Leuconostoc*, 2020. Disponível em <<http://www.bacterio.net/leuconostoc.html>>. Acesso em: 28 jan, 2020.

FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, p.1-4, 2001.

FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, 2002.

FAO/WHO – Food and Agriculture Organization of the United Nations, Save and grow: Cassava. A Guide to Sustainable Production Intensification, E-ISBN 978-92-5-107642-2, Rome, 2013.

FAOSTAT- Food and Agriculture Statistics. New Food Balances (Preliminary data) 2017. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>>. Acesso em: 24 dez, 2019.

FELLOEWS, P. J. Food Processing Technology: Principles and Practice. 2nd Edition. *Woodhead Publishing*, Limited, 2000.

FIORDA, F.A.; PEREIRA, G.V.M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RAKSHIT, S.K.; PAGNONCELLI, M.G.B.; VANDENBERGHE, L.P.S.; SCCOL, C.R. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. *Food Microbiology*, v. 66, p. 86-95, 2017.

FORSSTEN, S.D.; SINDELAR, C.W.; OUWEHAND, A.C. Probiotics from an industrial perspective. *Anaerobe*, v. 17, p. 410-413, 2011.

FRANK, J.C.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 24, p. 281-370, 2002.

FREIRE, A.L.; RAMOS, C.L.; SCHWAN, R.F. Microbiological and chemical parameters during cassava based-substrate fermentation using potential starter cultures of lactic acid bacteria and yeast. *Food Research International*, v. 76, p. 787–795, 2015.

FREIRE, A.L.; RAMOS, C.L.; SOUZA, P.N.C.; CARDOSO, M.G.B.; SCHWAN, R.F. Nondairy beverage produced by controlled fermentation with potential probiotic starter cultures of lactic acid bacteria and yeast. *International Journal of Food Microbiology*, v. 248, p. 39-46, 2017.

FREITAS, G.C.; FARIAS, S.C.; VILPOUX, F.O. A produção camponesa de farinha de mandioca na amazônia sul ocidental. *Boletim Goiano de Geografia*, v. 31, n. 2, p. 29-42, 2011.

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

FURTADO, Danielle Nader. *Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocina e sua aplicação no controle de Listeria monocytogenes em queijo fresco de leite de cabra*. 2010. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

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

GARCIA, Laura Pereira. *Liofilização aplicada a alimentos*. 2009. 46f. Trabalho Acadêmico - Bacharelado em Química de Alimentos. Disciplina de Seminários em Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

GARROTE, G.L.; ABRAHAM, A.G.; ANTONI, G.L. Chemical and microbiological characterization of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, v. 68, p. 639-652, 2001.

GAUTAM, N.; SHARMA, N.; AHLAWAT, O.P. Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus brevis* UN Isolated from Dhulliachar: a Traditional Food Product of North East India. *Indian Journal of Medical Microbiology*, v. 54, n. 2, p. 185-189, 2014.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*, v. 161, p. 480-487, 2010.

GOLDIN, B.R. Health benefits of probiotics. *British Journal of Nutrition*, v.80, p. S203-S207, 1998.

GOLOWCZYC, M.A.; GUGLIADA, M.J.; HOLLMANN, A.; DELFEDERICO, L.; GARROTE, G.L.; ABRAHAM, A.G.; SEMORILE, L.; DE ANTONI, G. Characterization of homofermentative *Lactobacilli* isolated from kefir grains: potential use as probiotic. *Journal of Dairy Research*, v. 75, p. 211-217, 2008.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F.X. Agentes probióticos em alimentos: Aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. *Boletim da sociedades portuguesa de biotecnologia*, v. 64, p.12-22, 1999.

GOMES, A.M.M.; SILVA, C.E.M.; RICARDO, N.M.P.S. Effects of annealing on the physicochemical properties of fermented cassava starch (polvilho azedo). *Carbohydrate Polymers*, v. 60, p. 1-6, 2005.

GONÇALVES, Otilia Maria de Almeida Ribeiro. Estudo comparativo de processos de desidratação por liofilização e secagem convencional. 2015. 142f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Escola Superior de Tecnologia de Tomar, 2015.

