

Ana Luisa Ferreira Simões Cunha

**Potencial probiótico *in vitro* de *Lactobacillus* spp.
isolados de queijo Minas artesanal da Serra do Salitre -
MG**

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

Orientador: Marcelo Resende de Souza

Co-orientadores:
Maximiliano Soares Pinto e Eduardo Robson Duarte

MONTES CLAROS
2018

Cunha, Ana Luisa Ferreira Simões.

C972p

2018

Potencial probiótico de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo Minas artesanal da Serra do Salitre - MG / Ana Luisa Ferreira Simões Cunha. Montes Claros, 2018.
49 f. : il.

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

Orientador: Prof. Marcelo Resende de Souza

Banca examinadora: Prof. Maximiliano Soares Pinto, Prof. Eduardo Robson Duarte, Prof. Leonardo Borges Acurcio e Prof. Marcelo Resende de Souza.

Referências: f: 25-31; 43-45.

1. Bactérias Produtoras de ácido lático. 2. Alimentos funcionais. 3. Alimentos -- Consumo. I. Souza, Marcelo Resende de (Orientador). II. Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais. III. Título.

CDU: 579.67(815.1)

ELABORADA PELA BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA DO ICA/UFMG

Josiel Machado Santos / CRB-6/2577

Ana Luisa Ferreira Simões Cunha

**Potencial probiótico *in vitro* de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo
Minas artesanal da Serra do Salitre - MG**

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: Qualidade de produtos de
origem animal

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

Aprovado pela banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Maximiliano Soares Pinto
UFMG/ICA

Prof. Eduardo Robson Duarte
UFMG/ICA

Prof. Leonardo Borges Acurcio
UNIFOR-MG

Prof. Marcelo Resende de Souza
UFMG/DTIPOA

Montes Claros, 04 de abril de 2018

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais Marcos e Isis, pelo apoio e amor incondicional; e ao meu filho Matheus, por me tornar uma pessoa melhor todos os dias.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por se fazer presente sempre, me abençoando com saúde e fé na conclusão de mais uma etapa.

Aos meus pais Marcos e Isis, que sempre me apoiaram e ajudaram na conquista dos meus sonhos, me confortando, acalmando e dando força.

Ao meu filho Matheus, que trouxe mais alegria e amor a minha vida, me tornando uma pessoa melhor, mais forte e feliz.

As queridas amigas Oasianas, que estiveram comigo na alegria e na tristeza, amenizando os momentos difíceis com muita risada e comemorando cada vitória com brindes e abraços.

Ao Fábio por me escutar, aconselhar e ser tão companheiro nos momentos em que mais precisei.

Ao Léo e ao Gustavo pelo apoio, disponibilidade e paciência na condução da parte experimental deste trabalho.

Ao coorientador, Maximiliano Soares Pinto, pela amizade e disposição para ajudar e passar seus conhecimentos, serei eternamente grata. Ao coorientador, Eduardo Robson Duarte, por toda ajuda na conclusão do trabalho.

Ao orientador, Marcelo Resende de Souza, pela disponibilidade, atenção, paciência e entusiasmo na condução do projeto.

A todos, meu sincero agradecimento.

“Você nunca sabe que resultados virão da sua ação.
Mas se você não fizer nada, não existirão resultados”

Mahatma Gandhi

RESUMO

O queijo Minas artesanal (QMA) é caracterizado pela utilização de leite cru e soro fermento endógeno em sua elaboração. O sabor e o aroma típicos desses queijos são obtidos por meio de transformações realizadas principalmente por bactérias ácido-láticas (BAL) presentes no leite, no fermento endógeno e no ambiente de produção. Além disso, algumas dessas bactérias podem inibir o crescimento de micro-organismos indesejáveis e são capazes de tolerar as condições de estresse do trato gastrointestinal, tornando-as potenciais probióticos. O objetivo nesta pesquisa foi submeter espécies de *Lactobacillus* spp., isolados de QMA da Serra do Salitre – MG, a testes *in vitro* de antagonismo contra micro-organismos patogênicos e BAL do próprio queijo, susceptibilidade a antimicrobianos e tolerância a ácido e sais biliares artificiais, com a finalidade de selecionar potenciais probióticos *in vitro*. A identificação proteômica foi realizada e seis amostras pertencentes às espécies *L. paracasei* (C1 e C2), *L. plantarum* (L1 e L2) e *L. rhamnosus* (R1 e R2) foram selecionadas para o experimento. Todas as amostras apresentaram atividade antagonista contra os patógenos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri* e *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, sendo *E. coli* e *S. aureus* mais inibidos e a ação inibitória contra *Lactobacillus* spp. foi discreta ou ausente. As amostras *L. plantarum* (L1 e L2) e *L. rhamnosus* (R1) foram consideradas tolerantes ao ácido gástrico (pH 2.0) e as amostras *L. paracasei* (C2) e *L. plantarum* (L1) foram consideradas tolerantes à presença de sais biliares artificiais (*Oxgall* 0,3%). Todas as amostras foram resistentes a cefoxitina e vancomicina e sensíveis a amoxicilina, ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina. Os resultados do teste de antagonismo indicam que as amostras estudadas possam auxiliar no controle de patógenos em queijos. A amostra L1 apresentou o melhor potencial probiótico *in vitro* devido à tolerância ao ácido e sais biliares e poderá ser submetida a testes *in vivo* para atestar esse potencial. A resistência a antibacterianos detectada neste trabalho aponta a necessidade do estudo da capacidade de transferência de genes que determinam esse fenótipo.

Palavras-chave: Bactérias ácido-láticas. Microbiologia. Micro-organismos benéficos. Saúde. Segurança alimentar.

ABSTRACT

The traditional artisanal Minas cheese is characterized by the use of raw milk and endogenous starter culture in its elaboration. The typical flavor of these cheeses is obtained by transformations performed mainly by lactic acid bacteria (LAB) present in milk, endogenous starter culture and cheesemaking environment. In addition, some of these bacteria can inhibit the growth of undesirable microorganisms and are able to tolerate gastrointestinal tract stress conditions, being considered probiotics. The objective in this study was to submit species of *Lactobacillus* spp. isolated from artisanal Minas cheese from Serra do Salitre (MG) to *in vitro* tests of antagonism against pathogenic microorganisms and LAB from the cheese, antimicrobial susceptibility and tolerance to artificial acid and bile salts in order to select potential probiotics *in vitro*. The proteomic identification was performed and six samples belonging to the species *L. paracasei* (C1 e C2), *L. plantarum* (L1 e L2) and *L. rhamnosus* (R1 e R2) were selected for the experiment. All the samples presented antagonism activity against the pathogens *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, being *E. coli* and *S. aureus* the most inhibited and the inhibitory action among *Lactobacillus* spp. was discreet or absent. The samples *L. plantarum* (L1 e L2) and *L. rhamnosus* (R1) were considered tolerant to gastric acid (pH 2.0) and *L. paracasei* (C2) and *L. plantarum* (L1) were considered tolerant to the presence of *Oxgall* (0,3%). All samples were resistant to cefoxitin and vancomycin and sensitive to amoxicillin, ampicilin, chloramphenicol and tetracycline. The results of the antagonism test indicate that the studied samples could aid in the control of pathogens in cheeses. The sample L1 presented the best probiotic potential due to tolerance to acid and bile salts and can be submitted to *in vivo* tests to ensure this potential. The resistance to antibacterial resistance detected in this research points to the need to study the ability to transfer antibiotic resistance genes that determine this phenotype.

Key words: Lactic acid bacteria. Microbiology. Benefic microorganisms. Health. Food safety.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura.....	16
Figura 1 - Mapa das regiões produtoras de queijo artesanal em Minas Gerais.....	17
Figura 2 – Mapa da localização do município de Serra do Salitre.....	18
Figura 3 – Fluxograma de produção do queijo Minas artesanal da Serra do Salitre.....	19

LISTA DE TABELAS

Artigo – Potencial probiótico <i>in vitro</i> de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de queijo Minas artesanal da Serra do Salitre - MG.....	31
Tabela 1 - Médias dos halos de inibição (mm) do teste de antagonismo <i>in vitro</i> de <i>Lactobacillus</i> spp., isolados de queijos Minas artesanal da Serra do Salitre – MG, contra patógenos, em triplicata com duas repetições.....	36
Tabela 2 – Médias dos halos de inibição (mm) do teste de sensibilidade a antimicrobianos de <i>Lactobacillus</i> spp., isolados de queijos Minas artesanal da Serra do Salitre – MG, em triplicata com duas repetições.....	38
Tabela 3 – Percentual de inibição de <i>Lactobacillus</i> spp., isolados de queijo Minas artesanal da Serra do Salitre – MG, após 12 horas de incubação na presença de ácido gástrico (pH 2.0) e sais biliares (0,3%) a 37°C, em triplicata com duas repetições.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS e SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAL	Bactérias ácido-láticas
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
°C	Graus Celsius
cm	Centímetros
%	Por cento
EMATER	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Estado de Minas Gerais
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FAO/WHO	<i>Food and Agriculture/World Health Organization</i>
g	Gramas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
kg	Quilograma
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>
MG	Minas Gerais
µg	Microgramas
min	Minutos
mL	Mililitros
µL	Microlitros
mm	Milímetros
MRS	<i>Man, Rogosa e Sharpe</i>
MTMAP	Mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba
NaCl	Cloreto de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
QMA	Queijo Minas artesanal
<i>S. flexneri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral.....	15
2.2	Objetivos específicos.....	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	Queijos: definição, composição química e valor nutricional.....	16
3.2	Queijo Minas artesanal.....	16
3.2.1	Histórico e legislação.....	16
3.2.2	Microrregião da Serra do Salitre e seu queijo Minas artesanal.....	17
3.2.3	Fermento natural – “pingo”.....	19
3.3	Probióticos.....	20
3.3.1	Histórico e definição.....	20
3.3.2	Propriedades probióticas.....	21
3.3.3	Mecanismos de ação.....	22
3.3.4	Bactérias ácido-láticas.....	23
3.4	Microbiota intestinal.....	24
3.5	Referências.....	25
4	ARTIGO	31
4.1	Potencial probiótico <i>in vitro</i> de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de queijo Minas artesanal da Serra do Salitre – MG.....	31
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
	APÊNDICES	46

1 INTRODUÇÃO

O queijo Minas artesanal (QMA) é um produto de origem secular, tradicional, fabricado em pequenas propriedades rurais, responsável pela geração de renda de inúmeras famílias, sendo caracterizado pela utilização de leite cru e adição do fermento natural (pingo e/ou rala) em sua elaboração (DORES; FERREIRA, 2012; COSTA JÚNIOR *et al.*, 2014).

Atualmente, o QMA é produzido principalmente nas regiões do Serro, Araxá, Cerrado, Serra da Canastra, Campo das Vertentes, Triângulo Mineiro e Serra do Salitre, que são regiões oficialmente reconhecidas como produtoras (EMATER, 2016).

O ambiente de produção, o leite cru e o pingo apresentam altas contagens de bactérias ácido-láticas (BAL), que variam em quantidade e diversidade de espécies entre as regiões produtoras de QMA. Essas bactérias são responsáveis por mudanças bioquímicas no queijo, devido à ação de suas enzimas, conferindo características desejáveis de aroma e sabor únicos ao produto final (REZENDE, 2010; DORES; FERREIRA, 2012).

Além disso, espécies de BAL podem apresentar tolerância a ácidos e sais biliares, ação inibitória contra micro-organismos patogênicos, capacidade de adesão ao epitélio intestinal, segurança e viabilidade de ingestão, se tornando potenciais probióticos. Tais características, que devem ser comprovadas *in vitro* e *in vivo*, fazem com que esses micro-organismos sejam amplamente utilizados em alimentos funcionais, que nutrem e proporcionam benefícios à saúde; e em produtos farmacêuticos, para humanos e animais. O uso dessas culturas contribui para a melhora do funcionamento do sistema digestivo, redução do colesterol, auxilia na prevenção e no tratamento de doenças alérgicas e redução do índice de depressões associadas à síndrome do intestino irritável, melhora do sabor dos alimentos, conservação das propriedades nutricionais, durabilidade e segurança alimentar dos produtos (LEE; SALMINEN, 1999; SAAD, 2006; BADARÓ *et al.*, 2008; BAPTISTA; ACCIOLY; PADILHA, 2013; PINTO-SANCHEZ *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017).

