

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação**

**Propriedades Probióticas *in vitro* de *Lactobacillus* spp. Isolados de Queijos Minas
Artesanais da Serra da Canastra – MG**

Camila Rodrigues Gontijo de Andrade

**MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE**

Camila Rodrigues Gontijo de Andrade

**Propriedades Probióticas *in vitro* de *Lactobacillus* spp. Isolados de Queijos Minas
Artesanais da Serra da Canastra - MG**

Dissertação apresentada à UFMG,
como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em
Medicina Veterinária Tecnologia
e Inspeção de Produtos de Origem
Animal.

Orientador: Professor Marcelo
Resende de Souza

**Belo Horizonte,
Escola de Veterinária da UFMG
2012**

Dissertação defendida e aprovada em 24 de abril de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:

Prof. Marcelo Resende de Souza
(Orientador)

Profa. Cláudia Freire de Andrade Moraes Penna

Dra. Ana Carolina Peixoto Teixeira

AGRADECIMENTOS

Várias pessoas contribuíram generosamente para a materialização do meu sonho de realizar o Mestrado.

Agradeço ao excelente profissional, o professor Marcelo Resende de Souza. Muito obrigada, pela consideração de ter aceitado a orientação de minha dissertação e pela confiança depositada em mim.

A professora Cláudia Freire de Andrade Morais Penna e a Doutora Ana Carolina Peixoto Teixeira pelas considerações e presença na banca de dissertação.

Aos colegas da Escola de Veterinária, especialmente Leo, Dalila, Felipe e Renata. Obrigada pela importante ajuda durante o experimento.

Aos professores do DTIPOA.

Aos funcionários do DTIPOA, Milton, Maura, Evaldo e Marco Antônio, pelo grande auxílio, paciência e boa vontade.

Ao colegiado de pós-graduação da Escola de Veterinária da UFMG, em especial as funcionárias Luzete e Débora.

A todos do laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitos do ICB.

Ao tio Humberto, meu professor de todas as horas, muito obrigada pela constante ajuda e palavras de incentivo.

A todos os meus tios, tias, primos e primas pela ajuda, torcida e orações.

A minha vovó Izaura, pelo esteio e por ser um exemplo de vida, forte, guerreira e batalhadora.

A minha querida falecida vó Neuza pela sabedoria, aconchego, ensinamentos de união familiar e valores morais.

Ao meu falecido pai. Quanta saudade! Sempre será meu ídolo, meu herói. Partiste cedo demais, mas sei que está bem. O carinho que me dedicou, estou retribuindo sendo honesta, humilde, digna em todos os sentidos. Orgulho-me, pois foi um pai amoroso, um marido íntegro, um amigo fiel e companheiro. Não há distância que me separe de sua alma e nem tão pouco que apague o amor que plantou dentro de mim.

A minha querida mãe, muito mais que mãe, minha amiga. Amiga lutadora, bondosa, linda. Quantas frustrações você me consolou, lições e mais lições. Agradeço por todos os momentos dedicados a mim (que não foram poucos), pelas palavras, pelos conselhos, pela paciência, pelo amor, pela honestidade, pela amizade e apoio sem fim. Estaremos sempre unidas!

As minhas irmãs pelas brincadeiras, aventuras, momentos de descontração e alegria. Obrigada pelo incentivo e torcida!

Ao Luiz pela paciência, compreensão e amor sincero. Obrigada por dar um novo sentido a minha vida!

Aos meus amigos que sempre me auxiliaram de alguma forma.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho.

Por fim, agradeço a Deus, ao meu Mentor e amigos espirituais, pela força e energia positiva no auxílio da evolução. Permitindo-me ter sabedoria e discernimento para sonhar, acreditar, seguir e concluir.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”.

Chico Xavier

SUMÁRIO

	RESUMO	9
	ABSTRACT	10
1.	INTRODUÇÃO	11
2.	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra	11
2.2	Alimentos funcionais	12
2.3	Micro-organismos probióticos	13
2.3.1	Histórico e Definição	13
2.3.2	Produtos probióticos	13
2.3.3	Mecanismos de ação	14
2.3.4	Efeitos benéficos	15
2.4	O gênero <i>Lactobacillus</i>	16
2.5	Análises <i>in vitro</i> de micro-organismos probióticos	17
3.	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	Amostragem	17
3.2	Teste de antagonismo <i>in vitro</i>	17
3.3	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos <i>in vitro</i>	18
3.4	Teste de sensibilidade ao pH gástrico <i>in vitro</i>	18
3.5	Teste de sensibilidade aos sais biliares <i>in vitro</i>	19
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1	Antagonismo <i>in vitro</i> contra bactérias reveladoras de amostras de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra	19
4.2	Susceptibilidade <i>in vitro</i> a antimicrobianos de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra	21
4.3	Sensibilidade <i>in vitro</i> ao pH gástrico de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra	23
4.4	Sensibilidade <i>in vitro</i> a sais biliares de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra	24
4.5	Seleção dos <i>Lactobacillus</i> spp. com potencial probiótico isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra	25
5.	CONCLUSÕES	26
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Médias dos halos de inibição (mm), de duas repetições em triplicata, do teste de antagonismo <i>in vitro</i> de amostras de <i>Lactobacillus</i> spp., isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra, contra bactérias reveladoras	19
Tabela 2	Médias dos halos de inibição (mm), de duas repetições em triplicata, do teste de antagonismo <i>in vitro</i> de amostras de <i>Lactobacillus</i> spp., isoladas de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra para cada bactéria reveladora	20

Tabela 3	Médias dos halos de inibição (mm), de duas repetições em triplicata, do teste de antagonismo <i>in vitro</i> de cada amostra de <i>Lactobacillus</i> spp., isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra, frente às bactérias reveladoras	20
Tabela 4	Médias dos halos de inibição (mm) por antimicrobianos, de duas repetições em duplicata, de amostras de <i>Lactobacillus</i> spp., isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra	22
Tabela 5	Absorbância máxima alcançada, em duas repetições em triplicata, por amostras de <i>Lactobacillus</i> spp., isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra, em 12 horas de incubação a 37°C, após 3 h de incubação em pH 7,0 (controle) e pH 2,0 (ácido gástrico) a 37°C	23
Tabela 6	Percentual de inibição por ácido gástrico (pH 2,0), de duas repetições em triplicata, sobre amostras de <i>Lactobacillus</i> spp., isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra, em 12 horas de incubação a 37°C, após 3 h de incubação em ácido gástrico (pH 2,0) a 37°C	24
Tabela 7	Absorbância máxima alcançada, em duas repetições em triplicata, por amostras de <i>Lactobacillus</i> spp., isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra, em 12 h de incubação a 37°C na presença de 0,3% de sais biliares e o controle	24
Tabela 8	Percentual de inibição por sais biliares (<i>oxgall</i> , <i>BD</i> , 0,3%), de duas repetições em triplicata, sobre amostras de <i>Lactobacillus</i> spp., isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra, em 12 h de incubação a 37°C	25

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Relação de algumas espécies do gênero <i>Lactobacillus</i>	16
----------	--	----

ANEXOS

Anexo 1	Níveis de susceptibilidade a antimicrobianos de <i>Lactobacillus</i> spp. de acordo com diâmetros dos halos de inibição (mm) em teste de difusão em ágar MRS (<i>Difco</i>)	32
Anexo 2	Curvas de crescimento da amostra <i>L. casei</i> (A1), incubada a 37°C em caldo MRS (<i>Difco</i>), após incubação em solução salina 0,9% em pH 2,0 e solução salina 0,9% em pH 7,0, por três horas	33
Anexo 3	Curvas de crescimento da amostra <i>L. rhamnosus</i> (A8), incubada a 37°C em caldo MRS (<i>Difco</i>), após incubação em solução salina 0,9% em pH 2,0 e solução salina 0,9% em pH 7,0, por três horas	33
Anexo 4	Curvas de crescimento da amostra <i>L. platarum</i> (A21), incubada a 37°C em caldo MRS (<i>Difco</i>), após incubação em solução salina 0,9% em pH 2,0 e solução salina 0,9% em pH 7,0, por três horas	34
Anexo 5	Curvas de crescimento da amostra <i>L. plantarum</i> (B13), incubada a 37°C em caldo MRS (<i>Difco</i>), após incubação em solução salina 0,9% em pH 2,0 e solução salina 0,9% em pH 7,0, por três horas	34
Anexo 6	Curvas de crescimento da amostra <i>L. plantarum</i> (B17), incubada a 37°C em caldo MRS (<i>Difco</i>), após incubação em solução salina 0,9% em pH 2,0 e solução salina 0,9% em pH 7,0, por três horas	35
Anexo 7	Curvas de crescimento da amostra <i>L. plantarum</i> (B21), incubada a 37°C em caldo MRS (<i>Difco</i>), após incubação em solução salina 0,9% em pH 2,0 e solução salina 0,9% em pH 7,0, por três horas	35
Anexo 8	Curvas de crescimento da amostra <i>L. plantarum</i> (D16), incubada a 37°C em caldo MRS (<i>Difco</i>), após incubação em solução salina 0,9% em pH 2,0 e solução salina 0,9% em pH 7,0, por três horas	36
Anexo 9	Curvas de crescimento da amostra <i>L. casei</i> (A1), incubada a 37°C, em meio contendo caldo MRS (<i>Difco</i>) com 0,3% de <i>Oxgall</i> (<i>BD</i>) e em caldo MRS (<i>Difco</i>)	36

Anexo 10	puro Curvas de crescimento da amostra <i>L. rhamnosus</i> (A8), incubada a 37°C, em meio contendo caldo MRS (<i>Difco</i>) com 0,3% de Oxgall (<i>BD</i>) e em caldo MRS (<i>Difco</i>) puro	37
Anexo 11	Curvas de crescimento da amostra <i>L. plantarum</i> (A21), incubada a 37°C, em meio contendo caldo MRS (<i>Difco</i>) com 0,3% de Oxgall (<i>BD</i>) e em caldo MRS (<i>Difco</i>) puro	37
Anexo 12	Curvas de crescimento da amostra <i>L. plantarum</i> (B13), incubada a 37°C, em meio contendo caldo MRS (<i>Difco</i>) com 0,3% de Oxgall (<i>BD</i>) e em caldo MRS (<i>Difco</i>) puro	38
Anexo 13	Curvas de crescimento da amostra <i>L. plantarum</i> (B17), incubada a 37°C, em meio contendo caldo MRS (<i>Difco</i>) com 0,3% de Oxgall (<i>BD</i>) e em caldo MRS (<i>Difco</i>) puro	38
Anexo 14	Curvas de crescimento da amostra <i>L. plantarum</i> (B21), incubada a 37°C, em meio contendo caldo MRS (<i>Difco</i>) com 0,3% de Oxgall (<i>BD</i>) e em caldo MRS (<i>Difco</i>) puro	39
Anexo 15	Curvas de crescimento da amostra <i>L. plantarum</i> (D16), incubada a 37°C, em meio contendo caldo MRS (<i>Difco</i>) com 0,3% de Oxgall (<i>BD</i>) e em caldo MRS (<i>Difco</i>) puro	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg	micrograma
µL	microlitro
°C	graus Celsius
%	por cento
ATCC	American Type Culture Collection (Cultura de Coleção Tipo Americano)
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado)
BHI	Brain Heart Infusion (Infusão de Cérebro e Coração)
cm	centímetro
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético)
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (Ensaio Imuno-enzimático)
et al.	e outros
g	força gravitacional
h	Hora
Kb	Quilobyte
Ltda	Limitada
m	metro
mL	mililitro
mM	micro Mol
mm	milímetro
MRS	Man, Rogosa e Sharpe
nm	nanômetro
OD	Optical Density (Densidade Óptica)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
p/v	peso por volume
v/v	volume por volume
pH	potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido Ribonucléico
rDNA	Ácido Desoxirribonucléico ribossomal

Tris HCL	Tris Hidrocloreto
UV	Ultravioleta
V	Volts

RESUMO

Os probióticos são micro-organismos vivos que conferem efeitos benéficos ao seu hospedeiro. Os queijos Minas artesanais da Serra da Canastra possuem diversas bactérias ácido-láticas ainda não exploradas que podem apresentar grande potencial probiótico. O objetivo deste estudo foi determinar o potencial probiótico *in vitro* de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos artesanais da Serra da Canastra. As propriedades probióticas avaliadas foram antagonismo entre amostras isoladas frente a micro-organismos indicadores, susceptibilidade a antimicrobianos, sensibilidade ao ácido gástrico e sensibilidade a sais biliares. Todas as bactérias ácido-láticas testadas apresentaram resistência ao ácido gástrico (pH 2,0) e aos sais biliares (0,3%), atividade antagonista contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* var. Typhimurium, *E. faecalis* e bactérias ácido-láticas isoladas dos próprios queijos, *Lactobacillus plantarum* (D27) e *Lactobacillus rhamnosus* (B25). Todas as amostras foram sensíveis aos antimicrobianos eritromicina e tetraciclina e resistentes a ciprofloxacina, gentamicina, oxacilina, estreptomicina e vancomicina. *L. plantarum* (B17) apresentou melhor potencial probiótico. Mais estudos são necessários para verificar a presença e capacidade de transmissão de genes de resistência antimicrobiana a outros micro-organismos e avaliar o potencial dos micro-organismos *in vivo*.

Palavras-chave: queijo Minas artesanal, micro-organismos probióticos, propriedades probióticas, *Lactobacillus* spp.

ABSTRACT

Probiotics are microorganisms that confer beneficial effects to consumers. Artisanal Minas cheese from Serra da Canastra region has several lactic acid bacteria which may have probiotic potential, even though not it has not been studied yet. The objective of this study was to determine some in vitro probiotic features of Lactobacillus spp. isolated from Serra da Canastra artisanal cheeses in order to select some bacteria for future production of safer cheeses keeping their natural flavor and tradition. The evaluated properties were antagonism against indicator microorganisms, antimicrobial susceptibility and also sensitivity to gastric acid and sensitivity to bile salts. All lactic acid bacteria tested were resistant to gastric acid (pH 2.0) and bile salts (0.3%). Antagonistic activities were detected against Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Salmonella enterica var. Typhimurium, Enterococcus faecalis and other bacteria isolated from the same cheeses – Lactobacillus plantarum (D27) and Lactobacillus rhamnosus (B25). All samples were sensitive to the antimicrobials erythromycin, tetracycline and resistant to ciprofloxacin, gentamycin, oxacillin, streptomycin and vancomycin). L. plantarum (B17) presented the best probiotic potential. More studies are needed to verify the presence and the capacity of transmission of antimicrobial resistance genes to other microorganisms and evaluate the potential of microorganisms in vivo.

Keywords: artisanal Minas cheese, probiotic microorganisms, probiotic properties, Lactobacillus spp.

INTRODUÇÃO

Os consumidores estão mais conscientes do papel da alimentação na saúde e gradativamente têm interesse em consumir alimentos saudáveis (Tamine, 2005; Badaró et al., 2008). O mercado de produtos lácteos probióticos é promissor e define-se como uma tendência importante entre os alimentos funcionais (Hawrelak, 2003; Santos et al., 2008).

Os probióticos são micro-organismos que oferecem efeitos benéficos ao hospedeiro (Coppola e Turnes, 2004; Tamine, 2005; Badaró et al., 2008). Estudos recentes têm indicado que as bactérias probióticas podem proporcionar várias vantagens terapêuticas, tais como a modificação do sistema imunitário, a redução de colesterol no sangue, diminuição da intolerância à lactose, manutenção da remissão da doença de Crohn, a cura da diarreia e prevenção de infecções nos órgãos uro-genitais (Hekmat, Soltani e Reid, 2009).

