

**FELIPE MACHADO DE SANT'ANNA**

***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**

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

Área: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Orientador: Marcelo Resende de Souza

Co-orientadora: Andréia Marçal da Silva

Belo Horizonte

Escola de Veterinária

2015

S2321 Sant'Anna, Felipe Machado de, 1985-  
Lactobacillus e Pediococcus de silagem, água, leite, soro fermento endógeno e queijo Minas artesanal da região do Campo das Vertentes: isolamento, identificação molecular, avaliações *in vitro* e *in vivo* do potencial probiótico / Felipe Machado de Sant'Anna. – 2015.

76 p. : il.

Orientador: Marcelo Resende de Souza

Co-orientadora: Andréia Marçal da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Queijo-de-minas – Análise – Teses. 2. Lactobacilo – Teses. 3. Bactérias produtoras de ácido láctico – Teses. 4. Salmonella typhimurium – Teses. 5. Probióticos – Teses.  
I. Souza, Marcelo Resende de. II. Silva, Andréia Marçal da. L. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

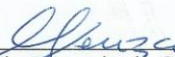
CDD – 637


## FOLHA DE APROVAÇÃO

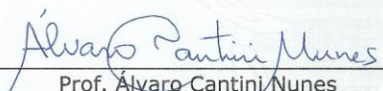
**FELIPE MACHADO SANT'ANNA**


Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau e MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.


Aprovada em 09 de fevereiro de 2015, pela banca constituída pelos membros:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Marcelo Resende de Souza  
Presidente - Orientador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Jacques Robert Nicoli  
Universidade Federal de Minas Gerais

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Alvaro Cantini Nunes  
Universidade Federal de Minas Gerais

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Márcio Roberto Silva  
EMBRAPA

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Liliâne Denize Miranda Menezes  
Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por sua infinita sabedoria, amor e compreensão, aos meus mentores que estão sempre ao meu lado iluminando meu caminho.

A minha mãe, por ter me dado o dom da vida e por sempre apoiar minhas decisões.

A Luciana, minha companheira e amiga, que está sempre ao meu lado me apoiando e oferecendo carinho nos diversos momentos da minha vida. Obrigado por tudo!

Ao professor Marcelo, mais que um orientador, um verdadeiro amigo sempre disponível para partilhar de sua sabedoria e seu precioso tempo, não importando as circunstâncias. Um verdadeiro exemplo de ser humano.

Ao Leo, pela amizade, momentos de diversão e por ter me proporcionado a oportunidade de expandir meus horizontes científicos.

Ao Jacques e Alvaro, por disponibilizarem seus laboratórios e equipamentos.

A professora Andréia, que sempre manifestou apoio e interesse no projeto.

A Renata e Leticia, por me auxiliarem desde o início do trabalho, obrigado por tudo.

Ao Luige e Sávio, pela amizade e apoio na realização desse trabalho.

A professora Mônica Cerqueira e Cláudia, por sempre acreditarem no meu potencial.

A turma do Beco, amigos-irmãos!

Aos colegas e companheiros de trabalho Carla, Lilian, Dalila, Givanildo, Gabi, Lívia, Carol, Cosme, Guilherme, Ethiene, Leo, Naiara, Cinthia, Gilson, Maurinha, César, Marco, Miltinho, Rodrigo, Gilmar. Agradeço a ajuda e companheirismo.

A turma do ICB e LGMPP, pelos momentos de alegria e companheirismo.

Ao Colegiado de Pós-Graduação e a CAPES, pelo fornecimento da bolsa.

A Luna, pelos momentos de descontração e extrema carência (muito deles inoportunos).

Ao Clube Atlético Mineiro, pelas grandes emoções proporcionadas ao longo desses dois anos de Mestrado.

*“Se cheguei até aqui, foi porque me apoiei no ombro dos gigantes”*

Sir Isaac Newton

---

## SUMÁRIO

---

### RESUMO

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos. ....	14
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 Queijo Minas artesanal.....	15
3.2 Bactérias do ácido láctico.....	17
3.2.1 O gênero <i>Pediococcus</i> .....	20
3.2.2 O gênero <i>Lactobacillus</i> .....	20
3.3 Probióticos.....	21
3.3.1 Histórico e definição.....	21
3.3.2 Mecanismo de ação dos probióticos .....	22
3.3.3 Potenciais atributos e benefícios associados ao uso de probiótico .....	25
3.4 Critérios de seleção aplicados a potenciais microrganismos probióticos.....	28
3.5 Identificação molecular de microrganismos de interesse probióticos... ..	28
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
5.1 Isolamento, caracterização morfológica e identificação molecular... ..	39
5.2 Amplificação da região intergênica espaçadora (ITS) 16S-23S rDNA.....	39
5.3 Avaliação <i>in vitro</i> do potencial probiótico .....	45
5.4 Avaliação <i>in vivo</i> do potencial probiótico .....	59
6. CONCLUSÃO .....	63
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	64
9. ANEXOS.....	76

---

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1	Distribuição das amostras de <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. rhamnosus</i> e <i>Pediococcus acidilactici</i> isolados de silagem, água, leite, soro fermento endógeno e queijos Minas artesanais com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação, nas sete queijarias da região de Campo das Vertentes	43
Tabela 2	Percentuais de resistência de amostras de BAL isoladas de silagem, água, leite, soro fermento endógeno e queijos Minas artesanais com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação frente aos sais biliares (0,3% oxgall)	46
Tabela 3	Percentuais de resistência de amostras de BAL isoladas de silagem, água, leite, soro fermento endógeno e queijos Minas artesanais com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação frente aos ácidos (pH 1.5 e pH 2.0)	48
Tabela 4	Percentuais de resistência das amostras de <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> isolados de silagem, soro fermento endógeno e queijos com 0, 21 e 60 dias de maturação da região de Campo das Vertentes frente aos testes de resistência a sais biliares e ácido (pH 2.0 e 1.5)	50
Tabela 5	Médias dos halos de inibição (mm), de duas repetições em duplicata, do teste de antagonismo <i>in vitro</i> das amostras de <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> e <i>Pediococcus acidilactici</i> isolados de silagem, soro fermento endógeno e queijos com 0, 21 e 60 dias de maturação da região de Campo das Vertentes, contra cada bactéria reveladora	51
Tabela 6	Médias dos halos de inibição (mm), de duas repetições em duplicata, do teste de antagonismo <i>in vitro</i> das amostras de <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> e <i>Pediococcus acidilactici</i> isolados de silagem, soro fermento endógeno e queijos com 0, 21 e 60 dias de maturação da região de Campo das Vertentes, contra cada bactéria reveladora	51
Tabela 7	Médias dos halos de inibição (mm) das amostras de <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> e <i>Pediococcus acidilactici</i> isolados de silagem, soro fermento e queijos com 0, 21 e 60 dias de maturação da região de Campo das Vertentes, contra bactérias reveladoras	52
Tabela 8	Níveis de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de <i>L. plantarum</i> , <i>L. paracasei</i> e <i>Pediococcus acidilactici</i> isolados silagem, soro fermento endógeno e queijos com 0, 21 e 60 dias de maturação da região de Campo das Vertentes	54
Tabela 9	Contagem de <i>S. Typhimurium</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. flexneri</i> em ágar MacConkey ( $\log_{10}$ UFC/ml) em cultura pura ou no co-cultivo (18h) com LP4 e PA2	56
Tabela 10	Contagem em ágar MacConkey ( $\log_{10}$ UFC/ml) de <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. flexneri</i> e <i>E. coli</i> , após cultivo (18h) em meio MRS LP4 a pH 3,85; meio MRS PA2 em pH 3,9 e meio MRS a pH 6,5	57