O ritmo de vida cada vez mais acelerado e estressante da população, aumenta o interesse em consumir alimentos que são nutritivos e ao mesmo tempo contribuem para a manutenção da saúde. Em consequência disso, pesquisas relacionadas a espécies de micro-organismos probióticos, bem como alimentos funcionais se tornaram mais intensas e relevantes.

Uma vez que espécies microbianas presentes nos QMA são variáveis entre as regiões, a busca por micro-organismos com características funcionais nos queijos de cada região torna-se necessária para o desenvolvimento de produtos seguros, de qualidade, que mantenham sua especificidade. O efeito benéfico é dependente da espécie, portanto, quanto maior o número de amostras microbianas isoladas e testadas, maiores são as chances de se encontrar micro-organismos probióticos.

Nesse contexto, o objetivo neste estudo foi avaliar o potencial probiótico de espécies do gênero *Lactobacillus*, isolados de QMA da Serra do Salitre (MG), submetendo-as a testes de antagonismo contra micro-organismos patogênicos e bactérias do próprio queijo, tolerância a ácido gástrico e sais biliares artificiais e susceptibilidade a antimicrobianos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial probiótico *in vitro* de espécies de *Lactobacillus* spp. isoladas do queijo Minas artesanal da região da Serra do Salitre (MG).

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar bactérias ácido-láticas (BAL) do queijo Minas artesanal da Serra do Salitre (MG).
- Verificar a capacidade de inibição das BAL contra micro-organismos indicadores (indesejáveis ou desejáveis, que podem estar presentes em queijos artesanais) por meio de teste de antagonismo *in vitro*.
- Avaliar a susceptibilidade *in vitro* das BAL a antimicrobianos de diferentes grupos farmacológicos.
- Submeter as BAL a testes de sensibilidade ao ácido gástrico e a sais biliares artificiais *in vitro*, mimetizando condições *in vivo*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Queijos: definição, composição química e valor nutricional

O Decreto nº 9.013, de 9 de março de 2017 define queijo como sendo: “o produto lácteo fresco ou maturado que se obtém por meio da separação parcial do soro em relação ao leite ou ao leite reconstituído – integral, parcial ou totalmente desnatado – ou de soros lácteos, coagulados pela ação do coalho, de enzimas específicas, produzidas por microrganismos específicos, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem adição de substâncias alimentícias, de especiarias, de condimentos ou de aditivos. O queijo fresco é aquele que está pronto para o consumo logo após a sua fabricação e o queijo maturado é o que sofreu as trocas bioquímicas e físicas necessárias e características da sua variedade” (BRASIL, 2017).

Um dos derivados do leite de maior consumo, o queijo é fonte de proteínas, gorduras, sais minerais (cálcio e fósforo), vitaminas e pode ser produzido tanto de maneira industrial quanto artesanal, sendo que, a diferença entre os dois tipos é o fato de os queijos artesanais serem elaborados a partir de leite cru, em propriedades leiteiras, de maneira tradicional e sem adição de culturas iniciadoras comerciais (Valsechi, 2001; Feitosa *et al.*, 2003; Dores; Ferreira, 2012; Minas Gerais, 2012).

3.2 Queijo Minas artesanal

3.2.1. Histórico e legislação

No Brasil, existe grande produção de queijos artesanais, cujos processos de fabricação têm sido passados de geração para geração. Sua comercialização é importante forma de subsistência para as famílias das regiões produtoras, além da sua bagagem cultural (Costa Júnior *et al.*, 2014).

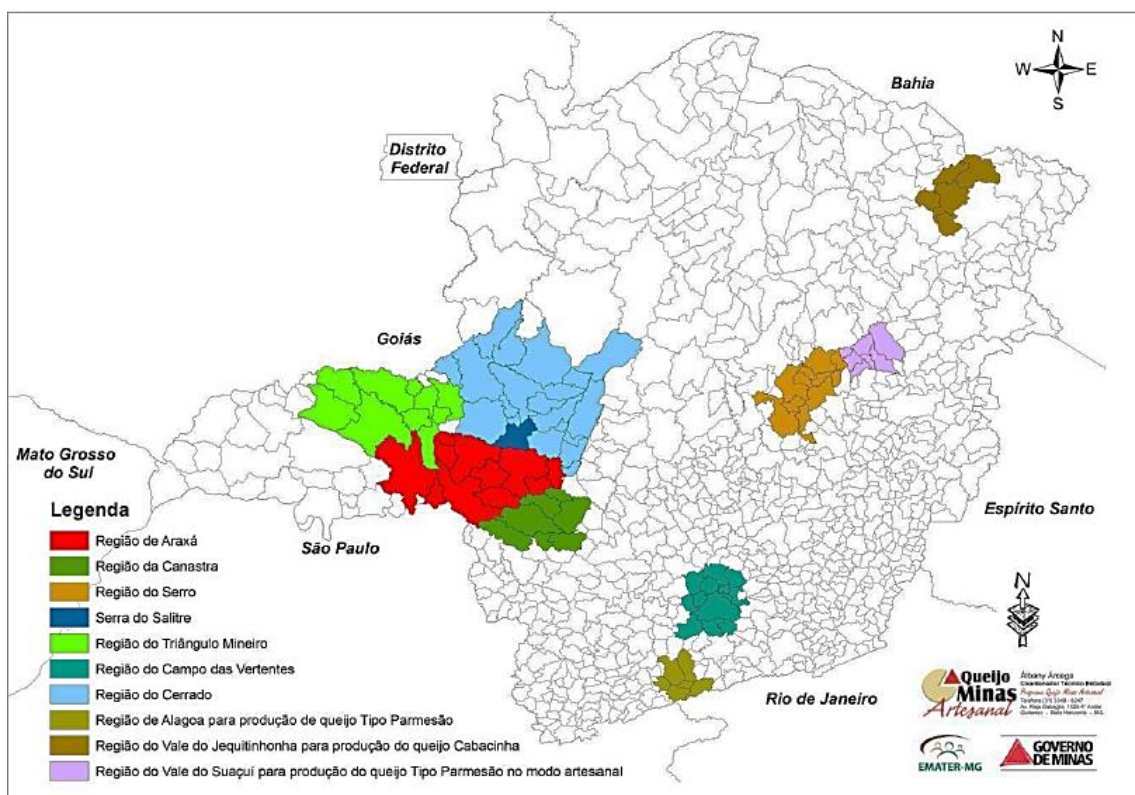
O estado de Minas Gerais se destaca como o mais importante e maior produtor de queijos artesanais do Brasil. O chamado queijo Minas artesanal (QMA) é produzido em propriedades rurais baseadas na agricultura familiar de regiões tradicionais e é caracterizado pela utilização do leite cru e obrigatória adição do pingão, que é parte do soro proveniente do dessoramento do queijo fabricado no dia anterior, sendo recolhido e utilizado como fermento na produção seguinte (Pinto *et al.*, 2004; Dores; Ferreira, 2012; Costa Júnior *et al.*, 2014).

A lei estadual nº 20.549, de 18 de dezembro de 2012, além de caracterizar os queijos artesanais de Minas Gerais, dispõe sobre a produção e comercialização dos mesmos, citando o uso de leite proveniente de rebanhos saudáveis, as condições adequadas das queijarias, bem como o transporte e a fiscalização (Minas Gerais, 2012).

Apesar de o modo artesanal de se produzir queijos em Minas estar presente em diversas regiões (Almeida *et al.*, 2012), atualmente o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) reconhece dez regiões tradicionalmente produtoras de queijos artesanais no estado (Figura

1), sendo Serro, Canastra, Serra do Salitre, Campo das Vertentes, Araxá, Triângulo Mineiro e Cerrado as regiões tipicamente produtoras de QMA (EMATER, 2016).

Figura 1 – Mapa das regiões produtoras de queijo artesanal em Minas Gerais.



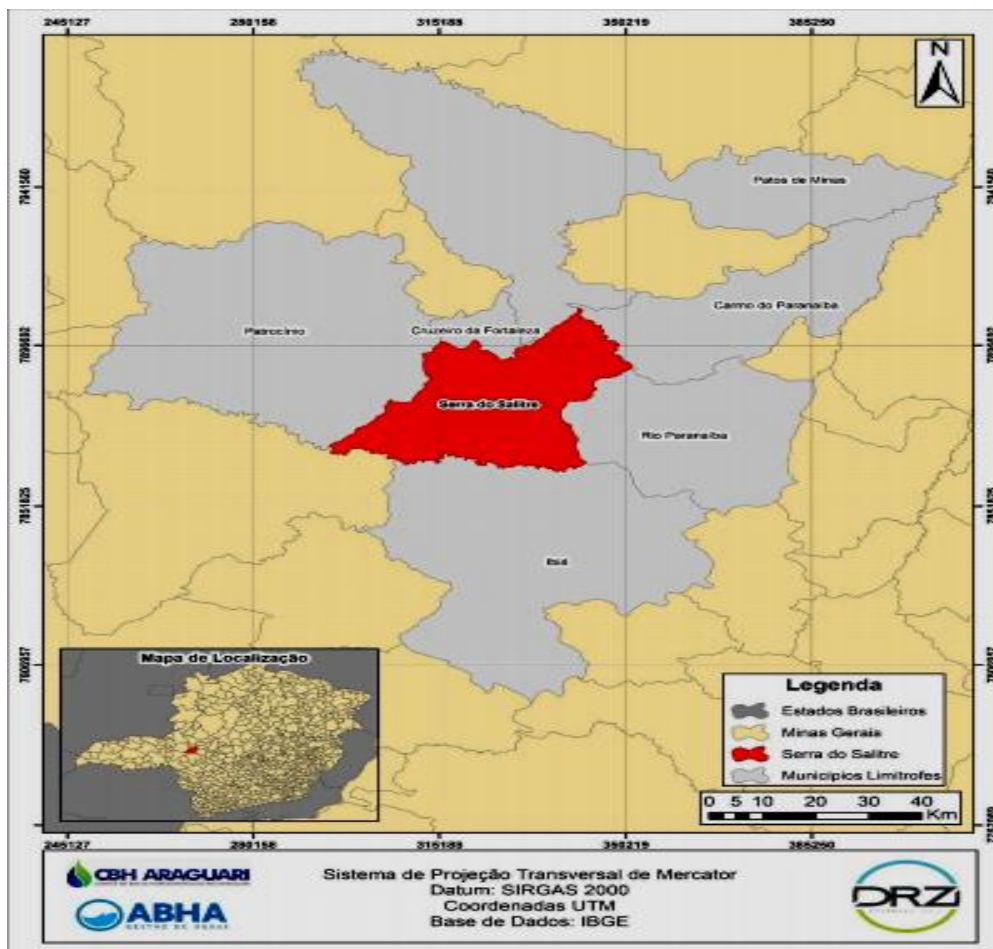
Fonte: EMATER, 2016

Os produtores de QMA cadastrados pelo IMA se distribuem entre as sete microrregiões da seguinte maneira: 123 produtores no Serro, 13 em Araxá, 47 na microrregião do Cerrado, 48 na Canastra, quatro em Campo das Vertentes, nove no Triângulo Mineiro, 18 na Serra do Salitre e seis sem região definida, totalizando 268 produtores cadastrados (IMA, 2017).

3.2.2. Microrregião da Serra do Salitre e seu queijo Minas artesanal

A microrregião de Serra do Salitre (FIGURA 2) é composta apenas pelo município de Serra do Salitre e pertence à mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, situada a leste do Estado de Minas Gerais, integrando 66 municípios (IBGE, 2012; EMATER, 2014).

Figura 2 – Mapa da localização do Município de Serra do Salitre.



Fonte: IBGE, 2012.