Em Minas Gerais, a produção de queijo Minas artesanal é uma atividade tradicional de vários municípios e, além de ser a principal atividade geradora de renda, está incorporada à identidade sócio-cultural da população mineira (Furtado, 1980). A produção de queijo, mesmo com o advento de vários processos tecnológicos mais avançados, não cessa porque se trata de uma atividade que tem história, pertence ao “modus vivendi” das famílias locais que desde o início da ocupação destes campos viam na fabricação do queijo uma alternativa segura de renda e de sobrevivência (Almeida e Fernandes, 2004).

O queijo Minas artesanal é produzido, na maioria das vezes, de maneira tradicional nas fazendas a partir de leite cru e, por isso, apresenta grande variabilidade na sua microbiota (Costa, 2010). As informações sobre o queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, principalmente a respeito de sua microbiota endógena, e os fatores que podem determinar variações nesta microbiota ainda são limitadas (Resende, 2010). Diversas pesquisas envolvendo alimentos produzidos artesanalmente são frequentes e têm como principal objetivo a caracterização da microbiota e a verificação das propriedades probióticas dos micro-organismos desejáveis, principalmente das bactérias ácido-láticas (Costa, 2010).

Os micro-organismos probióticos são selecionados inicialmente com o desenvolvimento de testes *in vitro* que avaliam a segurança e caracterizam as culturas e os mecanismos dos efeitos probióticos (FAO, 2002; Lee e Salminen, 2009). Esses testes ajudam a identificar as culturas que são mais resistentes e que podem exercer melhores chances de sucesso como produtos probióticos (Tamine, 2005).

O objetivo deste estudo foi determinar o potencial probiótico *in vitro* de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos Minas artesanais produzidos na região da Serra da Canastra, previamente isolados e identificados ao nível molecular por PCR ARDRA 16S23S.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra

O queijo Minas artesanal é uma variedade de origem brasileira, cuja produção iniciou-se no século XIX em Minas Gerais (Rezende et al., 2010).

Segundo a Lei estadual nº 14.185 de 2002 (IMA, 2002), para ser caracterizado como queijo Minas Artesanal, o processo de produção deve seguir algumas normas como ser produzido a partir do leite cru, com o uso do “pingo” – ou soro fermento - e de certas técnicas de maturação, além de apresentar cor e sabor próprios, massa uniforme é isento de corantes e conservantes.

O queijo Minas artesanal, feito a partir de leite cru não pasteurizado, promove a identidade dos queijos artesanais produzidos nas regiões de Araxá, Serra da Canastra, Cerrado, Serro e Campo das Vertentes (IMA, 2011).

Os queijos artesanais têm grande importância social no Brasil em consequência de seu ambiente histórico e cultural, sendo um dos principais produtos da agroindústria familiar mineira (Pinto et al., 2009; Gomes, 2012). Segundo o Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN), a produção do queijo Minas artesanal garantiu ao longo dos séculos a sustentabilidade das famílias, representando ajuda imprescindível à economia familiar (IPHAN, 2008).

O Conselho Consultivo do IPHAN aprovou em quinze de maio de 2008, por aclamação, o

registro do modo artesanal de fazer queijo Minas como patrimônio imaterial brasileiro (IPHAN, 2008).

O patrimônio imaterial é um legítimo referencial da memória coletiva de um grupo ou de uma comunidade. É a expressão da memória viva e dinâmica, merecendo que, através das políticas públicas, se perpetue e se dê condições de transmissão das tradições envolvidas com a categoria imaterial do patrimônio (Campos, 2010).

O “pingo” é uma porção de soro fermentado originado do dessoramento de queijos produzidos no dia anterior e que é coletado em vasilhames para ser utilizado como fermento. O pingo é responsável pelas características sensoriais tradicionais e peculiares do queijo Minas artesanal (Leite, 1993).

O queijo Minas artesanal da Serra da Canastra só é produzido nessa região, onde se combinam, de maneira única, solo, pastagem, clima, altitude e água. As informações sobre o queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, principalmente a respeito de sua microbiota endógena, e os fatores que podem determinar variações nesta microbiota ainda são limitados (Resende et al., 2011).

2.2 Alimentos funcionais

Em meados dos anos 80, surgiu no Japão o termo “alimentos funcionais”, como resultado de esforços para desenvolver alimentos que possibilitassem a redução dos gastos com saúde pública, considerando a elevada expectativa de vida naquele país (Araya e Lutz, 2003).

Os alimentos funcionais são aqueles que, além do seu valor nutritivo intrínseco, contêm um ou mais compostos nutritivos ou não, que apresentam funções bioquímicas e fisiológicas benéficas à saúde humana. Esses alimentos incluem produtos integrais, fortificados, enriquecidos ou melhorados, que têm efeitos potencialmente benéficos na saúde, quando consumidos regularmente como parte de uma dieta variada e em níveis efetivos (Costa e Rosa, 2006).

Os alimentos funcionais nutrem o organismo e são um veículo de promoção de saúde e qualidade de vida (Santos et al., 2008). Um alimento é considerado “funcional” se demonstrar um ou mais benefícios no

organismo. Além de obter efeitos nutricionais, ele deve melhorar o estado de saúde, o bem-estar físico e mental e/ou reduzir o risco de doença (Smit, 2003; Stringheta et al., 2007; Badaró et al., 2008).

Alimentos funcionais também são conhecidos por outros nomes, como nutracêuticos, alimentos terapêuticos e alimentos medicinais. Tais alimentos podem conter um ou até mesmo uma combinação de componentes que promovem efeitos fisiológicos desejáveis no corpo humano (Cruz, Faria e Van Dender, 2007).

Os alimentos lácteos podem ser divididos em três grupos: produtos básicos (leite, leites fermentados, queijos, sorvetes); produtos de valor acrescentado, em que a composição do leite foi alterada, como produtos com baixo teor de lactose ou sem lactose, fórmulas hipoalergênicas com proteína hidrolisada para bebês hipersensíveis, produtos lácteos enriquecidos com minerais ou vitaminas; e os produtos lácteos funcionais que possuem benefícios comprovados à saúde. Os produtos lácteos funcionais têm o leite como base, sendo enriquecidos com um componente funcional ou ingredientes originários do leite. Os produtos mais comumente produzidos pela indústria de laticínios funcionais são aqueles com bactérias probióticas (Smit, 2003).

De acordo com a legislação específica brasileira, alegação de propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano (ANVISA, 1999).

No Brasil, o órgão que avalia e defere a utilização de alegações de propriedades funcionais nos alimentos é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, através de sua Comissão Técnico-Científica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos (CTCAF), mesmo para alimentos, como os lácteos, regulamentados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento –MAPA (ANVISA, 2005).

Dentre aqueles com alegações de propriedades funcionais já aprovadas pela ANVISA, destacam-se, para o setor de lácteos, produtos enriquecidos com ácidos graxos poliinsaturados,

carotenóides, fibras alimentares, fitosteróis e probióticos (Ferreira et al., 2010).

2.3 Micro-organismos probióticos

2.3.1. História e Definição

O termo “probiótico”, de origem grega, significa “para a vida”, e tem sido empregado das mais diversas maneiras ao longo dos últimos anos (Gomes e Malcata, 1999; Lee e Salminen, 2009). Tal termo foi introduzido pela primeira vez em 1965 por Lilly e Stillwell. Eles o definiram como um fator de origem microbiana que estimula o crescimento de outros micro-organismos (Lilly e Stillwell, 1965; Fuller, 1989; Gomes e Malcata, 1999; Guarner, Khan e Garisch, 2008; Lee e Salminen, 2009). Posteriormente, Parker em 1974, definiu o nome “probiótico” como organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal. Essa definição era, no entanto, pouco satisfatória uma vez que a palavra “substância” poderia incluir suplementos tais como antimicrobianos, cuja função é virtualmente oposta (Parker, 1974; Gomes e Malcata, 1999; Lee e Salminen, 2009). Em 1989, Fuller enfatizou o requisito de viabilidade para os micro-organismos probióticos e introduziu a ideia de um efeito benéfico para o hospedeiro (Fuller, 1989; Guarner, Khan e Garisch, 2008; Lee e Salminen, 2009).

Havenaar e Huis Int Veld (1992) disseram que os probióticos são “um micro-organismo ou uma mistura de culturas que, quando aplicadas ao homem ou animal, afetam benéficamente o hospedeiro por melhorar as propriedades da microflora indígena”.

Em 1998 o *International Life Sciences Institute - ILSI* definiu probióticos como “um suplemento alimentar microbiano viável que beneficia a saúde do hospedeiro” (Salminen et al., 1998; Lee e Salminen, 2009).

Diplock et al. (1999) apontaram que “alimento probiótico é funcional se tiver sido satisfatoriamente demonstrado benefício sobre uma ou mais funções alvo no corpo além de adequados efeitos nutricionais, de uma maneira relevante tanto para melhorar o estado de saúde e bem-estar como para reduzir o risco de doenças”.

Naidu et al. (1999) disseram que os micro-organismos probióticos são “um adjuvante

microbiano alimentar que afeta benéficamente a fisiologia do hospedeiro por modulação na mucosa e imunidade sistêmica, bem como melhora o equilíbrio nutricional e microbiano no trato intestinal”.

Tannock et al. (2000) observaram que o consumo de probióticos a longo prazo não era associado com qualquer alteração drástica na composição microbiota intestinal, e assim propuseram uma definição alternativa: “são células microbianas que transitam pelo trato gastrointestinal e que, ao fazer isso, beneficiam a saúde do consumidor”.

Schrezenmeir e Vrese (2001) definiram os probióticos como “preparação de um produto contendo micro-organismos viáveis, definidos em número suficiente, que alteram a microbiota (por implantação ou colonização), contribuindo com hospedeiro por exercer efeitos benéficos para a saúde”.

Atualmente, a palavra “probiótico” é definida pela *Food and Agriculture Organization and World Health Organization* (FAO/WHO) como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidade apropriada, conferem benefícios à saúde do hospedeiro, pois melhoram o equilíbrio microbiano intestinal (FAO, 2002; Tamine, 2005; Saad, 2006; Guarner, Khan e Garisch, 2008; Dilnawaz et al., 2011).

2.3.2. Produtos probióticos

As preparações probióticas podem conter culturas simples ou qualquer número até oito culturas, sendo que as que contêm culturas múltiplas são ativas contra uma ampla gama de condições e podem ser usadas em diversas espécies animais (Fuller, 1989). É importante que os produtos probióticos contenham cepas bem caracterizadas, no sentido de obter funcionalidade probiótica no organismo e, consequentemente, trazer benefícios ao hospedeiro (Komatsu, Buriti e Saad, 2008).

Os alimentos contendo bactérias probióticas têm sido comercializados no Japão desde 1920 (Tamine, 2005). Os produtos probióticos disponíveis no mercado contêm os gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium* (Fuller, 1989; Marth e Steele, 2001; Tamine, 2005; Tamine, 2006; Lee e Salminen, 2009;

Dilnawaz et al., 2011). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* e algumas espécies de *Escherichia coli* e *Bacillus* também são utilizadas como probióticos (Guarner, Khan e Garisch, 2008; Dilnawaz et al., 2011).

Os meios mais comuns de veiculação de micro-organismos probióticos para humanos são os produtos lácteos e os alimentos fortificados. No entanto, também existem no mercado comprimidos, cápsulas, tabletes e sachês que contêm bactérias probióticas na forma liofilizada (FAO, 2006; Tamine, 2006; Guarner, Khan e Garisch, 2008). Para os animais de produção, os produtos probióticos são administrados nas espécies bovina, ovina, caprina, suína, equina, nas aves e em animais de companhia, dependendo do tipo de utilização pretendida, podem ser fornecidos na forma de ração peletizada, cápsulas, pasta e pó (Fuller, 1989).

2.3.3. Mecanismo de ação

O intestino contém uma abundante microbiota, 100.000 bilhões de bactérias localizadas fundamentalmente no cólon e que abrangem centenas de espécies. A maioria das células bacterianas das amostras fecais não podem ser cultivadas. Há alta diversidade de espécies microbianas, cada hospedeiro abriga seu próprio padrão de composição bacteriana, determinado em parte pelo genótipo do hospedeiro e pela colonização inicial no nascimento via transmissão vertical (Guarner, Khan e Garisch, 2008).

Os micro-organismos probióticos afetam o ecossistema intestinal estimulando os mecanismos imunitários da mucosa e estimulando os mecanismos não-imunitários através de um antagonismo/concorrência com os micro-organismos patogênicos potenciais. Pensa-se que estes fenômenos mediam a maioria dos efeitos benéficos, inclusive a redução da incidência e gravidade da diarreia, que é um dos usos mais amplamente reconhecidos dos alimentos probióticos (Guarner, Khan e Garisch, 2008).

Os mecanismos de ação de um micro-organismo probiótico podem variar de um para outro, podem estar envolvidos na produção de uma enzima específica ou de um metabólito que atua

diretamente sobre um micro-organismo, ou podem causar um efeito benéfico no organismo. Podem ser citados como exemplos de possíveis mecanismos de ação probiótica no controle de patógenos intestinais: a produção de substâncias antimicrobianas, a exclusão competitiva com micro-organismos patogênicos, a competição por nutrientes, e a modulação do sistema imune (Fuller, 1989; Hawrelak, 2003; FAO, 2006).

As características de um bom micro-organismo probiótico são: ser uma cepa que é capaz de exercer um efeito benéfico; não ser patogênico e/ou tóxico; ter células viáveis presentes em quantidades adequadas; ser capaz de sobreviver e metabolizar no intestino ambiente, por exemplo, resistindo ao baixo pH e à ácidos orgânicos e ser estável e capaz de permanecer viável por longos períodos sob condições de armazenamento e do organismo do animal hospedeiro (Fuller, 1989; Hawrelak, 2003).

Um fator importante é a viabilidade do produto probiótico, ou seja, se ele contém o número adequado de micro-organismos viáveis (Fuller, 1989; Hawrelak, 2003). Os preparados probióticos para conferirem benefícios à saúde devem ser consumidos na dosagem e duração recomendada pelo fabricante da cultura ou baseado em evidências científicas (FAO, 2006; Santos et al., 2008).

A dose necessária varia enormemente segundo a cultura probiótica, o produto (leite fermentado, cápsulas), a frequência da administração, o período da administração (antes, durante ou depois da refeição), a duração da administração (dias, semanas, meses) e a viabilidade da cultura (Guarner, Khan e Garisch, 2008; Lee e Salminen, 2009). O número mínimo de bactérias probióticas necessárias para atingir efeitos terapêuticos para algumas culturas é de 10^7 bactérias viáveis por grama (Shornikova et al., 1997), enquanto para outras culturas, são necessárias 10^9 bactérias viáveis por grama (Saxelin, 1996). Segundo dados da literatura, uma ingestão de pelo menos 10^8 a 10^9 células viáveis/dia seria necessária, e esse valor pode ser obtido com um consumo diário de pelo menos 100 gramas de um produto contendo 10^6 a 10^7 células viáveis/g (Boylston et al., 2004). A maioria das pesquisas utiliza com êxito no mínimo 10^9 bactérias/dose (Hawrelak, 2003; Tamine, 2005). Não é possível estabelecer uma dose geral para os probióticos, a dosagem tem

que estar baseada em estudos que mostrem um benefício à saúde (Guarner, Khan e Garisch, 2008).

2.3.4. Efeitos benéficos

Os benefícios para a saúde proporcionados pelo consumo das culturas probióticas têm sido investigados em abordagens *in vitro* em animais e em humanos. Com base nesses estudos foi demonstrado que os produtos fermentados que contém essas culturas probióticas podem beneficiar a saúde humana de muitas maneiras (Smit, 2003).