---

## LISTA DE QUADROS

---

Quadro 1.	Principais gêneros e espécies de BAL e seus principais efeitos no hospedeiro	19
-----------	--	----

---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1	Mesorregiões produtoras do queijo Minas artesanal	17
Figura 2	Mecanismos de ação exercidos pelos microrganismos Probióticos	23
Figura 3	Principais mecanismos de ação dos microrganismos Probióticos	25
Figura 4	Resultado do PCR 16S-23S rDNA de amostras isoladas de silagem, água, soro fermento, leite, silagem e queijo Minas artesanal com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação.	39
Figura 5	Árvore filogenética das amostras de BAL isoladas de silagem, água, soro fermento e queijo Minas artesanal com 0, 7, 14, 21 28 e 60 dias de maturação, oriundas de sete propriedades da região de Campo das Vertentes	41
Figura 6	Sobrevivência (%) de camundongos convencionais (BALB/c) tratados ou não com <i>L. casei</i> e desafiados dez dias depois com <i>S. Typhimurium</i> (inóculo de $10^5$ UFC).	59
Figura 7	Sobrevivência (%) de camundongos convencionais (BALB/c) tratados ou não com <i>L. plantarum</i> (LP4) e desafiados dez dias depois com <i>S. Typhimurium</i> (inóculo de $10^5$ UFC)	60
Figura 8	Sobrevivência (%) de camundongos convencionais (BALB/c) tratados ou não com <i>P. acidilactici</i> (PA2) e desafiados dez dias depois com <i>S. Typhimurium</i> (inóculo de $10^5$ UFC)	60
Figura 9	Peso relativo (%) de camundongos convencionais (BALB/c) antes e depois do tratamento ou não com <i>L. plantarum</i> LP4 e <i>L. casei</i> , e desafio dez dias depois com <i>S. Typhimurium</i> (inóculo de $10^5$ UFC)	62
Figura 10	Peso relativo (%) de camundongos convencionais (BALB/c) antes e depois do tratamento ou não com <i>P. acidilactici</i> PA2 e <i>L. casei</i> , e desafio dez dias depois com <i>S. Typhimurium</i> (inóculo de $10^5$ UFC)	62

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bactérias do ácido láctico
CCLR	Receptores de lectina do tipo C
CD	Células dendríticas
CEI	Células epiteliais intestinais
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DGGE	Gel desnaturante em gradiente de eletroforese
FAO/WHO	Food and Agriculture/World Health Organization
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognized as Safe
IL	Interleucina
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
INF	Interferon
IPHAN	Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional
ITS	Espaçador interno transcrito
LM	Linfonodo mesentérico
LPS	Lipopolissacarídeo
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRR	Receptor padrão de reconhecimento
TGI	Trato gastrointestinal
TLAI	Tecido linfoide associado ao intestino
TLR	Receptores do tipo Toll
TNF	Fator de necrose tumoral
UFC	Unidade formadora de colônia
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

---

## LISTA DE ANEXOS

---

Anexo 1	Certificado CEUA número 303 / 2014, com validade até 27/11/2019
Anexo 2	Produção de peróxido de hidrogênio por LP4 e PA2

## RESUMO

O estado de Minas Gerais é famoso pelo seu queijo artesanal (QMA) produzido a partir de leite cru e inoculado com soro fermento endógeno, também conhecido como “pingo”. Em virtude de sua produção artesanal, esse queijo é rico em bactérias do ácido láctico (BAL), provenientes de diferentes origens como soro fermento, silagem, água e leite, podendo manifestar potencial probiótico. O objetivo desse presente trabalho foi identificar molecularmente *Lactobacillus* spp., e *Pediococcus acidilactici* isolados de silagem, água, leite, soro fermento e QMA fresco (0 dias) e maturado (7, 14, 21, 28 e 60 dias), de sete queijarias e verificar suas origens por meio de relações filogenéticas entre as amostras, bem como caracterizar seu potencial probiótico *in vitro* e *in vivo*. Noventa e quatro amostras Gram positivo e catalase negativo foram submetidas à reação de rDNA 16S-23S, sendo posteriormente selecionadas trinta e seis amostras como sendo pertencentes ao gênero *Lactobacillus/Pediococcus*. O sequenciamento do gene rRNA 16S identificou cinco espécies: *Lactobacillus plantarum*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. rhamnosus* e *Pediococcus acidilactici*. A reação de *fingerprinting* via rep-PCR (GTG)<sub>5</sub> permitiu a montagem de um dendrograma via UPGMA e mostrou predominância de *Lactobacillus plantarum* (75,7%) em todas as origens pesquisadas, seguido de *L. brevis* (9,1%), *L. paracasei* (6,1%), *P. acidilactici* (6,1%) e *L. rhamnosus* (3,0%). Essas amostras foram submetidas aos testes *in vitro*, sendo selecionadas quanto ao seu potencial probiótico com base na resistência aos sais biliares, resistência aos ácidos em pH 2.0 e pH 1.5. Um total de oito amostras foram selecionadas por meio destes testes, sendo posteriormente submetidas à avaliação de susceptibilidade aos antimicrobianos e antagonismo frente a microrganismos patogênicos. Duas amostras (*Lactobacillus plantarum* LP4 e *Pediococcus acidilactici* PA2) foram selecionadas para os testes *in vivo* por apresentarem bons percentuais de resistência aos sais biliares e ácidos, baixos percentuais de resistência aos antimicrobianos e antagonizar a ação de microrganismos patogênicos. Os resultados de mortalidade e desenvolvimento ponderal de camundongos desafiados com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e associados ou não à administração oral de LP4 e PA2 exibiram baixo efeito protetor por parte das duas amostras, embora LP4 tenha apresentado desenvolvimento ponderal superior ( $p < 0,05$ ) aos controles negativo e positivo (uma amostra comercial de *Lactobacillus casei*). Esses resultados indicam que a amostra *L. plantarum* LP4 poderia ser mais explorada em futuras pesquisas referentes ao uso desse microrganismo quanto ao seu potencial probiótico.