GUARNER, F.; SANDERS, M.E.; ELIAKIM, R.; FEDORAK, R.; GANGL, A.; GARISCH, J.; KAUFMANN, P.; KARAKAN, T.; KHAN, A.G.; KIM, N.; DE PAULA, J.A.; RAMAKRISHMA, B.; SHANAHAN, F.; SZAJEWSKA, H.; THOMSON, A.; LE MAIR, A. Diretrizes mundiais da organização mundial de gastroenterologia (WGO):

Probióticos e Prebióticos. 2017. 35f. Disponível em: <<https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-portuguese-2017.pdf>>. Acesso em: 11 dez, 2019.

GULITZ, A.; STADIE, J.; WENNING, M.; EHRMANN, M.A.; VOGEL, R.F. The microbial diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology*, v. 151, p. 284-288, 2011.

GUIMARÃES, F.; DE ARAUJO, V. V.; SOARES, M. D.; CALIXTO, H.F.; SOARES, M.P.; TORRES, R.C.; ROBSON, E.D. Seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico provenientes do leite de transição bovino fermentado. *Interciencia*, v. 43, n. 2, p. 132-136, 2018.

GÜZEL-SEYDIM, Z.; SEYDIM, A.; GREENE, A.; BODINE, A. Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.13, p. 35-43, 2000.

HAFFNER, F. B.; DIAB, R.; PASC, A. Encapsulation of probiotics: Insights into academic and industrial approaches. *AIMS Materials Science*, v. 3, n. 1, p. 114-136, 2016.

HALL, J. E., 1946- GUYTON; HALL, J.E. *Textbook of Medical Physiology*.12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, 184p.

HANDA, S.; SHARMA, N. In vitro study of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* F22 isolated from chhang – A traditional fermented beverage of Himachal Pradesh, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v. 14, p. 91-97, 2016.

HASTINGS, J. W.; STILES, M. E.; HOLY, A. Bacteriocins of *Leuconostocs* isolated from meat. *International Journal of Food Microbiology*. v. 24, p. 75-81, 1994.

HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Probiotics: A General View. In: Wood B.J.B. (eds) *The Lactic Acid Bacteria (the normal micro flora of animals and humans)*, Springer, v.1, 1992.

HENG, N.C.K.; WESCOMBE, P.A.; BURTON, J.P.; JACK, R.W.; TAGG, J.R. The diversity of bacteriocins in Gram positive bacteria. *Bacteriocins: ecology and evolution*, p. 45-92, 2007.

HOFFMAN, D. E.; FRASER, C. M.; PALUMBO, F.; RAVEL, J.; ROWTHORN, V.; & SCHWARTZ, J. Probiotic: Achieving a better regulatory fit. *Food and Drug Law Journal*, v. 69, p. 237-272, 2014.

HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS IN'T VELD, J.H.J. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, v. 41, p. 85-101, 1998.

HSIEH, H.H.; WANG, S.Y.; CHEN, T.L.; HUANG, Y.L.; CHEN, M.J. Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains *International Journal of Food Microbiology*, v.157, n.1, p. 73-81, 2012.

HUANG, S., VIGNOLLES, M. L., CHEN, X. D., LE LOIR, Y., JAN, G., SCHUCK, P., & JEANTET, R. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 63, p.1–17, 2017.

IBGE- EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Análises gráficas dos principais produtos agropecuários do Estado do Pará*, 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/1354300/32272142/An%C3%A1lise+de+Cen%C3%A1rios+-+Mandioca/a23876b7-97ba-aff7-8c95-5dd1578cbe12>>. Acesso em: 16 dez, 2019.

IBGE, Title of subordinate document. Indicadores: produção agrícola: levantamento sistemático da produção agrícola: março de 2014; 2014 Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/ProducaoAgricola/LevantamentosistemáticodaProduçãoAgricola\[mensal/Comentários/lspa_201403comentarios.pdf\]](ftp://ftp.ibge.gov.br/ProducaoAgricola/LevantamentosistemáticodaProduçãoAgricola[mensal/Comentários/lspa_201403comentarios.pdf)>. Acesso em: 28 Dez, 2019.