Os probióticos são usados em medicina humana na prevenção e tratamento de doenças, na regulação da microbiota intestinal, em distúrbios do metabolismo gastrointestinal, como imunomoduladores, e na inibição da carcinogênese (Coppola e Turnes, 2004; Dilnawaz et al., 2011). Em medicina veterinária, além dessas aplicações, podem também ser usados como promotores de crescimento, constituindo-se em uma alternativa aos antimicrobianos, cujo uso indiscriminado pode selecionar cepas resistentes (Coppola e Turnes, 2004).

Os antimicrobianos foram largamente usados como agentes terapêuticos e estimulantes do crescimento para animais de criação na década de 50 (Fuller, 1989). A partir de 1980, tanto pesquisadores quanto produtores começaram a notar que determinadas cepas bacterianas haviam se tornado resistentes aos antimicrobianos utilizados e que uma parcela considerável da microbiota normal do trato gastrointestinal havia sido diminuída ou até mesmo eliminada devido a sua ação não seletiva (Ferreira e Kussakawa, 1999). Atualmente, os produtos probióticos já estão sendo utilizados, em substituição aos antimicrobianos, como promotores de crescimento por pecuaristas (Fuller, 1989).

Os micro-organismos probióticos podem ser benéficos para o organismo em infecções gastrointestinais, distúrbios intestinais, certas alergias e infecções urogenitais. Além disso, há novas evidências que indicam que eles podem ser ingeridos por pessoas saudáveis como forma de prevenir certas doenças e modular a imunidade (FAO, 2006).

Entre os papéis potencialmente benéficos, podem ser citados: a ativação do sistema imune, atividade anti-carcinogênica, síntese de vitaminas do complexo B, melhora na digestão da lactose por indivíduos lactase não persistentes e a modulação dos níveis de colesterol sérico (Marth e Steele, 2001; Badaró et al., 2008).

Outros benefícios fisiológicos de cepas probióticas são: regulação do fluxo intestinal, redução do colesterol, melhora da absorção de ferro e cálcio, a redução de compostos tóxicos no organismo, a melhoria da saúde urogenital, redução dos produtos catabólicos eliminados pelos rins e fígado, prevenção da arteriosclerose (redução de colesterol), prevenção da osteoporose, melhora do desenvolvimento (crescimento), a melhoria do bem-estar, síntese de nutrientes (ácido fólico, niacina, riboflavina, vitaminas B6 e B12), aumento da biodisponibilidade de nutrientes, prevenção de infecções do trato intestinal (induzido por bactérias ou vírus, *Candida enterite*, *Helicobacter pylori* úlcera/neoplasia), regulação da motilidade do intestino (constipação, síndrome do intestino irritável), diminuição da diarreia induzida por quimioterapia anti-tuberculose e melhora da colite (Granato, Branco e Cruz, 2010).

Os micro-organismos probióticos estão destinados a ajudar a microbiota intestinal que está naturalmente presente no organismo. Algumas preparações de probióticos foram utilizadas para evitar a diarreia causada por antimicrobianos, ou como parte do tratamento para a disbiose intestinal relacionada aos antimicrobianos. Existem estudos que documentam os efeitos probióticos em uma série de transtornos gastrointestinais e extra-intestinais, incluindo as doenças inflamatórias do intestino, a síndrome do intestino irritável, as infecções vaginais, e as alterações da imunidade. Algumas pesquisas também foram realizadas com relação ao eczema atópico, artrite reumatóide, e cirrose hepática (Guarner, Khan e Garisch, 2008).

Ballus et al. (2010) relataram que o efeito hipocolesterolêmico das bactérias probióticas está associado à desconjugação dos sais biliares, pois o fígado precisa transformar mais moléculas de colesterol em sais biliares,

diminuindo o teor de colesterol do plasma sanguíneo.

Segundo a Organização Mundial de Gastroenterologia, os micro-organismos probióticos reduzem o risco de câncer de cólon em modelos animais, provavelmente porque suprimem a atividade de certas enzimas bacterianas que podem aumentar os níveis de pró-carcinógenos, mas ainda não foi demonstrado em humanos (Guarner, Khan e Garisch, 2008).

Tuomola et al. (2001) disseram que os produtos probióticos mantêm e otimizam a viabilidade microbiana, enquanto ao mesmo tempo preservam as propriedades probióticas.

Há boas evidências de que os complexos da microbiota presente no trato gastrointestinal de todos os animais de sangue quente é eficaz na prestação de resistência às doenças. No entanto, a composição dessa microbiota protetora pode ser alterada por influências alimentares e ambientais, tornando o animal hospedeiro suscetível às doenças e/ou reduzindo sua eficiência na digestão dos alimentos. Com isso, o papel dos micro-organismos probióticos é restabelecer o equilíbrio natural da microbiota intestinal (Fuller, 1989).

A alimentação contínua de produtos probióticos é a melhor maneira para assegurar que esses estejam presentes nos intestinos em quantidade efetivas. No entanto, mesmo com a administração contínua é importante selecionar linhagens com grande habilidade de sobreviver no intestino e capacidade de colonização (Fuller, 1989). Além disso, o consumo de probióticos deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis (FAO, 2006; Santos et al., 2008).

2.4 O gênero *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* foi primeiramente isolado por Moro em 1900, a partir das fezes de lactentes amamentados com leite materno. Esse investigador atribuiu-lhes o nome de *Bacillus acidophilus*, designação genérica dos lactobacilos intestinais (Ferreira, 2003; Badaró et al., 2008). Foi o primeiro gênero a ser empregado em bacterioterapia e bacto profilaxia, iniciadas no começo do século XX, com trabalhos de Metchnikoff (1907), que apontou a importância do gênero na manutenção de uma

microbiota intestinal equilibrada, inibindo micro-organismos indesejáveis (Ferreira, 2003; Ljungh e Wadstrom, 2009).

O gênero *Lactobacillus* é composto por bactérias Gram positivo não esporuladas, catalase negativo, possuem morfologia celular variando de cocos, cocobacilos ou bacilos longos e finos até, algumas vezes, como bacilos curvados e pequenos (Jay, 2000; Botelho, 2005; Ljungh e Wadstrom, 2009).

Com base nas características fenotípicas e bioquímicas o gênero *Lactobacillus* é dividido em três grupos de acordo com o tipo de fermentação do açúcar: homofermentativas obrigatórias, heterofermentativas facultativas e heterofermentativas obrigatórias (Tamime e Robinson, 1999; Jay, 2000; Marth e Steele, 2001; Ferreira, 2003; Lee e Salminen, 2009; Ljungh e Wadstrom, 2009). Esse gênero compreende 113 espécies oficialmente reconhecidas (Ljungh e Wadstrom, 2009). Algumas espécies desse gênero estão listadas no quadro 1.

Quadro 1. Relação de algumas espécies do gênero *Lactobacillus*

Homofermentativo obrigatório	Heterofermentativo facultativo	Heterofermentativo obrigatório
<i>L. acidophilus</i> <i>L. amylovorus</i> <i>L. crispatus</i> <i>L. gallinarum</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. delbrueckii</i> spp. <i>delbrueckii</i> <i>L. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i> <i>L. delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. kefirano faciens</i> <i>L. salivarius</i> spp. <i>salivarius</i> <i>L. salivarius</i> spp. <i>salicinus</i>	<i>L. acetotolerans</i> <i>L. bavaricus</i> <i>L. casei</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. intestinalis</i> <i>L. murinus</i> <i>L. pentosus</i> <i>L. paracasei</i> spp. <i>paracasei</i> <i>L. paracasei</i> spp. <i>tolerans</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. brevis</i> <i>L. buchneri</i> <i>L. celobiosus</i> <i>L. fructivorans</i> <i>L. hilgardii</i> <i>L. kefir</i> <i>L. panis</i> <i>L. sanfrancisco</i>

Fonte: Adaptado de Ferreira, 2003.

Eles crescem em temperaturas que variam de 2°C a 53°C, com valores ótimos, geralmente, de 30°C a 40°C. São acidúricos, com pH ótimo entre 5,5 e 6,2, o crescimento ocorre a pH 5,0 ou menos. A taxa de crescimento é frequentemente reduzida em meios neutros ou alcalinos. Nas diversas espécies, a redução do nitrato não é usual, podendo acontecer, porém, quando o pH

terminal é estabilizado acima de 6,0 (Botelho, 2005).

2.5 Análises *in vitro* de micro-organismos probióticos

A seleção de uma cultura para ser utilizada como um probiótico eficaz é um processo complexo (Lee e Salminen, 2009). Essa seleção exige a observação de três fatores principais: segurança, características funcionais e características tecnológicas. A análise desses aspectos possibilitará a obtenção de produtos probióticos com a qualidade necessária e em sua máxima funcionalidade (Ballus et al., 2010).

Os testes *in vitro* são fundamentais para avaliar a segurança dos micro-organismos probióticos, além disso, são úteis para obter conhecimentos sobre as culturas e os mecanismos do efeito probiótico (FAO, 2002). Eles são muito importantes para selecionar novas culturas de micro-organismos probióticos para subsequente avaliação *in vivo* em grande escala (Smit, 2003). O organismo do ser humano seleciona a natureza da microbiota intestinal de várias maneiras. Secreções salivares, gástricas, intestinais, biliares e muco são fatores seletivos. O estômago é fortemente ácido, a motilidade intestinal move alimentos e micro-organismos ao longo do trato gastrointestinal, expulsando bilhões de bactérias diariamente, o potencial de redução e oxidação é também uma força seletiva (Marth e Steele, 2001).

Os micro-organismos probióticos devem ser capazes de sobreviver às condições gastrintestinais, a fim de serem ativos no intestino (Ferreira, 2003; Smit, 2003). Protocolos de testes *in vitro* podem ser adotados para analisar a capacidade de uma cultura de tolerar condições ácidas, sobreviver e crescer na presença de bile e metabolizar substratos seletivos (Tuomola et al., 2001; Ferreira, 2003). Dentre os testes de seleção que são realizados em micro-organismos probióticos podem ser citados: estabilidade fenotípica e genotípica, incluindo estabilidade de plasmídeos; padrões de utilização de carboidratos e proteínas; tolerância à acidez gástrica e aos sais biliares; metabolismo da bile; propriedades de adesão no muco e/ou epitélio intestinal; produção de substâncias antimicrobianas contra bactérias potencialmente patogênicas; padrões de

resistência aos antimicrobianos; capacidade de inibir a adesão de patógenos intestinais; deterioração de organismos; e imunogenicidade e resistência aos espermicidas, aplicável à probióticos vaginais (Tuomola et al., 2001; FAO, 2002; Lee e Salminen, 2009).

Essa variedade de testes ajuda a identificar as culturas que são mais resistentes e que podem possuir melhores chances de sucesso como produtos probióticos (Tamine, 2005).

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

O presente trabalho foi executado nos laboratórios de Genética Molecular de Protozoários Parasitas do Instituto de Ciências Biológicas e de Microbiologia de Leite e Produtos Derivados do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Os *Lactobacillus* spp. empregados nas análises foram previamente isolados e identificados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra por Resende (2010).

3.2 Teste de antagonismo *in vitro*

O teste de antagonismo foi realizado em triplicada com duas repetições para cada amostra conforme a técnica adaptada relatada por Tagg, Dajami e Wannamaker (1976).

Para a realização do teste de antagonismo, as sete amostras de *Lactobacillus* spp. selecionadas foram denominadas culturas produtoras, isto é, as que foram testadas quanto à capacidade antagonista contra outros micro-organismos, denominados de culturas reveladoras. Foram utilizadas como culturas reveladoras cinco bactérias patogênicas de referência, gentilmente cedidas pelo Prof. Jacques Robert Nicoli do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, e duas amostras isoladas dos mesmos queijos Minas artesanais da Serra da Canastra, com intuito de examinar atividade inibitória entre bactérias do próprio ambiente onde foram isoladas. As amostras de bactérias patogênicas foram: *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria*

monocytogenes ATCC 15313, *Salmonella enterica* var. Typhimurium ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e as amostras do próprio queijo foram: *Lactobacillus plantarum* (D27) e *Lactobacillus rhamnosus* (B25).

As amostras de *Lactobacillus* spp. foram ativadas em tubos de ensaio com rosca contendo caldo MRS (*Difco*, Detroit, Michigan, Estados Unidos), incubados a 37°C, durante 24h, sob aerobiose. Após duas ativações, 5µL de cada amostra foram depositados no centro de uma placa de Petri contendo ágar MRS (*Difco*), essas foram incubadas sob aerobiose a 37°C por 48 h. Após esse período, com o objetivo de eliminar os micro-organismos e restar somente substâncias inibidoras, foi adicionado clorofórmio as tampas das placas de Petri e aguardou-se 30 minutos sob luz UV.

As amostras reveladoras passaram por duas ativações, sendo as bactérias patogênicas crescidas em caldo BHI (*Difco*) e as bactérias do próprio queijo em caldo MRS (*Difco*). Dez µL do cultivo das reveladoras foram adicionados em tubos contendo 3,5mL de ágar semi-sólido (0,75% de BactoAgar, *Difco*, em caldo BHI, *Difco* ou MRS, *Difco*).

Após a ação do clorofórmio, os tubos com ágar semi-sólido contendo as bactérias reveladoras foram vertidos nas placas de Petri. As placas foram incubadas a 37°C por 24h, sob aerobiose. Por fim, houve a leitura dos halos de inibição com paquímetro digital (Mitutoyo Digimatic Caliper, Mitutoyo Sul Americana Ltda, Suzano, São Paulo, Brasil).

A comparação das médias dos halos de inibição foi submetida à análise de normalidade. Os resultados desse tipo de teste demonstraram comportamento não normal, sendo aplicado o teste de Kruskal-Wallis para a comparação entre as médias dos resultados (Sampaio, 2002).

3.3 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos *in vitro*

O antibiograma foi realizado em duplicata com duas repetições para cada amostra de acordo com o método adaptado de susceptibilidade a antimicrobianos exposto por Charteris et al. (1998).

As amostras de *Lactobacillus* spp. foram ativadas em tubos de ensaio com rosca contendo

caldo MRS (*Difco*) incubados a 37°C, durante 24h, sob aerobiose. A segunda ativação foi realizada em placas de Petri com ágar MRS (*Difco*) incubadas sob aerobiose, a 37°C, durante 24h.

Cada micro-organismo ativado foi transferido para um tubo de ensaio com rosca contendo 3,5 mL de salina 0,9%, para se atingir a concentração de 0,5 na escala *Mc Farland* (10^8 UFC/mL). Suabes foram mergulhados nos tubos e espalhados em toda extensão de placas de Petri de 14 cm de diâmetro contendo ágar MRS (*Difco*). Dez discos contendo antimicrobianos (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) foram distribuídos sobre o ágar MRS em cada placa de Petri. Os discos continham as seguintes drogas com suas correspondentes concentrações: ceftazidime - CAZ (30 µg), clindamicina - DA (2 µg), ciprofloxacina - CIP (5 µg), eritromicina - E (15 µg), gentamicina - GN (10 µg), oxacilina - OX (1 µg), penicilina - PEN (10 UI), estreptomicina - S (30 µg), tetraciclina - TE (30 µg), vancomicina - VA (30 µg). As placas foram incubadas sob aerobiose, durante 24h, a 37°C.

O controle de qualidade dos discos contendo os antimicrobianos foi realizado utilizando amostra de *Escherichia coli* ATCC 25922, de acordo com técnica proposta por Charteris et al. (1998). Por fim, houve a leitura dos halos de inibição com paquímetro digital (Mitutoyo Digimatic Caliper).

Os *Lactobacillus* foram classificados qualitativamente como resistente, moderadamente sensível e sensível as drogas antimicrobianas, de acordo com padrão proposto por Charteris et al. (1998), que podem ser observados no Anexo 1.

3.4 Teste de sensibilidade ao pH gástrico *in vitro*

Este teste foi realizado em triplicata com duas repetições para cada amostra de acordo com a técnica adaptada de Neumann (1991).