Palavras-chave: queijo Minas artesanal, BAL, probióticos, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *fingerprinting*, camundongos, *Salmonella* Typhimurium

## ABSTRACT

Minas Gerais state is known for its famous artisanal cheese, made from raw milk and inoculated with endogenous starter culture named “pingo”. Due to its artisanal production, that cheese is rich in lactic acid bacteria (LAB), that may occur in different sources, such as environment, milk, starter cultures and also water. The aim of this study was to molecularly identify *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. isolated from water, silage, milk, endogenous starter culture and Minas artisanal cheese fresh (0d) and ripened (7,14,21,28, and 60 days), from different dairy farms and identify its origin by establishing phylogenetical relations between these samples, as well as evaluate its *in vitro* and *in vivo* probiotic potential. Ninety four Gram positive and catalase-negative samples were submitted to rRNA 16S-23S PCR reaction, and later thirty six being selected as belonging to *Lactobacillus/Pediococcus* group. The rRNA 16S sequencing showed five species: *Lactobacillus plantarum*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. rhamnosus* and *Pediococcus acidilactici*. The rep-PCR (GTG)<sub>5</sub> fingerprinting reaction allowed the montage of a dendrogram via UPGMA and showed *Lactobacillus plantarum* predominance amongst the other LAB (75,7%) from all the studies sources, followed by *L. brevis* (9,1%), *L. paracasei* (6,1%), *P. acidilactici* (6,1%) and *L. rhamnosus* (3,0%). These samples were then submitted to *in vitro* tests, being selected for its probiotic potential regarding biliar salts and acid (pH 2.0 and pH 1.5) resistance. A total of eight samples were selected by these tests, and then evaluated its antimicrobial susceptibility and pathogenic inhibition rate. Two samples (*Lactobacillus plantarum* LP4 and *Pediococcus acidilactici* PA2) showed best biliar salt and acid resistance, high pathogenic inhibition rate and low antibiotic resistance percentual and then were selected for *in vivo* evaluation. The results of lethality and weight gain in mice orally infected with *Salmonella entérica* sorovar. Typhimurium and associated or not with oral administration of LP4 and PA2 showed low protective effect of both samples; although LP4 had showed higher values of weight gain ( $p < 0,05$ ) in contrast of negative and positive (a commercial sample of *L. casei*) controls. These results indicate that *L. plantarum* LP4 sample showed satisfactory *in vitro* values, as well as weight gain in orally infected *S. Typhimurium* mice, favoring future studies referring its use as a potential probiotic.

Keywords: Minas artisanal cheese, LAB, probiotics, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, fingerprinting, mice, *Salmonella Typhimurium*

## 1. INTRODUÇÃO

O estado de Minas Gerais é considerado o maior produtor de queijos do país. Isso se deve, em grande parte, às tradições que foram se sucedendo ao longo do tempo. Atualmente, existem regiões consideradas bem definidas em relação à localização das propriedades e das características inerentes às regiões como latitude, clima, amplitude térmica e qualidade das pastagens, solo e genética do gado. Todos esses fatores influenciam na qualidade físico-química, microbiológica e sensorial desses queijos, com destaque para a utilização do soro fermento endógeno e técnicas particulares de produção.

Em maio de 2008, o registro no Inventário Nacional de Referências Culturais do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) reconheceu o modo de fazer o queijo artesanal como patrimônio imaterial, destacando a forma tradicional de se fazer queijo, à base de leite cru, soro fermento endógeno e coalho. O queijo Minas artesanal possui indicação geográfica em determinadas regiões como Serro e Canastra, sendo considerado como legítimo apenas os queijos produzidos em sete regiões específicas, envolvendo mais de 10,7 mil produtores de origem familiar, sendo: Serro, Serra da Canastra, Cerrado, Araxá, Campo das Vertentes e mais recentemente Serra do Salitre e Triângulo Mineiro (Minas Gerais, 2014a,b). Os queijos dessas regiões têm características distintas na textura, sabor e carga microbiana, devido ao tipo de pastagem ingerida pelas vacas, o clima e a altitude locais. Utiliza-se um soro fermento endógeno, denominado “pingo”, oriundo do soro que se é obtido por meio do queijo produzido anteriormente, o que permite que seja mantida a microbiota da região e seu sabor único. O soro fermento endógeno é considerado a unidade identitária do produto (Chalita *et al.*, 2009), sendo rico em bactérias do ácido láctico, microrganismos que, em sua maioria, manifestam atividades probióticas. Esse soro geralmente fermenta a temperatura ambiente (média de 25°C) o que gera ambiente propício para a multiplicação de microrganismos benéficos, classificados como bactérias do ácido láctico, sendo que muitos desses microrganismos podem manifestar potencial probiótico.

Probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados na forma correta e na quantidade adequada, conferem benefícios à saúde de seu hospedeiro (FAO/WHO, 2002). O mercado consumidor atual busca cada vez mais produtos alimentícios que forneçam alto valor nutritivo e que se apresentem seguros ao consumo. Além disso, o atual estilo de vida dinâmico associado a altos níveis de *stress* levam as pessoas a manifestarem sintomas associados à má alimentação como infecções e intoxicações alimentares que podem culminar em quadros de gastroenterites e doenças autoimunes. Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2002). Nesse aspecto, os alimentos funcionais se destacam, encontrando uma lacuna presente nesse mercado cada vez mais exigente, quando se observa um aumento na expectativa de vida da população mundial associado a uma vida cada vez mais estressante e sedentária (Acurcio, 2011).