ILANGO, S.; PANDEY, R.; ANTONY, U. Functional characterization and microencapsulation of probiotic bacteria from koozh. *Journal of Food Science and Technology*, v. 53, n. 2, p. 977-989, 2016.

IRAPORDA, C.; JÚNIOR, M.A.; NEUMANN, E.; NUNES, A.C.; NICOLI, J.R.; ABRAHAM, A.G.; GARROTE, G.L. Biological activity of the non-microbial fraction of kefir: antagonism against intestinal pathogens. *Journal of Dairy Research*, v. 84, p. 339-345, 2017.

JALALI, M.; ABEDI, D.; VARSHOSAZ, J.; NAJJAEZADEH, M.; MIRLOHI, M.; TAVAKOLI, N. Stability evaluation of freeze-dried *Lactobacillus paracasei* subsp. tolerance and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. bulgaricus in oral capsules. *Research in Pharmaceutical Sciences*, v. 7, n. 1, p. 31-36, 2012.

JAY, J.M. *Modern food microbiology*. 6.ed. Maryland, Aspen Publishers, 2000.

JAY, J. M. *Microbiologia de alimentos*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 711p.

KANMANI, P.; KUMAR, R. S.; YUVARAJ, N.; PAARI, K. A.; PATTUKUMAR, V.; ARUL, V. Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* MC13 for long-term storage. *Biochemical Engineering Journal*, v. 58, p. 140–147, 2011.

KHALID, K. An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*, v. 1, n. 3, v. 1-13, 2011.

KHEM, S.; SMALL, D. M.; MAY, B. K. The behaviour of whey protein isolate in protecting *Lactobacillus plantarum*. *Food Chemistry*, v. 190, p. 717–723, 2016.

KIMOTO, H.; NOMURA, M.; KOBAYASHI, M.; MIZUMACHI, K.; OKAMOTO, T. Survival of lactococci during passage through mouse digestive tract. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 49, p. 707–711, 2003.

KOSTINEK, M.; SPECHT, I.; EDWARD, V.A.; PINTO, C.; EGOUNLETY, M.; SOSSA, C.; MBUGUA, S.; DORTU, C.; THONART, P.; TALJAARD, L.; MENGU, M.; FRANZ, C.M.A.P.; HOLZAPFEL, W.H. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, v. 114, p. 342-351, 2007.

KRASAEKOOPT, W.; WATCHARAPOKA, S. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT - Food Science and Technology*, v. 57, p. 761 e 766, 2014.

LACERDA, I.C.A.; MIRANDA, R.L.; BORELLI, B.M.; NUNES, A.C.; NARDI, R.M.D.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C.A. Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, v. 105, p. 213-219, 2005.

LACERDA, I. C. A. *Caracterização fisiológica e molecular das bactérias lácticas e leveduras na produção de polvilho azedo e utilização de culturas iniciadoras para processo fermentativo*. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 2006. 150 p. (Tese, Doutorado em Microbiologia).

LACERDA, I. C.A.; GOMES, F. C. O.; BORELLI, B. M.; FARIA JR., C. L. L.; FRANCO, G. R.; MOURÃO, M. M.; MORAIS, P. B.; ROSA, C. A. Identification of the bacterial community responsible for traditional fermentation during sour cassava starch, cachaça and minas cheese production using culture-independent 16S rRNA gene sequence analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, p. 650-657, 2011.

LAMONT, J.R.; WILKINS, O.; BYWATER-EKEGARD, M.; SMITH, D.L. From yogurt to yield: Potential applications of lactic acid bacteria in plant production. *Soil Biology & Biochemistry*, v.111, p.1-9, 2017.

LA RIVIÈRE, J.W.M.; KOOIMAN, P.; SCHMIDT, K. Kefiran, um novo polissacarídeo produzido no grão de kefirpor *Lactobacillus brevis*. *Archiv für Mikrobiologie*, v. 59, n. 1-3, p. 269-278, 1967.

