

Lilian Ferreira Neves

Propriedades Probióticas *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos artesanais do norte de Minas Gerais e qualidade físico-química dos queijos

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Animal Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Área de Concentração: Produção Animal

Orientador: Marcelo Resende de Souza

Coorientadores: Eduardo Robson Duarte;
Cintya Neves de Souza

MONTES CLAROS
2017

N511p
2017

Neves, Lilian Ferreira.

Propriedades probióticas *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas Gerais e qualidade físico-química dos queijos/Lilian Ferreira Neves. Montes Claros: Universidade Federal de Minas Gerais, 2017.

61 f.: il.

Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Produção Animal, Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador(a): Marcelo Resende de Souza.

Banca examinadora: Eduardo Robson Duarte, Claudia Freire de Almeida Moraes Penna , Andreia Marçal da Silva .

Inclui referências: f. 19-23, 45-48, 54-55.

1. Lactobacilo 2. Antibiograma. 3. Antagonismo láctico .4. Tolerância a ácidos e sais biliares. I. Souza, Marcelo Resende. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 637.1

Lilian Ferreira Neves

Propriedades probióticas *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos artesanais do norte de Minas Gerais e qualidade físico-química dos queijos

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Produção Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal

Área de Concentração: Produção Animal
Linha de Pesquisa: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Orientador: Marcelo Resende de Souza
Instituto de Ciências Agrárias da UFMG

Aprovado pela banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. (Eduardo Robson Duarte)
ICA/UFMG

Profa. (Claudia Freire de Almeida Morais Penna)
UFMG

Profa. (Andreia Marçal da Silva)
UFSJ

Prof. Marcelo Resende de Souza (orientador)
UFMG

Montes Claros, 02 de Junho de 2017

DEDICATÓRIA

Dedico a DEUS

AGRADECIMENTO

À DEUS pela vida e por todas as conquistas!

Ao meu filho Daniel e meu esposo Cleyson pelo amor, paciência e incentivo.

Ao prof. Marcelo pela orientação e contribuição.

Ao prof. Eduardo e à Cintya pela co-orientação e compreensão.

Ao Prof. Henrique pela identificação dos microrganismos.

À Grayce minha amiga parceira de estudos.

À Nanda amiga e parceira em alguns experimentos.

Ao Max, prof. Amigo.

Aos amigos que me ajudaram na realização dos procedimentos e análises laboratoriais (Cintya, Hugo, Mariuze, Felipe, Léo e Nanda).

Aos colegas de mestrado pelas boas amizades cultivadas e bons momentos de convívio.

Às boas amizades cultivadas no Laboratório de Ecologia Microbiana (Lívia, Sabrina, Andressa, Nanda, Katchuce, Cláudio, Angélica, Igor, Priscila, Bianca, Patty, Franciellen, Valdo, Manu...)

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

“Tudo posso Naquele que me dá forças”

Filipenses 4:13

RESUMO

A elaboração de produtos lácteos artesanais é uma atividade tradicional em diversos países, com características de cada região ou microrregião. A utilização de bactérias ácido lácticas (BAL) contribui para o desenvolvimento de sabor e aroma, com potencial de inibição do crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos. Alguns desses microrganismos podem ser probióticos, por promoverem efeitos benéficos à saúde dos consumidores, que buscam alimentos saudáveis e nutritivos, sendo os queijos uma alternativa para a incorporação dos mesmos. O objetivo deste estudo foi determinar o potencial probiótico *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas Gerais. Foram coletadas 15 amostras de queijos com maturação de quinze dias no período de janeiro a fevereiro de 2016. As amostras foram submetidas a análises físico-químicas para caracterizar a umidade, gordura, proteína, pH e acidez titulável. Bactérias isoladas dos queijos foram identificadas por análise proteômica e avaliada quanto ao seu potencial probiótico *in vitro* pela tolerância ao pH gástrico e aos sais biliares, sensibilidade a antimicrobianos e antagonismo contra amostras indicadoras. As bactérias foram identificadas como *Lactobacillus paracasei* e *Enterococcus faecium*. As amostras *L. paracasei* (L2) e *L. paracasei* (M3) apresentaram melhores resultados a tolerância a pH 2.0 e para o teste de antagonismo. Essas bactérias com potencial probiótico selecionadas poderão contribuir para a melhoria da qualidade microbiológica dos queijos e inocuidade alimentar dos consumidores.

Palavras-chave: *Lactobacillus*. Antibiograma. Antagonismo láctico. Tolerância a ácidos e sais biliares.

ABSTRACT

The elaboration of artisanal dairy products is a traditional activity in several countries, with characteristics of each region or microregion. The use of lactic acid bacteria (BAL) contributes to the development of flavor and aroma, with potential to inhibit the growth of deteriorating and pathogenic microorganisms. Some of these microorganisms may be probiotic, since they promote beneficial effects on the health of consumers, who seek healthy and nutritious food, and cheeses are an alternative for their incorporation. The objective of this study was to determine the in vitro probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from artisanal cheeses from Northern Minas Gerais. Fifteen cheese samples were collected with a maturation period of 15 days from January to February 2016. Samples were submitted to physical-chemical analysis to characterize moisture, fat, protein, pH and titratable acidity. Bacteria isolated from the cheeses were identified by proteomic analysis and evaluated for their in vitro probiotic potential by tolerance to gastric pH and bile salts, antimicrobial susceptibility and antagonism against indicator samples. Bacteria were identified as *Lactobacillus paracasei* and *Enterococcus faecium*. The *L. paracasei* (L2) and *L. paracasei* (M3) samples presented better tolerance at pH 2.0 and the antagonism test. These bacteria with probiotic potential selected may contribute to the improvement of the microbiological quality of cheeses and food safety of consumers.

Key-words: *Lactobacillus*. Antibiograma. Lactic antagonism. Tolerance to bile acids and salts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

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(Difco)	57
Anexo 2 - Níveis de susceptibilidade a antimicrobianos de <i>Staphylococcus Aureus</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Bacillus cereus</i> de acordo com diâmetros dos halos de inibição (mm) em teste de difusão em ágar Muller Hinton (Difco)	57
Anexo 3 - Curvas de crescimento de <i>L. parasei</i> (G1), incubado 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	58
Anexo 4 - Curvas de crescimento de <i>L. parasei</i> (L2), incubado 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	58
Anexo 5 - Curvas de crescimento de <i>L. paracasei</i> (G1), incubado a 37°C, em meio contendo caldo MRS (Difco) com 0,3% de Oxgall (BD) e em caldo MRS (Difco) puro	59
Anexo 6 - Curvas de crescimento de <i>L. paracasei</i> (L2), incubado a 37°C, em meio contendo caldo MRS (Difco) com 0,3% de Oxgall (BD) e em caldo MRS (Difco) puro	60
Anexo 7 - Composição química e propriedades físico-químicas de amostras de queijos artesanais produzidos em diferentes cidades do norte de Minas Gerais	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de bactérias lácticas isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas identificadas por MALDI TOF (<i>Matrix Associated Laser Desorption-Ionization- Time of Flight</i>)	32
Tabela 2 - Espécies de bactérias com efeito antagônico isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas identificadas por MALDI TOF	33
Tabela 3 - Médias dos halos de inibição (mm), de duas repetições em triplicata, do teste de antagonismo <i>in vitro</i> de amostras de bactérias lácticas, isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas Gerais, contra bactérias reveladoras	35
Tabela 4 - Médias dos halos de inibição (mm) da sensibilidade a antimicrobianos, de duas repetições em duplicata, de amostras de bactérias ácido lácticas, isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas Gerais	37
Tabela 5 - Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de amostras de <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Bacillus cereus</i> isolados de queijos artesanais do Norte de Minas e <i>S.aureus</i> ATCC 25923	39
Tabela 6- Absorbância máxima alcançada, em duas repetições em triplicata, por amostras de bactérias lácticas isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas Gerais, após três horas de incubação a 37°C em pH 7,0 (controle) e pH 2,0 (ácido gástrico)	40
Tabela 7 - Percentual de inibição por ácido gástrico (pH 2,0), de duas repetições em triplicata, sobre amostras de bactérias lácticas isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas, em 12 horas de incubação a 37°C, após 3h de incubação em ácido gástrico (pH 2,0) a 37°C	41
Tabela 8 - Absorbância máxima alcançada, em duas repetições em triplicata, por amostras de bactérias lácticas isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas Gerais, cultivadas em caldo MRS (Difco) após 12h de incubação a 37°C, na presença de 0,3% de sais biliares	43
Tabela 9 - Percentual de inibição por sais biliares (Oxgall, BD, 0,3%), de duas repetições em triplicata, sobre amostras de bactérias lácticas, isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas Gerais, em 12h de incubação a 37°C	44
Tabela 10 - Composição química e propriedades físico-químicas de amostras de queijos artesanais produzidos em diferentes cidades do Norte de Minas Gerais	52

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Cultura de Coleção Tipo Americano)
BAL	Bactérias ácido lácticas
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Infusão de Cérebro e Coração)
°C	Graus Celsius
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
%	Por cento
Elisa	<i>Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay</i> (Ensaio Imuno-enzimático)
Emater-MG	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAO/WHO	<i>Food and Agriculture/World Health Organization</i>
G	Grama
GES	Gordura no extrato seco
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
IPHAN	Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
MG	Minas Gerais
mL	Mililitros
µL	Microlitros
MRS	<i>Man Rogosa e Sharpe</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix Associated Laser Desorption-Ionization-Time of Flight</i>
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
p/v	Peso por volume
pH	Potencial hidrogeniônico
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i> - Ácido trifluoroacético
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo Geral	12
2.2	Objetivos Específicos	12
3	REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1	Queijos artesanais	13
3.2	Queijos do Norte de Minas Gerais	14
3.3	Bactérias ácido lácticas (BAL) em queijos artesanais	15
3.3.1	O gênero Lactobacillus	15
3.3.2	O genero Enterococcus	16
3.4	Probióticos	16
3.5	Propriedades probióticas de BAL isoladas de queijos artesanais	17
3.6	Proteômica	18
3.7	Referências	19
4	ARTIGO(S)	24
4.1	Artigo 1- Propriedades probióticas <i>in vitro</i> de bactérias ácido lácticas Isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas Gerais	25
4.2	Artigo 2 - Perfil físico-químico de queijos artesanais do norte de Minas Gerais	49
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
	ANEXOS	57

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda por alimentos saudáveis tem estimulado inovações e desenvolvimento de novos produtos em todo o mundo (MARCATTI *et al.*, 2009). Em alguns alimentos funcionais são adicionados probióticos, microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, exercem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

Os probióticos presentes em alimentos funcionais são fonte de pesquisa em todo o mundo, por também atuarem como redutores de riscos de algumas doenças como infecções gastrointestinais, infecções respiratórias, inflamações na pele dentre outras (VIDAL *et al.*, 2012).

Leites fermentados são considerados veículo ideal para condução de bactérias probióticas no trato gastrointestinal (DUARTE *et al.*, 2016). No entanto, outros derivados lácteos contendo probióticos, como diversos tipos de queijos, vêm sendo desenvolvidos, oferecendo ao consumidor maior variedade de produtos que conferem benefícios a saúde (STRINGHETA *et al.*, 2007).

Em Minas Gerais, a confecção de queijos artesanais é tradicional em vários municípios; sendo fonte geradora de renda, com grande importância social e valor cultural (VIANA, 2009). Os queijos artesanais apresentam variabilidade na microbiota, pois são produzidos a partir do leite cru; por isso podem veicular tanto microrganismos patogênicos e deteriorantes, quanto bactérias ácido lácticas que podem apresentar propriedades probióticas.

No Norte de Minas Gerais, o queijo artesanal também é produzido e comercializado, sendo essa uma atividade econômica expressiva na microrregião. Dados da Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais - EMATER-MG constataram que, anualmente, pelo menos 400 toneladas de queijo artesanal são comercializadas no município de Montes Claros, movimentando a economia da cidade (ALMEIDA *et al.*, 2012).

Diversos trabalhos demonstram a presença de bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de queijos com propriedades probióticas (COSTA, 2010; COSTA *et al.*, 2013; ANDRADE *et al.*, 2014).

As BAL são selecionadas a partir de testes *in vitro* a fim de identificar culturas mais resistentes, as quais possuem maior chance de sucesso como alimento probiótico (TAMIME, 2005). Esses testes podem ser adotados para analisar capacidade de uma cultura sobreviver às condições gastrointestinais e se manterem ativas. Dentre os testes de seleção realizados em microrganismos probióticos podem ser citados alguns como estabilidade fenotípica e genotípica, padrões de utilização de carboidratos e proteínas; tolerância à acidez gástrica e aos sais biliares; produção de substâncias antimicrobianas contra bactérias patogênicas; padrões de resistência aos antimicrobianos; capacidade de inibir a adesão de patógenos intestinais; imunogenicidade e outros (LEE; SALMINEN, 2009; ANVISA, 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial probiótico *in vitro* de bactérias ácido lácticas presentes em queijos artesanais provenientes de propriedades rurais no Norte de Minas Gerais e caracterizar o perfil físico-químico dos queijos avaliados.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar e identificar bactérias ácido-láticas (BAL) presentes em amostras de queijos artesanais produzidos no norte de Minas Gerais.
- Caracterizar as BAL segundo o seu potencial probiótico *in vitro*, de acordo com resistências ao suco gástrico e sais biliares, susceptibilidade a antimicrobianos e antagonismo contra microrganismos indicadores.
- Avaliar a qualidade físico-química dos queijos artesanais.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Queijos artesanais

Segundo Harbutt (2010), o queijo é um dos alimentos mais antigos da história da humanidade. A variedade artesanal mineira envolve ingredientes comuns ao queijo Minas como leite cru, coalho, sal, e apresenta-se como um concentrado de gordura e proteína, de consistência firme, sabor e cor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes (VIANA, 2009; PIRES, 2013).

Segundo o Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN), a elaboração de queijos artesanais tem garantido o sustento de famílias ao longo de vários anos (IPHAN, 2008). No Brasil, os queijos artesanais têm grande importância social, bem como valor histórico e cultural; em Minas destaca-se como sendo um dos principais produtos da agroindústria familiar (PINTO *et al.*, 2009). O Programa Queijo Minas Artesanal - feito a partir de leite cru, não pasteurizado - promove a identidade dos queijos artesanais produzidos nas regiões do Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro (IMA, 2016).

Os queijos artesanais são caracterizados por apresentarem alto valor nutricional e qualidades sensoriais apreciadas, além da facilidade de combinar seu paladar com diversos outros produtos. Minas frescal, minas curado, mussarela, prato são alguns exemplos de queijos artesanais (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Os queijos artesanais podem veicular BAL que, ao serem consumidas juntamente com o alimento em condições viáveis e quantidades adequadas, podem promover benefícios à saúde do consumidor (REIG; ANESTO, 2002).

O queijo Minas artesanal é o tipo mais tradicional de queijo produzido no Brasil e de grande aceitação no mercado nacional. Apresenta consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, com ou sem olhaduras mecânicas. Conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde foi produzido, o queijo Minas artesanal é elaborado a partir do leite de vaca integral e cru, na propriedade de origem (MINAS GERAIS, 2012).

Os queijos do estado de Minas Gerais são produzidos basicamente com a mesma tecnologia, com características finais que variam conforme a região do estado onde é produzido tais como: condições climáticas, solo, pastagens, etc. Os produtores artesanais utilizam coalho, sal e fermento endógeno, como coadjuvante à produção do queijo. Esse fermento endógeno, comumente conhecido como pingo, contém microrganismos responsáveis pela fermentação e maturação do queijo (NÓBREGA, 2007). Essa prática insere ao produto uma microbiota diversificada, representativa da região na qual o produto é fabricado e confere ao queijo características sensoriais diferenciadas (DORES; FERREIRA, 2012).