Atualmente são poucos os trabalhos que abordam o isolamento e caracterização de microrganismos probióticos de queijo Minas artesanal, principalmente no que tange a análise *in vivo* utilizando modelo murino. Dessa forma, faz-se mais que necessário esse tipo de estudo,

uma vez que os resultados podem contribuir para a seleção de linhagens probióticas bem como agregar maior valor ao produto, gerando maior fonte de renda às famílias produtoras do queijo Minas artesanal além de implementar um possível uso de culturas starter nesses queijos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Isolar, identificar por métodos moleculares e avaliar o potencial probiótico *in vitro* e *in vivo* de bactérias do ácido lático presentes em água, silagem, leite, soro fermento endógeno (pingo) e queijo Minas artesanal provenientes de queijarias da região de Campo das Vertentes, Minas Gerais.

### 2.2. Objetivos específicos

- Isolar e identificar ao nível molecular bactérias do ácido lático (BAL) presentes em amostras de água, silagem, leite, soro fermento endógeno (pingo) e queijo Minas artesanal em diferentes períodos de maturação (0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias)
- Avaliar a similaridade filogenética entre as BAL a fim de determinar a diversidade ecológica do produto final
- Caracterizar as BAL segundo o seu potencial probiótico *in vitro*, de acordo com:
  - Resistência ao suco gástrico e sais biliares com o intuito de simular sua passagem pelo trato gastrointestinal
  - Determinação da capacidade de inibição das BAL contra microrganismos patogênicos/reveladores por métodos de antagonismo *in vitro* direto, co-cultivo e sobrenadante e produção de peróxido
  - Teste de susceptibilidade de BAL frente aos antimicrobianos a fim de caracterizá-las como GRAS ou *Generally Recognized As Safe* (reconhecidamente seguras para o consumo)
- Avaliar a capacidade probiótica *in vivo* dos microrganismos selecionados determinando a taxa de mortalidade e o desenvolvimento ponderal em camundongos convencionais, tratados ou não com as amostras de BAL e desafiados com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Queijo Minas artesanal

É considerado queijo Minas artesanal o queijo que apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, confeccionado a partir do leite integral de vaca fresco e cru, retirado e beneficiado na propriedade de origem (Minas Gerais, 2012).

O queijo Minas artesanal e as características formas de sua confecção denotam uma tradição dinâmica radicada em sua origem nas técnicas típicas da serra da Estrela, em Portugal, sendo que a história e a cultura de um Brasil enquanto colônia desenvolveram métodos próprios de fabricação do queijo. Essa origem técnica que chegou à América portuguesa com o colonizador foi raiz de uma nova construção intimamente ligada, a cada tempo, à sobrevivência de colonos ibéricos, de indivíduos luso-brasileiros e por fim, de mineiros. A confecção desse queijo em específico se estabeleceu com variações por todo território de Minas Gerais dos tempos antigos e hoje tem características específicas reconhecidas para regiões geográficas distintas do Estado de Minas Gerais com condições geográficas, econômicas e sócio-culturais particulares (Meneses, 2006).

O queijo Minas é o tipo mais tradicional de queijo produzido no Brasil e de grande aceitação no mercado nacional. Até há algumas décadas se caracterizava como um dos queijos mais produzidos no Estado. A tecnologia artesanal desse queijo, desenvolvida principalmente na região do Serro e da Serra da Canastra a partir do leite cru, constitui uma tradição secular que deve ser preservada (Santos *et al.*, 1992).

O queijo Minas artesanal possui formato cilíndrico, com aproximadamente 40 cm de diâmetro. Em algumas queijarias o queijo é produzido com diâmetro ligeiramente maior e um pouco menor em altura. Sua casca é normalmente esbranquiçada, tendendo a se transformar numa crosta fina e amarelada quando o queijo é curado por alguns dias. Internamente, a massa é branca e consistente, às vezes ligeiramente quebradiça. O queijo apresenta sempre aberturas mecânicas de pequeno tamanho e, não raramente, diversas e pequenas olhaduras irregulares. Seu sabor é bastante típico e acentuadamente mais ácido do que o queijo Minas industrializado (Furtado, 1980).

De acordo com Meneses (2006), usa-se o tecido “volta ao mundo” para a prensagem/dessoragem da massa antes de enformá-la. Já na região do Serro, não se usa tecido para a prensagem manual que é feita diretamente na forma, pelas mãos do queijeiro.

Em Minas Gerais, o queijo Minas artesanal sobreviveu às pressões da modernização dos processos de produção, não só pelo apego às tradições, mas também pelo isolamento das propriedades produtoras, espalhadas pelas colinas e pelos vales do Estado. Isso contribuiu para que se preservassem produtos com características próprias e de imenso valor cultural e econômico (EMATER, 2004). De acordo com o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), as principais mesorregiões com seus respectivos municípios que produzem o legítimo queijo Minas artesanal são (fig.1):

- *Araxá* (Minas Gerais, 2003a) – Araxá, Campos Altos, Conquista, Ibiá, Pratinha, Pedrinópolis, Perdizes, Sacramento, Santa Juliana, Tapira;
- *Canastra* (Minas Gerais, 2004) - Bambuí, Delfinópolis, Medeiros, Piumhi, São Roque de Minas, Tapiraí, Vargem Bonita;
- *Cerrado* (Minas Gerais, 2007) – Abadia dos Dourados, Arapuá, Carmo do Paranaíba, Coromandel, Cruzeiro da Fortaleza, Guimarânia, Lagamar, Lagoa Formosa, Matutina, Patos de Minas, Patrocínio, Presidente Olegário, Rio Paranaíba, Santa Rosa da Serra, São Gonçalo do Abaeté, São Gotardo, Serra do Salitre, Tiros, Varjão de Minas;
- *Serro* (Minas Gerais, 2003b) – Alvoradas de Minas, Conceição do Mato Dentro, Dom Joaquim, Materlândia, Paulistas, Rio Vermelho, Sabinópolis, Santo Antônio do Itambé, Serra Azul de Minas, Coluna, Serro;
- *Campo das Vertentes* (Minas Gerais, 2009) - Barroso, Conceição da Barra de Minas, Coronel Xavier Chaves, Carrancas, Lagoa Dourada, Madre de Deus de Minas, Nazareno, Prados, Piedade do Rio Grande, Resende Costa, Ritópolis, Santa Cruz de Minas, São João Del Rei, São Tiago e Tiradentes.
- *Triângulo Mineiro* (Minas Gerais, 2014a) - Araguari, Cascalho Rico, Estrela do Sul, Indianópolis, Monte Alegre de Minas, Monte Carmelo, Nova Ponte, Romaria, Tupaciguara e Uberlândia
- *Serra do Salitre* (Minas Gerais, 2014b) – município de Serra do Salitre