LAUREYS, D.; VUYST, L.D. Microbial Species Diversity, Community Dynamics, and Metabolite Kinetics of Water kefir Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 8, p. 2564-2572, 2014.

LAZADO, C.C.; CAIPANG, C.M.A.; BRINCHMANN, M.F.; KIRON, V. In vitro adherence of two candidate probiotics from Atlantic cod and their interference with the adhesion of two pathogenic bacteria. *Veterinary Microbiology*, v. 148, p. 252-259, 2011.

- LEE, Y.K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. Handbook of probiotics. *John Wiley and Sons*, p. 211, 1999.
- LEITE, A.M.O.; MAYO, B.; RACHID, C.T.C.C.; PEIXOTO, R.S.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M.F.; DELGADO, S. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiology*, v. 31, p. 215-221, 2012.
- LEITE, A.M.O.; MIGUEL, M.A.L.; PEIXOTO, R.S.; ROSADO, A.S.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M.F. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, n. 2, p. 314-349, 2013.
- LEITE, A.M.O.; MIGUEL, M.A.L.; PEIXOTO, R.S.; RUAS-MADIEDO, P.; PASCHOALIN, V.M.; MAYO, B.; DELGADO, S. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *Journal of Dairy Science*, v. 98, p. 3622-3632, 2015.
- LIAO, L.K.; WEI, X.Y.; GONG, X.; LI, J.H.; HUANG, T.; XIONG, T. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* LK-1 by spray drying related to its stability and in vitro digestion. *LWT-Food Science and Technology*, v. 82, p. 82-89, 2017.
- LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, v. 147, p. 747-748, 1965.
- MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, G. V. M.; DIAS, D. R. & SCHWAN, R. F. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 26, n. 7, p. 1241- 1250, 2010.
- MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, G. V. M.; CAMPOS, C. R.; DRAGONE, G.; SCHWAN, R. F. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, p. 693-702, 2011.
- MARSH, A.J.; O'SULLIVAN, O.; HILL, C.; ROSS, R.P.; COTTER, P.D. Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources. *PloSone*, v.8, n. 7, e69371, 2014.
- MARTÍN, M.J.; LARA-VILLOSLADA, F.; RUIZ, M.A.; MORALES, M.E. Microencapsulation of bacteria: a review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 27, p. 15-25, 2015.
- MCFARLAND, L. V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World Journal Gastroenterology*, v. 16, n. 18, p. 2202-2222, 2010.
- MEDRANO, M.; PÉREZ, P.F.; ABRAHAM, A.G. kefir antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *International Journal of Food Microbiology*, v. 122, p. 1-7, 2008.

MIGUEL, M.G.C.P.; CARDOSO, P.G.; MAGALHÃES, K.T.; SCHWAN, R.F. Profile of microbial communities present in tibico (sugarykefir) grains from different Brazilian States. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 27, p. 1875-1884, 2011.

MINEKUS, M. et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food & Function*, v. 5, p. 1113-1124, 2014.

MIQUEL, S.; BEAUMONT, M.; MARTÍN, R.; LANGELLA, P.; BRAESCO, V.; THOMAS, M. A proposed framework for an appropriate evaluation scheme for microorganisms as novel foods with a health claim in Europe. *Microbial Cell Factories*, v.14, p. 1-11, 2015.

MOLINA, V.; MÉDICI, M.; DE VALDEZ, G.F.; TARANTO, M.P. Soybean-based functional food with vitamin B12-producing lactic acid bacteria. *Journal of Functional Foods*, v. 4, p. 831–836, 2012.

MONTEAGUDO-MERA, A.; CARO, I.; RODRÍGUEZ-APARICIO, L. B.; RÚA, J.; FERRERO, M. A.; GARCÍA-ARRESTO, M. R. Characterization of certain bacterial strains for potential use as starter or probiotic cultures in dairy products. *Journal of Food Protection*, v. 78, n. 8, p. 1379-1386, 2011.