As amostras de *Lactobacillus* spp. foram ativadas em tubos de ensaio com rosca contendo caldo MRS (*Difco*) incubados a 37°C, durante 24h, sob aerobiose. Após duas ativações, os micro-organismos ativados foram distribuídos em dois tubos Eppendorf distintos sendo um deles uma diluição de 10x em solução salina

0,9% pH 7 (controle) e o outro tubo uma diluição em solução salina 0,9% pH 2 (ácido gástrico artificial). Os tubos foram incubados a 37°C por 3h. Posteriormente, foram centrifugados a 13.000g por um minuto. O sobrenadante foi descartado e os pellets com as colônias foram suspensos em caldo MRS (*Difco*) puro. Em seguida, foram aplicados 200 µL/poço dos inóculos do controle e das colônias tratadas com ácido gástrico artificial em uma microplaca de ELISA com 96 poços que foi incubada em espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 - Molecular Devices) a 37°C. A absorbância do cultivo foi determinada pela leitura de OD620nm a cada 30 minutos, durante 12h, e a porcentagem de inibição de crescimento foi calculada utilizando o programa Origin 8.5 pela fórmula $(1-SG/CT) \times 100$, sendo que SG e CT correspondem a área sob a curva de crescimento das bactérias tratadas com ácido gástrico artificial e o controle, respectivamente.

3.5 Teste de sensibilidade aos sais biliares *in vitro*

Este teste foi realizado em triplicata com duas repetições para cada amostra de acordo com o protocolo de Walker e Gilliland (1993), adaptado para microplacas de ELISA com 96 poços.

As amostras de *Lactobacillus* spp. foram ativadas em tubos de ensaio com rosca contendo caldo MRS (*Difco*) incubados a 37°C, durante 24h, sob aerobiose. Após duas ativações, cada cultivo foi distribuído em um tubo Eppendorf na diluição de 4% (v/v). A partir dessa diluição,

100 µL foram transferidos a um poço da placa de ELISA contendo 100 µL de caldo MRS (*Difco*) puro (controle) e outros 100 µL foram transferidos a um poço da placa de ELISA contendo MRS (*Difco*) com 0,6% (p/v) de sais biliares artificiais (Oxgall, BD, Detroit, Michigan, Estados Unidos). A microplaca de ELISA com 96 poços foi então incubada em espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 - Molecular Devices, Sunnyvale, California, Estados Unidos) a 37°C. A absorbância do cultivo foi determinada pela leitura de OD620nm a cada 30 minutos, durante 12h, e a porcentagem de inibição de crescimento foi calculada utilizando o programa Origin 8.5 pela fórmula $(1-SB/CT) \times 100$, sendo que SB e CT correspondem a área sob a curva de crescimento das bactérias tratadas com sais biliares artificiais e o controle, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Antagonismo *in vitro* contra bactérias reveladoras de amostras de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra

Os resultados dos testes de antagonismo das amostras de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra contra bactérias reveladoras são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Médias dos halos de inibição (mm), de duas repetições em triplicata, do teste de antagonismo *in vitro* de amostras de *Lactobacillus* spp., isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra, contra bactérias reveladoras

Amostras	Bactérias Reveladoras						
	EC	EF	ST	LM	SA	LP (D27)	LR (B25)
<i>L. casei</i> (A1)	34,73	16,5	0	23,59	29,55	10,9	12,29
<i>L. rhamnosus</i> (A8)	40,94	27,94	0	50,87	48,07	19,33	11,61
<i>L. plantarum</i> (A21)	24,46	24,77	0	19,1	31,52	12,6	8,09
<i>L. plantarum</i> (B13)	33,54	24,71	0	32,87	36,27	7,95	9,73
<i>L. plantarum</i> (B17)	44,48	12,18	5,72	31,03	36,48	21,27	14,31
<i>L. plantarum</i> (B21)	37,01	14,68	0	30,39	28,16	20,59	8,79
<i>L. plantarum</i> (D16)	33,9	13,35	0	25,86	34,4	28,09	0

Legenda: EC = *Escherichia coli* ATCC 25922, EF = *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, ST = *Salmonella enterica* var. Typhimurium ATCC 14028, LM = *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, SA = *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, LP = *L. plantarum*, LR = *L. rhamnosus*.

A presença de *S. enterica* var. Typhimurium em alimentos e superfícies de trabalho é uma preocupação para a saúde pública, pois essa está entre as espécies de patógenos que apresentam culturas resistentes (Rocha e Dantas, 2009). Na tabela 1 mostra que *L. plantarum* (B17), além de inibir as outras bactérias reveladoras, foi a única capaz de inibir *S. enterica* var. Typhimurium. Essa observação indica uma possível utilização dessa cultura para o controle de patógenos em queijos.

Notou-se que houve inibição, mas em menor proporção, contra as bactérias reveladoras do próprio queijo, *L. plantarum* (D27) e *L. rhamnosus* (B25), e a amostra produtora *L. plantarum* (D16) não inibiu a reveladora *L. rhamnosus* (B25). Segundo Guedes Neto (2005), essa característica é desejável para a sobrevivência desses micro-organismos em ambientes que apresentam microbiota diversificada e complexa, como é o caso dos queijos.

Podem ser observadas na Tabela 2, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), que houve diferença nas inibições no teste de antagonismo *in vitro*. *Lactobacillus* spp. isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra apresentaram diferentes antagonismos contra cada bactéria reveladora.

As médias dos halos de inibição para cada bactéria reveladora, das amostras de *Lactobacillus* spp., isoladas de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra, foram mais expressivas sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Escherichia coli e *Staphylococcus aureus* são associadas a problemas de saúde pública no consumo de queijos Minas artesanais contaminados (ICMSF, 1998; Brant, 2003). Esses resultados mostram o possível potencial de utilização desses *Lactobacillus* spp. para minimizar ou controlar problemas causados por bactérias patogênicas em queijos, visando melhorar a qualidade sanitária do produto.

Na tabela 2, a média do halo de inibição também foi expressiva em *Listeria monocytogenes*, sendo que as inibições de *Enterococcus faecalis* e *Lactobacillus plantarum* (D27) foram superiores à inibição contra *Lactobacillus rhamnosus* (B25) e *S. enterica* var. Typhimurium.

Tabela 2. Médias dos halos de inibição (mm), de duas repetições em triplicata, do teste de antagonismo *in vitro* de amostras de *Lactobacillus* spp., isoladas de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra para cada bactéria reveladora

Reveladora	Média (mm)	Desvio-padrão	Coefficiente de variação (%)
<i>Escherichia coli</i>	35,58 ^a	4,53	12
<i>Enterococcus faecalis</i>	19,16 ^c	6,77	35
<i>S. enterica</i> var. Typhimurium	0,81 ^e	2,55	313
<i>Listeria monocytogenes</i>	30,53 ^b	10,19	33
<i>Staphylococcus aureus</i>	34,92 ^a	7,88	22
<i>Lactobacillus plantarum</i> (D27)	17,24 ^c	6,13	35
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (B25)	9,26 ^d	2,17	23

Legenda: Médias seguidas por letras distintas indicam resultados estatisticamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$).

Tabela 3. Médias dos halos de inibição (mm), de duas repetições em triplicata, do teste de antagonismo *in vitro* de cada amostra de *Lactobacillus* spp., isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra, frente às bactérias reveladoras

Amostra	Média (mm)	Desvio-padrão	Coefficiente de variação (%)
<i>L. casei</i> (A1)	18,22	11,92	65
<i>L. rhamnosus</i> (A8)	28,39	19,23	67
<i>L. plantarum</i> (A21)	17,22	10,94	63
<i>L. plantarum</i> (B13)	20,72	14,62	70
<i>L. plantarum</i> (B17)	23,63	14,13	59
<i>L. plantarum</i> (B21)	19,94	13,02	65
<i>L. plantarum</i> (D16)	19,37	14,95	77

Conforme Tabela 3, a média dos halos de inibição de todos *Lactobacillus* spp. isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra utilizadas frente às bactérias reveladoras, patogênicas ou do próprio queijo apresentaram valores semelhantes ($p < 0,05$) e não houve variação estatisticamente relevante.

Os valores dos coeficientes de variação apresentados na Tabela 3 demonstram a existência de comportamento similar das amostras de bactérias ácido-láticas utilizadas neste projeto frente às bactérias reveladoras.

No complexo ecossistema dos micro-organismos probióticos há o desenvolvimento de mecanismos de sobrevivência contra outros micro-organismos. O antagonismo é exercido pela competição por nutrientes, localização física e através da produção de substâncias

antimicrobianas. Os objetivos dos micro-organismos probióticos produzirem antimicrobianos são inibir, excluir ou competir com micro-organismos enteropatogênicos. Várias moléculas e mecanismos estão envolvidos na inter-relação entre probióticos e agentes patogênicos, sendo que dentre as substâncias produzidas podem ser citadas os ácidos orgânicos, o etanol, o peróxido de hidrogênio e os componentes protéicos semelhantes à bacteriocinas (Lee e Salminen, 2009).

O presente trabalho não avaliou a natureza das substâncias antagonistas produzidas pelas culturas produtoras. Porém as atividades inibitórias verificadas justificam-se pela produção de substâncias inibidoras que teriam se difundido pelo ágar e impedido o crescimento das culturas reveladoras (Funck et al., 2011).

A atividade dos *Lactobacillus* spp. testados frente as bactérias reveladoras pode ser explicada pela produção de ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico, pois as bactérias avaliadas são produtoras, principalmente dessa substância (Costa, 2010).

Resultados similares do antagonismo *in vitro* de bactérias ácido-láctica isoladas de queijos artesanais frente a bactérias reveladoras também foram encontrados por outros autores. Alexandre et al. (2002) demonstraram atividade antagonista de bactérias lácticas contra *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Guedes Neto et al. (2005)

verificaram inibição de *Lactobacillus* spp. contra *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli*, e fraca inibição contra as bactérias extraídas do próprio queijo, *L. acidophilus*, *L. raffinolactis* e *Lactococcus lactis*. Chioda et al. (2006) indicaram que *L. acidophilus* foi capaz de inibir o crescimento de *L. monocytogenes*. Chioda et al. (2007) mostraram que *Lactobacillus acidophilus* foram capazes de inibir *E. coli*. Costa (2010) detectou atividade antagonista de *Lactobacillus* spp. contra *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, e pouca inibição contra micro-organismos do próprio queijo, *L. rhamonosus* e *L. fermentum*. Kos et al. (2011) relataram atividade antagonista de *Lactococcus lactis* frente a *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli*.

4.2 Susceptibilidade *in vitro* a antimicrobianos de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra

Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra estão expostos na Tabela 4.

Todas as amostras de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra apresentaram resistência aos antimicrobianos vancomicina, estreptomicina, oxaciclina, gentamicina e ciprofloxacina.

Tabela 4. Médias dos halos de inibição (mm) por antimicrobianos, de duas repetições em duplicata, de amostras de *Lactobacillus* spp., isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra

Amostra	Antimicrobiano									
	CAZ	DA	CIP	E	GN	OX	PEN	S	TE	VA
<i>L. casei</i> (A1)	4,29 R	30,14 S	10,26 R	27,87 S	10,86 R	10,57 R	19,64 R	3,34 R	34,76 S	8,08 R
<i>L. rhamnosus</i> (A8)	3,80 R	25,83 S	11,44 R	35,69 S	10,44 R	4,47 R	20,85 MS	2,59 R	36,51 S	0,0 R
<i>L. plantarum</i> (A21)	25,39 S	10,26 MS	0,0 R	25,03 S	0,0 R	0,0 R	11,83 R	0,0 R	15,90 MS	0,0 R
<i>L. plantarum</i> (B13)	23,11 S	40,07 S	0,0 R	30,72 S	12,47 R	0,0 R	11,69 R	0,0 R	22,84 S	0,0 R
<i>L. plantarum</i> (B17)	25,21 S	12 S	0,0 R	28,51 S	8,24 R	2,22 R	9,16 R	0,0 R	19,59 S	0,0 R
<i>L. plantarum</i> (B21)	12,20 R	19,84 S	0,0 R	31,55 S	5,00 R	2,67 R	13,44 R	0,0 R	26,11 S	0,0 R
<i>L. plantarum</i> (D16)	12,55 R	20,32 S	0,0 R	34,58 S	10,34 R	0,0 R	12,61 R	0,0 R	26,23 S	0,0 R

Legenda: Ceftazidime - CAZ (30 µg), Clindamicina - DA (2 µg), Ciprofloxacina - CIP (5 µg), Eritromicina - E (15 µg), Gentamicina - GN (10 µg), Oxacilina - OX (1 µg), Penicilina - PEN (10 U), Estreptomicina - S (30 µg), Tetraciclina - TE (30 µg), Vancomicina - VA (30 µg). R = resistente; MS = moderadamente sensível; S = sensível.

A resistência de *Lactobacillus* spp. a vancomicina é uma característica comum, sendo associada a este gênero, podendo-se haver resistência intrínseca à esse antimicrobiano (Teuber, Meile e Schwarz, 1999; Danielsen e Wind, 2003; Zhou, 2005). Outros trabalhos (Herreros, Sandoval e González, 2005; Coppola et al., 2005; Costa, 2010; Acurcio, 2011) também relataram alta resistência de *Lactobacillus* à vancomicina.

Quatro amostras (57%) [*L. casei* (A1), *L. rhamnosus* (A8), *L. plantarum* (B21) e *L. plantarum* (D16)] apresentaram resistência ao antimicrobiano ceftazidime, enquanto as outras (43%) *L. plantarum* (A21), *L. plantarum* (B13) e *L. plantarum* (B17) mostraram sensibilidade. Uma amostra (14%), *L. plantarum* (A21), obteve moderada sensibilidade aos antimicrobianos clindamicina e tetraciclina, o restante mostrou-se sensível. Uma amostra (14%), *L. rhamnosus*, apresentou moderada sensibilidade ao antimicrobiano penicilina, às demais obtiveram resistência.

Todas as amostras de *Lactobacillus* spp. isolados

de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra analisadas neste trabalho foram sensíveis aos antimicrobianos eritromicina. *L. plantarum* (A21) foi a única amostra que não foi sensível ao antimicrobiano clindamicina, tendo sido

moderadamente sensível e apenas *L. plantarum* (A21) não foi sensível ao antimicrobiano tetraciclina, foi moderadamente sensível.

Em geral, as amostras de bactérias ácido-láticas foram resistentes aos antimicrobianos analisados. As amostras que obtiveram menor número de resistência a antimicrobianos foram *L. plantarum* (B13) e *L. plantarum* (B17), pois apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos ceftazidime, clindamicina, eritromicina, tetraciclina. As amostras que obtiveram maior número de resistência a antimicrobianos foram *Lactobacillus casei* (A1), *L. plantarum* (B21) e *L. plantarum* (D16), pois obtiveram sensibilidade somente aos antimicrobianos clindamicina, eritromicina e tetraciclina.

Para que um micro-organismo seja selecionado para uso como probiótico, seria ideal que fosse sensível a todos os antimicrobianos testados, a fim de não introduzir elementos que conferem este fenótipo em um ecossistema novo (Souza, 2006).

As bactérias ácido-láticas são naturalmente resistentes a vários antimicrobianos em virtude da sua estrutura ou fisiologia. Na maioria dos casos, a resistência não é transferível e as espécies também são sensíveis aos antimicrobianos de uso clínico. No entanto, é possível, através de plasmídeo, transferir

resistência aos antimicrobianos para outras espécies e gêneros (Lee e Salminen, 2009). Programas de vigilância de resistência aos antimicrobianos são necessários para controlar a susceptibilidade de bactérias aos antimicrobianos comumente utilizados (Raissy e Ansari, 2011).