Atualmente, um total de 298 produtores são listados nos documentos do IMA, dentre os produtores cadastrados e os inseridos no programa de agricultura familiar. Além disso, o estado de Minas Gerais conta com sete entrepostos - locais específicos de armazenamento e maturação, de temperatura e ventilação controladas - de queijos oriundos de associações de produtores de queijo Minas artesanal na região da Canastra. (Minas Gerais, 2014a). O queijo Minas artesanal tem sua produção característica em virtude da utilização do soro fermento endógeno denominado “pingo” - um verdadeiro fermento natural que o queijeiro mantém ativo por semanas ou meses. Após a enformagem e salga por aspersão de sal grosso em sua superfície, os queijos são deixados sobre uma bancada onde ficam a dessorar. O soro que escorre de um dia para o outro é coletado em uma vasilha e vem a constituir o "soro fermento endógeno". Trata-se de um soro que fermentou de um dia para o outro, contendo certa quantidade de sal que age como inibidor de certas fermentações indesejáveis, associado a outros fenômenos como a atuação de BAL. No momento de ser adicionado ao leite, na produção do dia, o "soro fermento endógeno" contém certamente milhões de bactérias do ácido lático por mililitro.



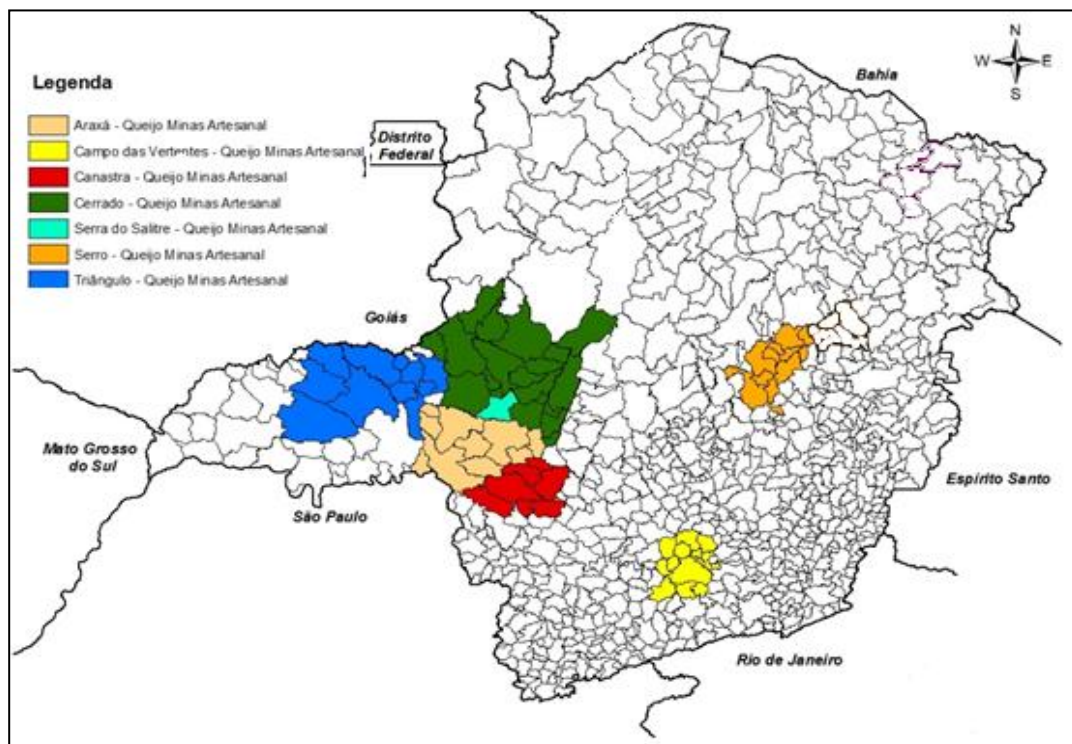


Figura 1 – mesorregiões produtoras do queijo Minas artesanal (Adaptado de EMATER, 2004)

A influência do clima e localização geográfica, o modo artesanal de produção e sua associação com o uso de soro fermento endógeno atuam diretamente na dinâmica microbioma desses queijos, garantindo um grande número de microrganismos diferentes, com destaque para as bactérias do ácido lático que, dentre outras características inerentes ao grupo, podem manifestar potencial probiótico.

### 3.2. Bactérias do ácido lático (BAL)

Bactérias do ácido lático pertencem ao grupo de bactérias Gram positivo que englobam características morfológicas, metabólicas e fisiológicas semelhantes. São cocos ou bacilos não formadores de esporos, produtoras de ácido lático como produto principal da fermentação de carboidratos (Salminen, 1993). Este grupo é composto por 13 gêneros pertencentes ao filo *Firmicutes*: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (Jay, 2005; Mayo, Sinderen e Ventura, 2008).

A classificação em diferentes gêneros se baseia na morfologia, modo de fermentação da glicose, crescimento em diferentes faixas de temperatura, configuração do ácido-lático produzido, habilidade de crescimento em altas concentrações de sal e tolerância a bases e ácidos. Em relação ao metabolismo, destacam-se duas vias principais de fermentação de carboidratos: a via glicolítica (Embden-Meyerhof-Parnas), sendo também classificada como via homofermentativa, uma vez que todo o produto do metabolismo oriundo da oxidação da lactose é transformado essencialmente em ácido lático; e a via 6-fosfogluconato/fosfocetolase ou via heterofermentativa, em virtude dos produtos oriundos do processo fermentativo serem variados

como a produção de etanol, acetato, CO<sub>2</sub>, ácido-graxos voláteis dentre outros compostos aromáticos (Salminen, 1993).