3.2 Queijos do Norte de Minas Gerais

O Norte de Minas Gerais é caracterizado por grande diversidade física, socioeconômica e cultural, com clima semiárido, altas temperaturas, chuvas em poucos meses do ano e longos períodos secos. Mesmo em meio a essas diversidades, a região apresenta potencial a ser explorado para o desenvolvimento sustentável (COSTA; RUAS; PEREIRA, 2010).

No Norte de Minas é evidente o envolvimento da família rural com a produção de queijo artesanal, sendo essa, na maioria dos casos, a principal ou única fonte de renda familiar (SILVA *et al.*, 2011).

O queijo na região Norte de Minas Gerais ainda não está enquadrado no Decreto no 44.864, de 1º de agosto de 2008, que alterou a Lei 14.185 de 2002, na qual o governo do Estado dispõe sobre as condições em que o queijo artesanal pode ser elaborado. No entanto, ações devem ser tomadas para melhoria na elaboração de queijos artesanais a fim de apresentar produto uniforme, com redução de riscos a saúde, resultando em ganho para os produtores e consumidores (PINTO, 2004).

A produção de queijos artesanais aumentou significativamente, sendo que esse aumento está relacionado à busca crescente da população por uma alimentação mais saudável e natural isenta de conservantes ou outros artifícios. Por ser um alimento muito apreciado por visitantes, estes queijos artesanais são comercializados em feiras livres e mercados da região (CARRIJO *et al.*, 2011).

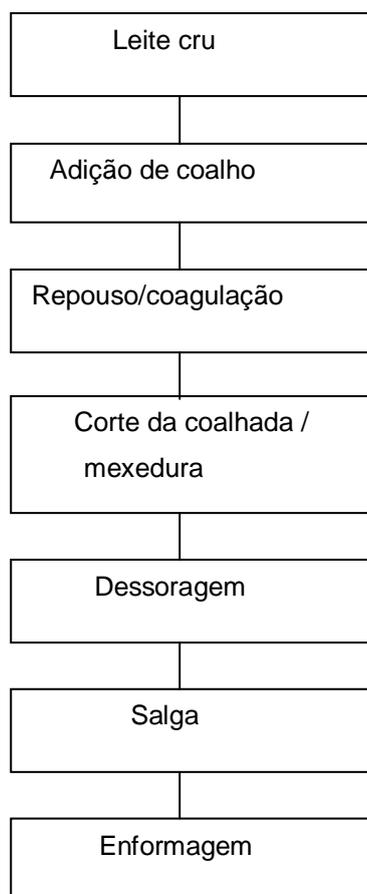


FIGURA 1: Fluxograma da elaboração de queijos artesanais do norte de Minas Gerais empregado nas regiões que compuseram o experimento.

3.3 Bactérias ácido-láticas (BAL) em queijos artesanais

O grupo das BAL compõe-se de gêneros microbianos que apresentam algumas características comuns como: são cocos ou bastonetes Gram positivo, catalase negativo e não esporulam. No entanto, a principal característica comum é a capacidade de fermentar lactose, para desenvolvimento de sabor e textura. Esses microrganismos favorecem a conservação de alimentos, associada à diminuição do pH, à produção de ácido lático e devido a produção de agentes antimicrobianos, como as bacteriocinas. A combinação desses fatores limita a multiplicação microbiana indesejável, promovendo papel importante na segurança microbiológica (DORES; FERREIRA, 2012).

A indústria de leite e derivados tem utilizado bactérias lácticas nos mais variados produtos, como culturas iniciadoras ou adjuntas em leites fermentados e queijos, pois melhoram as características sensoriais, além de promover a conservação inibindo a competição da microbiota deteriorante e de agentes patogênicos. Os derivados de leite, como os queijos artesanais, são bons meios de crescimento para bactérias probióticas, pois contêm fatores e substratos como lactose e proteínas indispensáveis para a fermentação (WENDLING; WESCHENFELDER, 2013).

Em vários países são produzidas pequenas quantidades de queijos, a partir de leite cru, manipulados pelos próprios produtores e confeccionados artesanalmente, de forma empírica. Na produção desses, as bactérias ácido lácticas (BAL) se encontram naturalmente presentes no leite e no ambiente (RESENDE *et al.*, 2011).

O uso de bactérias lácticas na produção de queijos confere ao produto característica peculiar, pois além de melhorar a qualidade sensorial que caracteriza os produtos fermentados, podem conter microrganismos com características probióticas (MARQUES *et al.*, 2011).

3.3.1 O gênero *Lactobacillus*

Lactobacillus é o gênero mais conhecido de microrganismos probióticos, isolado e identificado pela primeira vez em 1990 por Moro, de fezes de lactentes amamentados. A heterogeneidade e o número de espécies se devem à definição do gênero, apresentam formato bacilos Gram positivo, catalase negativo e não esporulam (SHARPE, 1981).

Das bactérias desse gênero identificadas e de importância e uso na produção de alimentos, principalmente nos derivados lácteos de apelo probiótico, estão: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius* e *L. tolerans* (Klaenhammer e Kullen, 1999). São conhecidas 56 espécies deste gênero com características probióticas, com pH ótimo de crescimento entre 5,5 e 6,2 (BARRONS *et al.*, 2008).

As bactérias do gênero *Lactobacillus* são frequentemente associadas como sendo probióticas por serem classificadas como seguras ao consumo ou GRAS (Generally recognized

as safe) por órgãos de pesquisa e de saúde pública, como a FAO/WHO e FDA (Food and Drug Administration). Dessa forma, essas espécies de *Lactobacillus* não devem manifestar potencial patogênico, nem serem capazes de transmitir genes de resistência à antimicrobianos (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

3.3.2 O gênero *Enterococcus*

As características deste gênero compreendem: forma de cocos isolados, em pares, ou em cadeias curtas; não esporulados; reação de oxidase negativo e aeróbio facultativas (HARDIE; WHILEY, 1997). *Enterococcus* crescem em uma temperatura ótima de 35 °C, embora a maioria das espécies do gênero cresça em temperaturas que variam de 10 a 45 °C. A maioria apresenta crescimento em concentrações de NaCl (até 6,5%), em pH em torno de 9,6 e ainda pode sobreviver a 60 °C durante 30 minutos - termotolerante. (GIRAFFA, 2003; FOLQUIE-MORENO, 2006).

Quando comparado com os outros microrganismos probióticos, os enterococos apresentam algumas vantagens quanto à sua resistência e pouca seletividade para crescimento e multiplicação, não sendo exclusivamente acidófilo, microaerófilo e/ou mesófilo como muitos dos microrganismos ácido lácticos. A espécie *Enterococcus faecium* é a mais comumente encontrada em produtos veiculando probióticos (BRANDALIZE, 2013).

Algumas espécies de microrganismos comumente utilizados como probióticos tem tido o seu uso questionado devido a possíveis riscos associados ao uso destes microrganismos, é o caso dos pertencentes ao gênero *Enterococcus*, devido aos estudos comprovando possível patogenicidade e transmissão cruzada de resistência a potentes antimicrobianos - como a vancomicina - a outros microrganismos (FRANZ *et al.*, 2011).

3.4 Probióticos

A Organização Mundial da Saúde - OMS, define probióticos como “organismos vivos” que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios a saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

Além dos benefícios em termos de nutrição e de saúde, que proporcionam ao organismo pela melhora do balanço microbiano (STEFÉ; ALVES; RIBEIRO, 2008), as culturas probióticas podem também contribuir para melhorar o sabor do produto (KARIMI; MORTAZAVIAN; CRUZ, 2011), por reduzir a acidez durante armazenagem pós-processamento - lipólise, proteólise, controle de microrganismos indesejáveis (THAMER; PENNA, 2005).

No Brasil, a Comissão Tecno-científica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, instituída junto à Câmara Técnica de Alimentos, tem avaliado os produtos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde aprovados no país (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008). A legislação brasileira afirma que a quantidade mínima de cultura de microrganismos viáveis deve ser entre 10^8 e 10^9 UFC por porção diária de produto e que a

população de probiótico deve ser indicada no rótulo (ANVISA, 2008).

Os probióticos aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhammnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum* (ANVISA, 2009).

Diferentes espécies e linhagens dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são utilizadas como probióticos. A principal razão para essa escolha é o fato de esses gêneros serem habitantes predominantes do intestino humano, sendo *Lactobacillus* do intestino delgado e *Bifidobacterium* do intestino grosso. *Lactobacillus acidophilus* é o microrganismo probiótico mais utilizado em alimentos por ser mais resistente ao baixo pH (RIBEIRO; SIMÕES; JURKIEWICZ, 2009).

3.5 Propriedades probióticas de BAL isoladas de queijos artesanais

Os efeitos benéficos dos leites fermentados tiveram embasamento científico no começo do século XX, segundo relatos do russo Eli Metchnikoff, que propôs uma teoria sobre o prolongamento da vida baseado no consumo diário de leites fermentados pelos povos dos Bálcãs. Esse pesquisador acreditava que a atividade metabólica das bactérias ácido lácticas inibiria as bactérias intestinais patogênicas e, concomitantemente, diminuiria a putrefação dos alimentos (THAMER; PENNA, 2005; SHAH, 2007).

Diversos benefícios são associados aos produtos que contêm organismos probióticos, dentre eles: atividade antimicrobiana, redução de infecções gastrointestinais, melhoria no metabolismo da lactose, redução da concentração sérica de colesterol, estimulação do sistema imunológico (SHAH, 2007), aumento da biodisponibilidade de nutrientes como ferro, cálcio, ácido fólico, vitamina B12, dentre outros (GRANATO; BRANCO; CRUZ, 2010).

Efeitos benéficos causados pelas BAL foram observados durante o tratamento de infecções intestinais, incluindo a estabilização da barreira da mucosa intestinal, prevenção e melhora da diarreia e constipação (FAVRETTO; PONTIN; MOREIRA, 2013). Além disso, evidências indicam que esses microrganismos podem ser ingeridos por pessoas saudáveis como forma de prevenir doenças e modular a imunidade (FAO/WHO, 2006).

Em relação a outros produtos contendo probióticos, como leites fermentados, os queijos apresentam vantagens por possuírem pH mais elevado, o que torna o meio mais estável para a sobrevivência das culturas probióticas por um período mais longo (MARCATTI *et al.*, 2009). Além disso, os queijos apresentam adequada atividade de água e matriz sólida, que oferecem proteção para a bactéria probiótica durante a passagem pelo trato gastrointestinal (HUNGRIA; LONGO, 2009; VINDEROLA *et al.*, 2009).

A adição de culturas probióticas foi testada em diversos tipos de queijos, como: *Petit Suisse* (MARUYAMA *et al.*, 2006), *cream chesse* (BURITI; CARDARELLI; SAAD, 2008; ALVES

et al., 2008), *cheddar* (ONG; SHAH, 2009), *cottage* (PARODIA, 2012) e *gouda* (BURITI; SAAD, 2007) e revelaram ser apropriadas alcançando as propriedades probióticas no produto final.

As BAL produzem enzimas que transformam os nutrientes fundamentais do leite e do queijo em compostos com propriedades desejáveis tais como: ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e bacteriocinas. Esses microrganismos atuam como bioconservadores mostrando-se uma alternativa na conservação de produtos alimentícios (KARIMI; MORTAZAVIAN; CRUZ, 2011; RESENDE *et al.*, 2011).

Outra importante característica das BAL é sua ação antagonista contra microrganismos indesejáveis em alimentos. Guedes Neto *et al.* (2005), verificaram inibição de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos de coalho artesanal e industrial contra *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli*, enquanto Chioda *et al.* (2006), observaram a inibição de amostras de *Listeria monocytogenes* por amostras de *Lactobacillus acidophilus* isolados de queijos Minas frescal. Chioda *et al.* (2007), indicaram que *L. acidophilus* foi capaz de inibir o crescimento *Escherichia coli* isolada de queijos Minas frescal.

Ainda nesse contexto, Costa (2010) detectou atividade antagonista de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos artesanais da Serra da Canastra em Minas Gerais, contra *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Costa *et al.* (2013), relataram 100% de inibição a *Bacillus cereus* por *Lactobacillus* spp. isolados de queijos Minas artesanal da Serra da Canastra. Por fim, Andrade *et al.* (2014), relataram amostras de *Lactobacillus* spp. isoladas de queijos Minas artesanais da Serra da Canastra que inibiram *in vitro* *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Estes autores tiveram o intuito de examinar atividade inibitória entre bactérias do próprio ambiente onde foram isoladas.

3.6 Proteômica

Foi por volta dos anos 80 que técnicas mais brandas de ionização, como MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption/ionization - time of flight*) e ESI (*electrospray ionization*), permitiram a análise de moléculas de peso molecular elevado a exemplo de proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos sem a decomposição desses analitos (KARAS, 1985; TANAKA, 1988; FENN, 2002). Com isso, a espectrometria de massas tornou-se uma ferramenta extremamente utilizada dentro da biologia em estudos de proteômica, caracterização de biomoléculas, entre outras. A Espectrometria de Massa começou a ser aplicada na microbiologia e trabalhos foram realizados na tentativa de obter espectros de massa de bactérias e assim classificar e identificar microrganismos (HETTICK *et al.*, 2004; RUPF *et al.*, 2005).

A espectrometria de massas é uma técnica utilizada no estudo das massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas. De uma forma geral, a espectrometria de massas baseia-se em propriedades físicas do analito de forma a determinar a relação entre a massa e a carga (m/z) de espécies ionizadas em fase gasosa. Uma vez que a espectrometria de massas mede a relação entre massa e carga, um espectrômetro de massas engloba uma fonte

de ionização para a obtenção de íons, um analisador de massas, o qual separa os íons formados, um detector desses íons e um sistema de aquisição dos dados. Em geral, as fontes de ionização mais comumente empregadas são ESI (Electrospray Ionization) e MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*) e os analisadores são os quadrupolos, íon-traps, time of flight (TOF), Fourier-transform ion cyclotron resonance (FT-ICR), orbitrap, entre outros. Para identificação e classificação de microrganismos, mais se tem utilizado são espectrômetros do tipo MALDI-TOF (AEBERSOLD *et al.*, 2003; GLISH, *et al.*, 2003).

A tradução que mais esclarece a sigla MALDI seria processo de ionização por dessorção a laser assistida por matriz, ou seja, a matriz é um ácido orgânico a qual fornece um próton para o processo de ionização da amostra. Ao mesmo tempo, tem a capacidade de absorver a energia emitida por um laser (light amplification stimulated energy radiation) e desencadear um processo de dessorção, o que possibilita a passagem da amostra em estado sólido para o estado gasoso. Já a sigla TOF (Time of Flight) caracteriza o tempo de voo da amostra ionizada em um tubo de vácuo até que esta atinja o detector. Uma vez ionizada e dessorvida, a amostra é acelerada por um campo elétrico dentro de um tubo de vácuo, separada em função da sua massa molecular e sua carga e assim, tem-se a medida da relação massa/carga (TANAKA *et al.*, 1988).

A utilização de MALDI-TOF é considerada revolucionária na identificação de microrganismos e uma das vantagens é a possibilidade de se utilizar células intactas de microrganismos que podem ser retiradas diretamente das colônias crescidas em placas de cultivo. A utilização de células intactas para espectrometria de massa (também designada ICM-MS, intact cell MALDI-TOF) produz um espectro de proteínas típicas de cada espécie, o que funciona como uma impressão digital (“fingerprinting”), que pode ser comparado aos espectros previamente identificados e depositados em banco de dados. O tempo de análise da amostra após o crescimento em placa é de cerca de 30 segundos enquanto que em outras metodologias esse tempo pode ser de horas e até dias (CLAYDON *et al.*, 1996; WALKER *et al.*, 2002; VARGHA *et al.*, 2006).