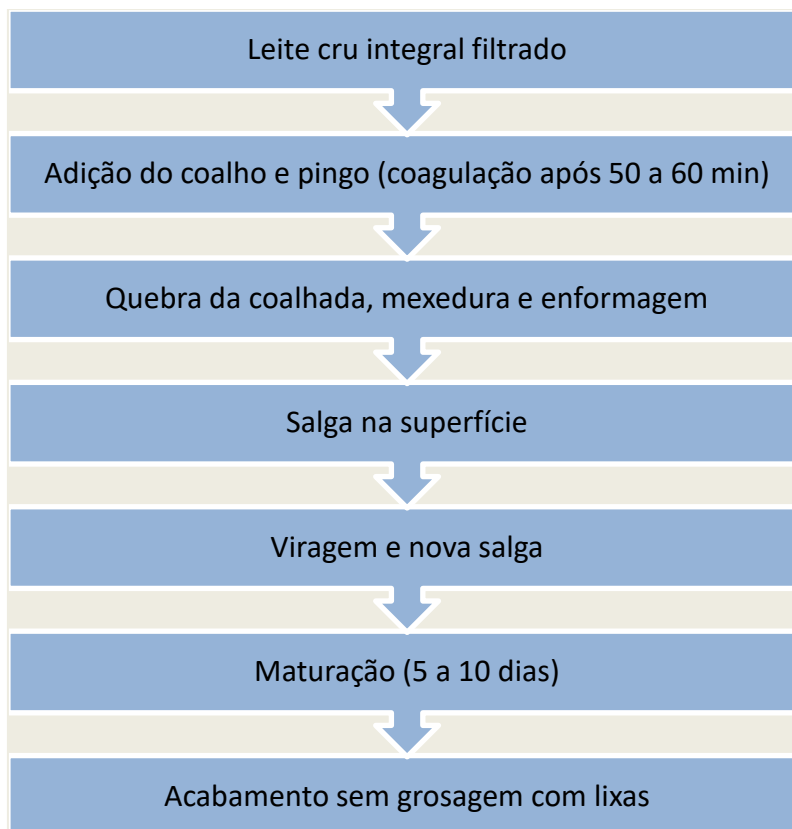
Na região compreendem dois biomas; o Cerrado e a Mata Atlântica, sendo o primeiro, de maior área. Fatores como o clima, fertilidade, acidez do solo, disponibilidade de água, relevo, e ainda, a interação entre os fatores, influenciam na vegetação do bioma do Cerrado, sendo, por esse motivo, bastante variada (EMATER, 2003).

Dentre os produtos cultivados na região estão: abacate, algodão, banana, café, batata-doce e cevada. Em toda a região, é marcante a presença da agricultura familiar, com diversidade de produtos e envolvimento também da atividade leiteira, que leva à fabricação e comercialização dos queijos artesanais, gerando renda para famílias rurais (EMATER, 2003).

A fabricação de queijos foi iniciada pelos colonos que chegaram na região à procura de ouro; desenvolvida em virtude do alto grau de perecibilidade do leite cru e favorecida por condições físico-ambientais, que propiciaram o desenvolvimento de bactérias típicas responsáveis pelo sabor característico tão apreciado dos queijos (EMATER, 2003).

Os queijos de Minas mais conhecidos são fabricados no Serro, Serra da Canastra e na Serra do Salitre e, ao longo dos anos, conquistaram grande mercado consumidor (BORELLI, 2006). Na Figura 3 é mostrado o fluxograma de fabricação do queijo Minas artesanal da Serra do Salitre.

Figura 3 – Fluxograma de produção do queijo Minas artesanal da Serra do Salitre.



Fonte: Adaptado de LIMA *et al.*, 2009.

Em trabalho realizado por Oliveira *et al.* (2013), os queijos Minas artesanais do Cerrado (microrregião a qual a Serra do Salitre pertencia) apresentaram teor médio de umidade de 46,5%, extrato seco total de 51,77%, 27,62% de lipídeos, 14,55% de proteína e 2,62% de sal.

Como aspectos sensoriais, a EMATER (2003) citou os queijos dessa microrregião como sendo de consistência semi-dura com tendência a macia, de natureza manteigosa, textura compacta, cor branca-amarelada, crosta fina, amarelada e sem trincas, com formato cilíndrico de quatro a seis cm de altura, 15 a 17cm de diâmetro, 1,0 a 1,2Kg, apresentando odor e sabor ligeiramente ácido, não picante agradável.

3.2.3 Fermento Natural – “pingo”

O fermento, também denominado ‘pingo’, representa o soro oriundo do dessoramento espontâneo do queijo. O pingo constitui uma cultura microbiana natural que atua no aumento da microbiota desejada, inibindo fermentações que possam prejudicar o produto final. Fato que torna esse ingrediente importante para a obtenção de um queijo de qualidade, com perfil sensorial próprio da região onde se encontra (PIRES, 2003; DORES; FERREIRA, 2012).

A coleta do fermento endógeno é feita logo após a salga do queijo, que é mantido em temperatura ambiente até o dia seguinte, quando será utilizado. Essa prática contribui para valores de acidez e pH que propiciam o crescimento de micro-organismos como bactérias

ácido-láticas (BAL), fungos e *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, que são bactérias patogênicas (NÓBREGA *et al.*, 2008).

A composição da microbiota endógena é influenciada por diversos fatores como, o ambiente, o método de ordenha e a época do ano; e varia entre as regiões que produzem QMA (BORELLI, 2006; NÓBREGA, 2007). Estudo conduzido por Nóbrega (2007) verificou a predominância de bactérias lácticas dos gêneros *Lactococcus*/*Streptococcus* e *Lactobacillus* (*L. plantarum* e *L. casei*) no fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra. No único estudo publicado sobre a microbiota do fermento endógeno proveniente da Serra do Salitre (MG), Lima *et al.* (2009) observaram predominância dos gêneros *Streptococcus* e *Pediococcus*. Sant'anna (2015) analisou a presença de *Lactobacillus* e *Pediococcus* no fermento endógeno da região de Campo das Vertentes e constatou a prevalência da espécie *L. plantarum*.

A concentração de sal (NaCl) do fermento também interfere e modula a microbiota presente e, conseqüentemente, a do queijo. A quantidade de NaCl adicionada varia de acordo com o produtor e com a época do ano, sendo que, em períodos onde observa-se maior contaminação dos queijos, geralmente no período das águas, adiciona-se maior quantidade de sal na tentativa de inibir o crescimento microbiano indesejável (NÓBREGA *et al.*, 2008). A adição desse ingrediente pode interferir na microbiota, selecionando micro-organismos halofílicos, aumentando *Staphylococcus* spp. e reduzindo BAL, prejudicando o direcionamento da fermentação inicial nos queijos (RESENDE *et al.*, 2011).

Os queijos que são fabricados com fermento natural possuem maior teor de ácido láctico, devido à atividade destas bactérias sobre a lactose, que aumenta a acidez, melhorando a atuação do coalho. Essa microbiota também influencia na maturação, promovendo maior extensão de proteólise (SILVA *et al.*, 2011). Existem BAL que atuam no início da fermentação (acidificantes) e BAL que se desenvolvem melhor ao longo da fermentação (proteolíticos) (RESENDE *et al.*, 2011).

A microbiota presente no fermento endógeno deve ser estudada, de maneira a escolher somente micro-organismos adequados para se obter o produto final desejado (TODESCATTO, 2014). Para que se mantenha a qualidade dos queijos artesanais, é importante também, controlar as populações microbianas indesejáveis enquanto se aumenta a população de micro-organismos desejáveis (NÓBREGA *et al.*, 2008).

3.3 Probióticos

3.3.1 Histórico e definição

A primeira observação dos possíveis efeitos benéficos dos probióticos foi relatada no final do século XIX por Henry Tissier, um pediatra francês, que visualizou bactérias bífidas em abundância nas fezes de crianças saudáveis e ausentes em fezes de crianças com diarreia (FAO/WHO, 2001).

Metchnikoff (1907), citado por Redondo (2008), observou a baixa incidência de câncer de cólon, proteção contra infecções gastrintestinais e longevidade apresentada por

camponeses búlgaros, atribuindo tais características ao consumo de leite fermentado por bactérias ácido-láticas.

No início do século XX, pesquisadores sugeriram que a microbiota intestinal poderia ser alterada com bactérias benéficas em substituição a micro-organismos indesejáveis, levando ao conceito de probióticos (WILLIAMS, 2010).

Os primeiros autores a utilizarem o termo probiótico foram Lilly e Stillwell (1965), e se referia a: “substância produzida por protozoário que estimula o crescimento de outro protozoário”. A fim de destacar a natureza microbiana dos probióticos, Fuller (1989) os definiu como sendo “um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro, melhorando o seu equilíbrio intestinal”. Havenaar e Huis in't Veld (1992) acrescentaram, “uma cultura ou mistura de culturas de bactérias que, quando aplicada a animais ou ao homem, altera benéficamente o hospedeiro, melhorando as propriedades da flora indígena”. Por fim, a definição mais utilizada internacionalmente para o termo probiótico é a da FAO/WHO (2001): “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”.

3.3.2 Propriedades probióticas

Para que um microrganismo seja considerado probiótico para humanos, é preferível que seja de origem humana e deve possuir resistência a ácido e bile, aderência ao muco intestinal e às células epiteliais, produção de compostos antimicrobianos, se manter viável no trato gastrointestinal, estável a processos tecnológicos, não patogênico e não causar riscos para a utilização humana (LEE; SALMINEN, 1999; SAARELA *et al.*, 2000; CARLI, 2006).

A especificidade do hospedeiro está relacionada com o fato da cepa microbiana ser isolada a partir da espécie animal que fará uso desse probiótico. Assim, o probiótico irá exercer melhor a função de beneficiar o hospedeiro, pois encontrará um ambiente semelhante ao sítio de onde foi isolado (SAARELA *et al.*, 2000). Entretanto, Sanders (2008) ressalta que alguns probióticos que não foram isolados de humanos são utilizados nesses indivíduos com efetividade, fazendo com que a especificidade seja um aspecto mais preferencial do que obrigatório.

A capacidade de fixação no intestino delgado é uma característica bastante desejável, pois contribui para o tempo de permanência e evita o assentamento de potenciais patógenos que ali produziram toxinas (COPPOLA; TURNES, 2004). Existem micro-organismos que colonizam permanentemente o trato gastrointestinal (TGI) e micro-organismos transitórios, que permanecem por um curto período de tempo (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

Em geral, os probióticos são transitórios, permanecendo pouco tempo no organismo do hospedeiro após o fim da sua ingestão (SANDERS, 2008). A colonização temporária e os efeitos benéficos dos probióticos são dependentes da microbiota presente no intestino do hospedeiro e da matriz alimentar (REID *et al.*, 2010). Espécies do gênero *Lactobacillus* são frequentemente encontrados habitando o TGI, sendo subdominantes, com diferentes capacidades de colonização e interação com o hospedeiro (GUARNER; MALAGELADA, 2003).

Como não há conhecimento de probióticos capazes de se estabelecer no trato digestivo, existe a necessidade de ingestão contínua e em elevadas quantidades para garantir os efeitos benéficos à saúde (COPPOLA; TURNES, 2004; MARTINS *et al.*, 2005; RODRIGUEZ, 2015).

A viabilidade está relacionada com a quantidade mínima de micro-organismos vivos presentes no alimento para que esse confira os benefícios probióticos. De acordo com a ANVISA, o alimento contendo probiótico deve ter consumo diário mínimo de 10^8 a 10^9 micro-organismos viáveis (BRASIL, 2002). A viabilidade pode ser aumentada com a adição dos chamados prebióticos, que são substâncias não digeríveis (inulina, frutooligossacarídeos) e chegam intactas ao final do trato gastrintestinal, sendo utilizadas pelos probióticos, que se mantêm no ambiente e crescem melhor (SAAD, 2006; GALLINA, 2015).

É importante que o microrganismo não seja patogênico, infeccioso ou possua fatores de virulência envolvendo toxicidade. As células viáveis e os metabólitos dos probióticos têm sido consumidos há muitos anos e não existem relatos de patogenicidade envolvendo sua ingestão por pessoas saudáveis (FAO, 2001; ISHIBASHI; YAMAZAKI, 2001).

Dentre os aspectos tecnológicos, o micro-organismo probiótico deve resistir ao processamento e se manter estável durante a vida de prateleira, podendo ser adicionado em produtos alimentícios, que devem apresentar boa propriedade sensorial, para exercer seus benefícios (SAARELA *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

3.3.3 Mecanismos de ação

Existem três mecanismos principais de ação dos probióticos: modulação da microbiota intestinal, alteração do metabolismo microbiano e estímulo da imunidade do hospedeiro. O primeiro está relacionado com a formação de compostos antimicrobianos e a competição por nutrientes e sítios de adesão. O segundo é influenciado pela atividade enzimática e o terceiro se relaciona com o aumento de anticorpos e da atividade de macrófagos (FULLER, 1989).