De acordo com Tamime (2005), bactérias do ácido láctico podem manifestar potencial probiótico, comumente utilizadas em produtos como queijos e produtos fermentados, com destaque para os gêneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*. Apesar de não pertencerem ao grupo das BAL, o gênero *Bifidobacterium* também é muito utilizado em produtos com alegação probiótica. Dentre as bactérias do ácido láctico pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, destacam-se *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. casei* ssp. *paracasei*, *L. casei* ssp. *tolerans*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius* (Collins, Thornton e Sullivan, 1998; Lee *et al.*, 1999; Sanders e Klaenhammer, 2001).

As bactérias do ácido láctico são consideradas benéficas e contribuem para a realização das alterações bioquímicas envolvidas no processo de maturação do queijo: são responsáveis pela transformação da lactose em ácido láctico, e suas enzimas contribuem na proteólise e na conversão de aminoácidos em substâncias voláteis responsáveis pelas propriedades sensoriais do produto final. As BAL podem ser adicionadas no início da fabricação, ou podem ser utilizadas aquelas que já ocorrem naturalmente no leite, como ocorre no caso dos queijos artesanais (Beresford *et al.*, 2001)

Dessa forma, o modo de produção do queijo Minas artesanal bem como as transformações bioquímicas que nele ocorrem conferem um ambiente propício à multiplicação de bactérias do ácido láctico (principalmente bactérias do gênero *Lactobacillus*), podendo muitas delas vir a manifestar potencial probiótico satisfatório.

O quadro 1 (um) descreve os principais gêneros e espécies de BAL que apresentam caráter probiótico:

Quadro 1. Principais gêneros e espécies de BAL e seus principais efeitos no hospedeiro

Gênero	Espécies	Principais efeitos
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Tratamento de diarreia do viajante, redução do tempo de internamento de crianças acometidas por diarreia aguda, atividade antifúngica, prevenção e tratamento de vaginose bacteriana, tratamento de diarreia associada a <i>C. difficile</i>
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Prevenção e redução de dermatite atópica em crianças, redução do risco de desenvolvimento de doenças alérgicas, potencial anti-diabético, prevenção de enterocolite necrotizante em recém-nascidos, prevenção e tratamento de vaginose bacteriana, auxílio na perda de peso em mulheres obesas, tratamento de gastroenterite aguda em crianças, proteção de musculatura colônica por danos induzidos via lipopolissacarídeo (LPS)
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Redução de colesterol (LDL), tratamento de gastroenterite aguda em crianças, diminuição da duração de diarreia em crianças, redução de sepse, intolerância à alimentos e tempo de internação em crianças
	<i>Lactobacillus casei</i>	Tratamento de constipação em adultos, atividade imunomodulatória, tratamento de diarreia associada a <i>C. difficile</i> , auxílio na restauração de microbiota vaginal acometida por vaginose bacteriana, redução dos sintomas de síndrome do intestino irritado, redução de diarreia associada ao uso de antimicrobianos, proteção contra infecção por <i>Salmonella</i> ssp., tratamento de vaginose estafilocócica
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Prevenção na produção de endotoxina, atividade antifúngica, redução dos sintomas de síndrome do intestino irritado
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Melhoria da imunidade adaptativa em afecções do trato respiratório em crianças, redução da ocorrência de gastrite por <i>Helicobacter pylori</i> , auxílio no tratamento em conjunto de levocetirizine para rinite alérgica perene em crianças
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Prevenção de vaginose bacteriana, inibição de aderência de patógenos à mucosa vaginal, ação anti-estafilocócica, redução de resistência à insulina e hipercolesterolemia
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus durans</i> , <i>E. faecium</i>	Atividade anti-inflamatória, aderência à mucosa colônica e produção de compostos antioxidantes e antimicrobianos
<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Produção de pediocina, bacteriocina e proteção contra infecção por <i>Helicobacter pylori</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	Redução dos efeitos de síndrome do intestino irritado e de enterocolite necrotizante em crianças
<i>Weissella</i>	<i>Weissella confusa</i> , <i>W. kimchii</i> , <i>W. paramesenteroides</i>	Prevenir e controlar patógenos bacterianos por meio da produção de compostos antimicrobianos que incluem ácido láctico, peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas

Adaptado de Collins, Thornton, Sullivan, 1998; Lee *et al.*, 1999; Sanders e Klaenhammer, 2001; Tamime 2005; Fijan, 2014.

### 3.2.1 O gênero *Pediococcus*

O gênero *Pediococcus* pertence à família Lactobacillaceae e consiste de onze espécies: *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. clausenii*, *P. cellicola*, *P. stilesii*, *P. inopinatus*, *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. dextrinicus*, *P. siamensis*, e *P. ethanolidurans*. Os microrganismos pertencentes ao gênero são Gram positivo, catalase-negativo, microaerófilos, homofermentativos e produtores de D-lactato. À microscopia se apresentam morfológicamente em cocos isolados, em pares, ou mais comumente em tétrades. Estão presentes em produtos cárneos fermentados em geral e em menor quantidade em produtos lácteos fermentados. (Bhowmik e Marth, 1990; Kantor *et al.*, 1997; Nigatu *et al.*, 1998). Dentre as espécies do gênero, pode-se destacar duas delas: *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* que são amplamente usadas na fermentação de vegetais, carnes, massas, sucos de fruta, derivados lácteos e silagem (Bhowmik e Marth, 1990; Luchansky *et al.*, 1992; Knorr, 1998; Hudson *et al.*, 2000).

Diversos estudos descrevem o potencial probiótico de *Pediococcus* spp., principalmente pela produção de compostos antimicrobianos como a pediocina. A pediocina PA-1 é uma bacteriocina pertencente à classe IIa (ou família das pediocinas) e devido ao seu amplo espectro antimicrobiano e estabilidade em alimentos torna-se uma substância de grande interesse industrial como bio-preservativo e clínico em virtude de seu potencial probiótico. Bhunia *et al.* (1990) avaliaram aspectos imunológicos da pediocina em coelhos e não constataram potencial imunogênico tampouco tóxico, podendo ser aplicada com segurança em alimentos como um bio-preservador (Bhunia *et al.*, 1990). Rodriguez *et al.* (2002) constataram que *P. acidilactici* BA28 produtora de pediocina foi capaz de retardar o crescimento e a colonização estomacal por *H. pylori* em camundongos, além de reverter o processo infeccioso causado pelo patógeno. Dabour *et al.* (2009) avaliando a diferença do efeito protetor frente a infecção por *Listeria monocytogenes* na administração intra-gástrica de pediocina e na administração oral de *P. acidilactici* constataram que a bacteriocina exerce maiores efeitos benéficos em detrimento da bactéria, quando administrados oralmente em camundongos.