3.7 REFERÊNCIAS

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**. v. 42., p. 198-207, 2003.

ALMEIDA A.C. *et al.* Caracterização da produção de queijo artesanal na região de Montes Claros, norte de Minas Gerais. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.4, p.312-320, 2012.

ALVES, L.L. *et al.* Avaliação sensorial de cream cheeses potencialmente simbióticos utilizando a metodologia de superfície de resposta. **Alimentos e Nutrição Araraquara** v.19, n.4, p. 409-416, 2008.

ANDRADE *et al.* Propriedades probióticas *in vitro* de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra - MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.5, p.1592-1600, 2014.

Agência Brasileira de vigilância sanitária (**ANVISA**). Alimentos com alegações de saúde. Novos alimentos/ingredientes, compostos bioativos e probióticos. 2008.

ANVISA. IX Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. In: Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. **ANVISA**, 2009.

ANVISA. Agência Brasileira de vigilância sanitária (**ANVISA**). Guia para comprovação de segurança de alimentos e ingredientes, 2013.

BARRONS, R., PHARMD, B.C.P.S., PHARMD, D. Use of *Lactobacillus* Probiotics for Bacterial Genitourinary Infections in Women: A Review **Clinical Therapeutics**, v.30, n.3, 2008.

BRANDALIZE, C.C. **Potencial probiótico de *Enterococcus faecium* isolados de queijo**. 2013. 70f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão.

BRASIL. DECRETO Nº 44.864, DE 1º DE AGOSTO DE 2008. Altera o Regulamento da Lei n. 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, MG, 1º de ago. 2008.

BURITI, F.C.A; CARDARELLI, H.R; SAAD, S.M.I. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* inulina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.1, p.75-84, 2008.

BURITI, F.C.A; SAAD, S.M.I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos. **Arquivo Latino Americano de Nutrição**, v.57 n. 4, 2007.

CARRIJO, K.F. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química de ricotas frescas comercializadas no município de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. **Veterinária Notícias**, Uberlândia, v.17. n.2, p. 97-110, 2011.

CHIODA, T.P. *et al.* Inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal elaborado com cultura de *Lactobacillus acidophilus*. **Revista Portuguesa Ciências Veterinárias**, v.101, n.557-558, p.121-124, 2006.

CHIODA, T.P. *et al.* Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de Queijo "Minas Frescal" por *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência Rural**, v.37, n.2, 2007.

CLAYDON, M. A.; DAVEY, S. N.; EDWARDS-JONES, V.; GORDON, D. B. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 1584-1586, 1996.

COSTA, D.S.M.; RUAS, K.F.; PEREIRA, A.M. As potencialidades da região semiárida do norte de Minas Gerais: Análise do Centro de Estudos de Convivência com o Semiárido. In: **Encontro Nacional de Geógrafos**, 16., 2010, Porto Alegre. Anais... Porto Alegre: [S.n.], 2010.

COSTA, H.H.S. **Potencial probiótico de *Lactobacillus spp.* e *Weissella 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, H.H.S. *et al.* Potencial probiótico *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.6, p.1858-1866, 2013.

DORES, M.T; FERREIRA, C.L.L.F. Queijo minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**, v.2, n.2., p.26-34, 2012.

DUARTE, M.C.K.H. *et al.* Ação antagonista de *Lactobacillus acidophilus* frente a estirpes patogênicas inoculadas em leite fermentado. **Journal of Bioenergy Food Science**, v.3, n.1, p.1-10, 2016.

FAVRETTO, D.C; PONTIN, B; MOREIRA, T.R. Effect of the consumption of a cheese enriched with probiotic organisms (*bifidobacterium lactis* bi-07) in improving symptoms of constipation. **Arquivos Gastroenterologia**, v.50, n.3, p.196-201, 2013.

FENN, J. B. Electrospray ionization mass spectrometry: How it all began. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 13., p. 101–118, 2002.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (**FAO/WHO**). Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. Rome: FAO/WHO, 2002. 33p.

FOULQUIE-MORENO, M.R. *et al.* The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, 1-24, 2006.

FRANZ, C.M.A.P. *et al.* Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v.151, p.125-140, 2011.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, p.163- 171, 2002.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2., p. 140-150, 2003.

GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; CRUZ, A.G. Probiotic dairy products as functional foods. **Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 455-470, 2010.

GUEDES NETO, L.G *et al.* Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 2, p. 245-250, 2005.

HARBUTT, J. **O livro do queijo**. São Paulo: Globo, 2010, 352p.

HARDIE, J.M.; WHILEY, R.A. Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus. **Society for Applied Bacteriology Symposium**. Series, v.26, p.1-11, 1997.

HETTICK, J. M. *et al.* Proteomic profiling of intact mycobacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 76., p. 5769–5776, 2004.

HUNGRIA, T.D; LONGO, P.L. Viabilidade de *Lactobacillus casei* em alimento probiótico infantil relacionada a vida-de-prateleira. **Revista Saúde**, v.3, n.3, p.10-15, 2009.

IMA. Instituto Mineiro de Agropecuária. Legislação queijo Minas artesanal. **IMA**, 2016.

IPHAN. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. Queijo artesanal de Minas vira patrimônio cultural. **IPHAN**. 2008.

KARAS, M.; BACHMANN, D.; HILLENKAMP, F. Influence of the wavelength in high-radiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. **Analytical Chemistry**, v. 57., p. 2935-2939, 1985.

KARIMI, R; MORTAZAVIAN, A.M; CRUZ, A.G. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: a review. **Dairy Science and Technology**, v.91, n.3, p.283-308, 2011.

KOMATSU, T.R; BURITI, F.C.A; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.44, n.3, p.30, 2008.

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

MARCATTI, B. *et al.* Minastype fresh cheese developed from buffalo milk with addition of *L. acidophilus*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.66, n.4, p.48-485, 2009.

MARQUES, K.A. *et al.* Características físico-químicas e sensoriais de queijo minas padrão probiótico. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.66, n. 378, p.17-25, 2011.

MARUYAMA, L. Y. *et al.* Textura instrumental de queijo petit-suisse potencialmente probiótico: influência de diferentes combinações de gomas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.386-393, 2006.

MINAS GERAIS. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. **Lei 20.549 de 18 dez. 2012. IMA**. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2012.

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

OLIVEIRA, M. N., SIVIERI, K., ALEGRO, J.H.A., SAAD.,S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002

OLIVEIRA, D.F. *et al.* Caracterização físico-química de queijos minas artesanais produzidos em diferentes microrregiões de Minas Gerais. *Oikos*: **Revista Brasileira de Economia Doméstica**, Viçosa, v. 24, n.2, p. 185-196, 2013.

ONG, L.; SHAH, N.P. Probiotic cheddar cheese: influence of ripening temperature on survival of probiotics microorganisms, cheese composition and organic acid profiles. **Food Science and Technology**, v.74, n.5, p-82-91, 2009.

PARODIA, C.G. **Desenvolvimento de queijo cottage simbiótico**. 2010 120f. (dissertação de mestrado em ciência e tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

PINTO, M. S. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do Queijo Minas Artesanal do Serro**. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

PINTO, M. S. *et al.* Queijo Minas Artesanal da região do Serro: Avaliação de *Staphylococcus Aureus* e suas enteroxinas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 336, 2004.

PINTO, M.S. *et al.* Segurança alimentar do queijo Minas artesanal do Serro, Minas Gerais, em função da adoção de boas práticas de fabricação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 39, n. 4, p. 342-347, 2009.

PIRES, M.C.S. **Memória e arte do queijo do Serro: o saber sobre a mesa**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

REIG, A. L. C.; ANESTO, J. B. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. **Revista Cubana de Alimentación e Nutrição**, v.16, n.1, p.63-68, 2002.

RESENDE, M.S. *et al.* Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido-lácticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1567-1573, 2011.

RIBEIRO, E. P.; SIMÕES, L. G.; JURKIEWICZ, C. H. Desenvolvimento de queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.1, p.19-23, 2009.

RUPF, S.; BREITUNG, K.; SCHELLENBERGER, W.; MERTE, K.; KNEIST, S.; ESCHRICH, K. Differentiation of mutans streptococci by intact cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20., p. 267–273, 2005.

SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v.17, p.1262–1277, 2007.

SHARPE. M. E. **The genus Lactobacillus, in The Procaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria.** Berlin: Springer-Verlag, 1981.

SILVA J.G. *et al.* Características físico-químicas do queijo minas artesanal da canastra. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.66, n. 380, p.16-22, 2011.

STEFE, C.A; ALVES, M.A.R; RIBEIRO, R.L. Probióticos, prebióticos e simbióticos. **Saúde e Ambiente em Revista**, v.3, n.1, p.16-33, 2008.

STRINGHETA, P.C *et al.* Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 43, n. 2, p.181-194, 2007.

TAMIME, A.Y. Probiotic dairy products. Oxford: **Blackwell Publishing Ltd.**, p.216, 2005.

TANAKA, K. *et al.* Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.2. p.151-153, 1988.

THAMER, K.G; PENNA, A.L.B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, 2005.

Vargha M. *et al.* Optimization of MALDI-TOF MS for strain level differentiation of *Arthrobacter* isolates. **Journal Microbiology Methods**, v.66, p.399-409, 2006

VIANA, F.R. **Caracterização microbiológica e físico-química do “requeijão do norte” artesanal.** Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos Belo Horizonte, MG, 2009.

VIDAL, A.M. *et al.* A ingestão de alimentos funcionais e sua contribuição para a diminuição da incidência de doenças. Cadernos de Graduação - **Ciências Biológicas e da Saúde**, v.1, n.15, p.43-52, 2012.

VINDEROLA, G. *et al.* Growth of *Lactobacillus paracasei* A13 in Argentinin a probiotic cheese and its impact on the characteristics of the product. **International Journal of Food Microbiology**. v.135, n.2, p.171–174, 2009.

Walker J. *et al.* Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: media effects and inter-laboratory reproducibility. **Journal Microbiology Methods**, v.48, n.10, p.117-126, 2002.

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

4 ARTIGO

Propriedades probióticas *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas Gerais

Este artigo foi elaborado conforme normas da Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

Propriedades probióticas *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas Gerais

RESUMO: Bactérias ácido lácticas estão naturalmente presentes nos queijos artesanais, contribuindo para o desenvolvimento de sabor e aroma, e com potencial em inibir o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, através da competição por nutrientes ou produção de substâncias antagonistas. Avaliou-se o potencial probiótico *in vitro* de bactérias lácticas isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas Gerais. As amostras de bactérias lácticas isoladas foram identificadas por proteômica, caracterizadas *in vitro* quanto à susceptibilidade a antimicrobianos, sensibilidade a pH gástrico e sais biliares e antagonismo contra microrganismos indicadores. Os microrganismos isolados foram identificados como *Lactobacillus paracasei* e *Enterococcus faecium*. As amostras *Enterococcus faecium* (C6) e *Enterococcus faecium* (G3) foram sensíveis a maioria dos antimicrobianos testados, enquanto a amostra *Lactobacillus paracasei* (E5) apresentou resistência a ceftazidima e oxacilina e *Lactobacillus paracasei* (M3) a oxacilina e penicilina. Três das 14 amostras bacterianas apresentaram atividade antagonista contra as bactérias patogênicas testadas. Todas as amostras foram resistentes aos sais biliares. As amostras *Lactobacillus paracasei* (L2) e *Lactobacillus paracasei* (M3) apresentaram o melhor potencial probiótico de acordo com os testes *in vitro* realizados. Os queijos artesanais do norte de Minas Gerais podem veicular microrganismos com potencial probiótico podendo auxiliar na segurança alimentar dos consumidores.

Palavras-chave: queijo artesanal, *Lactobacillus*, antagonismo, antibiograma, sais biliares, suco gástrico

ABSTRACT

Lactic acid bacteria are naturally present in artisanal cheeses, contributing to the development of flavor and aroma, and with potential to inhibit the growth of deteriorating and pathogenic microorganisms, through competition for nutrients or production of antagonistic substances. The probiotic potential was evaluated *in vitro* Lactic bacteria isolated from these cheeses. Samples of lactic bacteria isolated were identified by proteomics, characterized *in vitro* in susceptibility to antimicrobials, sensitivity to gastric pH and bile salts and antagonism against indicator microorganisms. The isolated microorganisms were identified as *Lactobacillus paracasei* and *Enterococcus faecium*. The samples *Enterococcus faecium* (C6) and *Enterococcus faecium* (G3) were sensitive to most of the antimicrobials tested, while the *Lactobacillus paracasei* (E5) sample showed resistance to ceftazidime and oxacillin and *Lactobacillus paracasei* (M3) to oxacillin and penicillin. Three of the 14 bacterial samples showed antagonistic activity against the pathogenic bacteria tested. All samples were resistant to bile salts. The samples *Lactobacillus paracasei* (L2) and *Lactobacillus paracasei* (M3) presented the best probiotic

potential according to the in vitro tests performed. Artisanal cheeses from the north of Minas Gerais can carry microorganisms with probiotic potential and can help in the food safety of consumers.

Key words: artisanal cheese, *Lactobacillus*, antagonism, antibiogram, bile salts, gastric juice

INTRODUÇÃO

O Estado de Minas Gerais é reconhecido nacionalmente pela tradição na produção de queijos artesanais, elaborado principalmente em pequenas propriedades e representando não somente importância econômica, mas também sócio-cultural (Lima *et al.*, 2009).

Os queijos artesanais apresentam variabilidade na microbiota, por serem produzidos a partir do leite cru e podem veicular tanto microrganismos patogênicos e deteriorantes, acarretando risco à saúde do consumidor, quanto bactérias ácido lácticas que podem apresentar propriedades probióticas (Viana, 2009).

As bactérias lácticas são microrganismos desejáveis, pois contribuem para a formação das propriedades sensoriais do produto, devido à produção de metabólitos que atuam nos componentes do queijo, além de contribuírem na conservação e segurança higiênico-sanitária do produto final pela produção de substâncias inibitórias ao crescimento de microrganismos indesejáveis e pela competição por nutrientes (Oliveira *et al.*, 2012). Os microrganismos probióticos devem ser consumidos com frequência regular e serem viáveis no sítio de ação ao organismo, possibilitando manifestação de efeitos benéficos (Costa *et al.*, 2013).

Dessa forma pesquisas vêm sendo desenvolvidas para ampliar o conhecimento microbiológico sobre bactérias ácido lácticas e seu potencial probiótico, com relevância para melhoria da qualidade dos queijos artesanais e preservação da microbiota a fim de garantir inocuidade alimentar e qualidade ao produto (Costa *et al.*, 2013).

A produção de queijos artesanais, em geral, é desprovida de mecanização, seguindo padrões históricos de elaboração e, geralmente, sem controle de qualidade durante o processo, podendo implicar em variações físico-químicas desses produtos (Borelli *et al.*, 2006; Brant *et al.*, 2007).

Os queijos artesanais do norte de Minas Gerais faz parte da alimentação diária de diversos consumidores, isolar e identificar microrganismos com potencial probiótico de produto artesanal da região é de grande importância para a saúde da população.

Nesta pesquisa, avaliou-se o potencial probiótico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos artesanais do norte de Minas Gerais, a fim de possibilitar futuros avanços na utilização desses microrganismos.