A chamada exclusão competitiva, caracterizada pela formação de compostos ácidos, bacteriocinas e outros antimicrobianos, pela competição por nutrientes e sítios de adesão à mucosa intestinal, impede a fixação dos patógenos, que produziram toxinas, desencadeando doenças (REDONDO, 2008).

A atividade enzimática das bactérias lácticas desempenha importante papel, pois as enzimas produzidas são capazes de degradar a lactose, facilitando a digestão e auxiliando pessoas intolerantes a esse carboidrato (SAAD, 2006).

Para influenciar na imunidade do hospedeiro, os probióticos precisam ativar o tecido linfóide, composto por placas de Peyer e células intestinais, que estimulam a comunicação dos linfócitos B e T com outros tecidos e produzem imunoglobulina A. As bactérias lácticas, que são a maioria dos probióticos, apresentam compostos imunomoduladores em suas paredes celulares, que estimulam macrófagos a liberarem interleucina-1, responsável pela ativação dos linfócitos T. A modulação do sistema imune protege o hospedeiro de possíveis desarranjos gastrintestinais, infecções respiratórias e doenças alérgicas (COPPOLA; TURNES, 2004; SAAD, 2006).

A microbiota intestinal, as respostas imunes inatas e a genética são fatores que determinam o desenvolvimento de doenças inflamatórias. A participação de micro-organismos probióticos na modulação de respostas de citocinas, que inclui o aumento da produção da citocina protetora IL-10, é um importante mecanismo de ação no tratamento e prevenção de inflamações no intestino (DAY; KEENAN, 2011).

Nos últimos dez anos pesquisas sobre efeitos do uso de probióticos no tratamento de doenças e/ou seus sintomas se intensificaram. Asahara *et al.* (2010), verificaram que a administração diária de *Lactobacillus casei* Shirota inibiu completamente a colonização intestinal de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 e a infecção provocada no intestino de ratos. Estudo conduzido por Luhulima *et al.* (2013) utilizou suplemento probiótico contendo as espécies *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus clausii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus rhamnosus* juntamente com o tratamento padrão em pacientes de dois a oito anos de idade com rinite alérgica e verificou que após 30 dias, houve redução do percentual de eosinófilos nasais, e, conseqüentemente, da duração da doença e dos sintomas nasais.

Velez *et al.* (2015) induziram processo alérgico utilizando ovoalbumina em ratos, os trataram com leite fermentado contendo probiótico e obtiveram como resultado a redução de IgE específico, estimulando a produção de células de defesa. Os autores sugeriram que o consumo de alimentos contendo esses micro-organismos regule o sistema imune em tecidos epiteliais distantes, como os pulmões. Pinto-Sanchez *et al.* (2017) verificaram que o probiótico *Bifidobacterium longum* NCC3001 contribuiu para a redução dos sintomas de pacientes com Síndrome do Intestino Irritável e da qualidade de vida, devido a alterações nos padrões de ativação cerebral em regiões previamente implicadas na depressão e que são influenciadas por terapia antidepressiva, indicando que esse probiótico reduz a reatividade límbica. Slykerman *et al.* (2017) concluíram que a administração do probiótico *L. rhamnosus* HN001 em mulheres grávidas e no período pós parto reduziu a prevalência dos sintomas de depressão e ansiedade.

3.3.4 Bactérias ácido-láticas

As bactérias ácido-láticas (BAL) constituem a maioria da classe dos micro-organismos probióticos. São agrupadas por características morfológicas, metabólicas e fisiológicas; sendo apresentadas na forma de cocos ou bastonetes Gram-positivo, não esporogênicos. Esses micro-organismos são imóveis, catalase negativa, estão presentes em alimentos, boca, trato gastrointestinal e urogenital inferior de humanos e animais e realizam a fermentação de carboidratos, produzindo principalmente ácido lático (AXELSSON, 1993; REDONDO, 2008; NOGUEIRA, 2010).

As BAL podem ser classificadas em mesofílicas ou termofílicas, em função da temperatura ótima de crescimento e também de acordo com o produto da fermentação. Se produzirem principalmente ácido lático, são denominadas homofermentativas, se produzirem mais de um tipo de ácido (lático, acético e propiônico), são denominadas heterofermentativas. Essa produção de ácido desempenha importante papel no aumento da vida útil dos produtos, pois reduz consideravelmente o pH (BRUNO; CARVALHO, 2009).

Além disso, as BAL apresentam propriedades tecnológicas, sendo utilizadas principalmente na fabricação de produtos lácteos, conferindo características de sabor e aroma; e produzem as chamadas bacteriocinas, eficazes na inibição de importantes patógenos, juntamente com os ácidos (NOGUEIRA, 2010).

O grupo é composto por treze gêneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. A classificação está relacionada com a morfologia, o tipo de fermentação, crescimento em diferentes temperaturas e concentrações de sal e resistência a ácidos e álcalis (KHALID, 2011; PATRICK, 2012).

Os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* se destacam devido à capacidade fermentativa e benefícios à saúde, sendo utilizados nas indústrias de alimentos e farmacêutica (RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2010).

Na produção de queijos artesanais, o leite cru, o ambiente e o soro-fermento apresentam altas quantidades de BAL, que desempenham o papel de cultura *starter* e têm como principal função a produção ácido no processo de fermentação de carboidratos, participando também do processo de proteólise que auxilia na maturação dos queijos (ARAÚJO, 2004).

Segundo Furtado (1990), as BAL presentes no fermento convertem a lactose em ácido láctico, evitando que este substrato seja utilizado em fermentações indesejáveis e, ainda, a redução do pH inibe o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos, contribuindo para a qualidade e segurança alimentar dos queijos artesanais. Esse grupo bacteriano produz a enzima galactosidase, que degrada a lactose e ajuda na digestão, principalmente de indivíduos intolerantes a esse carboidrato, aliviando os sintomas de desconforto abdominal (BADARÓ, 2008).

Estudos também relataram efeitos probióticos de BAL, sendo capazes de sobreviver no canal intestinal e colonizar o intestino (DURRIEU *et al.*, 2006). Uma vez presentes no organismo, os compostos orgânicos (ácido láctico e peróxido de hidrogênio) e as bacteriocinas produzidas por essas bactérias auxiliam no combate aos patógenos, resultando na melhora da saúde (MORAIS; JACOB, 2006). Costa *et al.* (2012) verificaram que amostras de BAL *Lactobacillus acidophilus* LA 5 e *Lactobacillus plantarum* DCTA 8420 foram capazes de inibir *in vitro* patógenos potenciais, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*, *in vitro*.

3.4 Microbiota intestinal

A presença das muitas espécies bacterianas faz com que o intestino seja capaz de responder a quaisquer mudanças anatômicas e físico-químicas. Existe uma relação de mutualismo entre o hospedeiro e a microbiota autóctone, de maneira que ambos se beneficiam e, sem essa relação, não sobreviveriam (LEE; SALMINEN, 1999).

Ao nascer, o intestino é estéril e ao longo da vida, a comunidade microbiana; que varia ao longo do trato gastrointestinal e é único em cada indivíduo; é influenciada por fatores como o

tipo de parto, a alimentação, o ambiente e a genética, interferindo na saúde do hospedeiro (VAARALA, 2003; ANDOH; FUJIYAMA, 2006; BEDANI; ROSSI, 2009).

Além dos fatores supracitados, o uso de antimicrobianos, estresse, cigarro, tratamentos médicos como quimioterapia, radioterapia e o próprio envelhecimento exercem influência na microbiota e o estudo da composição intestinal e de suas interações estimulou a alimentação no sentido de equilibrar e manter as condições normais (GIBSON; FULLER, 2000; SANTOS *et al.*, 2008).

Os micro-organismos presentes no indivíduo adulto e estável podem colonizar o intestino permanentemente (nativos ou autóctones), ocupando sítios de adesão específicos ou transitar temporariamente (alóctone), sendo adquiridos externamente (BRANDT; SAMPAIO; MIUKI, 2006). Apesar de, em geral, os probióticos não colonizarem o trato gastrointestinal de modo permanente, algumas espécies permanecem por tempo suficiente para modular a microbiota intestinal (BEDANI; ROSSI, 2009).

A microbiota nativa fornece nutrientes essenciais como vitaminas, aminoácidos, substratos energéticos (ácidos butírico, propiônico e acético); realiza o aproveitamento de nutrientes não digeríveis como hidratos de carbono (celulose e pectinas), que chegam intactos ao intestino grosso e ali, são degradados pela microbiota presente, gerando produtos, dentre eles ácidos graxos, que inibem o crescimento de patógenos (SUÁREZ, 2015).

O contato com os micro-organismos também mantém a eficácia e permite o aumento da resposta imune contra agentes infecciosos e impede a ação de micro-organismos potencialmente patogênicos nas mucosas (BEDANI; ROSSI, 2009; SUÁREZ, 2015).

Mais de 500 espécies diferentes de micro-organismos habitam o trato gastrointestinal humano e, enquanto uns são considerados benéficos ao hospedeiro, outros são causadores de doenças, sendo o uso de probióticos indicado para a restauração da microbiota intestinal e reforço dos mecanismos de defesa do organismo (PUUPPONEN-PIMIÑ *et al.*, 2002; WILLIAMS, 2010).

3.5 Referências

ALMEIDA, A.C. *et al.* Caracterização da produção de queijo artesanal na região de Montes Claros, norte de Minas Gerais. **Acta Veterinária Brasília**, v.65, n.4, p.312-320, 2012.

ANDOH, A.; FUJIYAMA, Y. Therapeutic approaches targeting intestinal microflora in inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol.**, v.12, n.28, p.4452-4460, 2006.

ARAÚJO, R.A.B. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal da região de Araxá**. 2004. 121p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

ASAHARA, T. *et al.* Protective effect of *Lactobacillus casei* strain Shirota against lethal infection with multi-drug resistant *Salmonella enteric* serovar Typhimurium DT104 in mice. **Journal of Applied Microbiology**, v.110, p.163-173, 2010.

AXELSSON, L.T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. **New York: Marcel Dekker**, p.1-63, 1993.

BADARÓ, A.C.L. *et al.* Alimentos probióticos: aplicações como promotores de saúde humana – parte 1. **Nutrir Gerais** – Revista Digital de Nutrição, v.2, n.3, 2008.

BAPTISTA, I.P.C.; ACCIOLY, E.; PADILHA, P. C. Effect of the use of probiotics in the treatment of children with atopic dermatitis; a literature review. *Nutrition Hospitalaria*, v.28, n.1, p.16-26, 2013.

BEDANI R.; ROSSI, E.A. Microbiota intestinal e probióticos: Implicações sobre o câncer de cólon. **Journal Português de Gastroenterologia**, v.16, n.1, 2009.

BORELLI, B. M. **Caracterização das bactérias lácticas, leveduras e das populações de *Staphylococcus* enterotoxigênicos durante a fabricação do queijo Minas curado produzido na Serra da Canastra-MG.** 2006. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

BRANDT, K.; SAMPAIO, M.; MIUKI, C. Importance of the intestinal microflora. **Pediatria**, v.28, n.2, p.117-127, 2006.

BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283 de dezembro de 1950 e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. *Diário Oficial*, Brasília, DF, 29 mar. 2017. Cap. V, Seção II, Subseção III, pg 50.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 02, de 07 de janeiro de 2002. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF.

BRUNO, L.M.; CARVALHO, J.D.G. Microbiota láctica de queijos artesanais. Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, 2009. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/881123/1/Microbiotalactica.pdf>> Acesso em: 19 maio 2016.

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

COPPOLA, M.M.; TURNES, C.G. Probióticos e resposta immune. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1297-1303, 2004.

COSTA, G.N. *et al.* Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* frente a microorganismos patogênicos “in vitro”. **Ciências Agrárias**, v.33, n.5, p.1839-1846, 2012.

COSTA JÚNIOR, L.C.G. *et al.* Maturação do queijo Minas artesanal da microrregião Campo das vertentes e os efeitos dos períodos seco e chuvoso. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.69, n.2, p.111-120, 2014.

DAY, A.D.; KEENAN, J.I. Probiotic-mediated modulation of host inflammation. **Gastroenterology & Hepatology**, v.5, n.3, p.319, 2011.

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.