MORAIS, Murielle Ferreira. *Inibição de Listeria monocytogenes em salsicha por Leuconostoc mesenteroides isolada de grãos de kefir*. 2015. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

MORGAN, C.A.; HERMAN, N.; WHITE, P.A.; VESEY, G. Preservation of microorganisms by drying; A review. *Journal of Microbiological Methods*, v. 66, p. 183-193, 2006.

NURANDA, L. A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods. *Food Science and Human Wellness*, v. 4, p. 47-55, 2015.

OLIVEIRA, Letícia de Castro. *Análise do potencial probiótico de Lactococcus lactis subsp. Lactis NCDO 2118 por meio de genômica comparativa*. 2014. 123f. Dissertação (Mestrado em Bioinformática) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

OLIVEIRA, C.P.; JÚNIOR, J.P.S.; SILVA, J.A. Bacteriocinas como alternativa na conservação de alimentos. *Revista Verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável*, v. 7, n. 1, p. 09-15, 2012.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002.

ONZE, A.E.; PONS, A.; TUR, J.A. Worldwide consumption of functional foods: a systematic review. *Nutrition Reviews*, v. 70, n. 8, p. 472-481, 2012.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KAMELO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

OTLES, S.; CAGINDI, O. kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 2, n. 2, p. 54-59, 2003.

PADONOU, S.W.; NIELSEN, D.S.; HOUNHOUIGAN, J.D.; THORSEN, L.; NAGO, M.C.; JAKOBSEN, M. The microbiota of lafun, an African traditional cassava food product. *International Journal of Food Microbiology*, v.133, p.22-30, 2009.

PADONOU, S.W.; NIELSEN, D.S.; AKISSOE, N.H.; HOUNHOUIGAN, J.D.; NAGO, M.C.; JAKOBSEN, M. Development of starter culture for improved processing of Lafun, an African fermented cassava food product. *Journal of Applied Microbiology*, v.109, p.1402-1410, 2010.

PARK, G.S.; HONG, S.J.; JUNG, B.K.; LEE, C.; PARK, C.K.; SHIN, J.H. The complete genome sequence of a lactic acid bacterium *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *Dextranicum* strain DSM 20484 (T). *Journal of Biotechnology*, v. 2019, p. 3-4, 2016.

PENIDO, Fernanda Corrêa Leal. *Isolamento e identificação molecular da microbiota predominante na fermentação natural de mandioca: seleção de culturas indicadoras para produção de polvilho azedo em escala piloto*. 2013. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

PENIDO, F.C.L.; PILÓ, F.B.; SANDES, S.H.C.; NUNES, A.C.; COLEN, G.; OLIVEIRA, E.S.; ROSA, C.A.; LACERDA, I.C.A. Selection of starter cultures for the production of sour cassava starch in a pilot-scale fermentation process. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 49, p. 911-919, 2018.

PENIDO, F.C.L.; GOULART, C.O.; GALVA~O, Y.C.F.; TEIXEIRA, C.V.; OLIVEIRA, R.B.P.; BORELLI, B.M.; GUIMARA~ES, G.M.; NEUMANN, E.; SANDE, D.; ARAÚJO, R.L.B.; ROSA, C.A.; LACERDA, I.C.A. Antagonistic lactic acid bacteria in association with *Saccharomyces cerevisiae* as starter cultures for standardization of sour cassava starch production. *Journal of Food Science and Technology*, v. 56, n. 9, p. 3969-3979, 2019.

PEREIRA, V.G.; GÓMEZ, R.J.H.C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. *Semina: Ciência Agrária*, v. 28, n. 2, p. 229-240, 2007.

PEREIRA, Juliane Mascarenhas. *Características funcionais, antimicrobianas e aplicação das águas sobrenadantes da fermentação do amido de mandioca*. 174f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

PERDANA, J.; BERESCHENKO, L.; FOX, M. B.; KUPERUS, J. H.; KLEEREBEZEM, M.; BOOM, R. M.; SCHUTYSER, M. A. Dehydration and thermal inactivation of *Lactobacillus plantarum* WCFS1: Comparing single droplet drying to spray and freeze-drying. *Food Research International*, v. 54, n. 2, p. 1351–1359, 2013.