Algumas pesquisas encontraram resistência à tetraciclina e eritromicina (Azevedo et al., 2000; Temmerman et al., 2002; Flórez, Delgado e Mayo, 2005; Klare et al., 2007), contrapondo com os resultados do presente projeto, pois as amostras de *Lactobacillus* spp. demonstraram sensibilidade aos antimicrobianos eritromicina e tetraciclina.

Dados de outros autores assemelharam-se com os apresentados no presente trabalho. Charteris et al. (1998) determinaram que 100% das amostras de *Lactobacillus* spp. foram sensíveis a tetraciclina, 97,82% foram sensíveis a eritromicina e a maioria das amostras foram resistentes a gentamicina, estreptomicina e ciprofloxacina. Temmerman et al. (2002) observaram resistência das amostras de *Lactobacillus* spp. a penicilina. Hummel et al. (2007) verificaram a resistência a antimicrobianos em quarenta culturas de fermento lácteo e cinco culturas probióticas. As culturas foram sensíveis a tetraciclina e eritromicina, e resistentes à gentamicina, estreptomicina e ciprofloxacina. Herreros, Sandoval e González (2005) também encontraram altas taxas de resistência à vancomicina e oxaciclina em cepas isoladas de queijo artesanal espanhol. Zhou (2005) demonstraram que bactérias ácido-láticas foram sensíveis aos antimicrobianos eritromicina e tetraciclina, e resistentes a vancomicina, gentamicina e estreptomicina. Belletti et al. (2009) encontraram alta porcentagem de resistência a gentamicina, penicilina, oxacilina e vancomicina e sensibilidade a clindamicina, eritromicina e tetraciclina.

4.3 Sensibilidade *in vitro* ao pH gástrico de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra

Os resultados da absorvância máxima alcançada pelos *Lactobacillus* spp. cultivados em caldo

MRS (*Difco*) incubado por 12 h a 37°C, após 3h de incubação a 37°C em salina com pH gástrico (NaCl 0,85% com pH 2,0) podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5. Absorvância máxima alcançada, em duas repetições em triplicata, por amostras de *Lactobacillus* spp., isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra, em 12 horas de incubação a 37°C, após 3 h de incubação em pH 7,0 (controle) e pH 2,0 (ácido gástrico) a 37°C

Amostra	Absorvância máxima	
	pH 2,0	pH 7,0
<i>L. casei</i> (A1)	0,754	0,768
<i>L. rhamnosus</i> (A8)	0,895	0,922
<i>L. plantarum</i> (A21)	0,584	0,674
<i>L. plantarum</i> (B13)	0,753	0,770
<i>L. plantarum</i> (B17)	0,685	0,579
<i>L. plantarum</i> (B21)	0,632	0,711
<i>L. plantarum</i> (D16)	0,612	0,682

Gilliland, Stanley e Bush (1984), preconizaram que para uma bactéria ácido-láctica ser resistente ao ácido gástrico, essa teria que alcançar absorvância de 0,3 após 2h de incubação em valores de pH na faixa de 1,5 a 4,0.

Considerando somente a absorvância máxima alcançada, todas as amostras (100%) de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra foram tolerantes ao ácido gástrico (pH 2,0), pois apresentaram absorvância maior que 0,3.

No presente trabalho, analisou-se também a sensibilidade ao ácido gástrico pela diferença entre as áreas das curvas de crescimento do controle e da amostra após incubação em salina (NaCl 0,85%) com pH 2,0 por 3h, para comparar o crescimento com o do grupo controle.

As curvas de crescimento das amostras de *Lactobacillus* spp., isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra, na presença de ácidos, simulando ambiente gástrico, considerando as duas repetições, estão ilustradas nos Anexos 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

Os resultados do percentual de tolerância dos *Lactobacillus* spp. ao ácido gástrico podem ser vistos na Tabela 6.

Tabela 6. Percentual de inibição por ácido gástrico (pH 2,0), de duas repetições em triplicata, sobre amostras de *Lactobacillus* spp.,

isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra, em 12 horas de incubação a 37°C, após 3 h de incubação em ácido gástrico (pH 2,0) a 37°C

Amostra	Percentual de inibição (%)
<i>L. casei</i> (A1)	-1,55
<i>L. rhamnosus</i> (A8)	10,92
<i>L. plantarum</i> (A21)	13,49
<i>L. plantarum</i> (B13)	3,58
<i>L. plantarum</i> (B17)	-19,88
<i>L. plantarum</i> (B21)	13,84
<i>L. plantarum</i> (D16)	12,99

Segundo Acurcio (2011), uma amostra é considerada tolerante ao ácido gástrico pH 2,0 se houver um percentual de inibição menor que 35%.

De acordo com a Tabela 6 e os Anexos 3 até 9, considerando a diferença entre as curvas de crescimento, todas as amostras de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra avaliadas foram tolerantes ao ácido gástrico, por apresentarem menos de 35% de inibição ao pH 2,0.

Um dos critérios de seleção para culturas probióticas é ser resistente ao pH baixo (Quwehand et al., 1999). Uma vez que, para atingir o intestino delgado, elas precisam passar por condições estressantes no estômago (Chou e Weimer, 1999).

Os resultados obtidos sobre viabilidade de culturas afirmam que, em geral, os *Lactobacillus* spp. são mais tolerantes a condições ácidas que outras bactérias-láticas (Dunne et al., 1999). No presente trabalho as amostras de *Lactobacillus* spp. suportaram o ácido gástrico ao pH 2,0.

Como as bactérias ácido-láticas testadas no presente trabalho foram isoladas de um ambiente em que predomina a acidez, pois em todo o processo de produção de queijos o pH baixo é frequente, era esperado que esses micro-organismos fossem adaptados as condições de estresse gerado pela elevada acidez (Costa, 2010; Resende, 2010).

Resultados similares da sensibilidade *in vitro* ao pH gástrico de bactérias ácido-láticas também foram encontrados por outros autores. Chou e Weimer (1999) apresentaram tolerância de amostras *L. acidophilus* ao pH 3,5. Araújo et al. (2009) indicaram que as culturas de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 extraídas de queijo tipo Cottage exibiram resistência

satisfatória a baixos valores de pH. Costa (2010) verificou tolerância ao pH 2,0 de todas as amostras de *Lactobacillus* spp. retiradas de queijos artesanais da Serra da Canastra. Meira (2010) apresentou tolerância ao pH 3,0 e pH 4,0 de bactérias ácido-láticas de leite e queijo de ovelha. Tambekar e Bhutada (2010) demonstraram que todas as bactérias de *Lactobacillus* spp. pesquisadas apresentaram tolerância ao ácido gástrico pH 2,0. Shruthy et al. (2011) verificaram tolerância ao ácido gástrico (pH 3,5) da maioria dos *Lactobacillus* spp. de amostra de coalhada.

4.4 Sensibilidade *in vitro* a sais biliares de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra

Os resultados da absorvância máxima alcançada pelos *Lactobacillus* spp. cultivados em caldo MRS (Difco) com 0,3% de *Oxgall* (BD), incubado por 12 h a 37°C, podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7. Absorvância máxima alcançada, em duas repetições em triplicata, por amostras de *Lactobacillus* spp., isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra, em 12 h de incubação a 37°C na presença de 0,3% de sais biliares e o controle

Amostra	Absorvância máxima	
	Sais biliares 0,3%	Controle
<i>L. casei</i> (A1)	1,031	0,905
<i>L. rhamnosus</i> (A8)	1,016	1,017
<i>L. plantarum</i> (A21)	1,057	0,876
<i>L. plantarum</i> (B13)	0,712	0,964
<i>L. plantarum</i> (B17)	1,016	0,836
<i>L. plantarum</i> (B21)	0,977	0,760
<i>L. plantarum</i> (D16)	0,985	0,857

Segundo Gilliland, Stanley e Bush (1984), quando a absorvância de 0,3 é atingida por uma bactéria ácido-lática, após oito horas de incubação em meio adicionado de 0,3% de *Oxgall*, essa pode ser considerada tolerante aos sais biliares.

Considerando somente a absorvância máxima alcançada, todas (100%) as amostras de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos Minas

artesanais da Serra da Canastra foram tolerantes aos sais biliares com 0,3% de *Oxgall* (BD), pois apresentaram absorvência maior que 0,3.

No presente trabalho, analisou-se também a sensibilidade a sais biliares pela diferença entre as áreas das curvas de crescimento do controle e da amostra em presença de *Oxgall* (BD) 0,3%, para comparar o crescimento com o do grupo controle.

As curvas de crescimento das amostras de *Lactobacillus* spp., isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra, na presença de sais biliares, considerando as duas repetições, estão ilustradas nos Anexos 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16.

Os resultados do percentual da tolerância dos *Lactobacillus* spp. aos sais biliares podem ser vistos na Tabela 8.

Tabela 8. Percentual de inibição por sais biliares (*Oxgall*, BD, 0,3%), de duas repetições em triplicata, sobre amostras de *Lactobacillus* spp., isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra, em 12h de incubação a 37°C

Amostra	Percentual de inibição (%)
<i>L. casei</i> (A1)	2,33
<i>L. rhamnosus</i> (A8)	14,41
<i>L. plantarum</i> (A21)	-9,51
<i>L. plantarum</i> (B13)	37,61
<i>L. plantarum</i> (B17)	-3,15
<i>L. plantarum</i> (B21)	-11,85
<i>L. plantarum</i> (D16)	-0,04

Segundo Acurcio (2011), uma amostra é considerada tolerante aos sais biliares, *Oxgall* 0,3%, se houver um percentual de inibição menor que 40%.

De acordo com a Tabela 8 e os Anexos 9 até 15, considerando a diferença entre as curvas de crescimento, todas as amostras de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra avaliadas foram tolerantes por apresentarem menos de 40% de inibição ao *Oxgall* (BD) 0,3%.

A capacidade de sobrevivência de bactérias probióticas à ação de sais biliares é um dos critérios utilizados para selecionar potenciais culturas probióticas (Morelli, 2000). Os sais biliares são importantes na eliminação de bactérias patogênicas presentes no trato gastrointestinal, pois são capazes de solubilizar a membrana plasmática dos agentes patogênicos pela sua ação detergente. Essa ação, porém, não

afeta exclusivamente as bactérias patogênicas e os micro-organismos probióticos precisam, portanto, ser tolerantes a esses sais biliares para que possam exercer efeitos benéficos aos seus consumidores (Ballus et al., 2010).

Resultados similares da sensibilidade *in vitro* aos sais biliares de bactérias ácido-láticas também foram encontrados por outros autores. Chou e Weimer (1999) mostraram tolerância de amostras *L. acidophilus* aos sais biliares a 0,2%. Araújo et al. (2009) indicaram que culturas *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 extraídas de queijo tipo Cottage exibiram resistência satisfatória a altas concentrações de sais biliares. Meira (2010) revelou tolerância aos sais biliares a 0,3% de bactérias ácido-láticas de leite e queijo de ovelha. Tambekar e Bhutada (2010) demonstraram que todas as bactérias de *Lactobacillus* spp. pesquisadas apresentaram tolerância aos sais biliares a 2%. Shruthy et al. (2011) verificaram tolerância aos sais biliares (0,3%) da maioria dos *Lactobacillus* spp. pertencentes a coalhada.

4.5 Seleção dos *Lactobacillus* spp com pontencial probiótico isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra

No teste de susceptibilidade *in vitro* a antimicrobianos, houve grande resistência dos *Lactobacillus* spp. isolados de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra frente aos antimicrobianos testados. Esse teste não demonstrou ser apropriado para selecionar bactérias com melhor potencial probiótico, entretanto, ainda são necessários testar a presença e capacidade de transmissão dos genes de resistência aos antimicrobianos para uma caracterização probiótica mais completa.

A amostra *L. plantarum* (B17) chama atenção, pois foi a única que inibiu a bactéria reveladora patogênica *S. enterica* var. Thyphimurium (Tabela 1), além disso, obteve o menor valor de inibição por ácido gástrico ao pH 2,0 (Tabela 7) e o terceiro menor valor de inibição por sais biliares 0,3% (Tabela 8).

No teste de antagonismo *in vitro* entre amostras de *Lactobacillus* spp. contra bactérias reveladoras, no teste de sensibilidade ao pH gástrico (2,0) e no teste de sensibilidade aos sais biliares (0,3% de *Oxgall*), todos *Lactobacillus*

spp. testados apresentaram comportamento favorável.

Os micro-organismos isolados devem ser resistentes ou tolerantes aos desafios ao longo do trato gastrointestinal, como o pH ácido do estômago e a secreção de sais biliares ao longo do intestino delgado, para que possam persistir e se estabelecer ao longo do trato digestivo, além de uma forte atividade antagonista contra bactérias enteropatogênicas.

Nesse sentido, embora todas as amostras de *Lactobacillus* spp. analisadas neste trabalho apresentaram capacidade de inibir todas ou quase todas as bactérias patogênicas no teste de antagonismo, boa tolerância aos sais biliares e ao ácido gástrico, a amostra *L. plantarum* (B17) demonstrou ser a bactéria testada que obteve o melhor potencial probiótico, sendo candidata a elaboração de novas culturas lácteas para produção de produtos probióticos, auxiliando na segurança alimentar e preservação da microbiota original de queijos artesanais de Minas Gerais.

CONCLUSÃO

As amostras de *Lactobacillus* spp. isoladas de queijos da Serra da Canastra atenderam alguns critérios de seleção *in vitro* de probióticos. Elas apresentaram atividade antagonista *in vitro* contra bactérias de interesse em saúde pública, tolerância ao ácido gástrico e aos sais biliares e sensibilidade a antimicrobianos.

De todos os micro-organismos analisados neste trabalho, *L. plantarum* (B17) demonstrou melhor potencial probiótico, embora as outras bactérias avaliadas também apresentaram tolerância aos sais e ácidos e atividade antagonista contra as bactérias reveladoras.

Os resultados do presente trabalho indicam o grande potencial das bactérias ácido-láticas adquirirem resistência a antimicrobianos, o que causa uma grande preocupação tendo em vista que os genes que conferem resistência podem ser transferidos de uma bactéria a outra.

Mais estudos devem ser feitos para confirmar a presença e capacidade de transmissão dos genes de resistência a antimicrobianos e verificar o potencial dos micro-organismos probióticos *in vivo*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACURCIO, L.B. *Isolamento, enumeração, identificação molecular e avaliação de propriedades probióticas de Enterococos isolados de leite de ovelha*. 2011. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ALEXANDRE, D.P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 54, n. 4, p. 424-428, 2002.

ALMEIDA, E.F.L.; FERNANDES, M.R. Caracterização da microrregião da Canastra como produtora do queijo Minas artesanal. *Emater*, 13 p., 2004. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/QUEIJO_HISTORICO/caracteriza%C3%A7%C3%A3o%20do%20queijo%20canastra.pdf>. Acesso em: 05 dez. 2011.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/ Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos*. 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 05 dez. 2011.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. *Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos*. 1999. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/19_99.htm>. Acesso em: 07 dez. 2011.

ARAÚJO, E.A.; CARVALHO, A.F.; LEANDRO, E.S. et al. Produção de queijo tipo cottage simbiótico e estudo de sobrevivência das células probióticas quando expostas a diferentes estresses. *Pesq. Agropec.Trop.*, v. 39, n. 2, p. 111-118, 2009.

ARAYA, H.; LUTZ, M.R. Alimentos funcionales y saludables. *Rev. Chil. Nutr.*, v.30, n. 1, p.8-14, 2003.