MATERIAL E METODOS

Amostragem

A coleta dos queijos artesanais foi realizada no período de janeiro a fevereiro de 2016. Foram adquiridos 15 queijos artesanais, com 15 dias de maturação, direto dos produtores rurais situados em diferentes municípios do Norte de Minas Gerais (Bocaiuva, Mirabela, Janaúba, Guaraciama, Mucambo, Brasília de Minas, Pirapora, Francisco Sá, Juramento, Januária, São Pedro, Nova Esperança, Glauclândia e São Francisco). Após a coleta, os queijos sob refrigeração (4° a 10°) foram encaminhados para o laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, para realização das análises microbiológicas.

Análises microbiológicas

Isolamento de bactérias lácticas e *Staphylococcus* spp.

O processamento e posterior diluição das amostras foram realizados de acordo com a metodologia empregada por IDF (1987): 25g de cada amostra foram homogeneizadas em 225mL de solução salina peptonada 0,1 % esterilizada. Em seguida foram realizadas diluições seriadas 10^{-1} - 10^{-5} e semeados 100µl na superfície de placas de Petri contendo os meios de cultura ágar MRS de *Man, Rogosa e Sharpe* (*Difco*, Detroit, Michigan, Estados Unidos) para bactérias lácticas e ágar Sal Manitol para *Staphylococcus* spp. As placas foram incubadas a 37°C, por 24 a 48 horas, em aerobiose.

Caracterização morfo-tintorial e bioquímico das bactérias

As colônias de bactérias com morfotipos diferentes, crescidas em ágar MRS e ágar Sal Manitol foram retiradas e depositadas em tubos contendo caldo MRS (*Difco*, Detroit, Michigan, Estados Unidos) para bactérias lácticas e caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) para bactérias de diferentes morfotipos e incubadas a 37° por 24h. Após foram realizadas análises morfo-tintorial destas bactérias pelo método de Gram e a partir dessas mesmas colônias foram feitos teste de catalase. As bactérias crescidas em Sal Manitol foram submetidas aos testes bioquímicos, coagulase e DNase. Posteriormente, uma alíquota de 800 µL de cada tubo foi transferida para tubo Eppendorf e adicionada de glicerol esterilizado (200 µL); sendo, em seguida, congelada a -18°C para posterior utilização (Silva *et al.*, 2010).

Identificação de bactérias lácticas por proteômica

Preparação da amostra para MALDI-TOF MS (*Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight - mass spectroscopy*)

As bactérias lácticas foram identificadas pela análise proteômica, seguindo o protocolo de extração padrão adaptado de Freiwad e Sauer (2009). Aproximadamente uma alçada de cultura bacteriana foi ressuspensa em 1,2 mL de solução de etanol 75%. A amostra foi centrifugada e após a centrifugação o sobrenadante foi removido. Ao *pellet* formado, foram adicionados 50 microlitros de acetronitrila, ácido fórmico e água (50:35:15 v/v) e seguido da agitação em vortex durante 1 min para extração de células. Foi realizada uma segunda centrifugação e logo após 0,3µl de sobrenadante foram depositados em uma placa com três poços, que foi secada em temperatura ambiente. A amostra foi então coberta com uma solução de 0,3µl de solução saturada de alpha-ciano-4-ácido-hidroxicianídrico, acetronitrila, água e TFA (50:47:5:2,5 v/v) e enviada para a análise em MALDI-TOF MS

Análise por MALDI-TOF MS

A análise por MALDI-TOF MS foi realizada segundo Dusková *et al.* (2012), utilizando o aparelho Microflex TM MALDI-TOF MS, da Bruker Daltonics. A identificação dos resultados foi expressa por BioTyper log (scores), indicando a similaridade da cepa desconhecida com o perfil disponível em bancos de dados do MALDI-TOF MS.

Seleção de bactérias lácticas pelo teste de antagonismo com *Staphylococcus aureus*

As bactérias lácticas isoladas dos queijos foram selecionadas quanto ao efeito antagonico contra a bactéria patogênica *S. aureus* ATCC 25923 padrão para realização posterior de seu potencial probiótico *in vitro*. O inóculo dessa bactéria foi preparado com a suspensão direta de colônias crescidas em placas contendo ágar Muller Hinton a 37° em 48h. A suspensão dessas bactérias foi ajustada com o padrão de 0,5 da escala de McFarland, que correspondeu a aproximadamente a 10⁸ UFC/mL (Chaves *et al.*, 1999).

Em placas contendo Ágar Muller Hinton, a solução do inóculo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 padronizado foi distribuída, com o auxílio de *swabs* estéreis em discos de papel filtro com diâmetro de 6 mm embebidos com o inóculo de 10⁸UFC/mL das bactérias ácido lácticas isoladas, crescidas em caldo MRS (*Difco*, Detroit, Michigan, Estados Unidos) e adicionados à superfície do meio de cultura. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e após esse período, os halos de inibição foram medidos com auxílio de paquímetro digital (Super Tool MK-DC-6 Makro Atacadista S/A, China), conforme descrito por Tagg e Mc Given (1971). Após testes de normalidade e homogeneidade, os dados foram comparados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis a 5% significância, utilizando-se o software SAEG - Sistema para Análises Estatísticas, Versão 9.1.

Antagonismo de bactérias lácticas contra bactérias reveladoras

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

realização do teste de antagonismo, as amostras de bactérias lácticas previamente selecionadas foram denominadas culturas produtoras, isto é, as que foram testadas quanto à capacidade antagonista contra outros microrganismos, denominados de culturas reveladoras. Como cultura reveladora, utilizou uma bactéria patogênica de referência *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e dez amostras isoladas dos mesmos queijos artesanais do Norte de Minas Gerais, com intuito de examinar atividade inibitória entre bactérias do próprio ambiente onde foram isoladas.

As amostras de bactérias lácticas 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 microrganismos e restar somente substâncias inibidoras, foi adicionado 1mL clorofórmio às tampas das placas de Petri invertidas e aguardou-se 30 minutos sob luz UV com tampa fechada e depois 30 minutos com tampa aberta.

As amostras reveladoras passaram por duas ativações, sendo as bactérias patogênicas crescidas em caldo BHI (Difco) e as bactérias lácticas 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 (Super Tool MK-DC-6 Makro Atacadista S/A, China). 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 Scott-Knott para a comparação entre as médias dos resultados (Sampaio, 2002).

Sensibilidade de bactérias lácticas aos antimicrobianos

O antibiograma para bactéria lácticas foi realizado em duplicata, com três repetições, de acordo com a técnica adaptada de susceptibilidade a antimicrobianos por difusão da droga em discos (Charteris *et al.*, 1998). As amostras de microrganismos isolados e selecionados foram cultivadas em ágar MRS (Difco, Detroit, Estados Unidos), em aerobiose (37°C, por 48h). As colônias crescidas foram transferidas para tubos contendo 3,5mL de salina 0,85% (0,85% NaCl) até alcançarem 0,5 na escala McFarland (10^8 UFC/mL). Em seguida, utilizando-se *swabs*, os microrganismos foram inoculados sobre a superfície de placas de Petri (diâmetro de 14 cm) contendo ágar MRS (Difco, Detroit, Estados Unidos). Logo após, foram distribuídos dez discos contendo os antimicrobianos (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) sobre o ágar MRS em cada placa de Petri. Foram usados os seguintes antimicrobianos com suas correspondentes concentrações: ceftazidima (30µg), clindamicina (2µg), ciprofloxacina (5µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), oxacilina (1µg), penicilina (10U), estreptomicina (30µg), tetraciclina (30µg) e vancomicina (30µg). As placas foram novamente incubadas (37°C, 24h). O controle de

qualidade dos discos foi realizado com amostra de *Staphylococcus* ATCC 25923. Após a incubação, com auxílio do paquímetro digital Super Tool MK-DC-6 (Makro Atacadista S/A, China), foram feitas as leituras dos diâmetros dos halos de inibição. Os resultados foram submetidos a uma classificação qualitativa dos microrganismos como sensíveis, moderadamente sensíveis ou resistentes aos antimicrobianos testados (Charteris *et al.*, 1998).

Sensibilidade de *Staphylococcus aureus* ATCC, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus cereus* aos antimicrobianos

O antibiograma foi realizado em duplicata, com duas repetições, de acordo com o CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2012). As amostras de microrganismos isolados e selecionados foram cultivadas em ágar BHI (*Brain Heart infusion*), em aerobiose (37°C, 48h). Colônias crescidas foram transferidas para tubos contendo 3,5mL de salina 0,85% (0,85% NaCl) até alcançarem 0,5 na escala McFarland (10^8 UFC/mL). Em seguida, utilizando-se *swabs*, os microrganismos foram inoculados sobre a superfície de placas de Petri contendo ágar MH (Muller Hinton). Logo após, foram distribuídos os mesmos tipos de discos (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) contendo os antimicrobianos usados no teste com as bactérias láticas. As placas foram novamente incubadas (37°C, 24h). Com auxílio de um paquímetro digital Super Tool MK-DC-6 (Makro Atacadista S/A, China) foram feitas as leituras dos halos de inibição. As amostras de foram classificadas qualitativamente como resistente, moderadamente sensível e sensível às drogas antimicrobianas, de acordo com padrão proposto por CLSI (2012).

Sensibilidade a pH gástrico e aos sais biliares

Os testes de sensibilidade ao pH gástrico e aos sais biliares *in vitro* foram realizados em triplicata, com duas repetições, adaptando-se a técnica de Walker e Gilliland (1993). As amostras de bactérias láticas isoladas e selecionadas foram cultivadas duas vezes em caldo MRS (Difco, Detroit, Estados Unidos). Em seguida, a densidade óptica (OD) do inóculo a ser utilizado de cada cultura ativada foi determinada em espectrofotômetro Spectrophotometer, modelo UV 2000 (Molecular Devices, Califórnia, Estados Unidos), com comprimento de onda de 600nm.

O volume do inóculo de cada amostra foi adicionado a 1mL de salina 0,85% pH 2 e pH 7 e incubado a 37°C, por três horas. Após esse período, 10µL de cada um dos inóculos em pH 2 e pH 7 foram transferidos para tubos tipo Eppendorf, obtendo-se, para cada amostra, dois tubos. A seguir, foi preparada a microplaca de ELISA de fundo chato, com 96 poços. Nos poços, foram colocados 200µL - retirados do tubo Eppendorf com inóculo - em solução salina pH 2 (pH gástrico) e 200µL em solução salina pH 7 (controle). Então, foram realizadas leituras na OD 620nm, com intervalo de 30 minutos, durante 12h de incubação a 37°C, no espectrofotômetro Microplate Spectrophotometer, modelo SpectraMax 340 (Molecular Devices).

O pH gástrico foi obtido por meio da adição de ácido clorídrico (HCl) 1M e mensuração simultânea do pH em pHmetro digital de bancada (mPA-210, Piracicaba, São Paulo, Brasil) até que fosse atingido o pH 2,0. O percentual de inibição do crescimento foi calculado nos tempos de seis e 12 horas pela fórmula: $(1 - A_{pH2} / A_{pH7}) \times 100$, sendo A_{pH2} : absorvância do inóculo em solução salina pH 2 (gástrico); A_{pH7} : absorvância do inóculo em solução pH 7 (controle), de acordo com Mota *et al.* (2006). A diferença para o teste de sensibilidade aos sais biliares é que não houve incubação prévia por três horas, sendo as amostras colocadas em microplaca de ELISA com 96 poços em presença de caldo MRS (Difco, Detroit, Estados Unidos) puro (controle) e caldo MRS (Difco, Detroit, Estados Unidos) com 0,3% de oxgall (Difco, Detroit, Estados Unidos). Os inóculos foram padronizados à semelhança do que foi feito para o teste anterior. O percentual de inibição do crescimento foi calculado utilizando o programa Origin 8.5 pela fórmula: $(1 - ASB/AC) \times 100$, sendo ASB: absorvância da amostra com sais biliares; AC: absorvância da amostra controle (Acurcio *et al.*, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento e caracterização de bactérias lácticas

Verificou-se o crescimento de bactérias lácticas para todas as amostras de queijos avaliados do Norte de Minas Gerais. Foram obtidas 61 amostras de bactérias lácticas. Destas, foram selecionadas 14 para análises posteriores por apresentarem halos de inibição contra *S. aureus* ATCC 25923 - A5 (Bocaiuva), B1 (Mirabela), C6 (Janaúba), D1 (Guaraciama), E5 (Mucambo), F5 (Brasília de Minas), G1 (Pirapora), G3 (Francisco Sá), H1 (Juramento), I3 (Januária), J2 (São Pedro), K1 (Nova Esperança), L2 (Glaucilândia), e M3 (São Francisco).

Os queijos de diferentes cidades apresentaram bactérias com potencial de inibição de *Staphylococcus aureus*, o que representa um achado importante em virtude da preocupação com esse microrganismo e os riscos que este representa para a saúde.

Identificação de bactérias lácticas por proteômica

A identificação por MALDI TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight - mass spectroscopy*) das bactérias lácticas selecionadas revelou a presença de duas espécies (Tab. 1).

Tabela 1. Espécies de bactérias lácticas isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas identificadas por MALDI TOF

Amostra	Espécie	Valor (escore)*
A5	<i>Enterococcus faecium</i>	2.346
B1	<i>Enterococcus faecium</i>	2.218
C6	<i>Enterococcus faecium</i>	2.407
D1	<i>Enterococcus faecium</i>	2.246
E5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2.379
F5	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2.215
G1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2.331
G3	<i>Enterococcus faecium</i>	2.264
H1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2.433
I3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2.416
J2	<i>Enterococcus faecium</i>	2.305
K1	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2.274
L2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2.343
M3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2.486

Fonte: da autora

* Escore > 1,7 é indicativo de identificação de gênero e escore > 2,0 é o limiar definitivo para identificação da espécie.

Oito das 14 amostras de bactérias ácido lácticas foram identificadas como *Lactobacillus paracasei* e seis como *Enterococcus faecium*.

Essas quatorze amostras foram selecionadas e enviadas para identificação por terem apresentado halos de inibição frente a um microrganismo patogênico *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, comumente encontrado em produtos alimentícios, como no caso os queijos artesanais que são muito manuseados.

O *Staphylococcus aureus* por ser uma bactéria presente nos alimentos de origem animal e está muito relacionada a surtos de intoxicação alimentar, devido à capacidade de produzir toxinas, acarreta riscos a saúde humana.

Identificação de bactérias reveladoras (para efeito antagônico) por proteômica

A identificação por MALDI TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight - mass spectroscopy*) das bactérias selecionadas (Tab. 2).

Tabela 2. Espécies de bactérias com efeito antagônico isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas identificadas por MALDI TOF

Amostra	Espécie	Valor (escore)*
BS1	<i>Enterococcus faecium</i>	2.483
BS2	<i>Enterococcus faecium</i>	2.423
BS3	<i>Enterococcus faecium</i>	2.441
BS4	<i>Enterococcus faecium</i>	2.442
BS5	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.321
BS6	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.299
BS7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.372
BS8	<i>Bacillus cereus</i>	2.058
BS9	<i>Enterococcus faecium</i>	2.359
BS10	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.39

Fonte : Da autora

* Escore > 1,7 é indicativo de identificação de gênero e escore > 2,0 é o limiar definitivo para identificação da espécie.

O MALDI TOF é um método produtivo e eficiente na identificação de microrganismos; é uma ferramenta de diagnóstico rápido e confiável.

Características de *Enterococcus*

Enterococcus são bactérias Gram-positivas, de catalase negativa sem formação de esporos, anaeróbias facultativas, geralmente dispõem-se aos pares e em curtas cadeias. Pertencem a um grupo de organismos conhecidos como bactérias ácido lácticas têm capacidade de sobreviver em grandes níveis de stress e ambientes hostis, como temperaturas entre os 5-65°C, valores de pH entre 4.6-9 e também altas concentrações de sais 6,5%NaCl (Fisher e Phillips, 2009).