PIDOUX, M. The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v. 5, p. 223–238, 1989.

PIMENTEL-GONZÁLEZ, D. J.; CAMPOS-MONTIEL, R. G.; LOBATO-CALLEROS, C.; PEDROZA-ISLAS, R.; VERNON-CARTER, E. J. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, v. 42, n. 2, p. 292–297, 2009.

PINTO, S.S.; VERRUCK, S.; VIEIRA, C.R.W.; PRUDÊNCIO, E.S.; AMANTE, E.R.; AMBONI, R.D.M.C. Influence of microencapsulation with sweet whey and prebiotics on the survival of *Bifidobacterium*-BB-12 under simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *LWT - Food Science and Technology*, v. 64, p. 1004-1009, 2015.

PODDAR, D.; DAS, S.; JONES, G.; PALMER, J.; JAMESON, G. B.; HAVERKAMP, R. G.; SINGH, H. Stability of probiotic *Lactobacillus paracasei* during storage as affected by the drying method. *International Dairy Journal*, v. 39, n. 1, p. 1–7, 2014.

POFFO F.; SILVA, M.A.C. Caracterização taxonômica e fisiológica de bactérias ácido-láticas isoladas de pescado marinho. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, v. 31, p. 303-307, 2011.

PRADO, C. S; SANTOS, W. L. M.; CARVALHO, C. R.; MOREIRA, E. C.; COSTA, J. O. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas de embutidos curados frente a *Listeria monocytogenes*. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, n.4, p.417- 423, 2000.

PRADO, F.C., LINDNER, J.D.D., INABA, J., THOMAZ-SOCCOL, V., BRAR, S.K., SOCCOL, C.R. Development and evaluation of a fermented coconut water beverage with potential health benefits. *Journal of Functional Foods*, v.12, p. 489–497, 2015.

PUTRI, W.D.R.; HARYADI; MARSENO, D.W.; CAHYANTO, M.N. Role of Lactic Acid Bacteria on Structural and Physicochemical Properties of Sour Cassava Starch. *Apcbee Procedia*, v. 2, p. 104-109, 2012.

RAMOS, C.L.; THORSEN, L.; SCHWAN, R.F.; JESPERSEN, L. Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiology*, v. 36, p. 22-2, 2013.

REDDY, G.; ALTAF, M.; NAVEENA, B. J.; VENKATESHWAR, M.; KUMAR, E. V. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation – A review. *Biotechnology Advances*, v. 26, p. 22-34, 2008.

ROSA, P.R.F.; GOMES, B.C.; VARESCHE, M.B.A.; SILVA, E.L. Characterization and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from fermentative bioreactors during hydrogen production using cassava processing wastewater. *Chemical Engineering Journal*, v. 248, p. 1-9, 2016.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, v. 84, p. 197-215, 2000.

SABIR, F.; BEYATLI, Y.; COKMUS, C.; DARILMAZ, D. O. Assessment of Potential Probiotic Properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. Strains Isolated from kefir. *Journal of Food Science*, v. 75, n. 9, p. 568- 573, 2010.

SALVETTI, E.; O'TOOLE, P.W. When regulation challenges innovation: The case of the genus *Lactobacillus*. *Trends in Food Science & Technology*, v. 66, p.187-194, 2017.

SANDES, S.; ALVIM, L.; SILVA, B.; ACURCIO, L.; SANTOS, C.; CAMPOS, M.; SANTOS, C.; NICOLI, J.; NEUMANN, E.; NUNES, A. Selection of new lactic acid bacteria strains bearing probiotic features from mucosal microbiota of healthy calves: Looking for immunobiotics through in vitro and in vivo approaches for immunoprophylaxis applications. *Microbiological Research*, v. 200, p. 1-13, 2017.

SANDERS, M.; KLAENHAMMER, T. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *Journal of Dairy Science*, v. 84, n. 2, p. 319-331, 2001.