DURRIEU, C. *et al.* Immunomodulating effects water-soluble extracts of traditional French Alps cheeses on a human Tlymphocyte cell line. **International Dairy Journal**, v.16, n.12, p.1505-1514, 2006.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS – EMATER. Caracterização da microrregião do Alto Paranaíba como produtora tradicional de queijo Minas artesanal. Patos de Minas, MG. 2003. Disponível em: <<http://www.emater.mg.gov.br/>> Acesso em: 26 maio 2016.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS (EMATER). Programa do Queijo Minas Artesanal, 2014. Disponível em: <<http://www.emater.mg.gov.br/>> Acesso em: 26 maio 2016.

FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder Milk with live lactic acid bacteria. 2001. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>> Acesso em: 18 maio 2016.

FEITOSA, T. *et al.* Pesquisa de Salmonella sp. Listeria sp. E micro-organismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.162-165, 2003.

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

FURTADO, M.M. **Isolamento de bactérias lácticas de leite cru e soro de queijo de leite cru da região do Serro, Minas Gerais**. 1990. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1990.

GALLINA, D.A. *et al.* Caracterização de leites fermentados com e sem adição de probióticos e probióticos e avaliação da viabilidade de bactérias lácticas e probióticas durante a vida-de-prateleira. **UNOPAR Ciência Biologia e Saúde**, v.13, n.4, p.239-244, 2015.

GIBSON, G.R.; FULLER, R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics for human use. **The Journal of Nutrition**, v.130, p.391S-394S, 2000.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, v.361, n.9356, p.512-519, 2003.

HAVENAAR, R.; HUIS INT VELD, J.H.J. Probiotics: A general view. Amsterdam: Elsevier **Applied Science**, p.151-170, 1992.

INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Produtores de queijo Minas artesanal. Disponível em: http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_details/680-produtores-queijo-minas-artesanal-2017. Acesso em: 01 dezembro 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Serra do Salitre – Minas Gerais – Aspectos Históricos**, 2012. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=316680>> Acesso em: 10 junho 2016.

ISHIBASHI, N.; YAMAZAKI, S. Probiotics and safety. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.465S-470S, 2001.

KHALID, K. Na overview of lactic acid bacteria. **International Journal of Bioscience**, v.1, n.3, p.1-13, 2011.

LEE, Y.K.; SALMINEN, S. **Handbook of probiotics and prebiotics**. 1.ed. New York: John Wiley & Sons, 1999. 211 p.

LILLY, D.; STILLWELL, R.H. Probiotics growth – promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.147, p.747-748, 1965.

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

LUHULIMA, F.; KARYANA, I.P.G; SUMADIONO. Probiotic therapy on children with allergic rhinitis. **Paediatrica Indonesiana**, v.53, n.5, p. 264-267, 2013.

MARTINS, M.L.M. *et al.* Utilização de leveduras como probióticos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.5, p.1-13, 2005.

MINAS GERAIS. ASSEMBLÉIA LEGISLATIVA DO ESTADO DE MINAS GERAIS. Lei nº 20.549 de 18 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a produção e 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: 30 maio 2016.

MORAIS, M.B.; JACOB, C.M.A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Jornal de Pediatria**, Porto Alegre, 2006.

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

NÓBREGA, J.E. *et al.* Diferenças sazonais do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Minas artesanal, fabricado na Serra da Canastra, Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.63, n.363, p.26-30, 2008.

NOGUEIRA, V.C. **Culturas de bactérias lácticas com propriedades probióticas e tecnológicas para aplicação como bioconversantes**. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

OLIVEIRA, M.N. *et al.* Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.1, 2002.

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

PATRICK, O.M. Lactic acid bacteria in health and disease. **Rwanda Journal of Health Sciences**, v.1, n.1, p.39-50, 2012.

PINTO, M.S; MARTINS, J.M.; FERREIRA, C.L.L.F. Queijo Minas artesanal da região do Serro: Avaliação de *Staphylococcus aureus* e suas enterotoxinas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.59, n.339, p.336-338, 2004.

PINTO-SANCHEZ, M.I. *et al.* Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 reduces depression scores and alters brain activity: a pilot study in patients with irritable bowel syndrome. **Gastroenterology**, v.153, n.2, p.448-459, 2017.

PIRES, M.C.S. Produção artesanal do queijo do Serro. Fev. 2003. Disponível em: <http://www.mao.org.br/wp-content/uploads/pires_01.pdf> Acesso em: 25 maio 2016.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.*et al.* Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.13, p.3-11, 2002.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Antimicrobial activity of Basil (*Ocimum basilicum*) oil against *Salmonella Enteridis* in vitro and in food. **Food & Nutrition Science**, v.74, n.6, p.1200-1204, 2010.

REDONDO, N.C. **Avaliação *in vitro* de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus* SSP *jugurti* 416**. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição)- Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Araraquara, 2008.

REID, G.; MCGROARTY, J.A.; ANGOTTI, R.; COOK, R.L. *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 63, n.4, p.269-277, 2017.

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. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, p.1563-1573, 2011.

REZENDE, M.F.S. de. **Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra: Influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas**. 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2010.

RODRÍGUEZ, J.M. Probióticos: Del laboratorio al consumidor. **Nutrição Hospitalar**, v.31, n.1, p.33-47, 2015.

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

SAARELA, M. *et al.* Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, p.197-215, 2000.

SANDERS, M. E. Probiotics: Definition, Sources, Selection and Uses. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, n.2, p.S58-S61, 2008.

SANT'ANNA, F. M. de. ***Lactobacillus* e *Pediococcus* de silagem, água, leite, soro fermento endógeno e queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes: isolamento, identificação molecular, avaliações *in vitro* e *in vivo* do potencial probiótico**. 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

SANTOS, F.L. *et al.* Utilização de probióticos na redução da anemia ferropriva. **Diálogos e Ciência**, v.7, n.4, p.13-18, 2008.

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.

SLYKERMAN, R.F. *et al.* Effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 in pregnancy on postpartum symptoms of depression and anxiety: a randomized double-blind placebo-controlled trial. **EBioMedicine**, v.24, p.159-165, 2017.

SUÁREZ, J.E. Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. **Nutrição Hospitalar**, v.31, n.1, p.3-9, 2015.

TODESCATTO, C. **Obtenção de fermento láctico endógeno para produção de queijo típico da mesorregião sudoeste do Paraná**. 2014. 174f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)- Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2014.

VAARALA, O. Immunological effects of probiotics with special reference to Lactobacilli. **Clinical Exp. Allergy**, v.33, n.12, p.1634-1640, 2003.

VALSECHI, O.A. O leite e seus derivados. Tecnologia de produtos agrícolas de origem animal. Departamento de tecnologia agroindustrial e socioeconomia rural – Centro de ciências agrárias, UFSCAR, Araras – SP, 2001. Disponível em:<<http://www.cca.ufscar.br/~vico/O%20LEITE%20E%20SEUS%20DERIVADOS.pdf>> Acesso em: 26 maio 2016.

WILLIAMS, N. T. Probiotics. **American Journal of Health-System Pharmacy**, 2010.

ZHANG, F. *et al.* Beneficial effects of probiotic cholesterol-lowering strain of *Enterococcus faecium* WEFA23 from infants on diet-induced metabolic syndrome in rats. **J. Dairy Sci.**, v.100, p.1618-1628.

4 ARTIGO

Potencial probiótico *in vitro* de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo Minas artesanal da Serra do Salitre – MG

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

Potencial probiótico *in vitro* de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo Minas artesanal da Serra do Salitre – MG

***In vitro* probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from Minas artisanal cheese from Serra do Salitre – MG**

RESUMO

O potencial probiótico *in vitro* de seis amostras de *Lactobacillus* spp., isolados de queijos Minas artesanais da Serra do Salitre – MG, foi avaliado por meio de testes de antagonismo contra micro-organismos patogênicos e bactérias lácticas isoladas dos queijos, susceptibilidade a antimicrobianos e tolerância ao ácido gástrico e à sais biliares. Todas as amostras apresentaram efeito antagonista contra os micro-organismos patogênicos testados, sendo *E. coli* e *S. aureus* mais inibidos e a inibição contra *Lactobacillus* spp. foi discreta ou ausente. Todas as amostras foram resistentes a cefoxitina e vancomicina e sensíveis a amoxicilina, ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina. As amostras *L. plantarum* (L1 e L2) foram consideradas tolerantes ao ácido gástrico (pH 2.0) e as amostras *L. paracasei* (C2) e *L. plantarum* (L1) foram consideradas tolerantes à presença de sais biliares (0,3%). Todas as amostras avaliadas podem também contribuir para a redução de micro-organismos indesejáveis em queijos artesanais. A capacidade de transmissão de genes de resistência deve ser analisada para que os micro-organismos estudados sejam considerados seguros. A amostra L1 apresentou o melhor potencial probiótico por ser tolerante a presença de ácido gástrico e sais biliares artificiais, sendo necessários testes *in vivo* para confirmar tal potencial.

Palavras-chave: bactérias ácido-láticas, micro-organismos benéficos, promotores da saúde, segurança alimentar

ABSTRACT

The *in vitro* probiotic potential of six samples of *Lactobacillus* spp., isolated from Minas artisanal cheese from Serra do Salitre – MG, was evaluated by tests of antagonism against pathogenic microorganisms and lactic acid bacteria isolated from the cheeses, antimicrobial susceptibility and tolerance to gastric acid and bile salts. All the samples showed antagonist effect against the pathogenic microorganisms tested, being *E. coli* and *S. aureus* more inhibited and the inhibition against *Lactobacillus* spp. was discreet or absent. All samples were resistant to cefoxitin and vancomycin and sensitive to amoxicillin, ampicilin, chloramphenicol and tetracycline. The samples *L. plantarum* (L1 e L2) were tolerant to gastric acid (pH 2.0) and *L. paracasei* (C2) and *L. plantarum* (L1) were tolerant in presence of bile salts (0,3%). All the evaluated samples can contribute in reduction of undesirable microorganisms in artisanal cheeses. The capacity of resistance gene transmission must be analysed in order to consider the studied microorganisms safe. The sample L1 presented the best probiotic potential due to the tolerance in presence of gastric acid and artificial bile salts, being necessary *in vivo* tests to confirm this potential.

Keywords: lactic acid bacteria, beneficial microorganisms, health promoters, food security

INTRODUÇÃO

O queijo Minas artesanal (QMA) é um produto de origem secular, fabricado de maneira única por pequenos produtores rurais em sete regiões do estado de Minas Gerais e representa importante fonte de renda para estas famílias (Costa Júnior *et al.*, 2014).

A utilização de leite cru e adição do soro-fermento, oriundo do queijo fabricado no dia anterior, contribuem para que o QMA possua uma microbiota complexa e diversificada, composta principalmente por bactérias ácido-láticas (BAL), que produzem compostos responsáveis pela formação do sabor e aroma típicos dos queijos de cada região (Lima *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2013).

Além disso, algumas BAL são capazes de tolerar a exposição ao ácido gástrico, enzimas e sais biliares, chegando viáveis ao fim do trato gastrointestinal. No intestino, a não patogenicidade, a capacidade de produzir compostos antimicrobianos, bacteriocinas, a competição com outros micro-organismos por sítios de adesão e nutrientes, o estímulo da imunidade (Oliveira *et al.*, 2002; Saad, 2006), dentre outras atividades, beneficiam a saúde do hospedeiro e as qualificam como possíveis probióticos, sendo que, para constatar tal propriedade, são necessárias diversas análises *in vitro* e *in vivo*.

Uma vez que as espécies microbianas presentes nos QMA são variáveis entre as regiões, a busca por micro-organismos com características funcionais nos queijos de cada região torna-se necessária para o desenvolvimento de produtos seguros, de qualidade, que mantenham sua especificidade. O efeito benéfico exercido é dependente da espécie, portanto, quanto maior o número de amostras microbianas isoladas e testadas, maiores são as chances de se encontrar amostras probióticas.

Nesta pesquisa o objetivo foi avaliar o potencial probiótico *in vitro* de *Lactobacillus* spp., isolados do QMA da Serra do Salitre (MG), por meio de testes de antagonismo contra micro-organismos patogênicos, susceptibilidade a antimicrobianos e tolerância ao ácido gástrico e a sais biliares artificiais.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento e identificação de *Lactobacillus* spp.