Enterococcus faecium é normalmente encontrado em produtos veiculando probióticos; esse microrganismo tem sido questionado por apresentar genes de resistência a antimicrobianos.

Enterococcus faecalis encontrada normalmente no intestino dos seres humanos e está relacionado a quadro de infecções, especialmente em ambientes hospitalares.

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella pneumoniae é uma espécie de bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa em forma de bastonete. É um microrganismo causador de infecções (pneumonia).

Bacillus cereus

Bacillus cereus é uma bactéria da família *Bacillaceae* que se destaca por ter formato de bastão, ser gram-positiva, aeróbica facultativa, formadora de esporos esféricos e responsável pela produção de uma grande quantidade de toxinas.

A presença desses patógenos entéricos nos queijos pode indicar condições inadequadas de manipulação e armazenamento, caracterizando dessa forma um risco potencial para saúde pública.

Antagonismo

Das 14 amostras de bactérias lácticas, três apresentaram halos de inibição para as bactérias reveladoras (Tab. 3).

Estas três bactérias lácticas foram as únicas capazes de inibir a bactéria patogênica isolada do próprio queijo *L. paracasei* (K1) inibiu o *Enterococcus faecalis* BS6, *L. paracasei* (L2) inibiu o *Enterococcus faecalis* BS7 e o *L. paracasei* (M3) inibiu o *Bacillus cereus* BS8.

Esta inibição é muito importante, pois elimina os microrganismos patogênicos e deteriorantes e permite o desenvolvimento das bactérias lácticas nos queijos. A presença dessas BAL nos queijos contribuirá para saúde do consumidor.

.

Tabela 3. Médias dos halos de inibição (mm), de duas repetições em triplicata, do teste de antagonismo *in vitro* de amostras de bactérias lácticas, isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas Gerais, contra bactérias reveladoras

Amostras BAL	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (BS11)	<i>Enterococcus faecium</i> (BS3)	<i>Enterococcus faecium</i> (BS1)	<i>Enterococcus faecalis</i> (BS6)	<i>Enterococcus faecium</i> (BS9)	<i>Enterococcus faecalis</i> (BS10)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (BS7)	<i>Enterococcus faecalis</i> (BS5)	<i>Bacillus cereus</i> (BS8)	<i>Enterococcus faecium</i> (BS2)	<i>Enterococcus faecium</i> (BS4)
<i>Lactobacillus paracasei</i> (K1)	33.72 Ab	27.22 Ba	26.18 Ba	21.67 Ca	21.22 Ca	20.00 Cb	19.87 Cb	19.65 Ca	19.63 Ca	0.00 Da	0.00 Da
<i>Lactobacillus paracasei</i> (L2)	36.05 Aa	25.05 Bb	23.62 Cb	21.50 Db	20.87 Db	20.53 Da	20.37 Da	18.48 Ec	0.00 Fb	0.00 Fa	0.00 Fa
<i>Lactobacillus paracasei</i> (M3)	33.75 Ab	23.07 Bc	21.33 Cc	20.20 Dc	19.92 Dc	19.87 Dc	19.87 Db	19.03 Eb	0.00 Fb	0.00 Fa	0.00 Fa

Médias seguidas por letras distintas, maiúscula na linha e minúscula na coluna, diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%.

O antagonismo é efetuado pela competição por nutrientes, sítio de adesão e pela produção de substâncias antimicrobianas; esses microrganismos probióticos produzem estas substâncias antimicrobianas tais como bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, ácidos orgânicos, acetaldeído e diacetil a fim de competir, inibir ou mesmo excluir microrganismos patogênicos e deteriorantes (Costa, 2010).

As médias dos halos de inibição das amostras de *Lactobacillus paracasei* isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas Gerais foram mais expressivas contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e para *Enterococcus faecium* BS2, esses mostraram-se mais sensíveis.

As bacteriocinas sintetizadas por *Enterococcus* são chamadas de enterocinas. Algumas dessas enterocinas demonstraram atividade inibitória de microrganismos deteriorantes e patogênicos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium* spp e *Bacillus* spp. em estudo feito por Ferreira (2005).

As inibições de *L. paracasei* (K1) foram superiores à inibição *L. paracasei* (L2) e *L. paracasei* (M3). A *L. paracasei* K1 foi a única capaz de inibir a bactéria reveladora (BS6), sendo que esses microrganismos foram isolados do mesmo queijo. Guedes Neto *et al.*, (2005); Costa, (2010); Andrade *et al.* (2014), também avaliaram inibição contra as bactérias reveladoras dos próprios queijos analisados e apresentaram resultados semelhantes ao desse estudo.

Esta atividade antagonista dos *Lactobacillus paracasei* K1, L2 e M3 pode ser explicada pela produção do ácido láctico, bacteriocinas, H_2O_2 , pois estes microrganismos são produtores dessas substâncias; sendo que a inibição de microrganismos patogênicos e deteriorantes é importante pois contribui para sobrevivência das bactérias ácido lácticas em queijos (Guedes Neto *et al.*, 2005).

Carvalho (2007) estudou a atividade de enterocinas sintetizadas por *Enterococcus* não patogênicos provenientes da matéria-prima e produto final no processamento de queijo de coalho, contra *Listeria monocytogenes*. Quando comparado a enterocinas de outras BAL, foi observada maior atividade anti-*Listeria* das enterocinas provenientes de *Enterococcus*. Os resultados deste estudo diferem dos resultados apresentados por Carvalho (2007), sendo que nenhuma das amostras de *Enterococcus faecium* apresentou halos de inibição para as bactérias reveladoras.

A produção de enterocinas por *Enterococcus* não é uma característica relacionada a todas as culturas do gênero, sendo específica a alguns isolados. Andrade (2009), estudou a inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* por *Enterococcus faecium* isolados de queijo Serra da Canastra, não obtendo a inibição deste microrganismo por nenhuma das 56 culturas isoladas.

Resultado semelhante ao obtido nesse estudo que as amostras de *Enterococcus* não apresentaram halos de inibição.

Sensibilidade de bactérias lácticas aos antimicrobianos

Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de bactérias lácticas isoladas de queijos artesanais do norte de Minas Gerais estão expostos na Tabela 4. No geral, as amostras testadas apresentaram maior sensibilidade do que resistência aos antimicrobianos testados.

Todas as amostras de bactérias lácticas isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas Gerais analisadas neste trabalho foram sensíveis à ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, tetraciclina e vancomicina. Apenas o *E. faecium* (B1), *L. paracasei* (G1) e *E. faecium* (k1) foram moderadamente sensíveis a estreptomicina, os demais foram sensíveis a este antimicrobiano (Tab. 4).

Tabela 4. Médias dos halos de inibição (mm) da sensibilidade a antimicrobianos, de duas repetições em duplicata, de amostras de bactérias ácido lácticas, isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas Gerais

Amostras	Antimicrobianos									
	CAZ	CIP	DA	E	GN	OX	P	S	T	VA
<i>Enterococcus faecium</i> (A5)	R	S	R	S	S	R	MS	S	S	S
<i>Enterococcus faecium</i> (B1)	R	S	R	S	S	R	MS	MS	S	S
<i>Enterococcus faecium</i> (C6)	MS	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Enterococcus faecium</i> (D1)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Lactobacillus paracasei</i> (E5)	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
<i>Lactobacillus paracasei</i> (F5)	R	S	S	S	S	MS	S	S	S	S
<i>Lactobacillus paracasei</i> (G1)	R	S	S	S	S	R	MS	MS	S	S
<i>Enterococcus faecium</i> (G3)	MS	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>Lactobacillus paracasei</i> (H1)	R	S	MS	S	S	R	S	S	S	S
<i>Lactobacillus paracasei</i> (I3)	R	S	MS	S	S	R	S	S	S	S
<i>Enterococcus faecium</i> (J2)	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S
<i>Lactobacillus paracasei</i> (K1)	S	S	R	S	S	R	R	MS	S	S
<i>Lactobacillus paracasei</i> (L2)	R	S	R	S	S	R	MS	S	S	S
<i>Lactobacillus paracasei</i> (M3)	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S

Legenda: CAZ (ceftazidima - 30µg), DA (clindamicina - 2µg), CIP (ciprofloxacina - 5µg), E (eritromicina - 15µg), GN (gentamicina 10µg), OX (oxacilina - 1µg), PEN (penicilina - 10U), S (estreptomicina - 30µg), TE (tetraciclina - 30µg), VA (vancomicina - 30µg). R = resistente; MS = moderadamente sensível; S = sensível. Adaptado de Charteris *et al.* (1998).

As amostras *E. faecium* (C6) *E. faecium* (D1) e *E. faecium* (G3) foram sensíveis a oxacilina, enquanto a amostra *L. paracasei* (F5) não foi sensível, apresentando-se moderadamente sensível a oxacilina, e todas as outras amostras foram resistentes a este antimicrobiano. Esta

elevada porcentagem de resistência a este antimicrobiano pode ser explicada por ser muito utilizada nos animais para controle de infecção, como por exemplo a mastite (Rosa *et al.*, 2015).

Em outros trabalhos, que avaliaram a susceptibilidade a oxacilina, autores relataram valores semelhantes aos obtidos neste estudo (Coppola *et al.*, 2005; Rodríguez-Alonso *et al.*, 2009, Costa *et al.*, 2013). Para o antimicrobiano ceftazidima, este estudo obteve apenas duas amostras sensíveis e as demais se mostraram resistentes a este antimicrobiano (83,33%). Dados semelhantes aos obtidos neste estudo foram encontrados em estudos realizados por Costa *et al.* (2013), com bactérias lácticas isoladas de queijos Minas artesanal da Serra da Canastra, MG.

Em concordância com resultados deste trabalho, Charteris *et al.* (1998), relataram 100% das amostras de bactérias lácticas sensíveis à tetraciclina e 97,82% sensíveis à eritromicina. Temmerman *et al.* (2002), observaram resistência de amostras de bactérias lácticas à penicilina. Zhou (2005) demonstrou que bactérias ácido lácticas foram sensíveis aos antimicrobianos eritromicina e tetraciclina, em concordância a este trabalho. Belletti *et al.* (2009), encontraram resultados próximos ao presente trabalho, alta porcentagem de bactérias lácticas resistentes a oxacilina e sensíveis à eritromicina e tetraciclina.

Cueto-Vigil *et al.* (2010), em Cundinamarca na Colômbia, avaliando a susceptibilidade de bactérias lácticas isoladas de queijos a antimicrobianos, observaram que a maioria das bactérias lácticas eram sensíveis à clindamicina, eritromicina, penicilina e tetraciclina, resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho.

Diversos trabalhos têm relatado bactérias lácticas resistentes a vancomicina (Acurcio, 2011; Costa *et al.*, 2013; Andrade *et al.*, 2014) como sendo uma característica comum a esse gênero, achado esses que difere deste estudo, como pode ser observado na tabela 4. Todas as bactérias foram sensíveis a este antimicrobiano, podendo ser um achado novo para as bactérias desta região.

Esses microrganismos serem sensíveis aos antimicrobianos é um resultado satisfatório, podendo representar bactérias com efeitos probióticos, pois não carregariam genes de resistência a outros microrganismos.

Sensibilidade de *Enterococcus faecium* (5), *Enterococcus faecalis* (3), *Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus cereus* aos antimicrobianos

Os resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras BS1 (Bocaiuva), BS2 (Janaúba), BS3 (Brasília de Minas), BS4 (Francisco Sá), BS5 (Juramento),

BS6 (Nova Esperança), BS7 (Glaucilandia), BS8 (São Francisco), BS9 (Januária), BS10 (Mirabela) isolados de queijos artesanais do norte de Minas Gerais estão expostos na Tabela 5.

Todas as amostras testadas neste trabalho foram sensíveis a ciprofloxacina. As amostras *Staphylococcus* spp. BS7, BS8 e BS9 foram resistentes a eritromicina e a vancomicina (Tab. 5).

Tabela 5. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de amostras de *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Bacillus cereus* isolados de queijos artesanais do Norte de Minas e *S.aureus* ATCC 25923

Amostras	Antimicrobianos								
	CAZ	CIP	DA	E	GN	OX	P	T	VA
<i>Enterococcus faecium</i> BS1	R	S	R	S	R	R	R	R	S
<i>Enterococcus faecium</i> BS2	R	S	R	S	S	R	R	I	S
<i>Enterococcus faecium</i> BS3	I	S	R	S	S	R	R	R	S
<i>Enterococcus faecium</i> BS4	R	S	S	S	S	R	R	S	S
<i>Enterococcus faecalis</i> BS5	S	S	I	S	S	R	R	S	S
<i>Enterococcus faecalis</i> BS6	S	S	S	S	S	S	R	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i> BS7	R	S	R	R	R	R	R	I	R
<i>Bacillus cereus</i> BS8	R	S	R	R	R	R	R	R	R
<i>Enterococcus faecium</i> BS9	R	S	R	R	R	R	R	R	R
<i>Enterococcus faecalis</i> BS10	R	S	R	S	R	R	R	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Legenda: CAZ (ceftazidima - 30µg), DA (clindamicina - 2µg), CIP (ciprofloxacina - 5µg), E (eritromicina µ 15µg), GN (gentamicina 10µg), OX (oxacilina - 1µg), PEN (penicilina - 10U), TE (tetraciclina - 30µg), VA (vancomicina - 30µg). R = resistente; I = intermediário; S = sensível; segundo CLSI, 2012

As amostras testadas apresentaram alto percentual de resistência para penicilina, ceftazidima e oxacilina. Resultados semelhantes a este estudo foram encontrados por Rosa *et al.* (2015), ao analisarem a susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de queijos artesanais.

O *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 apresentou-se sensível a todos os antimicrobianos testados.

Em similaridade a este estudo, André *et al.* (2008), ao avaliarem a susceptibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* isolados de leite de vaca e queijo Minas frescal, encontraram alta resistência a penicilina a oxacilina, além de observarem resistência intermediária a eritromicina e tetraciclina.

O amplo uso de penicilinas na medicina veterinária pode ser justificado através da associação do uso intensivo destas na criação animal, especialmente de gado leiteiro, para controle de

mastite pode favorecer o desenvolvimento de resistência e explicar a prevalência das amostras resistentes a este princípio ativo (Zafalon *et al.*, 2008).

Bactérias resistentes a antibióticos preocupam, uma vez que, no trato gastrointestinal do homem, elas podem transferir genes de resistência antimicrobiana a outras bactérias da própria espécie ou de espécies não relacionadas, patogênicas ou não (Guimarães *et al.*, 2012). Um dos principais problemas da resistência a antibióticos adquirida por *Enterococcus* está relacionado à capacidade de transferência desta resistência a microrganismos conhecidamente patogênicos, como *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Esta capacidade de transferência e aquisição de resistência facilita a seleção destes microrganismos nos produtos, podendo acarretar na maior incidência de patogenias relacionadas aos mesmos (Franz e Holzapfel, 2006).

Sensibilidade a pH 2.0

Os resultados da absorvância máxima alcançada pelas bactérias lácticas cultivadas em caldo MRS (Difco) incubadas 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 6.