SANTOS, J.P.V.; ARAÚJO, T.F.; FERREIRA, C.L.L.F; GOULART, S.M. Evaluation of antagonistic activity of milk fermented with kefir grains of different origins. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 56, n. 5, p. 823-827, 2013.

SANTOS, R.B.; BARBOSA, L.P.J.L.; BARBOSA, F.H.F. Probióticos: microrganismos funcionais. *Ciência Equatorial*, v. 1, n. 2, p. 26-38 - ISSN 2179-9563, 2011.

SANTOS, C.C.A.A., LIBECK, B.S., SCHWAN, R.F. Co-culture fermentation of peanut – soy milk for the development of a novel functional beverage. *International Journal of Food Microbiology*, v.186, p. 32–41, 2014.

SANTOS, A.; SAN MAURO, M.; SANCHEZ, A.; TORRES, J.M.; MARQUINA, D. The Antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus* spp. Isolated from kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 26, p. 434-437, 2003.

SANTOS, F. L.; SILVA, E. O.; BARBOSA, A. O.; SILVA, J. O. kefir: uma nova fonte alimentar funcional?. *Centro de Ciências da Saúde (CCS)*, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Bahia. 2012.

SARKAR, S. Potential of kefir as a dietetic beverage – a review. *British Food Journal*, v.109, n. 4, p. 280-290, 2007.

SAVINI, M.; CECCHINI, C.; VERDENELLI, M.C.; SILVI, S.; ORPIANESI, C.; CRESCI A. Pilot-scale Production and Viability Analysis of Freeze-Dried Probiotic Bacteria Using Different Protective Agents. *Nutrients*, v. 2, n. 3, p. 330-339, 2010.

SCHNEEDORF, J.M. kefir D'Aqua and Its Probiotic Properties. *IntechOpen – Probiótico em animais*, n. 3, p. 53-76, 2012.

SILVA, Andreza Tallyne de Aguiar. *Cultivo de kefir em soro de leite e avaliação da viabilidade celular por liofilização*. 2015. 48f. TCC (Bacharel em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão. 2015.

SILVA, B.C.; JUNG, L.R.C.; SANDES, S.H.C.; ALVIM, L.B.; BOMFIM, M.R.Q.; NICOLI, J.R.; NEUMANN, E.; NUNES, A.C. In vitro assessment of functional properties of lactic acid bacteria isolated from faecal microbiota of healthy dogs for potential use as probiotics. *Beneficial Microbes*, v. 4, p. 267- 275, 2013.

SILVA, H.A.; MURRIETA, R.S.S. Mandioca a rainha do Brasil? Ascensão e queda da *Manihot esculenta* no estado de São Paulo. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas*, v. 9, n.1, p.37-60, 2014.

SILVA, A.T.A.; OLIVEIRA, S.K.M.; LOCATELLI, G.O.; FINKLER, C.L.L. Eficiência de diferentes crioprotetores, empregados na liofilização, para preservação de bactérias lácticas e leveduras em kefir. In.: Anais do 12º Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos- Microal, 2014 - *Blucher food science proceedings*, v. 1, n. 1. São Paulo: Editora Blucher, 2014.

SIMOVA, E.; BESHKOVA, D.; ANGELOV, A.; HRISTOZOVA, T.; FRENGOVA, G.; SPASOV, Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them, *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, v.28, p.1e6, 2002.

ŠINKO, S.; ZAMBERLIN, Š.; SAMARŽIJA, D. Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo*, v. 63, n.1, p. 3-14, 2013.

SHIBY, V.K.; MISHRA, H.N. Fermented Milks and Milks products as funtional foods – a review. *Food Science and Nutrition*, v. 53, n. 5, p. 482-496, 2013.

STANTON, C.; DESMOND, C.; COAKLEY, M.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In: FARNWORTH, E.R., ed. Handbook of fermented functional foods. Boca Raton: CRC Press, p. 27-58, 2003.

STRASSER, S.; NEUREITER, M.; GEPPL, M.; BRAUN, R.; DANNER, H. Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bactéria. *Journal of Applied Microbiology*, v. 107, p. 167-177, 2009.