Foram utilizadas neste estudo seis amostras de *Lactobacillus* spp., provenientes de queijos Minas artesanais da Serra do Salitre (MG), com 21 e 28 dias de maturação à temperatura ambiente nas queijarias onde foram produzidos. O isolamento das bactérias foi realizado conforme Resende *et al.* (2011). As colônias com aspectos típicos de bactérias ácido-láticas (BAL) – cocos ou bastonetes, Gram-positivo e catalase negativo – foram conservadas a -20°C, em microtubos estéreis contendo solução de MRS (*Difco*, Detroit, Estados Unidos) adicionada de glicerina (20%). A identificação proteômica das amostras foi realizada pela técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF (Dec *et al.*, 2016). Ao final, duas amostras de *Lactobacillus paracasei* (C1 e C2), duas de *Lactobacillus plantarum* (L1 e L2) e duas de

Lactobacillus rhamnosus (R1 e R2) foram selecionadas para os testes de propriedades probióticas *in vitro*.

Antagonismo *spot on the lawn*

O teste de antagonismo “spot on the lawn” foi realizado conforme técnica adaptada relatada por Tagg *et al.* (1976), em triplicata com duas repetições. As seis amostras identificadas, denominadas culturas produtoras, foram testadas quanto à capacidade antagonista contra micro-organismos patogênicos, denominados culturas reveladoras: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 13076, *Shigella flexneri* ATCC 12022 e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 13076. As BAL e os patógenos foram ativados em tubos contendo caldo MRS (*Difco*) e BHI (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), respectivamente.

No centro da superfície de placas de Petri contendo ágar MRS (*Difco*) foram inoculados 5µL de suspensão de cada amostra e incubou-se a 37°C por 48h em aerobiose, formando os *spots*. Posteriormente, um mL de clorofórmio foi colocado nas tampas das placas, que foram expostas à luz UV por 30 minutos para eliminar as BAL, mantendo apenas substâncias produzidas que se difundiram no ágar. Em seguida, 3,5mL de ágar semissólido contendo 10µL de cada bactéria reveladora supracitada foram vertidos nas placas contendo os *spots*, e após a solidificação, incubou-se a 37°C/24h em aerobiose. A leitura dos halos de inibição foi realizada com paquímetro digital (Mitutoyo Digimatic Caliper). Os resultados foram submetidos à análise estatística paramétrica e o teste de Scott-Knott foi aplicado ao nível de 5% de significância no programa SAEG.

Simultaneamente, foi testado o antagonismo entre os *Lactobacillus* spp. isolados do próprio queijo. Para isso, as amostras *L. paracasei* (C1) e *L. rhamnosus* (R1) foram utilizadas como culturas reveladoras para avaliar possíveis inibições contra as culturas produtoras. O experimento foi conduzido da maneira supracitada e os resultados foram submetidos à análise descritiva.

Susceptibilidade antimicrobiana

O antibiograma foi conduzido em triplicata com duas repetições, conforme preconizado por Charteris *et al.* (1998a). As BAL selecionadas foram ativadas em tubos contendo ágar MRS (*Difco*, Detroit, Estados Unidos). Uma alíquota foi transferida para tubos contendo 3,5mL de salina 0,9% (0,9% NaCl) até atingir 0,5 na escala *McFarland* (aproximadamente 10⁸ UFC/mL). Swabs foram imersos nos tubos e espalhados em placas de Petri grandes tipo pizza 150x15 contendo ágar MRS (*Difco*). Em seguida, discos contendo os antimicrobianos (concentrações padrão de cada droga): amoxicilina (30µg), ampicilina (10µg), cefoxitina (30µg), ceftriaxona (30µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), estreptomicina (30µg), gentamicina (10µg), penicilina (10µg), tetraciclina (30µg) e vancomicina (30µg) foram distribuídos nas placas de maneira equidistante, que foram incubadas a 37°C por 24h. O controle de qualidade dos discos foi feito utilizando amostras de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Os halos de inibição foram medidos com paquímetro digital (Mitutoyo Digimatic Caliper)

e, de acordo com o diâmetro médio, as amostras foram classificadas qualitativamente em resistentes, moderadamente sensíveis e sensíveis aos antimicrobianos, conforme Charteris *et al.* (1998a) (Apêndice A).

Tolerância ao ácido gástrico e a sais biliares

Os testes de tolerância ao ácido gástrico e a sais biliares foram conduzidos em triplicata com duas repetições, de acordo com o protocolo de Walker e Gilliland (1993), adaptado para microplacas de ELISA com 96 poços. Para a análise da tolerância ao ácido gástrico, as amostras foram cultivadas duas vezes em caldo MRS (Difco) e distribuídas em microtubos *Eppendorf* contendo solução salina 0,9% em pH 7 (controle) e pH 2 (suco gástrico artificial), que foram incubados a 37°C/3h e centrifugados 5000g/5min. Os pellets foram suspensos em caldo MRS (*Difco*) e 200µL do controle e 200µL das culturas tratadas com suco gástrico artificial foram aplicados em poços de uma microplaca de ELISA, que foi incubada em espectrofotômetro (Microplate Spectrophometer, SpectraMax 340) a 37° por 12 horas, sendo feita a leitura de OD_{620nm} a cada 30 minutos. O pH gástrico foi obtido adicionando ácido clorídrico (HCl) e medindo o pH em pHmetro digital de bancada (mPA-210, Piracicaba, São Paulo, Brasil) até chegar ao valor desejado. As áreas sob as curvas de crescimento foram calculadas no programa Graphpad Prism 6.0 e o percentual de inibição foi calculado pela fórmula $((1-(SG/CT)) \times 100$ no programa Excel, sendo que SG e CT correspondem às áreas sob a curva de crescimento das bactérias tratadas com suco gástrico e controle, respectivamente.

No teste de tolerância a sais biliares não foram feitas as etapas de incubação prévia por três horas e centrifugação. As culturas foram alocadas em poços de uma microplaca de ELISA com 96 poços em presença de caldo MRS (*Difco*, Detroit, Estados Unidos) puro (controle) e acrescido de 0,3% de Oxgall (*Difco*, Detroit, Estados Unidos). O cálculo do percentual de inibição foi feito pela fórmula supracitada, utilizando os valores das curvas de crescimento em sais biliares (SB) em substituição a SG e controle obtidos. As amostras foram classificadas de acordo com o critério proposto por Acurcio (2011): percentual de inibição inferior a 40% - amostra tolerante – percentual de inibição entre 40 e 80% - amostra moderadamente tolerante – percentual de inibição superior a 80% - amostra sensível para os dois testes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras de *Lactobacillus* spp. avaliadas formaram halos de inibição expressivos contra os patógenos testados (Tab. 1). A amostra de BAL que apresentou maior média dos halos de inibição variou de acordo com a cultura reveladora, uma vez que a interação entre os fatores *Lactobacillus* spp. e patógeno foi significativa a 5%. Entretanto, para cinco das seis amostras, os maiores halos de inibição foram formados contra *E. coli* e *S. aureus* (Tab. 1).

Tabela 1. Médias dos halos de inibição (mm) do teste de antagonismo *in vitro* de *Lactobacillus* spp., isolados de queijos Minas artesanais da Serra do Salitre – MG, contra patógenos, em triplicata com duas repetições

Culturas Produtoras	Culturas reveladoras			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>Salmonella</i> <i>enterica</i> serovar Typhimurium
<i>L. paracasei</i> (C1)	47,59 Ac	50,47 Aa	32,70 Cd	38,09 Bc
<i>L. paracasei</i> (C2)	50,09 Aa	46,80 Bc	30,16 De	37,87 Cd
<i>L. plantarum</i> (L1)	44,47 Ad	39,83 Bf	26,09 Df	32,96 Cf
<i>L. plantarum</i> (L2)	49,11 Ab	48,10 Bb	35,09 Ca	34,70 De
<i>L. rhamnosus</i> (R1)	37,45 Cf	39,94 Ae	34,48 Dc	39,10 Ba
<i>L. rhamnosus</i> (R2)	40,37 Be	42,32 Ad	34,85 Db	38,27 Cb

Coefficiente de variação - 12,86%

Legenda: Médias seguidas por letras distintas, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ($p < 0,05$).

O coeficiente de variação entre as amostras foi de 12,86%. A diferença entre os tamanhos dos diâmetros dos halos formados pode ser explicada pela maior ou menor quantidade de substâncias inibidoras difundidas e presentes no meio, como bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (Chioda *et al.*, 2007).

A ação inibitória de *Lactobacillus* spp. e outras BAL contra patógenos verificada nesta pesquisa e em outros estudos (Acurcio, 2011; Alvim, 2011; Costa *et al.*, 2013; Cunha *et al.*, 2013; Melgar-Lallane *et al.*, 2013; Andrade *et al.*, 2014), aponta o potencial de utilização dessas bactérias lácticas no controle de micro-organismos indesejáveis em queijos artesanais e outros produtos. Além disso, os bons resultados apresentados por essas amostras as torna alvo de futuros estudos do efeito antagonico *in vivo*, visando a propriedade probiótica de beneficiar o hospedeiro ao inibir patógenos no intestino.

O principal fator responsável pela inibição de outros micro-organismos protagonizada pelas BAL está relacionado à produção significativa de ácido láctico a partir da fermentação de carboidratos realizada por essas bactérias (Gómez *et al.*, 2000). O ácido láctico e outros ácidos orgânicos como o ácido butírico, propiônico e acético proporcionam efeito bacteriostático alterando o metabolismo bacteriano pela redução do pH do meio, contribuindo para a

multiplicação de espécies do gênero *Lactobacillus* e inibição de patógenos (Gómez *et al.*, 2000; Chioda *et al.*, 2007).

Entretanto, Stecchini *et al.* (1991) concluíram que, ao longo de dez dias de maturação de um tipo de queijo italiano produzido com leite cru, amostras de *L. plantarum* foram capazes de reduzir metade da população inicial de *Salmonella* Typhimurium alterando levemente o pH, demonstrando que a inibição não foi devida a produção de ácidos. Além dos ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e bacteriocinas são produzidos pelas BAL (Gomes e Malcata, 1999), auxiliando na inibição microbiana.

Diferentemente do presente estudo, Costa *et al.* (2013) testaram o antagonismo de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra contra patógenos e a menor média dos halos foi formada contra *S. aureus*. Em um dos poucos estudos envolvendo antagonismo de BAL contra *Shigella flexneri*, Guedes Neto *et al.* (2005) também observaram expressivos halos de inibição formados por *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp. contra esse patógeno.

Dentro do corpo do hospedeiro, o antagonismo protagonizado por micro-organismos probióticos depende da auto-agregação e co-agregação, características que não foram avaliadas no presente trabalho. A capacidade de agregação permite a adesão à superfície das células epiteliais, garantindo a ação contra invasores patogênicos e a imunomodulação do organismo (Grigoryan *et al.*, 2017). Grigoryan *et al.* (2017), verificaram que as amostras *L. helveticus* INRA-2010-H11 e *L. acidophilus* JM-2012 apresentaram propriedades de agregação, com consequente adesão às células epiteliais do intestino e modificação da microbiota de camundongos, demonstrando efeito benéfico relacionado ao equilíbrio microbiano.

As amostras produtoras *L. paracasei* (C1) e *L. rhamnosus* (R1) foram utilizadas também como culturas reveladoras para avaliar possíveis atividades inibitórias entre os *Lactobacillus* spp. presentes no queijo Minas artesanal da Serra do Salitre. Apenas as culturas produtoras *L. paracasei* (C1) e *L. plantarum* (L1) formaram halos de inibição contra *L. rhamnosus* (R1), sendo seus valores médios de 2,68 e 5,92 mm, respectivamente.

O resultado do antagonismo entre as amostras avaliadas nesta pesquisa corrobora outros estudos, que encontraram pequenos halos formados entre BAL (Guedes Neto *et al.*, 2005, Costa *et al.*, 2013; Andrade *et al.*, 2014). A ausência ou pequeno halo formado sugere que as BAL presentes nos queijos não estão em competição e, portanto, atuam em harmonia para o desenvolvimento das características dos queijos. Costa *et al.* (2013) ressaltaram que o uso dessas bactérias em conjunto pode aumentar a atividade inibitória contra micro-organismos indesejáveis.

A resistência a antimicrobianos torna-se um problema devido ao possível risco de transferência de genes de resistência por parte de um micro-organismo potencialmente probiótico para micro-organismos patogênicos nos alimentos ou no intestino, sendo necessárias análises *in vitro* (Gueimonde *et al.*, 2013), antes de assegurar seu uso.