Tabela 6. Absorvância máxima alcançada, em duas repetições em triplicata, por amostras de bactérias lácticas isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas Gerais, após três horas de incubação a 37°C em pH 7,0 (controle) e pH 2,0 (ácido gástrico)

Amostras	Absorvância máxima	
	pH 2,0	pH 7,0
<i>Enterococcus faecium</i> (A5)	0,116	0,725
<i>Enterococcus faecium</i> (B1)	0,212	0,706
<i>Enterococcus faecium</i> (C6)	0,122	0,872
<i>Enterococcus faecium</i> (D1)	0,224	0,909
<i>Lactobacillus paracasei</i> (E5)	0,119	0,919
<i>Lactobacillus paracasei</i> (F5)	0,129	0,907
<i>Lactobacillus paracasei</i> (G1)	0,469	0,716
<i>Enterococcus faecium</i> (G3)	0,142	0,697
<i>Lactobacillus paracasei</i> (H1)	0,148	0,779
<i>Lactobacillus paracasei</i> (I3)	0,119	0,774
<i>Enterococcus faecium</i> (J2)	0,500	0,889
<i>Lactobacillus paracasei</i> (K1)	0,135	0,898
<i>Lactobacillus paracasei</i> (L2)	0,393	0,788
<i>Lactobacillus paracasei</i> (M3)	0,188	0,959

Fonte: Da autora

Segundo Gilliland Stanley e Bush (1984), para uma bactéria láctica ser resistente ao ácido gástrico em valores entre 1,5 a 4,0, esta precisa alcançar uma absorvância de 0,3 após incubação por duas horas.

Um dos mecanismos de seleção para culturas probióticas é este ser resistente ao baixo pH, resistir as condições ácidas no estômago para chegar ao intestino delgado (Costa *et al.*, 2013). A fim de conferir os efeitos desejados ao consumidor.

As curvas de crescimento das amostras de *Lactobacillus paracasei* (G1) e *L. paracasei* (L2), isolados de queijos artesanais do norte de Minas Gerais, na presença de ácidos, simulando ambiente gástrico, considerando as duas repetições, estão ilustradas nos Anexos 3 e 4.

Tabela 7. Percentual de inibição por ácido gástrico (pH 2,0), de duas repetições em triplicata, sobre amostras de bactérias lácticas isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas, 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>Enterococcus faecium</i> (A5)	84
<i>Enterococcus faecium</i> (B1)	72
<i>Enterococcus faecium</i> (C6)	86
<i>Enterococcus faecium</i> (D1)	77
<i>Lactobacillus paracasei</i> (E5)	87
<i>Lactobacillus paracasei</i> (F5)	86
<i>Lactobacillus paracasei</i> (G1)	29
<i>Enterococcus faecium</i> (G3)	80
<i>Lactobacillus paracasei</i> (H1)	85
<i>Lactobacillus paracasei</i> (I3)	85
<i>Enterococcus faecium</i> (J2)	28
<i>Lactobacillus paracasei</i> (K1)	86
<i>Lactobacillus paracasei</i> (L2)	31
<i>Lactobacillusparacasei</i> (M3)	82

Fonte: Da autora

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

Os resultados mostram que as amostras de bactérias lácticas que suportaram o ácido gástrico de pH 2,0 foram *L. paracasei* (G1), *E. faecium* (J2) e *L. paracasei* (L2).

Segundo Resende *et al.* (2011) e Costa *et al.* (2013), era esperado que esses microrganismos fossem adaptados às condições de estresse gerado por uma alta acidez, a fim de permanecerem viáveis; no entanto, observou-se um alto percentual de inibição das bactérias lácticas isoladas de queijos artesanais do norte de Minas Gerais ao pH 2,0, pode ser explicado por serem isoladas de ambiente com pH que varia de 5,0 a 6,0.

Em estudos realizados por Andrade *et al.* (2014), em queijos Minas artesanais da Serra da Canastra relataram todas as amostras bacterianas avaliadas foram resistentes ao pH 2,0; Tambekar e Bhutada (2010) observaram bactérias lácticas isoladas de leite de vacas tolerantes ao ácido gástrico com pH 2,0. Costa *et al.* (2013), verificaram tolerância ao pH 2,0 por todas as amostras de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos artesanais da Serra da Canastra.

Sensibilidade aos sais biliares

Os resultados da absorvância alcançada pelas bactérias lácticas podem ser observados na Tabela 8.

Tabela 8. Absorbância máxima alcançada, em duas repetições em triplicata, por amostras de bactérias lácticas isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas Gerais, cultivadas em caldo MRS (Difco) após 12h de incubação a 37°C, na presença de 0,3% de sais biliares

Amostra	Absorbância máxima	
	Sais biliares a 0,3%	Controle
<i>Enterococcus faecium</i> (A5)	0,516	0,712
<i>Enterococcus faecium</i> (B1)	0,435	0,674
<i>Enterococcus faecium</i> (C6)	0,537	0,915
<i>Enterococcus faecium</i> (D1)	0,554	0,855
<i>Lactobacillus paracasei</i> (E5)	0,532	0,919
<i>Lactobacillus paracasei</i> (F5)	0,480	0,883
<i>Lactobacillus paracasei</i> (G1)	0,575	0,654
<i>Enterococcus faecium</i> (G3)	0,586	0,678
<i>Lactobacillus paracasei</i> (H1)	0,510	0,828
<i>Lactobacillus paracasei</i> (I3)	0,635	0,829
<i>Enterococcus faecium</i> (J2)	0,651	0,856
<i>Lactobacillus paracasei</i> (K1)	0,465	0,774
<i>Lactobacillus paracasei</i> (L2)	0,503	0,661
<i>Lactobacillus paracasei</i> (M3)	0,430	0,712

Fonte: Da autora

Os sais biliares possuem ação detergente capaz de eliminar bactérias patogênicas. As bactérias probióticas, tais como as BAL, precisam ser resistentes a esses sais a fim de conferirem efeitos esperados aos seus consumidores (Ballus *et al.*, 2010).

Considerando-se somente a absorbância máxima alcançada, todas as amostras de bactérias lácticas isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas Gerais (Tab. 8) foram tolerantes aos sais biliares com 0,3% de *Oxgall* (BD), pois apresentaram absorbância maior que 0,3.

As curvas de crescimento das amostras de *Lactobacillus paracasei* (G1) e *L. paracasei* (L2), isolados de queijos artesanais do norte de Minas Gerais, na presença de sais biliares, considerando as duas repetições, estão ilustradas nos Anexos 5 e 6.

Os resultados do percentual da tolerância das bactérias lácticas aos sais biliares podem ser vistos na Tabela 9.

Tabela 9. Percentual de inibição por sais biliares (Oxgall, BD, 0,3%), de duas repetições em triplicata, sobre amostras de bactérias láticas, isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas Gerais, em 12h de incubação a 37°C

Amostra	Percentual de inibição (%)
<i>Enterococcus faecium</i> (A5)	28
<i>Enterococcus faecium</i> (B1)	35
<i>Enterococcus faecium</i> (C6)	40
<i>Enterococcus faecium</i> (D1)	36
<i>Lactobacillus paracasei</i> (E5)	43
<i>Lactobacillus paracasei</i> (F5)	46
<i>Lactobacillus paracasei</i> (G1)	13
<i>Enterococcus faecium</i> (G3)	14
<i>Lactobacillus paracasei</i> (H1)	47
<i>Lactobacillus paracasei</i> (I3)	39
<i>Enterococcus faecium</i> (J2)	24
<i>Lactobacillus paracasei</i> (K1)	25
<i>Lactobacillus paracasei</i> (L2)	24
<i>Lactobacillus paracasei</i> (M3)	40

Fonte: Da autora

Segundo Acurcio (2011), Silva *et al.* (2013) e Andrade *et al.* (2014), 64% das amostras estudadas poderiam ser consideradas resistentes; sendo que esses pesquisadores basearam seus resultados num limite máximo de <40% de inibição.

De acordo com a Tabela 9, a maioria das amostras de bactérias láticas isoladas de queijos artesanais do Norte de Minas Gerais avaliadas foram tolerantes por apresentarem menos de 40% de inibição ao Oxgall (BD) 0,3%. As amostras *E. faecium* (C6), *L. paracasei* (E5), *L. paracasei* (F5), *L. paracasei* (H1) e *L. paracasei* (M3) atingiram a absorvância 0,3 mas ficaram acima do limite de 40% de inibição.

Resultados similares da sensibilidade *in vitro* aos sais biliares de bactérias ácido láticas também foram encontrados por outros autores. Meira *et al.* (2010), avaliaram bactérias ácido láticas isoladas de leite e queijo de ovelha, estas BAL apresentaram tolerância aos sais biliares a 0,3%. Shruthy *et al.* (2011), verificaram tolerância aos sais biliares (0,3%) da maioria dos

Lactobacillus spp. isolados de coalhada de leite de vacas em Vellore no sul da Índia. Andrade *et al.* (2014), verificaram que todas suas amostras de *Lactobacillus* isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra foram tolerantes por apresentarem menos de 40% de inibição ao Oxgall (BD) 0,3%.

CONCLUSÃO

Queijos artesanais do Norte de Minas Gerais podem veicular microrganismos com potencial probiótico para os consumidores. O antagonismo de bactérias ácido lácticas contra *Staphylococcus* spp. e a sensibilidade *in vitro* a pH gástrico foram menos seletivos quando comparados à susceptibilidade a antimicrobianos e à sensibilidade *in vitro* a sais biliares, o que possibilitou uma seleção mais rigorosa das amostras por estes dois testes. As amostras *L. paracasei* (L2) e *L. paracasei* (M3) que apresentaram melhores resultados para as análises realizadas, seriam candidatas à elaboração de novas culturas lácteas para elaboração de produtos lácteos fermentados funcionais, podendo auxiliar na segurança alimentar e na preservação da microbiota original de queijos artesanais do Norte de Minas Gerais.

REFERENCIAS

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

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

ANDRADE, C.R.G.; SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M. et al. Propriedades probióticas *in vitro* de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra - MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.5, p.1592-1600, 2014.

ANDRE, M.C.D.P.B.; CAMPOS, M.R.H.; BORGES, L.J. et al. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiograma and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion. **Food Control**, v.19, n.2, p.200-207, 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.; GATTI, M.; BOTTARI, B. et al. Antibiotic Resistance of *Lactobacilli* isolated from two Italian hard cheeses. **Journal of Food Protection**, v.72, p.2162-2169, 2009.

BORELLI, B.M.; FERREIRA, E.G.; LACERDA, I.C.A et al. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.22, p.1115-1119, 2006.

BRANT, L.M.F.; FONSECA, L.M.; SILVA, M.C.C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p.1570-1574, 2007.

CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da Microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 2007. 154p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.; MORELLI, L. et al. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **Journal Food Protection**, v. 61, n. 12, p. 1636-1643, 1998.

CHAVES, A. H.; SILVA, J.F.C.; PINHEIRO, A.J.R et al. Isolamento de *Lactobacillus acidophilus* a partir de fezes de bezerros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, p. 1086-92, 1999.

Clinical and Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: fifteenth informational supplement. Wayne: Clinical and Laboratory Standards; 2012 (CLSI document M100-S21).

COSTA, H.H.S.; SOUZA, M.R.; ACURCIO, L.B et al. Potencial probiótico *in vitro* de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, p.1858-1866, 2013.

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.

COPPOLA, R.; SUCCI, M.; TREMONTE, P.; REALE, A. et al. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. **Lait**, v.85, p.193-204, 2005.

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

DUSKOVÁ, M.; SEDO, O.; KSICOVÁ, et al. Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. **International Journal of Food Microbiology**, v.159, p.107-114, 2012.

FERREIRA, A. E. **Estudo de bacteriocinas produzidas por espécies de *Enterococcus***. 2005.126 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2005.

FISCHER K; PHILLIPS C. The ecology, epidemiology and virulence of enterococcus. **Microbiology**, v.155, n.6, p.1749-57, 2009

FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W.H. Enterococci. In: MOTARJEMI, Y.; ADAMS, M. **Emerging foodborne pathogens**. New York: CRC Press. 2006. p. 557 - 613.

FREIWALD, A.; SAUER, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. **Nature Protocols**, v.4, p.732-742, 2009.

GILLILAND, S.E. (Ed). **Bacterial Starter Cultures for Food**. EUA: CRC, 1985. 175p

GILLILAND, S.E.; STANLEY, T.E.; BUSH, L.J. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. **Journal Dairy Science**, v. 67, n. 12, p. 30453051, 1984.

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

GUIMARÃES, A.G.; CARDOSO, R.C.V.; AZEVÊDO, P.F. et al. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos coalho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n.2, p.259-265, 2012.

IDF. Bovine mastitis: Definition and guidelines for diagnosis. IDF Bulletin 211/1987. Brussels, Belgium: **International Dairy Federation**, 1987

LIMA, C.D.L.C.; LIMA, L.A.; CERQUEIRA, M.M.O.P et al. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.1, p.266-272, 2009.

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. Journal of Food Technology**, n.12, p.75-80, 2010.

MOTA, R.M.; MOREIRA, J.L.S.; SOUZA, M.R. et al. Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines. **BMC Biotechnology**, v.6, 2, 2006.

OLIVEIRA, L. M.; ANJOS, L.M.J.; SOUZA, P.R.R. et al. Avaliação da qualidade de queijos ralados para proteção à saúde pública. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 384, v. 67, p. 41-47, 2012.

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

RODRIGUEZ-ALONSO, P.; FERNANDEZ-OTERO, C.; CENTENO, J.A. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria and micrococcaceae/Staphylococcaceae isolates from artisanal raw milk cheeses and potential implications on cheese making. **Journal of Food Science**, v.74, p.284-293, 2009.

ROSA, D.L.S.O.; ACURCIO, L.B.; SANT'ANNA, F.M. et al. Genes toxigenicos, antibiograma e antagonismo de *Staphylococcus* spp. **Vigilância Sanitária em Debate**. V.3, n.1, p.37-42, 2015.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. 265p.

SHRUTHY, V.V. PAVITHRA, M.; GOWRI, S. et al. Probiotic potentials among lactic acid bacteria isolated from curd. **International Journal of Research Ayurveda and Pharmacy**, v.2, p.602-609, 2011

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. et al. **Manual de métodos de análise Microbiológica de Alimentos e água**. 4. Ed. 2010

SILVA, B.C.; JUNG, L.R.; SANDES, S.H. et al. *In vitro* assessment of functional properties of lactic acid bacteria isolated from faecal microbiota of healthy dogs for potential use as probiotics. **Beneficial Microbes**, v.4, p.267-275, 2013.

TAGG, J.R.; GIVEN, A.R. Assay system for bacteriocins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 21, p.943, 1971.

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

TAMBEKAR, D.H.; BHUTADA, S.A. Acid and bile tolerance, antibacteria lactivity, antibiotic resistance and bacteriocins activity of probiotic *Lactobacillus* species. **Recent Research in Science in Technology**, v. 2, n.4, p. 94-98, 2010.

TEMMERMAN, R.; POT, B.; HUYS, G. et al. Identification and antibiotics usceptibility of bacterial isolates from probiotic products. **International Journal of Food Microbiology**, v.81, p.1-10, 2002.

VIANA, F.R. **Caracterização microbiológica e físico-química do “queijão do norte” artesanal**. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos Belo Horizonte, MG, 2009.

WALKER, D.K.; GILLILAND, S.E. Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.956-961, 1993.

ZAFALON, L.F.; ARCARO, J.R.P.; NADER FILHO, A. et al. Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. **Revista do Instuto Adolfo Lutz**, v.67,n.2, p.118-125, 2008.