TACO *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos*. 4.ed. NEPA/UNICAMP, 2011, 161p.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of gram positive bacteria. *American Society for Microbiology*, v. 40, n. 3, p. 722-756, 1976.

TRIPATHI, M.K.; GIRI, S.K. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, v. 9, p. 225–241, 2014.

UGWU, F.M. The Potentials of Roots and Tubers as Weaning Foods. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 8, n.10, p.1701-1705, 2009.

VALERIANO, V. D.; PARUNGAO-BALOLONG, M. M.; KANG, D. K. *In vitro* evaluation of the mucin-adhesion ability and probiotic potential of *Lactobacillus mucosae* LM1. *Journal of Applied Microbiology*, v. 117, n. 2, p. 485–497, 2014.

VAN DE GUCHTE, P.S.; CHERVAUX, C.; SMOKVINA, T.; EHRLICH, S.D.; MAGUIN, E. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 82, p. 186-216, 2002.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Lactic acid starter and probiotic bacteria a comparative “in vivo” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, v. 36, n. 9, p. 895-904, 2003.

XIRAPHI, N.; GEORGALAKI, M.; RANTSIOU, K.; COCOLIN, L.; TSAKALIDOU, E.; DROSINOS, E.H. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Meat Science*, v. 80, p. 194-203, 2008.

ZAGO, M.; FORNASARI, M.E.; CARMINATI, D.; BURNS, P.; SUÀREZ, V.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J.; GIRAFFA, G. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, v. 28, p. 1033-1040, 2011.

ZANIRATI, D.F.; ABATEMARCO, M.J.R.; SANDES, S.H.C.; NICOLI, J.R.; NUNES, A.C.; NEUMANN, E. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Journal Anaerobe*, v. 32, p. 70-76, 2015.

WALSH, A.M.; CRISPIE, F.; KILCAWELY, K.; O’SULLIVAN, O.; O’SULLIVAN, M.G.; CLAEISSON, M.J.; COTTER, P.D. Microbial Succession and Flavor Production in the Fermented Dairy Beverage kefir. *Applied and Environmental Science*, v. 1, n. 5, p. e00052-16, 2016.

WENDLING, L.K.; WESCHENFELDER, S. Probióticos e alimentos lácteos fermentados - uma revisão. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 68, n. 395, p. 49-57, 2013.

WESCHENFELDER, S.; PEREIRA, G.M.; CARVALHO, H.H.C.; WIEST, J.M. Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, n. 2, p. 473-480, 2011.

WITTHUHN, R.C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T.J. Characterization of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal*, v. 15, p. 383-389, 2004.

WORAPRAYOTE, W.; MALILA, Y.; SORAPUKDEE, S.; SWETWIWATHANA, A.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. *Meat Science*, v.120, p. 118-132, 2016.

WÜRTH, R.; HÖRMANNSPERGER, G.; WILKE, J.; FOERST, P.; HALLER, D.; KULOZIK, U. Protective effect of milk protein based microencapsulation on bacterial survival in simulated gastric juice versus the murine gastrointestinal system. *Journal of Functional Foods*, v. 15, p. 116–125, 2015.

YAMAGUCHI, S.K.F.; KREBS, C.S.; BERTOLLI, S.L.; CARVALHO, L.F. Freeze-drying of dairy products: A review. *Revista Espacios*, v. 38, n. 22, p. 2, 2017.

YANG, Y.; SHEVCHENKO, A.; KNAUST, A.; ABUDURESSULE, I.; XINGJUN, H.U.W.L.; WANG, C.; SHEVCHENKO, A. Proteomics evidence for kefir dairy in Early Bronze Age China. *Journal of Archaeological Science*, v. 45, p. 178-186, 2014.

YING, D.Y.; PHOON, M.C.; SANGUANSRI, L.; WEERAKKODY, R.; BURGAR, I.; AUGUSTIN, M.A. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: Relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. *Journal of Food Science*, v.75, p. E588–595, 2010.

YUKSEKGAG ZN, BEYATLI Y, ASLIM B. Determination of some characteristics of cocci forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v. 37, p. 663-667, 2004.