No antibiograma, todas as amostras de BAL analisadas foram resistentes a cefoxitina e vancomicina (Tab. 2). Outros estudos também reportaram resistência de *Lactobacillus* spp. à vancomicina (Charteris *et al.*, 1998a; Costa *et al.*, 2013; Andrade *et al.*, 2014). Algumas espécies de *Lactobacillus* realizam a substituição da d-alanina na parede celular, que seria ligada à vancomicina e impediria a polimerização de precursores de peptidoglicanos, por d-lactato ou d-serina (Gueimonde *et al.*, 2013), sendo uma possível explicação para a resistência intrínseca a esse antimicrobiano.

Tabela 2. Médias dos halos de inibição (mm), do teste de sensibilidade a antimicrobianos de *Lactobacillus* spp., isolados de queijo Minas artesanal da Serra do Salitre – MG, em triplicata com duas repetições

Amostra	Antimicrobiano										
	AMO	AMP	CFO	CRO	CIP	CLO	S	GN	PEN	TE	VA
<i>L. paracasei</i> (C1)	30,94	25,05	0,0	19,06	20,64	34,69	0,0	11,04	34,60	29,15	0,0
	S	S	R	MS	S	S	R	R	S	S	R
<i>L. paracasei</i> (C2)	28,82	27,12	0,0	14,17	24,82	33,10	9,84	12,50	32,56	33,72	0,0
	S	S	R	MS	S	S	R	R	S	S	R
<i>L. plantarum</i> (L1)	36,03	45,63	10,05	33,55	10,71	28,88	12,87	15,61	22,94	26,56	0,0
	S	S	R	S	R	S	MS	S	MS	S	R
<i>L. plantarum</i> (L2)	38,45	29,29	7,00	36,00	10,54	28,86	10,33	14,71	33,25	24,31	0,0
	S	S	R	S	R	S	R	S	S	S	R
<i>L. rhamnosus</i> (R1)	31,15	32,09	0,0	23,01	26,57	36,10	12,79	13,66	36,23	36,88	0,0
	S	S	R	S	S	S	MS	S	S	S	R
<i>L. rhamnosus</i> (R2)	31,18	28,55	0,0	10,36	28,54	32,58	13,61	13,82	30,20	37,41	7,64
	S	S	R	R	S	S	MS	S	S	S	R

Legenda: AMO – amoxicilina (30µg), AMP – ampicilina (10 µg), CFO – cefoxitina (30 µg), CRO – ceftriaxona (30 µg), CIP – ciprofloxacina (5 µg), CLO – cloranfenicol (30 µg), S – estreptomicina (30 µg), GN – gentamicina (10 µg), PEN – penicilina (10 µg), TE – tetraciclina (30 µg), VA – vancomicina (30 µg). R = resistente; MS = moderadamente sensível; S = sensível.

Todas as amostras foram sensíveis a amoxicilina, ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina (Tab. 2). Charteris *et al.* (1998a), Costa *et al.* (2013) e Andrade *et al.* (2014) verificaram sensibilidade

a tetraciclina em todas as amostras de *Lactobacillus* spp. testadas. Assim como no presente trabalho, Charteris *et al.* (1998a) observaram a sensibilidade de todas as amostras de *Lactobacillus* spp. ao cloranfenicol.

De modo geral, *Lactobacillus* spp. são sensíveis às penicilinas e apresentam mais resistência às cefalosporinas (Gueimonde *et al.*, 2013). Entretanto, no presente estudo, a amostra *L. plantarum* (L1) apresentou moderada sensibilidade a penicilina e a maioria das amostras foi sensível a ceftriaxona.

A amostra *L. rhamnosus* (R1) apresentou maior sensibilidade aos antimicrobianos testados, sendo resistente apenas à ceftioxima e vancomicina. *L. paracasei* (C1 e C2) apresentaram comportamento semelhante no antibiograma, sendo resistentes aos mesmos quatro antimicrobianos (ceftioxima, estreptomicina, gentamicina e vancomicina) e, juntamente com *L. plantarum* (L2), foram as amostras resistentes a um maior número de antimicrobianos.

Todas as amostras apresentaram resistência a pelo menos dois antimicrobianos, fazendo-se necessário o estudo do genótipo dessas bactérias, para verificar se a resistência é intrínseca ou adquirida, sendo esta última de maior risco de ser transmitida a outros micro-organismos (Anadón *et al.*, 2005) e um agravante a ser considerado quanto à segurança do uso dessas amostras.

Micro-organismos potencialmente probióticos devem permanecer viáveis durante a passagem pelo trato gastrointestinal e aderir às células epiteliais no intestino para exercer efeitos benéficos (Melgar-Lalanne *et al.*, 2013). A secreção de ácido clorídrico e enzimas no estômago é a primeira barreira contra a entrada de bactérias, onde o pH atinge o menor valor (Morelli *et al.*, 2000).

Tabela 3. Percentual de inibição de amostras de *Lactobacillus* spp., isolados de queijo Minas artesanal da Serra do Salitre, após 12 horas de incubação na presença de ácido gástrico (pH 2,0) e sais biliares (0,3%) a 37 °C, em triplicata com duas repetições

Amostras	Inibição pH gástrico (%)	Inibição sais biliares (%)
<i>L. paracasei</i> (C1)	64,62	43,73
<i>L. paracasei</i> (C2)	47,60	35,20
<i>L. plantarum</i> (L1)	0,0	9,05
<i>L. plantarum</i> (L2)	4,08	45,39
<i>L. rhamnosus</i> (R1)	22,84	76,16
<i>L. rhamnosus</i> (R2)	77,44	48,31

Percentual de inibição (PI) = $(1 - (\text{SG ou SB/CT})) \times 100$

Legenda: SG= área sob a curva das bactérias tratadas com suco gástrico ou sais biliares; CT= área sob a curva das bactérias tratada com MRS.

Devido a produção de ácido láctico realizada por BAL e condição de baixos valores de pH durante a fabricação dos queijos dos quais foram isoladas (Resende *et al.*, 2011), era esperado que as amostras apresentassem tolerância à condição ácida. Entretanto, metade das amostras não foi tolerante a presença de ácido gástrico artificial (Tab. 3), de acordo com o critério de Acurcio (2011).

Lactobacillus plantarum (L1 e L2) e *L. rhamnosus* (R1) foram considerados tolerantes a presença de ácido gástrico (pH 2) e as curvas de crescimento geradas por essas amostras estão ilustradas nos Apêndices B, C e D. *L. paracasei* (C1 e C2) e *L. rhamnosus* (R2) foram considerados moderadamente sensíveis ao ácido gástrico.

O presente experimento utilizou pH próximo a condições de jejum (pH 2.0) para selecionar amostras de melhor desempenho, representando um estresse maior aos micro-organismos. Durante a ingestão de alimentos, o pH do estômago pode chegar a 4.5, aumentando as chances de sobrevivência microbiana (Melgar-Lalanne *et al.*, 2013).

Diversos estudos observaram resistência de BAL a condições de baixo pH (Meira *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2013; Cunha *et al.*, 2013; Melgar-Lalanne *et al.*, 2013; Andrade *et al.*, 2014). BAL são capazes de tolerar meio com elevada acidez por meio da manutenção da homeostase do pH intracelular, da funcionalidade da membrana celular e da regulação positiva das proteínas de resposta ao estresse (Lebeer *et al.*, 2008).

Juntamente com a resistência em condições de acidez, a sobrevivência tanto *in vitro* quanto *in vivo*, na presença de sais biliares, que são nocivos à membrana e estrutura do DNA bacteriano,

é importante critério utilizado na seleção de bactérias potencialmente probióticas (Morelli *et al*, 2000; Merrit e Donaldson, 2009).

Assim como no teste de tolerância ao ácido gástrico, o percentual de inibição foi utilizado para classificar as amostras de acordo com o critério de Acúrcio (2011). *L. paracasei* (C2) e *L. plantarum* (L1) foram considerados tolerantes a presença de sais biliares artificiais (0,3%) e as curvas de crescimento dessas amostras estão ilustradas nos anexos E e F. *L. paracasei* (C1), *L. plantarum* (L2) e *L. rhamnosus* (R1 e R2) foram considerados moderadamente tolerantes (ou moderadamente sensíveis) (Tab. 3).

A classificação distinta entre bactérias de mesma espécie também ocorreu no estudo de Alvim (2011), demonstrando que a capacidade de resistir ao *Oxgall* está relacionada com a linhagem do micro-organismo (Morelli *et al*, 2000). A variação das inibições apresentadas pelas amostras no teste de tolerância a sais biliares *in vitro* também ocorreu no trabalho de Costa *et al.* (2013). Entretanto, os autores concluíram que até as amostras com maior percentual de inibição continuaram viáveis ao final do período de incubação avaliado.

Micro-organismos considerados probióticos sofrem redução em suas contagens, mesmo que em menor grau, na presença de sais biliares (Vinderola e Reinheimer, 2002), fato que explica a necessidade de se estabelecer a quantidade mínima a ser ingerida para que esse grupo forneça os benefícios ao hospedeiro.

A tolerância aos sais biliares protagonizada por bactérias probióticas pode estar relacionada à produção de enzimas do grupo sal biliar hidrolase, que catalizam a reação de desconjugação do sal biliar. Essa desconjugação também contribui para a redução do colesterol do hospedeiro (Begley *et al.*, 2006; Ballus *et al.*, 2010).

Melgar-Lalanne *et al.* (2013), após simularem *in vitro* a passagem de amostras bacterianas isoladas de queijo e amostras comerciais de origem humana (*L. casei* Shirota e *L. plantarum* 299v) pelo trato gastrointestinal *in vitro*, em condições semelhantes a passagem pela boca até a chegada ao íleo. Os autores constataram que a origem do micro-organismo perde a importância diante de características intrínsecas que caracterizam bactérias probióticas.

Além disso, a maioria dos micro-organismos probióticos é veiculada pelo consumo de produtos alimentícios, que podem auxiliar a passagem pelo trato gastrointestinal, mantendo sua sobrevivência, crescimento e viabilidade (Meira *et al.*, 2010).

CONCLUSÕES

A inibição verificada no teste de antagonismo sugere que as seis amostras de *Lactobacillus* spp. isolados do queijo Minas artesanal da Serra do Salitre – MG podem contribuir para a redução de micro-organismos indesejáveis presentes nesses queijos.

A resistência a antimicrobianos apresentada por todas as amostras gera preocupação quanto à possível capacidade de transmissão de genes de resistência a micro-organismos patogênicos, sendo necessário analisar os potenciais riscos desses *Lactobacillus* spp.

A amostra *L. plantarum* (L1) apresentou tolerância na presença de ácido gástrico e sais biliares artificiais, sendo a amostra com o maior potencial probiótico *in vitro* testada neste trabalho. Futuros estudos *in vivo* devem ser conduzidos para caracterizá-la probiótica.

REFERÊNCIAS

- ACURCIO, 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.
- ALVIM, L.B. *Identificação molecular e seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico isoladas de diferentes mucosas de suínos*. 2011. 76f. Dissertação (Mestrado em genética) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ANADÓN, A.; ABROIX, M.; BORIES, G. *et al.* Opinion of the FEEDAP Panel on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *The EFSA Journal*, v.223, p.1-12, 2005.
- 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. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.5, p.1592-1600, 2014.
- 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.
- BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C.G.M. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl. Environ. Microb.*, v.72, n.3, p.1729-1738, 2006.
- CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L. COLLINS, K. Antibiotic susceptibility of potential probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food Protect.*, v.61, p.1636-1643, 1998.
- CHIODA, T.P.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; GARCIA, G.R. *et al.* Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de queijo “Minas Frescal” por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciênc. Rural*, v.37, n.2, p.583-585, 2007.
- 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. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, n.6, p.1858-1866, 2013.
- COSTA JÚNIOR, L.C.G.; MORENO, V.J.; MAGALHÃES, F.A.R. *et al.* Maturação do queijo Minas artesanal da microrregião Campo das Vertentes e os efeitos dos períodos seco e chuvoso. *Rev. Inst. de Laticínios Cândido Tostes*, v.69, n.2, p.111-120, 2014.
- CUNHA, A.F.; ACURCIO, L.B.; ASSIS, B.S. *et al.* *In vitro* probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from fermented milks. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, n.6, p.1876-1882, 2013.
- DEC, M.; PUCHALSKI, A.; URBAM-CHEMIEL, R. *et al.* 16S-ARDRA and MALDI-TOF mass spectrometry as tools for identification of *Lactobacillus* bacteria isolated from poultry. *BMC Microbiology*, v. 16, 2016.

- GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Food Sci. & Technol. Int.*, v.10, p.139-157, 1999.
- GOMEZ, J.M.R.; SUÁREZ, A.M.; CORBACHO, J.M.C. *et al.* Las bacteriocinas de las bacterias lácticas 1: Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. *Alimentaria*, v.37, p.59-66, 2000.
- GRIGORYAN, S.; BAZUKYAN, A.; TRCHOUNIAN, A. Aggregation and adhesion activity of Lactobacilli isolated from fermented products in vitro and in vivo: a potential probiotic strain. *Probiotics and antimicrobial proteins*, p.1-8, 2017.
- GUEDES NETO, L.G.; SOUZA, M.R.; NUNES, A.C. *et al.* Atividade antimicrobiana de bacterias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a micro-organismos indicadores. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, supl.2, p.245-250, 2005.
- GUEIMONDE, M.; SANCHEZ, B.; REYES-GAVILÁN, C.G. de los; MARGOLLES, A. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Front Microbiol.*, v.202, n.4, 2013.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; de KEERSMAECKER, S.C.J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol.*, n.72, v.4, p728-764, 2008.
- LIMA, C.D.L.C.; LIMA, L.A.; CERQUEIRA, M.M.O.P. *et al.* Bacterias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 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 bacterias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha. *Braz. Jour. Food. Technol.*, n.12, p.75-80, 2010.
- MELGAR-LALANNE, G.; RIVERA-ESPINOZA, Y.; MENDEZ, A.I.R.; SANCHEZ, H.H. In vitro Evaluation of the probiotic potential of halotolerant Lactobacilli Isolated from a Ripened Tropical Mexican Cheese. *Probiotic & Antimicro. Prot.*, v.5, p.239-251, 2013.
- MERRIT, M.E.; DONALDSON, J.R. Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. *J. Med. Microb.*, v.58, p.1533-1541, 2009.
- MORELLI, L. In vitro Selection of probiotic Lactobacilli: A Critical Appraisal. *Curr. Iss. Mol. Biol.*, v.1, n.2, p.59-67, 2000.
- OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.38, n.1, p.1-21, 2002.
- 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 bacterias acido-lácticas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, p.1563-1573, 2011.
- SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.1, p.1-16, 2006.
- STECCHINI, M.L. SARAIS, I.; BERTOLDI, M. de. The influence of *Lactobacillus plantarum* culture inoculation on the fate of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* in Montasio cheese. *Int. J. Food Microb.*, v.14, p.99-110, 1991.

TAGG, J.R.; DAJAMI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocin of Gram positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, v.40, n.3, p. 772-756, 1976.

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

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

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A amostra *L. plantarum* (L1) obteve os melhores resultados nos testes para avaliação do potencial probiótico de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos Minas artesanais da Serra do Salitre (MG). Futuros estudos *in vivo* devem ser desenvolvidos, a fim de confirmar os possíveis benefícios que essa amostra pode proporcionar ao hospedeiro, podendo ser utilizada na produção de queijos artesanais e outros produtos, que seriam caracterizados funcionais, promotores da saúde.

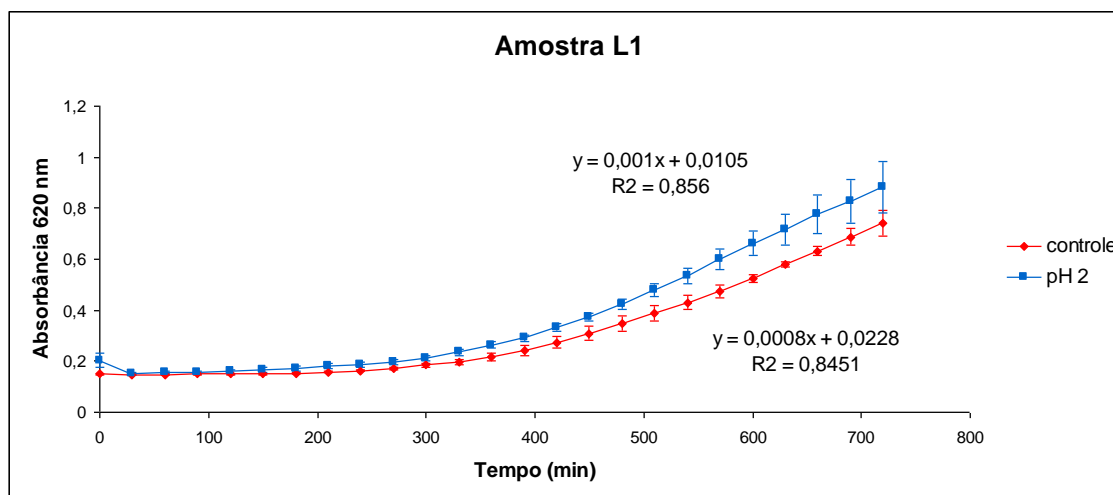
APÊNDICES

APÊNDICE A – Níveis de susceptibilidade de *Lactobacillus* spp. a antimicrobianos de acordo com a média dos diâmetros dos halos de inibição (mm) em teste de difusão em ágar MRS (Difco), em triplicata com duas repetições

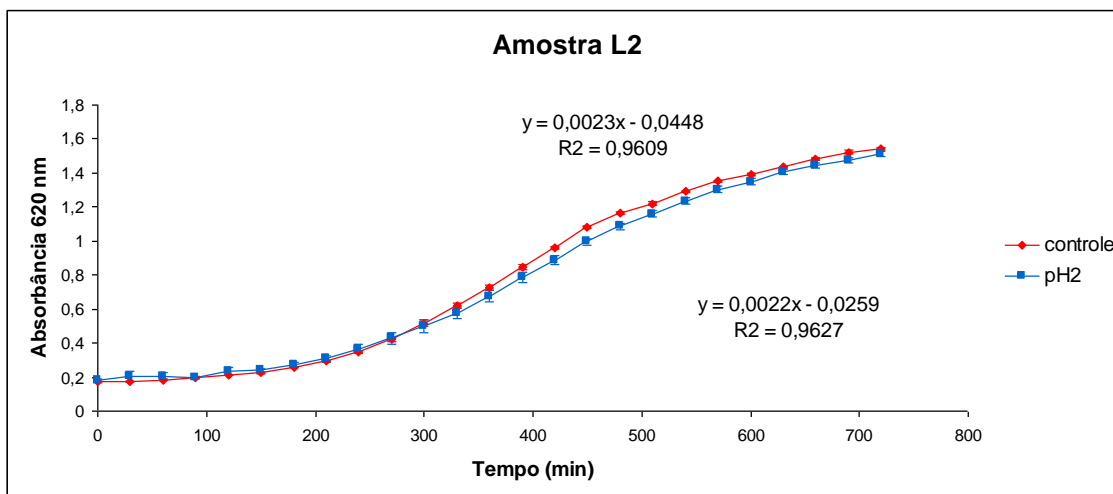
Nome	Concentração (µg)	Nível de Susceptibilidade		
		Resistente	Moderadamente sensível	Sensível
Amoxicilina	10	≤18	19-20	≥21
Ampicilina	30	≤12	13-15	≥16
Cefoxitina	30	≤14	15-17	≥18
Ceftriaxona	30	≤13	14-20	≥21
Ciprofloxacina	5	≤13	14-18	≥19
Cloranfenicol	30	≤13	14-17	≥18
Estreptomicina	10	≤11	12-14	≥15
Gentamicina	10	≤12	-	≥13
Penicilina	10	≤19	20-27	≥28
Tetraciclina	30	≤14	15-18	≥19
Vancomicina	30	≤14	15-16	≥17

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

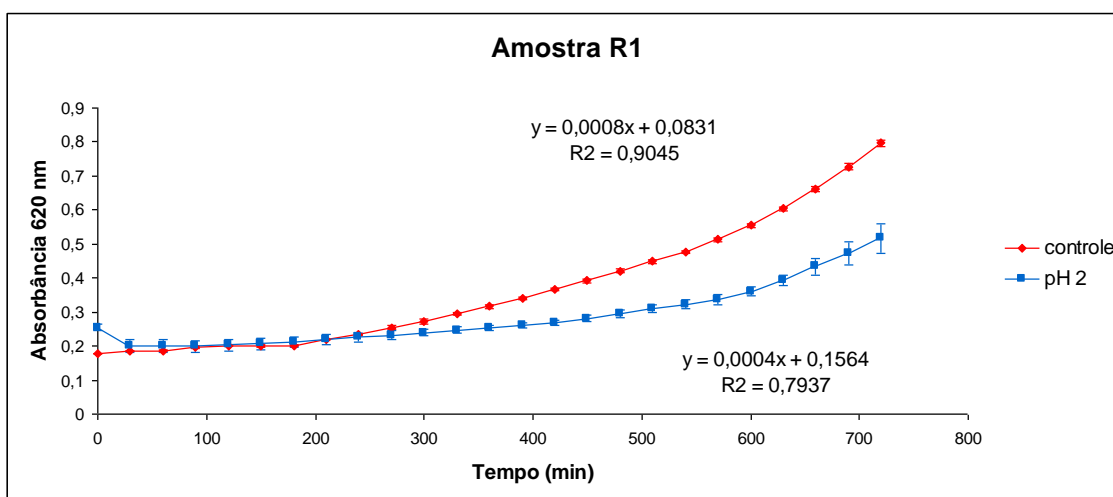
APÊNDICE B – Curvas de crescimento da amostra *L. plantarum* (L1), incubada a 37°C em caldo MRS em pH 2.0 e 7.0 durante 12 horas, em triplicata com duas repetições



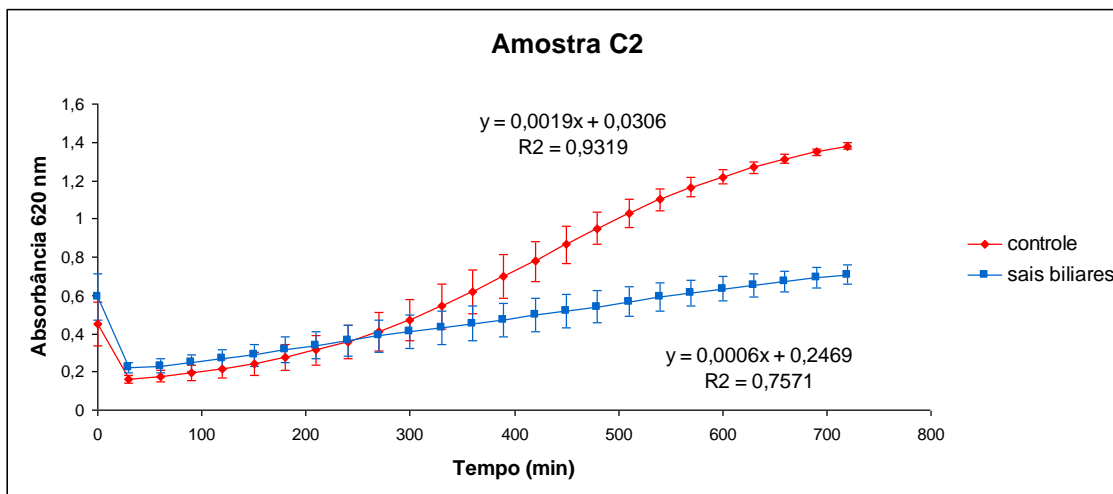
APÊNDICE C – Curvas de crescimento da amostra *L. plantarum* (L2), incubada a 37°C em caldo MRS em pH 2.0 e 7.0 durante 3 horas, em triplicata com duas repetições



APÊNDICE D – Curvas de crescimento da amostra *L. rhamnosus* (R1), incubada a 37°C em caldo MRS em pH 2.0 e 7.0 durante 3 horas, em triplicata com duas repetições



APÊNDICE E – Curvas de crescimento da amostra *L. paracasei* (C2), incubada a 37°C em caldo MRS puro e acrescido por *Oxgall* (0,3%), durante 12 horas, em triplicata com duas repetições



APÊNDICE F – Curvas de crescimento da amostra *L. plantarum* (L1), incubada a 37°C em caldo MRS puro e acrescido por *Oxgall* (0,3%), durante 12 horas, em triplicata com duas repetições