- AZEVEDO, P.A.; PERIN, C.; BECKER, F.L. et al. Isolamento e caracterização de *Lactococcus garvieae*. *Rev. AMRIGS*, v. 44, n. 3, p. 81-84, 2000.
- BADARÓ, A.C.L.; GUTTIERRES, A.P.M.; REZENDE, A.C.V. et al. Alimentos probióticos: Aplicações como promotores da saúde. *Rev. Dig. Nutr.*, v. 2, n. 3, 2008.
- BALLUS, C.A.; KLAJN, V.M.; CUNHA, M.F. et al. Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: revisão. *Bol. CEPPA*, v. 28, n. 1, p. 85-96, 2010.
- BELLETTI, N. et al. Antibiotic Resistance of Lactobacilli Isolated from Two Italian Hard Cheeses. *Jour. Food Protect.*, vol. 72, n. 10, p. 2162-2169, 2009.
- BOTELHO, L. *Isolamento e identificação de lactobacilos e bifidobactérias em alimentos probióticos disponíveis no mercado brasileiro*. 2005. 227f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- BOYLSTON, T.D.; VINDEROLA, C.G.; GHODDUSI, H.B. et al. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *Int. Dairy Jour.*, v. 14, n. 5, p.375-87, 2004.
- BRANT, L.M.F. *Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas artesanal do Serro – MG*. 2003. 43f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CAMPOS, Y.D.S. Patrimônio Imaterial e Memória Coletiva em Minas Gerais. *Cadernos do CEOM*, n. 31, p. 33-43, 2010.
- CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.; MORELLI, L. et al. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *Jour. Food Protect.*, v. 61, n. 12, p. 1636-1643, 1998.
- CHIODA, T.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; GARCIA, G.R. et al. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. *Cienc. Rural*, v. 37, n. 2, p. 583-585, 2007.
- CHIODA, T.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; GARCIA, G.R. et al. Inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal elaborado com cultura de *Lactobacillus acidophilus*. *Rev. Port. Clin. Vet.*, vol. 101, n. 557-558, p. 121-124, 2006.
- CHOU, L.S.; WEIMER, B. Isolation and characterization of acid and bile tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Jour. Dairy Sci.*, v. 82, n. 1, p. 23-31, 1999.
- COPPOLA, M.M.; TURNES, C.G. Probióticos e resposta imune. *Cienc. Rural*, v. 34, n. 4, p.1297-1303, 2004.
- COPPOLA, R.; SUCCI, M.; TREMONTE, P. et al. Antibiotic susceptibility of *L. rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano Cheese. *Lait*, v. 85, n. 3, p. 193-204, 2005.
- COSTA, H.H.S. *Potencial probiótico de Lactobacillus spp. e Weisella paramesenteroides isolados de queijo minas artesanal da Serra da Canastra- MG*. 2010. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B. *Alimentos Funcionais*. Viçosa: Folha de Viçosa, 2006. 202 p.
- CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F.; VAN DENDER, A.G.F. Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Res. Int.*, v. 40, n. 8, p. 951-956, 2007.
- DANIELSEN, N.; WIND, A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Inter. Jour. Food Microbiol.*, v. 82, n. 1, p. 1-11, 2003.
- DILNAWAZ, P.; SHAKEEL, M.; ZIYAURRAHMAN, A.R. et al. A Review on Probiotics. *Inter. Res. Jour. Pharm.*, v. 2, p. 26-33, 2011.
- DIPLOCK, A.T. et al. Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document. *Brit. Jour. Nutr.*, v. 81, p. 1-27, 1999.
- DUNNE, C.; MURPHY, L.; FLYNN, S. et al. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Anton. van Leeuw.*, v. 76, p. 279-292, 1999.

- FAO/WHO. Food and Agricultural Organization/World Health Organization. *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. London: FAO/WHO, 2002. 11p.
- FAO/WHO. Food and Agricultural Organization/World Health Organization. *Probiotics in food health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Rome: FAO/WHO, 2006. 33p.
- FERREIRA, C.L.L.F. *Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção*. Viçosa: Suprema, 2003. 206 p.
- FERREIRA, F.A.B.; KUSSAKAWA, K.C.K. Uso de probióticos na alimentação de frangos de corte. *Biotec. Ciênc. Desenv.*, n. 8, p. 40-44, 1999.
- FERREIRA, E.H.R.; CABRAL, J.R.A.; NARDELLI, P.M. Alimentos funcionais: mercado, regulamentação e benefícios à saúde. *CTS*. 07 jul. 2010. Disponível em: <<http://alimentosebebidas.drupalgardens.com/content/alimentos-funcionais-mercado-regulamentação-e-benefícios-à-saúde>>. Acesso em: 05 dez. 2011.
- FLÓREZ, A.B.; DELGADO, S.; MAYO, B. Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Can. Jour. Microbiol.*, v. 51, p. 51-58, 2005.
- FULLER, R.A. Review: Probiotics in man and animals. *Jour. Appl. Bact.*, v. 66, p. 365-378, 1989.
- FUNCK, G.D.; HERMANN, G.; VICENZI, R. et al. Atividade antagonista de bactérias ácido-láticas isoladas de leite in natura e queijos artesanais frente a *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium* e *L. monocytogenes*. In: Encontro de Pós-Graduação da UFPel, 2011, Pelotas. *Anais do XIII Encontro de Pós-Graduação UFPel*. Pelotas: UFPel, 2011.
- FURTADO, M.M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. *Rev. ILCT*, v. 35, p. 33-36, 1980.
- GILLILAND, S.E.; STANLEY, T.E.; BUSH, L.J. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Jour. Dairy Sci.*, v. 67, n. 12, p. 3045-3051, 1984.
- GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; CRUZ, A.G. Probiotic dairy products as functional foods. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.*, v. 9, p. 455-470, 2010.
- GUARNER, F.; KHAN, A.G.; GARISCH, J. Guias práticas: Probióticos e Prebióticos. *Organização Mundial de Gastroenterologia*. 2008. 22p. Disponível em: <http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/pt/pdf/guidelines/19_probiotics_prebiotics_pt.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2011.
- GUEDES NETO, L.G.; SOUZA, M.R.; NUNES, A.C. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microorganismos indicadores. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 57, supl. 2, p. 245-250, 2005.
- GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. *Bol. Biotec.*, n. 64, p. 12-22, 1999.
- GOMES, M. Programa queijo Minas artesanal comemora 10 anos. Disponível em: <http://inovadefesa.ning.com/forum/topics/programa-queijo-minas-artesanal-comemora-10-anos?xg_source=activity>. Acesso em: 06 fev. 2012.
- HAVENAAR, R.; HUIS INT VELD, J.H.J. *Probiotics: A general view*. Amsterdam: Elsevier Applied Science, 1992., p. 151-170.
- HAWRELAK, J. Probiotics: Choosing the right one for your needs. *Jour. Austr. Trad. Med. Soc.*, v. 9, n. 2, p. 67-75, 2003.
- HEKMAT, S.; SOLTANI, H.; REID, G. Growth and survival of *Lactobacillus reuteri* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in yogurt for use as functional food. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.*, v. 10, n. 2, p. 293-296, 2009.
- HERREROS, M.A.; SANDOVAL H.; GONZÁLEZ, L. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). *Jour. Food Microbiol.*, v. 22, n. 5, p. 455-459, 2005.
- HUMMEL, A.S.; HERTEL, C.; HOLZAPFEL, W.H. et al. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, p. 730-739, 2007.

ICMSF. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. *Microorganisms in food: Characteristics of microbial pathogens*. London: Blackie Acad. Prof., 1998.

IMA. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002. *Dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas Artesanal e dá outras providências*. Disponível em: <http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gce/outros_documento/42645>. Acesso em: 05 dez. 2011.

IPHAN. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. *Queijo artesanal de Minas vira patrimônio cultural*, 2008. Disponível em: <<http://portal.iphan.gov.br/portal/montarDetalheConteudo.do?id=13927&sigla=Noticia&retorno=detalheNoticia>>. Acesso em: 05 dez. 2011.

JAY, J.M. *Modern Food Microbiology*. 6ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. 635p.

KLARE, I., KONSTABEL, C.; WERNER, G. et al. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *Jour. Antimicro. Chemother.*, v. 59, n. 5, p. 900–912, 2007.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S. M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008.

KOS, B., BEGANOVIC, J.; JURASIC, L. et al. Coculture-inducible bacteriocin biosynthesis of different probiotic strains by dairy starter culture *Lactococcus lactis*. *Mljekarstvo*, v. 61, n. 4, p. 273-282, 2011.

LEE, Y.K.; SALMINEN, S. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*. 2 ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons Inc., 2009. 174 p.

LEITE, M.O. *Isolamento e seleção de culturas lácticas nacionais resistentes a bacteriófagos para elaboração de queijo Minas curado*. 1993. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

LILLY, D.M.; STILLWEL, R.H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, v. 471, n. 3659, p. 747–749, 1965.

LJUNGH, A.; WADSTROM, T. *Lactobacillus Molecular Biology*. Norfolk: Caister Academic Press, 2009. 205 p.

MARTH, E.H.; STEELE, J.L. *Applied Dairy Microbiology*. 2 ed. Nova Iorque: Marcel Dekker, 2001. 744p.

MEIRA, S.M.M.; HELFER, V.E.; VELHO, R.V. et al. Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha. *Braz. Jour. Food Technol.*, p. 75-80, 2010.

MORELLI, L. In Vitro Selection of Probiotic Lactobacilli: A Critical Appraisal. *Curr. Iss. Mol. Biol.*, v. 1, n. 2, p. 59-67, 2000.

NAIDU, A.S.; BIBLACK, W.R.; CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 39, n. 1, p. 13–126, 1999.

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

PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health*, v. 29, p. 4-8, 1974.

PINTO, M.S. et al. Segurança alimentar do queijo Minas artesanal do serro, minas gerais, em função da adoção de boas práticas de fabricação. *Pesq. Agropec Trop.*, v. 39, n. 4, p. 342-347, 2009.

QUWEHAND, A.C.; KIRJAVAINEN, P.V., SHORTT, C. et al. Probiotics: Mechanisms and established effects. *Inter. Dairy Jour.*, v. 9, n. 1, p. 43-52, 1999.

RAISSY, M.; ANSARI, M. Antibiotic susceptibility of *Lactococcus garvieae* isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran fish farms. *African Jour. Biotech.*, v. 10, n. 8, p. 1473-1476, 2011.

- RESENDE, M.F.S. *Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas*. 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- RESENDE, M.F.S. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido-láticas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 63, n. 6, p.1567-1573, 2011.
- ROCHA, F.A.G.; DANTAS, L.I.S. Atividade antimicrobiana *in vitro* do látex do aveloz (*Euphorbia tirucalli* L.), pinhão bravo (*Jatropha mollissima* L.) e pinhão roxo (*Jatropha gossypifolia* L.) sobre microrganismos patogênicos. *Holos*, v. 4, p. 3-11, 2009.
- SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.
- SALMINEN, S.; BOULEY, C.; BOUTRON-RUAULT, M.C. et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Brit. Jour. Nutr.*, v. 80, p. 147–171, 1998.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. 265p.
- SANTOS, K.O.; DO EGITO, A.S.; BOMFIM, M.A.D. et al. *Produção de Queijos Probióticos para Agregação de Valor ao Leite Caprino*. Sobral: Embrapa caprinos, 2008. 21 p.
- SAXELIN, M. Colonization of the human gastrointestinal tract by probiotic bacteria (*Lactobacillus* GG). *Nutr. Today*, v.31, p.5-9, 1996.
- SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M. Probiotics, prebiotics and synbiotics- approaching a definition. *Am. Jour. Clin. Nutr.*, v. 73, p. 361–364, 2001.
- SHORNIKOVA, A.V., CASAS, I. A., MYKKANEN, N. et al. Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. *Ped. Infect. Dis. Jour.*, v.16, n. 12, p.1103-1107, 1997.
- SHRUTHY, V.V.; PAVITHRA, M.; GOWRI, S. et al. Probiotic potentials among latic acid bacteria isolated from curd. *Inter. Jour. Res. Ayurveda Pharm.*, v. 2, n. 2, p. 602-609, 2011.
- SMIT, G. *Dairy processing: improving quality*. Cambrigde: Woodhead Publishing Limited, 2003. p. 229-244
- SOUZA, M.R. *Identificação molecular e propriedades probióticas de bactérias ácido lácticas isoladas de cecos de gallu gallus domesticus "caipira" e de granja*. 2006. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- STRINGHETA, P.C.; VILELA, M.A.P.; OLIVEIRA, T.T. et al. *Alimentos “Funcionais”*: Conceitos, contextualização e regulamentação. Juiz de Fora: Templo, 2007. 246 p.
- TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bact. Rev.*, v. 40, n. 3, p. 722-756, 1976.
- TAMBEKAR, D.H.; BHUTADA, S.A. Acid and bile tolerance, antibacterial activity, antibiotic resistance and bacteriocins activity of probiotic *Lactobacillus* species. *Rec. Res. Sci. Technol.*, v. 2, n.4, p. 94-98, 2010.
- TAMINE, A.Y. *Probiotic dairy products*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2005, 216 p.
- TAMINE, A. *Fermented milk*. Ayr: Blackwell Science Ltd., 2006. 266 p.
- TAMIME, A.; ROBINSON, R.K. *Yoghurt: science and technology*. 2 ed. Boca Raton: CRC, 1999. 368 p.
- TANNOCK, G.W.; MUNRO, K.; HARMSSEN, H.J.M. et al. Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 66, n. 6, p. 2578-2588, 2000.
- TEMMERMAN, R.; POT, B.; HUYS, G. et al. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Inter. Jour. Food Microbiol.*, v. 81, p. 1-10, 2002.
- TEUBER, M.; MEILE, L.; SCHWARZ, F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Anton. van Leeuw. Jour.*, v. 76, n.1-4, p. 115-137, 1999.

TUOMOLA, E.; CRITTENDEN, R.; PLAYNE, M. et al. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am. Jour. Clin. Nutr.*, v.73, n. 2, 393-398, 2001.

WALKER, D.K.; GILLILAND, S.E. Relationships among bile tolerance, bile salt desconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Jour. Dairy Sci*, v. 76, n. 4, p. 956-961, 1993.

ZHOU, J.S. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Inter. Jour. Food Microbiol.*, v. 98, p. 211-217, 2005.