### 3.2.2 O gênero *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* pode ser considerado como o principal representante do grupo de bactérias do ácido láctico. A heterogeneidade e o grande número de espécies se devem à definição do gênero, essencialmente de formato bacilar Gram positivo, não formadores de esporos e catalase negativo. De caráter ubiqüitário, muitas espécies possuem aplicação na tecnologia de alimentos. *Lactobacillus* spp. também estão associados à cavidade bucal, tratos gastrintestinal e vaginal de humanos e de outros animais (Sharpe, 1981; Kandler e Weiss, 1986).

Atualmente, o gênero *Lactobacillus* é representado por 167 espécies e 27 subespécies, ocupando diversos ambientes onde carboidratos fermentáveis encontram-se disponíveis, como o trato gastrintestinal e vaginal, cavidade oral e a pele além da matéria orgânica dos solos e associados aos vegetais e principalmente produtos lácteos fermentados e queijos (Tamime, 2005; Felis e Dellaglio, 2007). A diversidade desse grupo é representada pelo grande conteúdo GC, variando de 32 a 53 mol%. Dessa forma, o gênero *Lactobacillus* foi organizado em três grupos baseados principalmente nas suas características fermentativas (Stiles e Holzapfel, 1997; Slover *et al.*, 2008).

O grupo um inclui as espécies homofermentativas obrigatórias (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. delbrueckii*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, grupo *L. salivarius*, *L. salivarius*). O grupo dois é formado pelas espécies heterofermentativas facultativas (grupo *L. casei*, *L. casei*, *L. paracasei*, grupo *L. plantarum*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. sake*), sendo que os membros deste grupo fermentam pentoses. O grupo três é o das espécies heterofermentativas obrigatórias, que produzem CO<sub>2</sub> a partir da glicose e englobam as espécies *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. sanfranciscensis*. As espécies de *Lactobacillus* podem produzir um pH de 4,0 em alimentos que contém carboidratos fermentáveis e pH de aproximadamente 7,1 (Salminen, 1993; Stiles e Holzappel, 1997; 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 (Gomes e Malcata, 1999; Oliveira *et al.*, 2002)

### 3.3. Probióticos

#### 3.3.1 História e definição

Inicialmente, probióticos eram definidos como suplementos alimentares de microrganismos vivos que afetavam benéficamente o hospedeiro pelo melhoramento do balanço da microbiota intestinal (Fuller, 1989). Embora os benefícios de consumir produtos fermentados sejam conhecidos pela humanidade por séculos, muito antes da descoberta dos microrganismos, o conceito de administrar microrganismos com o intuito de conferir benefícios à saúde começaram há décadas quando Metchnikoff teorizou que a saúde poderia ser melhorada, bem como a senilidade pudesse ser adiada, pela manipulação da microbiota intestinal em virtude do consumo de bactérias benéficas ora encontrada em iogurtes (Mackowiak, 2013)

Atualmente, a definição mais amplamente aceita e difundida a respeito de probióticos baseia-se no conceito da *Food and Agriculture Organization* e *World Health Organization* (FAO/WHO, 2002), sendo os probióticos considerados “*microrganismos vivos que, quando administrados em concentrações adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro*”. O uso de culturas bacterianas de potencial probiótico favorece a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (Puupponen-Pimiä *et al.*, 2002).

Diversos preparos empregando *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. e *Enterococcus* spp., são bem estabelecidos no mercado e alimentos contendo probióticos têm sido comercializados no Japão desde 1920 (Tamime, 2005).

Nas últimas duas décadas, houve um crescente interesse em pesquisas de base e de caráter clínico envolvendo probióticos, resultando em mais de seis mil publicações na literatura biomédica, sendo 60% desses artigos publicados nos últimos cinco anos, alguns ocupando altos *rankings* de classificação e fator de impacto em periódicos e bases indexadoras (Rijkers *et al.*, 2011)

Para fornecer benefícios à saúde, é essencial que o produto comercial apresente concentrações de  $10^6$  UFC/mL ou g até a data de vencimento, enquanto a dose mínima terapêutica sugerida é de  $10^8$  a  $10^9$  UFC/mL ou g (Shah, 2000). A fisiologia intestinal e os mecanismos de defesa do hospedeiro exercem importante papel na prevenção de superpopulações da microbiota, além de determinar a composição e distribuição final desses microrganismos por todo o trato gastrointestinal (TGI) (Stiles e Holzapfel, 1997).

Uma série de pré-requisitos devem ser avaliados para que um microrganismo seja considerado probiótico (Salminen *et al.*, 1996), devendo: a) ter habilidade de aderir às células localizadas nas mucosas intestinais, b) reduzir ou impedir a aderência por patógenos, c) multiplicar e resistir ao ambiente, sejam eles leite fermentado, iogurte e outros derivados lácteos, bem como produtos derivados cárneos, d) produzir ácidos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas com ação antagonista direta ao crescimento de patógenos, e) ser seguro, não invasivo, não carcinogênico e não patogênico e f) co-agregar com o intuito de formar uma microbiota normal e equilibrada, por meio da formação de uma barreira no epitélio intestinal (Kaur, Chopra e Saini, 2002)

A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos.

### **3.3.2 Mecanismo de ação dos probióticos**

Os mecanismos de ação de probióticos baseiam-se no fato de que diversas comunidades microbianas autóctones são hospedeiro-específicas, local-específicas, complexas em sua composição e que proporcionam efeitos benéficos ao hospedeiro. Para tanto, esses são pressupostos dos quais deve-se levar em consideração para que os microrganismos benéficos possam manifestar potencial probiótico por meio de seus mecanismos de ação (Nagpal *et al.*, 2012)

Três possíveis mecanismos de atuação são atribuídos aos probióticos, sendo o primeiro deles a supressão do número de células viáveis de patógenos pela ação de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão. O segundo desses mecanismos seria a alteração do metabolismo microbiano, pelo aumento ou diminuição da atividade enzimática. O terceiro seria o estímulo da imunidade do hospedeiro, pelo aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos. O espectro de atividade dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos (figura 2) (O'Toole e Cooney, 2008; Fuller, 1989).