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

4.1 Artigo 2 - Perfil físico-químico de queijos artesanais do norte de Minas Gerais

Este artigo foi elaborado conforme normas da Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes

Perfil físico-químico de queijos artesanais do norte de Minas Gerais

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade físico-química de queijos artesanais do norte de Minas Gerais. Foram analisados 15 amostras de queijos de diferentes cidades do norte de Minas; as análises de pH, acidez titulável, umidade, teor de proteínas, gordura e GES foram realizadas pelos métodos oficiais de acordo com a legislação vigente. Os resultados mostraram que houve diferenças quanto ao percentual de proteínas, umidade e lipídios, em função de não ter uma padronização na elaboração desses produtos. Os queijos se classificaram como magros e semigordos e quanto aos percentuais de umidade como de média, alta e de muita alta umidade. Os resultados demonstram a falta de padronização na elaboração dos queijos artesanais relacionados a forma de elaboração destes produtos e que cada família insere sua cultura e tradição na elaboração deste alimento; diversificando os queijos da região.

Palavras chave: queijo artesanal, composição, qualidade.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the physical-chemical quality of artisanal cheeses from northern Minas Gerais. We analyzed 15 tons of cheeses from different cities in the north of Minas Gerais; PH, titratable acidity, moisture, protein, fat and GES were determined by official methods in accordance with current legislation. The results showed that there were differences in the percentage of proteins, moisture and lipids, due to not having a standardization in the elaboration of these products. The cheeses were classified as lean and semi-delicious and as the percentages of humidity as medium, high and very high humidity. The results demonstrate the lack of standardization in the elaboration of the artisanal cheeses related to the way of elaboration of these products and that each family inserts its culture and tradition in the elaboration of this food; Diversifying the cheeses of the region.

Key words: artisanal cheese, composition, quality.

Introdução

O norte de Minas Gerais, caracterizado como região de seca em longo período do ano e chuvas escassas. É uma região que os produtores optam por vacas da raça girolanda, essa raça destaca-se por suas características de produtividade, rusticidade, precocidade, longevidade e fertilidade, além da alta capacidade de adaptação a diferentes tipos de manejo e clima.

As fêmeas Girolando, produtoras de leite por excelência, possuem características fisiológicas e morfológicas perfeitas para a produção nos trópicos, como a capacidade e suporte de úbere,

tamanho de tetas, fatores intrínsecos à lactação, pigmentação, capacidade termorreguladora, aprumos e pés fortes, conversão alimentar, eficiência reprodutiva, etc., atribuindo um desempenho muito satisfatório economicamente.

A elaboração de queijos artesanais é de grande importância social, cultural e econômica no estado de Minas Gerais. Confeccionados de maneira empírica nas pequenas propriedades rurais cada família insere sua cultura e tradição na elaboração deste alimento, diversificando os queijos da região; e esta atividade é responsável pela sustentabilidade de muitas dessas famílias de pequenos produtores (Lima *et al.*, 2009; Almeida *et al.*, 2012).

Os queijos artesanais são elaborados a partir do leite cru, resultando em rica composição nutricional e alta disponibilidade de nutrientes como proteínas de alto valor biológico, cálcio, lipídios, lactose e vitaminas lipossolúveis, sendo um alimento de grande importância nos hábitos de consumo da população (Oliveira *et al.*, 2012).

A produção de queijos artesanais, em geral, é desprovida de mecanização, seguindo padrões históricos de elaboração e, geralmente, sem controle de qualidade durante a elaboração, podendo implicar em variações na qualidade físico-química desses produtos (Borelli *et al.*, 2006; Brant *et al.*, 2007). Nesta pesquisa, avaliou-se qualidade físico-química de queijos artesanais produzidos no Norte de Minas Gerais.

Material e Métodos

A coleta dos queijos foi realizada no período de janeiro a fevereiro de 2016 em quinze propriedades rurais nas localidades de Bocaiúva, Mirabela, Janaúba, Guaraciama, Mucambo, Brasília de Minas, Pirapora, Francisco Sá, Juramento, Januária, São Pedro, Nova Esperança, Glaucilândia e São Francisco, propriedades tradicionais na produção de queijos artesanais.

Foram coletadas 15 queijos artesanais em quinze localidades diferentes, diretamente dos produtores em suas propriedades, com 15 dias de maturação, estes queijos eram maturados sob refrigeração. Após adquiridos, foram transportados sob refrigeração a 4 - 10°C em caixas isotérmicas até o laboratório de Tecnologia de Produtos Vegetais, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, em Montes Claros.

A fim de determinar a composição química e propriedades físico-químicas dos queijos, as amostras foram raladas até a obtenção de massa homogênea, armazenadas e identificadas individualmente em potes de polietileno de 250 gramas. Foram realizadas análises para determinações de pH e acidez titulável e teores percentuais de proteína, gordura, gordura no extrato seco e umidade. A determinação do pH foi realizada com auxílio de potenciômetro digital com eletrodo de vidro combinado (Analyser pH/Ion 450 M - São Paulo, Brasil) e a acidez titulável expressa em ácido láctico foi determinada por meio de titulação ácido-base. O

percentual de proteínas foi determinado pelo método Kjeldahl (fator de conversão 6,38) e o percentual de gorduras foi obtido pelo método butirométrico. A determinação de umidade foi realizada pela secagem até obtenção de peso constante. A quantidade de gordura no extrato seco foi determinada por meio da razão entre teor de gordura e o extrato seco total do queijo. Todas as análises foram realizadas em triplicata de acordo com Brasil (2006).

Os resultados de composição químicas e propriedades físico-químicas das amostras de queijos artesanais do Norte de Minas foram submetidas a análise estatística descritiva.

Resultados e discussão

As médias dos parâmetros físico-químicos encontrados nas análises de queijos artesanais do norte de Minas Gerais são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Composição química e propriedades físico-químicas de amostras de queijos artesanais produzidos em diferentes cidades do Norte de Minas Gerais

Amostras	Proteína %	Gordura%	GES %	Umidade%	Acidez	pH
MED.	18,59	22,45	46,69	51,23	0,42	5,25
D.P	±5,06	±1,94	±8,21	±5,06	±0,01	±0,25
C.V	0,129	0,086	0,175	0,098	0,045	0,049

Legenda: MED = média, D.P = desvio padrão, C.V = coeficiente de variação

Os teores de proteína dos queijos variaram entre 14,27 a 23,10% e os valores médios obtidos para os teores de gordura e umidade variaram entre 20,6 a 26,66% e 44,71 a 60,18%, respectivamente. O pH das amostras variou entre 4,99 a 5,88 e os valores de acidez entre 0,35 a 0,49%. Que pode ser observado na tabela 7 em anexo.

Apesar de serem da mesma região e localidades próximas, os queijos, apresentaram diferentes porcentagens de proteína resultado da elaboração artesanal, sem controle rígido das etapas do processo. Alguns fatores podem ter contribuído para diminuir o rendimento desses queijos como o tipo de salga, o tempo de maturação, a redução da temperatura para coagulação do leite, corte com pá de madeira, mexedura incompleta ou excessiva, dieta dos animais. Segundo Coelho *et al.* (2010), quantidade em excesso de coalho adicionada à massa, pode ocasionar maior proteólise, implicando na redução do teor de proteínas. Resende (2010), ao analisar queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra, verificou teores de proteínas entre 23,50% e 24,42%, sendo valores próximos aos obtidos neste estudo para 26,66% das amostras. Silva *et al.* (2011), reportaram média de proteínas em queijos Minas artesanais da Canastra de 23,9% em queijos Minas artesanais da Canastra. Segundo Pinto *et al.* (2004), existe grande variação no teor proteico de queijos tanto da mesma região produtora como da mesma propriedade, podendo ser observado neste estudo a variação no teor proteico de queijos do norte de Minas

Gerais. A falta de padronização existente entre os produtores da mesma região dificulta a representatividade do tipo de queijo por região.

Os queijos apresentaram percentuais de gordura na faixa de 20,6 a 26,66% sendo classificados como magros e semigordos. Essa variação nos percentuais de gordura dos queijos avaliados pode ser justificada devida a gordura no leite ser o componente mais variável, sendo influenciada por fatores - genéticos, ambientais, manejo, nutrição do animal, idade e raça (Nunes *et al.*, 2010). Os percentuais de lipídios observados nas amostras estudadas são próximos aos valores obtidos por Lempk (2013), que relatou teor de 26,34% em queijos artesanais produzidos na microrregião de Montes Claros. Contudo, Resende (2010) observou teores de lipídios entre 27,0% e 29,5% em queijos da Serra da Canastra, valores um pouco acima aos observados neste estudo. E um estudo feito por Pinto (2004) na região do Serro aponta queijos com o teor de gordura no extrato seco variando de 37,0 a 59,0% e o teor de proteína do queijo Canastra de 14,9 a 29,9. Essas diferenças observadas podem ser justificadas pelo diferente tipo de processamento utilizado, conforme a região de origem, e os hábitos populares característicos de cada uma delas. (Oliveira *et al.*, 2013).

As amostras analisadas apresentaram diferentes teores de umidade, podendo os queijos serem classificados como de média, alta e de muita alta umidade (Brasil, 1996). O teor de umidade influencia diretamente na qualidade e as variações desse parâmetro nestes queijos podem estar ligadas ao processo de produção, à quantidade e ao tipo de salga, à pressão exercida no momento da prensagem e o tempo de maturação. A umidade pode influenciar também na textura e sabor do produto, dificultando este controle por se tratar de elaboração artesanal.

Os valores de pH, na produção queijeira, são adotados com o objetivo de realizar o controle durante o armazenamento (Correia *et al.*, 2014). O pH das amostras analisadas variou entre 4,99 e 5,88; essa variação pode ocorrer devido ao tempo e temperatura de processamento dos queijos. Por isso, o controle do pH durante o processo de elaboração e, em especial, nos primeiros dias de maturação, é de grande importância para assegurar a qualidade do produto (Dias *et al.*, 2016). Valores de pH deste estudo apresentaram-se próximo aos observados para os queijos artesanais analisados na microrregião de Montes Claros que foi de 5,36 (Lempk, 2013). O leite usado na produção de queijos artesanais contribui diretamente nas características como o pH, teor de gorduras e cálcio do produto final (Pinto *et al.*, 2016).

A variação aleatória nos valores da acidez como observado em anexo na tab.7 deve-se, provavelmente, a falta de padronização na salga. O sal, além de conferir gosto característico ou realçar o sabor, complementa a dessagem e regula acidez do queijo, favorecendo a liberação de água livre na massa pela diferença de pressão osmótica e a dissolução de algumas

proteínas e seus produtos, os quais são substâncias tituláveis como ácidos. (Nhuch *et al.*, 2004)

Definido pela Lei Estadual como todo queijo confeccionado conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde for produzido, a partir do leite integral da vaca, fresco e cru, sem nenhum tratamento térmico, retirado e beneficiado na propriedade de origem, que apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corante e conservantes (Minas Gerais, 2012), os queijos Minas Artesanais devem ter apenas ingredientes culturas lácticas naturais como “pingo” (soro fermentado), coalho e sal.

De acordo com Queiroga *et al.* (2009), esta variação nos resultados físico-químicos podem estar relacionada a uma falta de uniformização e padronização dos métodos de elaboração destes produtos, já que são elaborados manualmente e estas famílias confeccionam os queijos de forma empírica preservando o sabor e a tradição da região.

Conclusão

Pode-se concluir que queijos artesanais do Norte de Minas Gerais encontram-se dentro dos padrões físico-químicos, estabelecidos pela legislação vigente, caracterizando assim os queijos desta região.

Não há estudos sobre queijos artesanais do norte de Minas Gerais, para comparação com os resultados deste estudo, portanto é necessários continuar estudando e difundindo sobre os queijos artesanais e outros produtos que esta região pode oferecer.

REFERENCIAS

ALMEIDA, A. C. et al. Caracterização da produção de queijo artesanal na região de Montes Claros, norte de Minas Gerais. **Acta Veterinaria Brasilica**, V.6, N.4, P.312-320, 2012.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, V.59, N.6, P.1570-1574, 2007.

BRASIL. Portaria n. 146, de 07 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 11 mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de origem Animal. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 14 de dez. 2006.

BORELLI, B.M. *et al.* Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.22, p.1115-1119, 2006.

COELHO, S. G. *et al.* Manipulação da composição do leite a partir de fatores nutricionais. **Caderno de Ciências Agrárias**, Montes Claros, v. 2, n. 2, 2010.

CORREIA, P. M. R. *et al.* Influence of different processing parameters in physical and sensorial properties of Serra da Estrela cheese. **Journal of Hygienic Engineering and Design**, v. 8, p. 135-140, 2014.

DIAS, B. F. *et al.* Qualidade microbiológica e físico-química de queijo minas frescal artesanal e industrial. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 3, p. 57-64, 2016.

LEMPK, M. W. **Caracterização físico-química, microbiológica e tecnológica do queijo artesanal da microrregião de Montes Claros - MG**. 2013. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, MG, 2013.

LIMA, C.D.L.C. *et al.* Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.1, p.266-272, 2009

MINAS GERAIS. ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Lei nº 20.549, de 18 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Diário do Executivo. Belo Horizonte, 19 dez. 2012. p. 1 col. 2. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br/consulte/legislacao>>. Acesso em: 12 jun. 2017.

NHUCH, E. *et al.* Caracterização dos Queijos Artesanais Produzidos em Viamão, no Estado do Rio Grande do Sul, Quanto à Evolução Físico-Química e Microbiológica. **Veterinária em foco**, v.2, n.1, p15-24, 2004.

OLIVEIRA, L. M. *et al.* Avaliação da qualidade de queijos ralados para proteção à saúde pública. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 384, v. 67, p. 41-47, 2012.

OLIVEIRA, D. F.; PORTO, M. A. C.; BRAVO, C. E. C.; TONIAL, I. B. Caracterização físico-química de queijos Minas artesanais produzidos em diferentes microrregiões de Minas Gerais. **Oikos: Revista Brasileira de Economia Doméstica**, v. 24, n. 2, p. 185-196, 2013.

PINTO, M. S. *et al.* Características físico-químicas e microbiológicas do queijo artesanal produzido na microrregião de Montes Claros - MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 1, p. 43-52, 2016

PINTO, M. S. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do Queijo Minas Artesanal do Serro**. 2004. 134 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

QUEIROGA, R. C. R. E. *et al.* Elaboração e caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de queijo "tipo Minas frescal" de leite de cabra condimentado. **Revista Ciência Agronômica**, v. 40, p. 363-372, 2009.

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. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

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

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As amostras de bactérias lácticas *L. paracasei* L2 e M3 apresentaram bom desempenho nos testes de seleção probiótica *in vitro*, sendo assim sugere-se que futuros experimentos possam investigar *in vivo* a ação desses microrganismos através da elaboração de queijos ou outro derivado lácteo com adição destas amostras. Quanto a pesquisa, o queijo artesanal pode ser considerado um alimento favorável para seleção de amostras com potencial probiótico podendo ser enquadrado como alimento funcional.

Os queijos artesanais do Norte de Minas Gerais se encontram dentro dos padrões físico-químicos estabelecidos pela legislação.