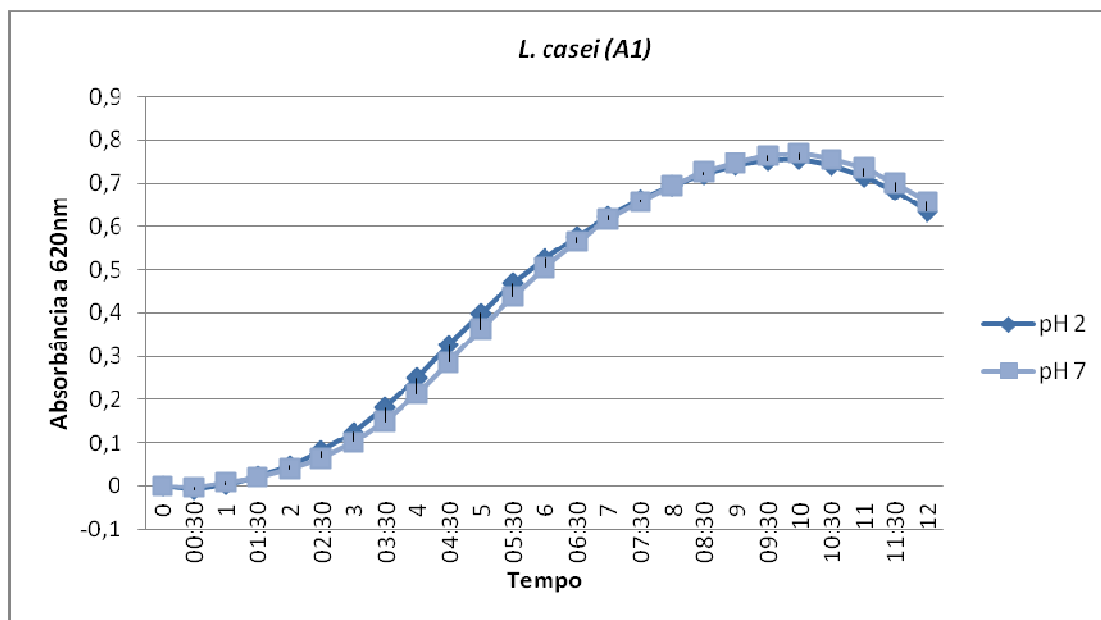
ANEXOS

Anexo 1. Níveis de susceptibilidade a antimicrobianos de *Lactobacillus* spp. de acordo com diâmetros dos halos de inibição (mm) em teste de difusão em ágar MRS (*Difco*)

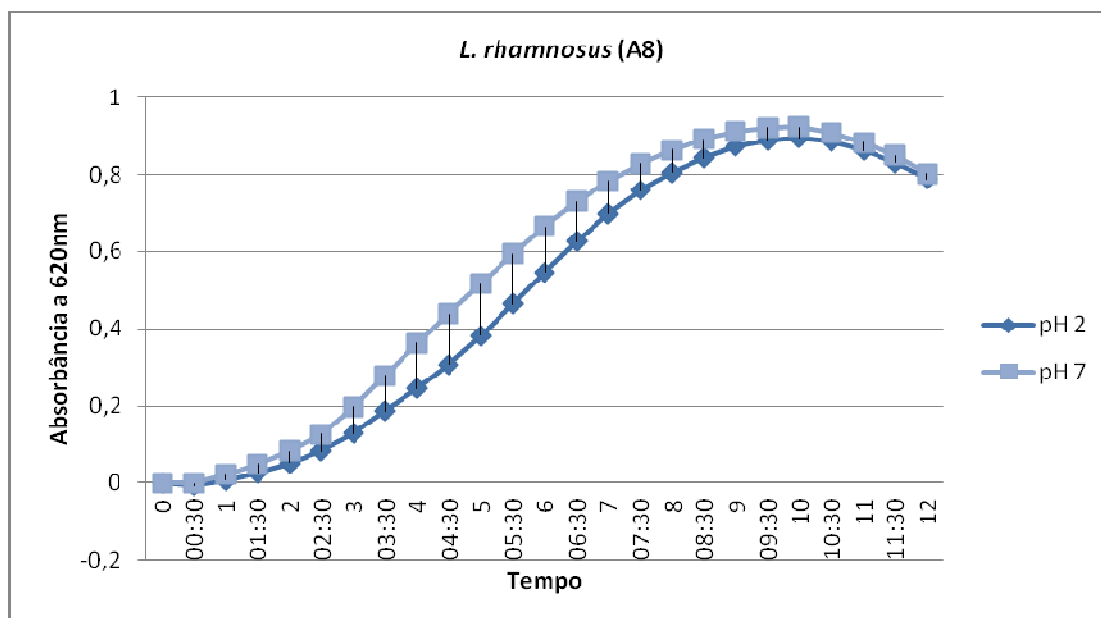
Antimicrobiano		Nível de Susceptibilidade	
Nome (Concentração)	Resistente	Moderadamente Sensível	Sensível
Ceftazidime (30 µg)	≤ 15	16-18	≥ 19
Clindamicina (2 µg)	≤ 8	9-11	≥ 12
Ciprofloxacina (5 µg)	≤ 13	14-18	≥ 19
Eritromicina (15 µg)	≤ 13	14-17	≥ 18
Gentamicina (10 µg)	≤ 12	-	≥ 13
Oxacilina (1 µg)	≤ 18	19-20	≥ 21
Penicilina G (10 UI)	≤ 19	20-27	≥ 28
Estreptomicina (30 µg)	≤ 11	12-14	≥ 15
Tetraciclina (30 µg)	≤ 14	15-18	≥ 19
Vancomicina (30 µg)	≤ 14	15-16	≥ 17

Fonte: Adaptado de Charteris et al. (1998).

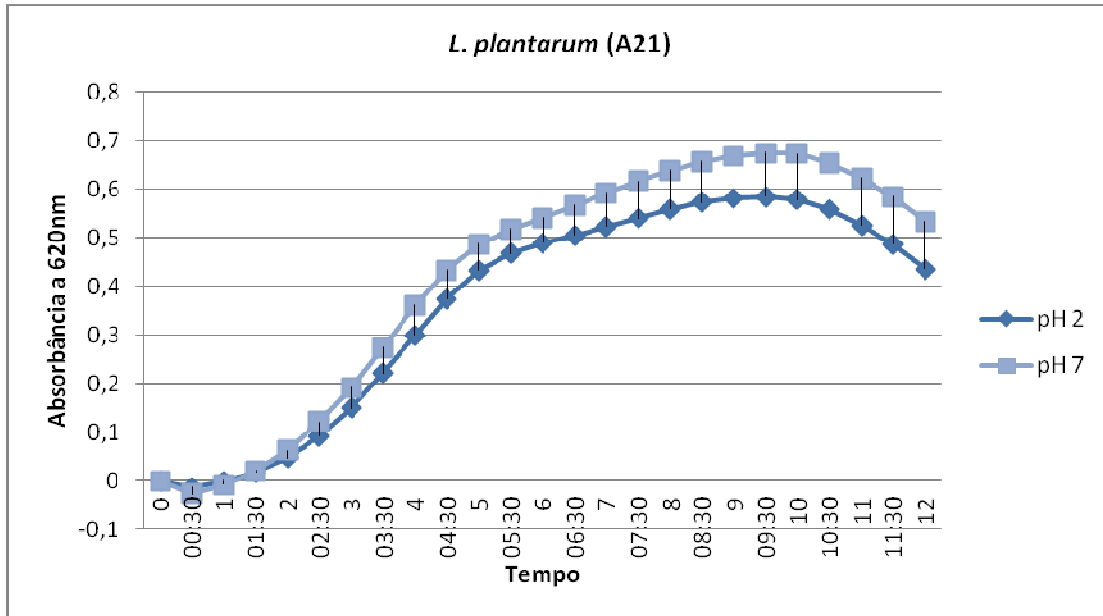
Anexo 2. Curvas de crescimento da amostra *L. casei* (A1), incubada a 37°C em caldo MRS (*Difco*), após incubação em solução salina 0,9% em pH 2,0 e solução salina 0,9% em pH 7,0, por três horas



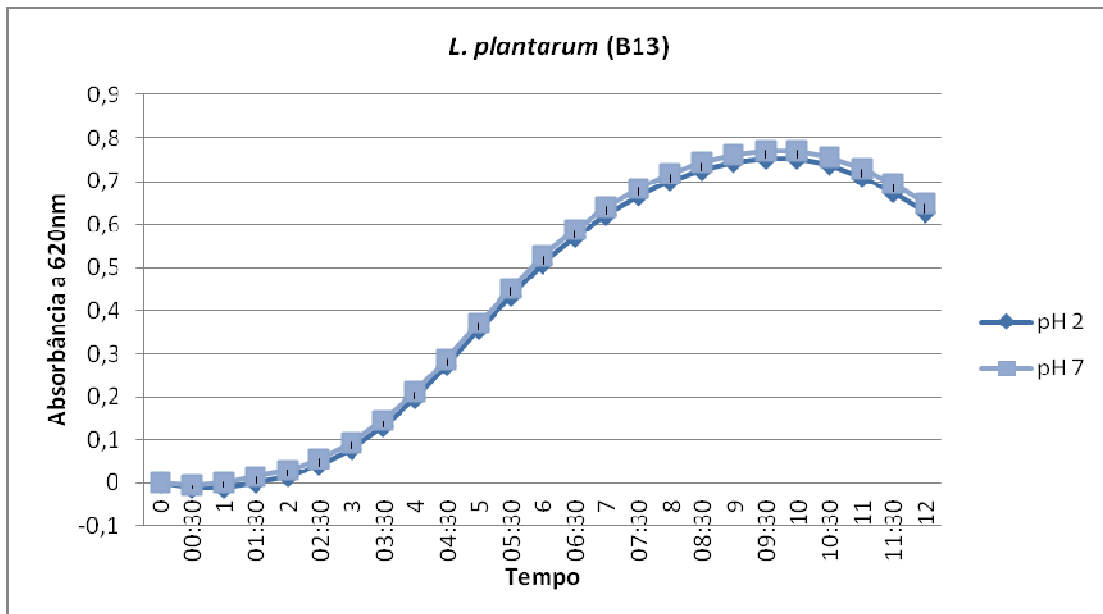
Anexo 3. Curvas de crescimento da amostra *L. rhamnosus* (A8), incubada a 37°C em caldo MRS (*Difco*), após incubação em solução salina 0,9% em pH 2,0 e solução salina 0,9% em pH 7,0, por três horas



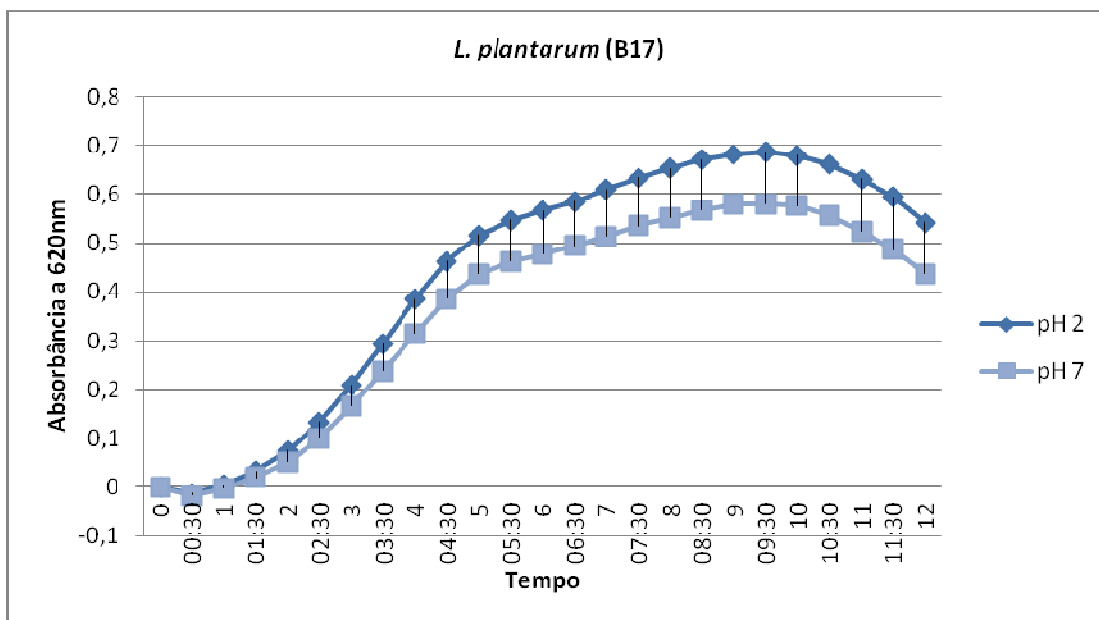
Anexo 4. Curvas de crescimento da amostra *L. plantarum* (A21), incubada a 37°C em caldo MRS (*Difco*), após incubação em solução salina 0,9% em pH 2,0 e solução salina 0,9% em pH 7,0, por três horas



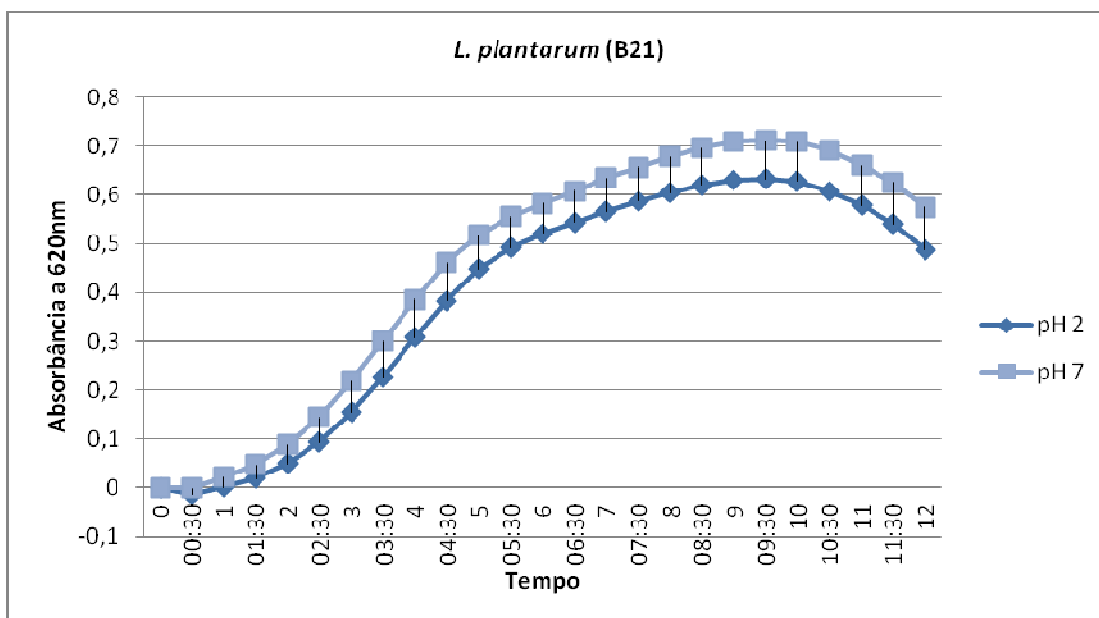
Anexo 5. Curvas de crescimento da amostra *L. plantarum* (B13), incubada a 37°C em caldo MRS (*Difco*), após incubação em solução salina 0,9% em pH 2,0 e solução salina 0,9% em pH 7,0, por três horas



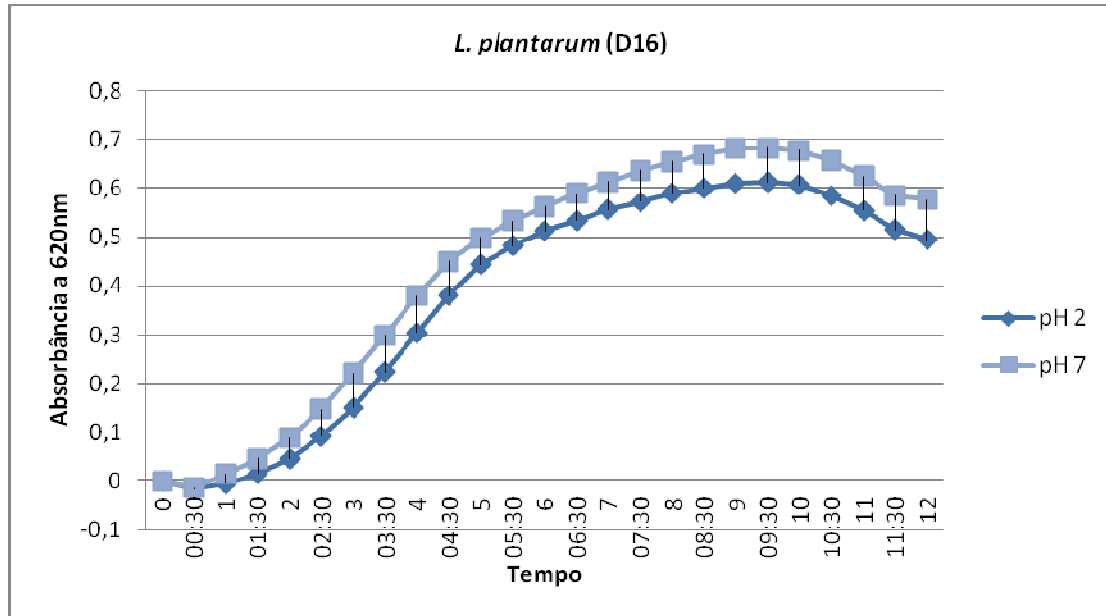
Anexo 6. Curvas de crescimento da amostra *L. plantarum* (B17), incubada a 37°C em caldo MRS (*Difco*), após incubação em solução salina 0,9% em pH 2,0 e solução salina 0,9% em pH 7,0, por três horas



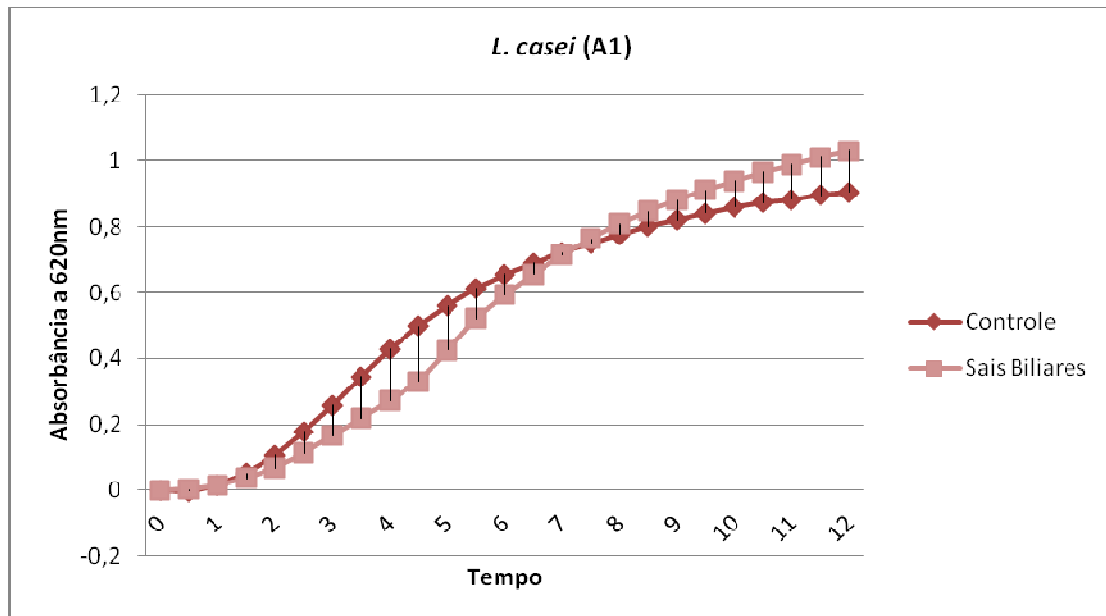
Anexo 7. Curvas de crescimento da amostra *L. plantarum* (B21), incubada a 37°C em caldo MRS (*Difco*), após incubação em solução salina 0,9% em pH 2,0 e solução salina 0,9% em pH 7,0, por três horas



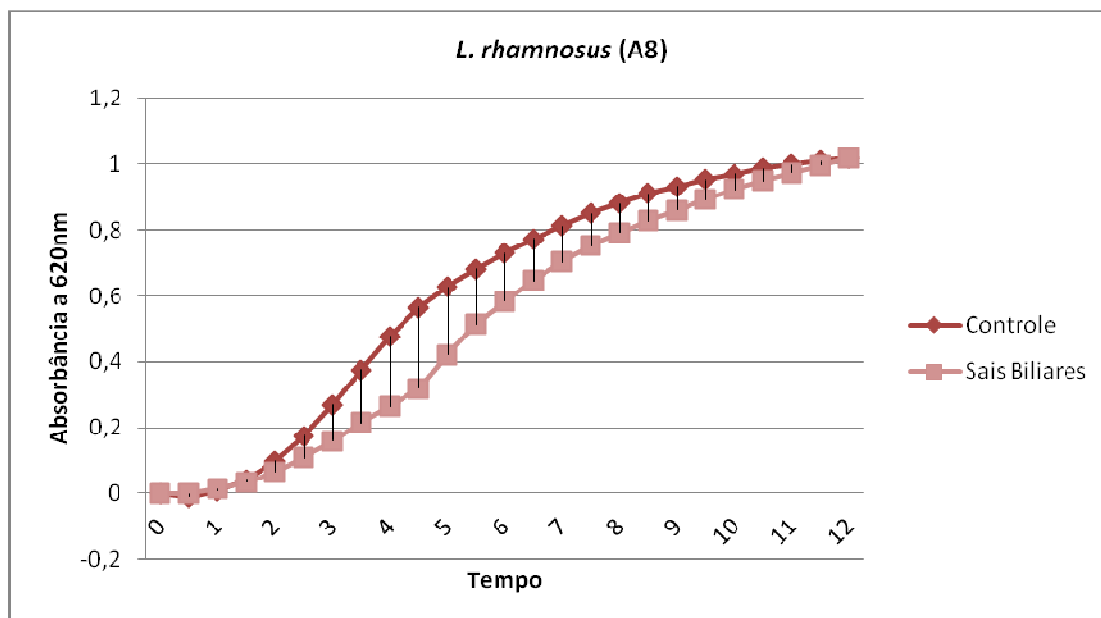
Anexo 8. Curvas de crescimento da amostra *L. plantarum* (D16), incubada a 37°C em caldo MRS (*Difco*), após incubação em solução salina 0,9% em pH 2,0 e solução salina 0,9% em pH 7,0, por três horas



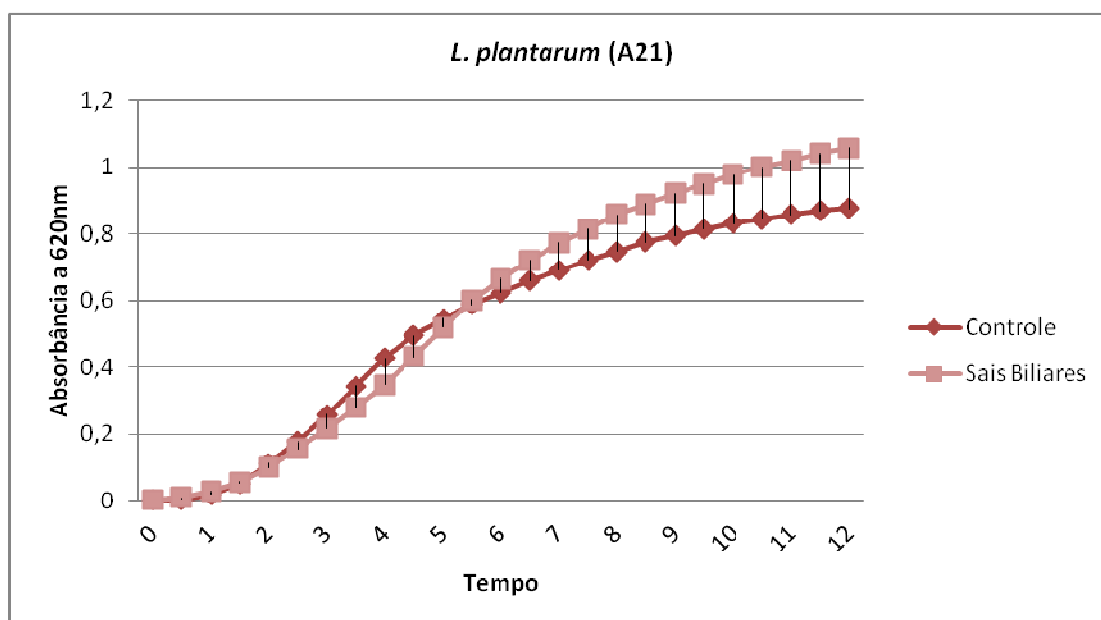
Anexo 9. Curvas de crescimento da amostra *L. casei* (A1), incubada a 37°C, em meio contendo caldo MRS (*Difco*) com 0,3% de Ovgall (*BD*) e em caldo MRS (*Difco*) puro



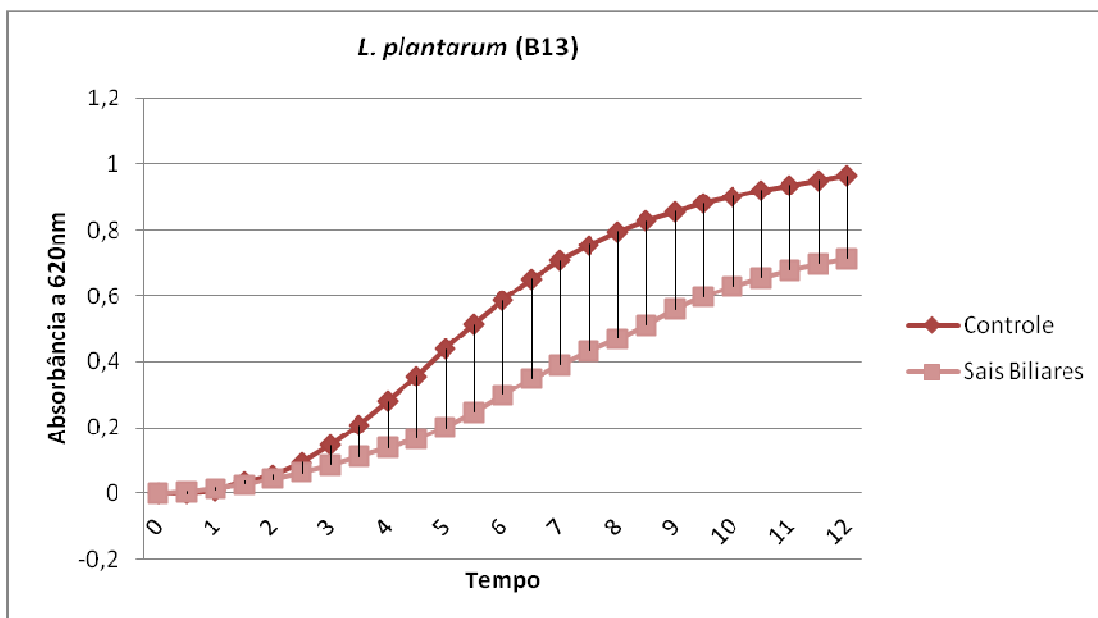
Anexo 10. Curvas de crescimento da amostra *L. rhamnosus* (A8), incubada a 37°C, em meio contendo caldo MRS (*Difco*) com 0,3% de Oxgall (*BD*) e em caldo MRS (*Difco*) puro



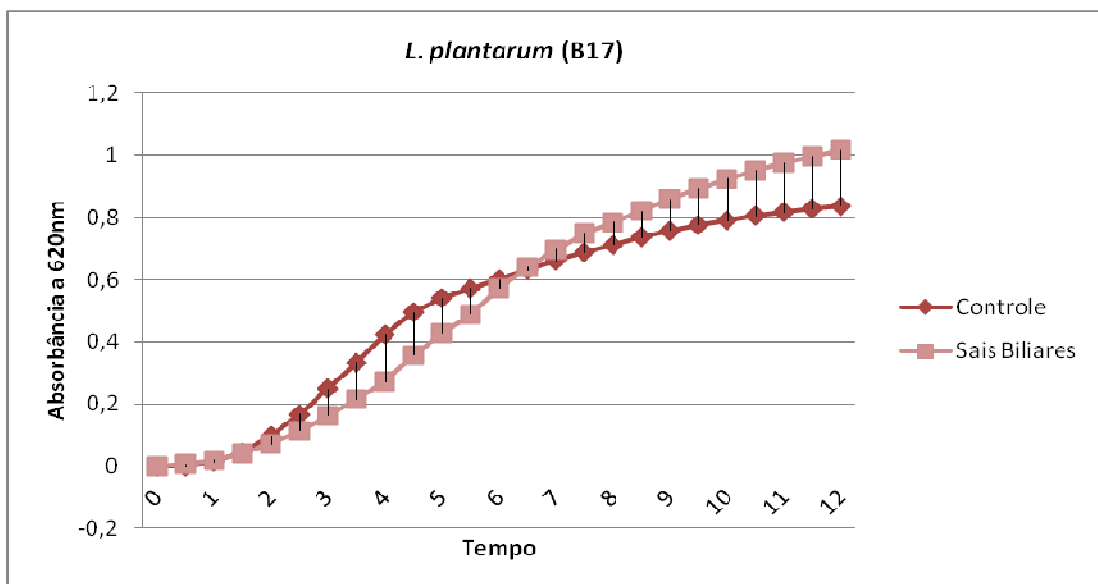
Anexo 11. Curvas de crescimento da amostra *L. plantarum* (A21), incubada a 37°C, em meio contendo caldo MRS (*Difco*) com 0,3% de Oxgall (*BD*) e em caldo MRS (*Difco*) puro



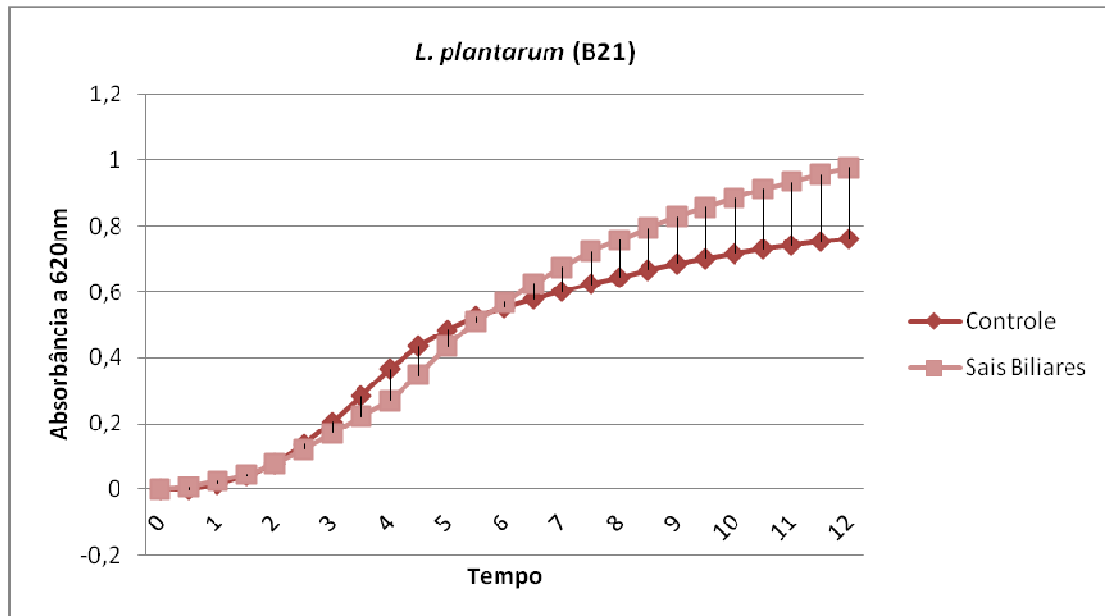
Anexo 12. Curvas de crescimento da amostra *L. plantarum* (B13), incubada a 37°C, em meio contendo caldo MRS (*Difco*) com 0,3% de Oxgall (*BD*) e em caldo MRS (*Difco*) puro



Anexo 13. Curvas de crescimento da amostra *L. plantarum* (B17), incubada a 37°C, em meio contendo caldo MRS (*Difco*) com 0,3% de Oxgall (*BD*) e em caldo MRS (*Difco*) puro



Anexo 14. Curvas de crescimento da amostra *L. plantarum* (B21), incubada a 37°C, em meio contendo caldo MRS (*Difco*) com 0,3% de Oxgall (*BD*) e em caldo MRS (*Difco*) puro



Anexo 15. Curvas de crescimento da amostra *L. plantarum* (D16), incubada a 37°C, em meio contendo caldo MRS (*Difco*) com 0,3% de Oxgall (*BD*) e em caldo MRS (*Difco*) puro