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 Nome (Concentração)	Nível de Susceptibilidade		
	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

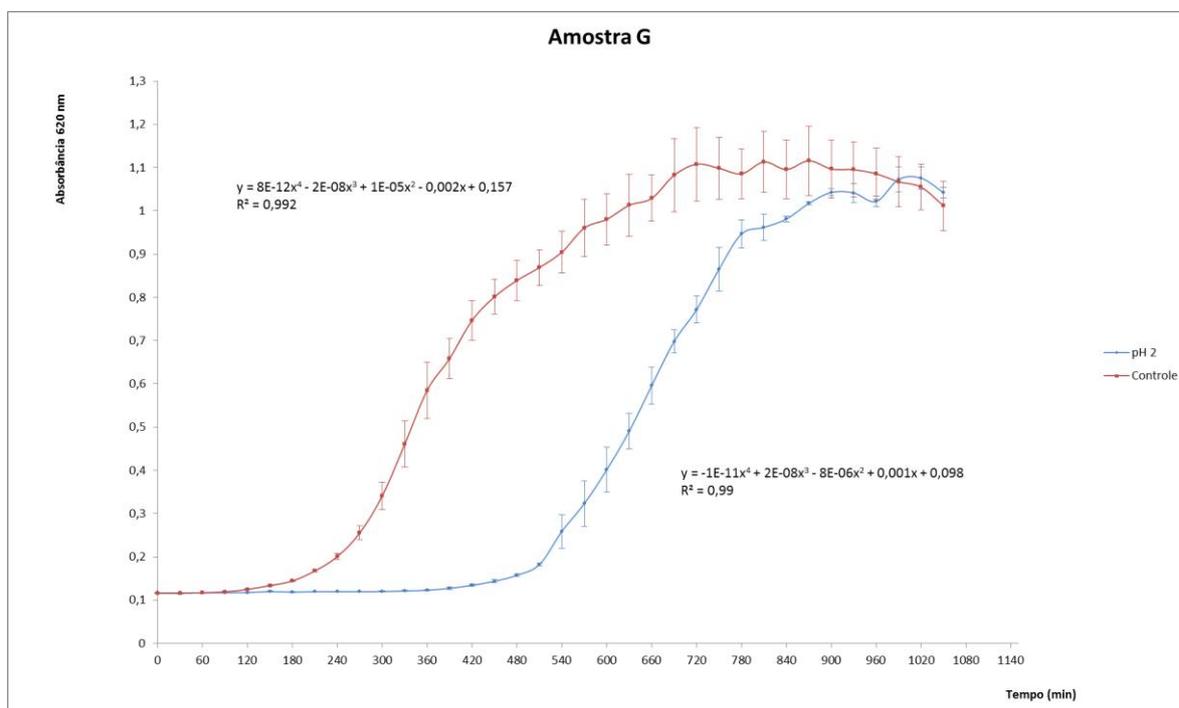
Fonte: Adaptado de Charteris *et al.* (1998).

Anexo 2. Níveis de susceptibilidade a antimicrobianos de *Staphylococcus* spp. de acordo com diâmetros dos halos de inibição (mm) em teste de difusão em ágar Muller Hinton (Difco)

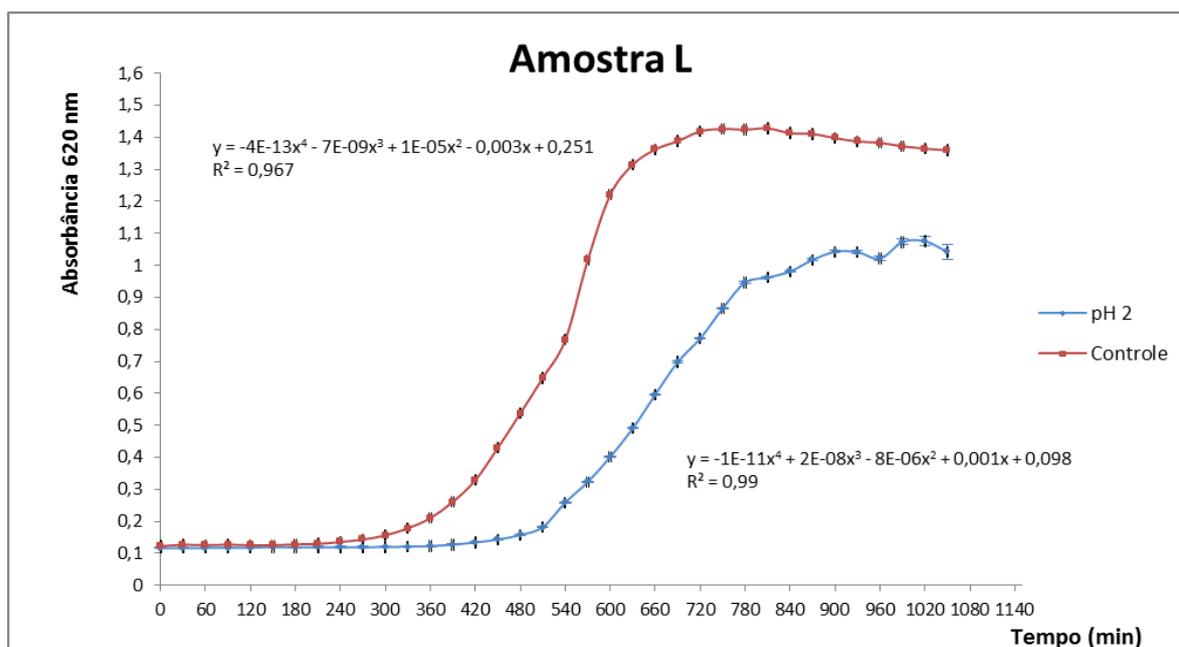
Antimicrobiano Nome (Concentração)	Nível de Susceptibilidade		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Ceftazidime (30 µg)	≤ 14	15-17	≥ 18
Clindamicina (2 µg)	≤ 14	15-20	≥ 21
Ciprofloxacina (5 µg)	≤ 15	16-20	≥ 21
Eritromicina (15 µg)	≤ 13	14-22	≥ 23
Gentamicina (10 µg)	≤ 12	13-14	≥ 15
Oxacilina (1 µg)	≤ 17	-	≥ 18
Penicilina G (10 UI)	≤ 28	-	≥ 29
Tetraciclina (30 µg)	≤ 14	15-18	≥ 19
Vancomicina (30 µg)	-	-	≥ 15

Fonte: CLSI (2012)

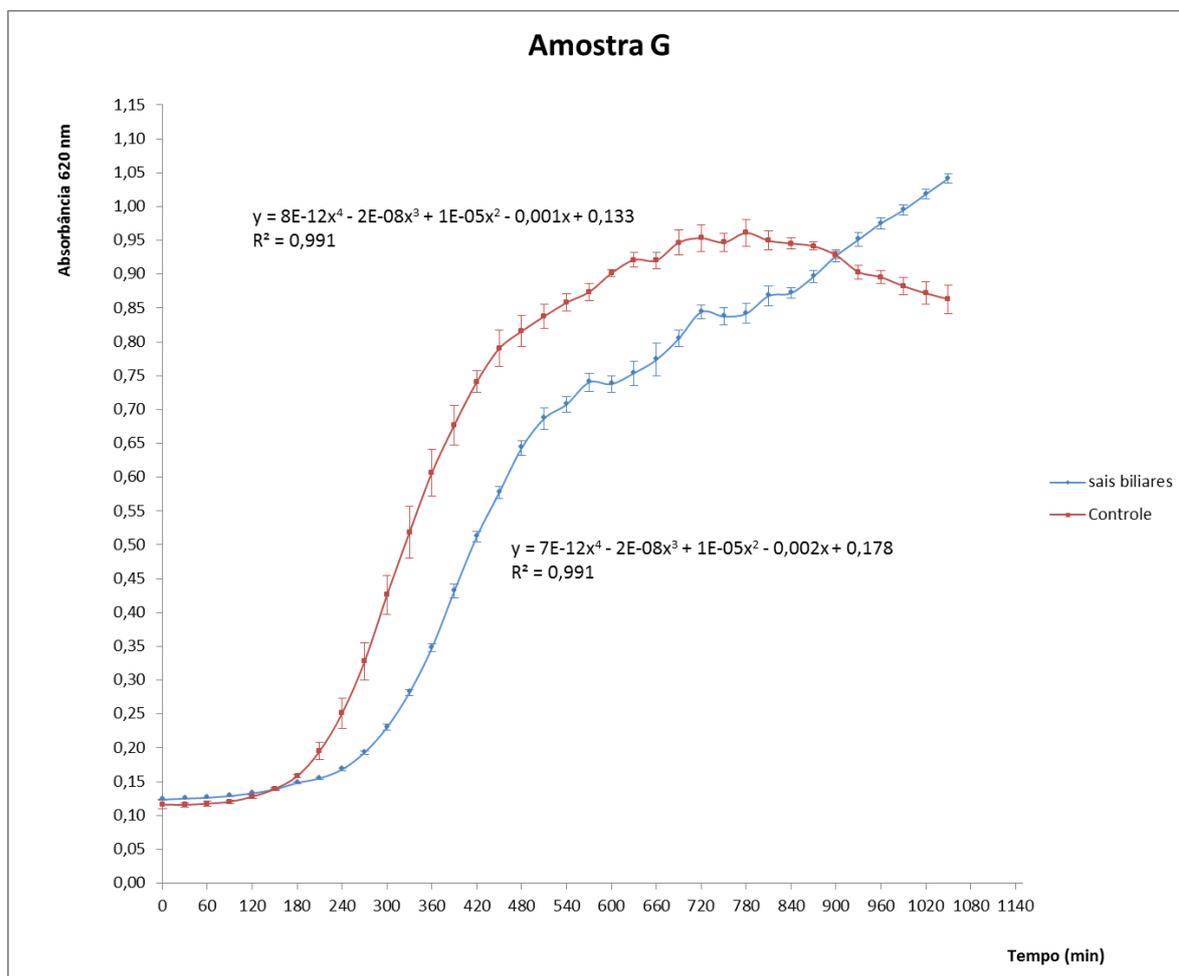
Anexo 3. Curvas de crescimento da amostra *L. paracasei* (G1), incubada a 37°C em caldo MRS (Difco), após incubação em solução salina 0,9% em pH 2,0 e solução salina 0,9% em pH 7,0, por três horas



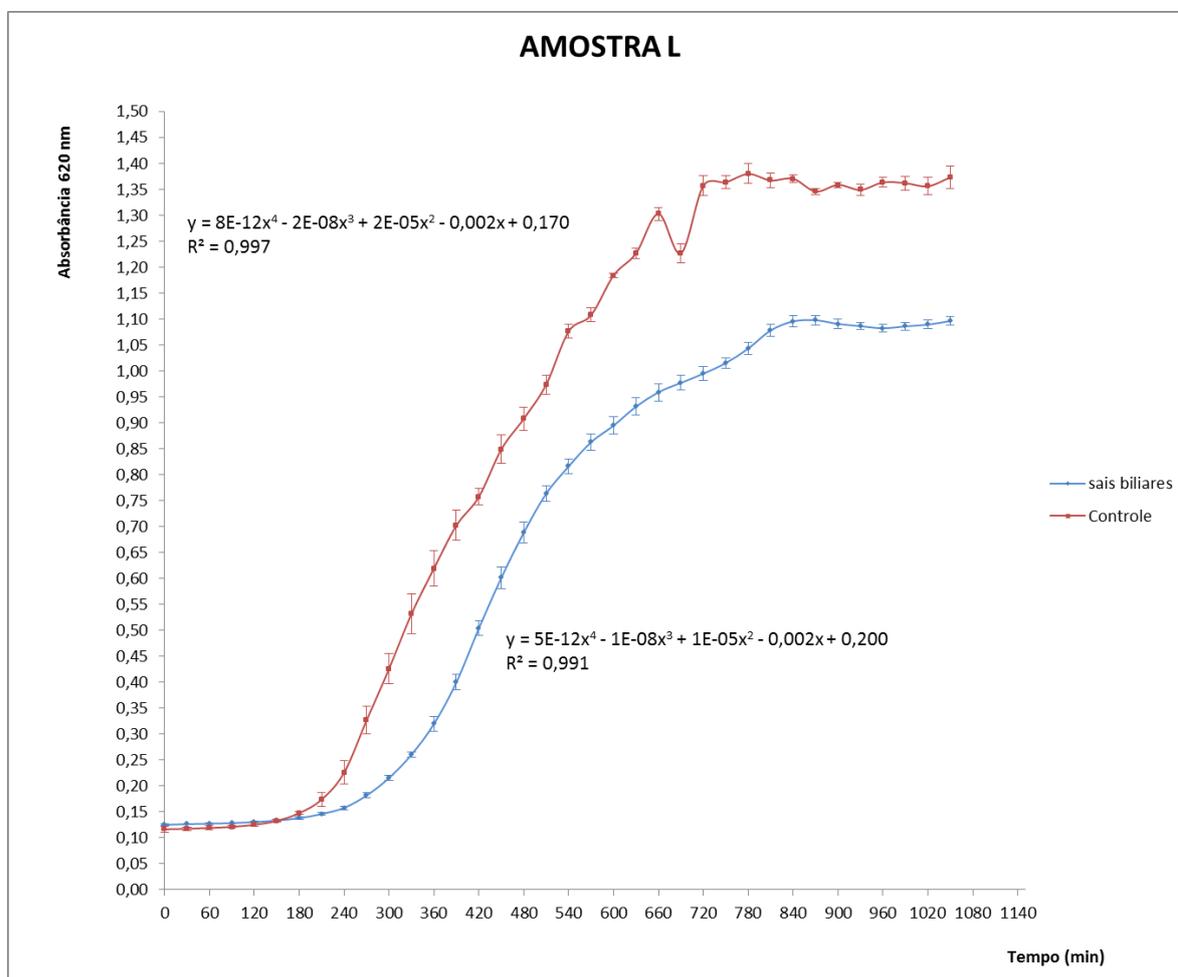
Anexo 4. Curvas de crescimento da amostra *L. paracasei* (L2), incubada a 37°C em caldo MRS (Difco), após incubação em solução salina 0,9% em pH 2,0 e solução salina 0,9% em pH 7,0, por três horas



Anexo 5. Curvas de crescimento da amostra *L. paracasei* (G1), incubada a 37°C, em meio contendo caldo MRS (Difco) com 0,3% de Oxgall (BD) e em caldo MRS (Difco) puro



Anexo 6. Curvas de crescimento da amostra *L. paracasei* (L2), incubada a 37°C, em meio contendo caldo MRS (Difco) com 0,3% de Oxgall (BD) e em caldo MRS (Difco) puro



Anexo 7. Composição química e propriedades físico-químicas de amostras de queijos artesanais produzidos em diferentes cidades do norte de Minas Gerais

Amostras	Proteína %	Gordura%	GES %	Umidade%	Acidez	pH
A(Bocaiuva)	17,42	21,33	44,62	52,27	0,40	5,03
B(Mirabela)	17,94	21,00	41,65	49,59	0,44	5,25
C(Janaúba)	17,95	20,6	42,51	51,55	0,42	5,88
D(Guaraciama)	18,09	21,06	42,25	50,16	0,45	5,34
E(Mucambo)	17,91	21,16	46,84	54,83	0,45	5,15
F(Bras. Minas)	18,94	22,73	43,28	47,49	0,42	5,06
G(Pirapora)	20,78	22,06	41,17	46,42	0,41	5,17
H(F. Sá)	21,09	20,73	50,19	58,70	0,42	5,29
I(Juramento)	16,86	21,06	41,69	49,49	0,46	5,23
J(Januária)	22,92	21,00	38,42	45,35	0,37	5,44
K(S. Pedro)	17,97	23,5	42,50	44,71	0,35	5,88
L(Nova Esp)	16,62	26,66	66,00	59,61	0,42	5,30
M(Glaucilândia)	23,10	23,83	45,03	47,09	0,42	4,99
N(S. Francisco)	14,27	25,83	64,86	60,18	0,42	5,66
O(S. Francisco)	17,02	24,16	49,38	51,08	0,49	5,09
MED.	18,59	22,45	46,69	51,23	0,42	5,25
D.P	±5,06	±1,94	±8,21	±5,06	±0,01	±0,25
C.V	0,129	0,086	0,175	0,098	0,045	0,049

Legenda: MED = média, D.P = desvio padrão, C.V = coeficiente de variação, GES = gordura no extrato seco