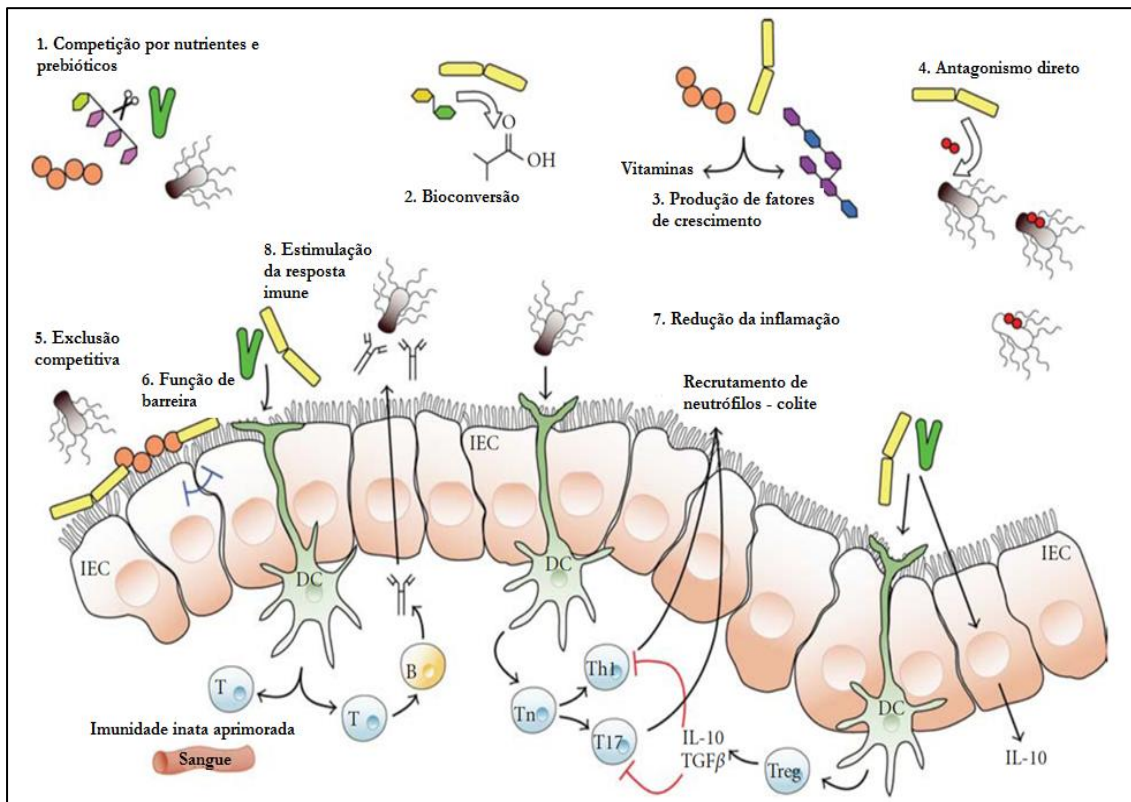


Figura 2. mecanismos de ação exercidos pelos microrganismos probióticos. Adaptado de O'Toole e Cooney (2008).

1. Competição por nutrientes e prebióticos: o hospedeiro fornece as quantidades de nutrientes que as bactérias intestinais necessitam e estas exibem ativamente as suas necessidades. Essa relação simbiótica impede uma produção excessiva de nutrientes, a qual favoreceria o estabelecimento de competidores microbianos com potencial patogênico ao hospedeiro.
2. Bioconversão: em adição aos ácidos láctico e acéticos produzidos pelas BAL e bactérias do gênero *Bifidobacterium*, probióticos produzem outros tipos de ácido como ácido hipúrico e cítrico (Dave e Shah, 1997).
3. Produção de fatores de crescimento: um grande número de BAL e bactérias do gênero *Bifidobacterium*, foram identificados como produtoras de vitaminas como folato, cobalamina, vitamina K, riboflavina e tiamina (Tamime, 2005). A ação de microrganismos durante a fabricação de produtos contendo culturas ou no trato digestivo influencia favoravelmente a quantidade, a biodisponibilidade e a digestibilidade de alguns nutrientes da dieta. A fermentação de produtos lácteos por bactérias do ácido láctico pode aumentar a concentração de determinados nutrientes, como vitaminas do complexo B. As bactérias do ácido láctico caracterizam-se pela liberação de diversas enzimas no lúmen intestinal. Essas enzimas exercem efeitos

sinérgicos sobre a digestão, aliviando sintomas de deficiência na absorção de nutrientes (Kopp-Hoolihan, 2001).

4. Antagonismo direto: probióticos também atuam na microbiota geral por antagonismo direto. Diversos estudos recentes mostram que esses microrganismos podem modular números de um único microrganismo modelo em sistemas experimentais. Como exemplo, amostras *Lactobacillus salivarius* inibem o crescimento *in vitro* de *Helicobacter pylori* por meio de mecanismos envolvendo a secreção de ácido láctico. Além disso, o antagonismo direto ocorre principalmente pela produção de bacteriocinas, pequenos peptídeos termoestáveis com potente atividade antimicrobiana (Cotter, Hill e Ross, 2005; Ryan *et al.*, 2008)
5. Exclusão competitiva: a modulação da microbiota intestinal pelos microrganismos probióticos ocorre em virtude de um mecanismo denominado “exclusão competitiva”, impedindo a colonização dessa mucosa por microrganismos potencialmente patogênicos, por meio da competição por sítios de adesão, da competição por nutrientes e/ou da produção de compostos antimicrobianos (Kaur, Chopra e Saini, 2002; Guarner e Malagelada, 2003)
6. Função de barreira: os probióticos agem como uma barreiras, formando uma verdadeira linha do trato gastrointestinal próximo à borda escovada do lúmen e, por meio de inibição competitiva, impedindo outras bactérias do lúmen de alcançarem a lâmina própria e alterarem o sistema imune do hospedeiro (Fedorak, 2010)
7. Redução da inflamação: acredita-se que as colites e inflamações crônicas do trato gastrointestinal são determinadas geneticamente, permitindo que de alguma forma as bactérias “agressivas” do TGI iniciem uma resposta inflamatória que nunca cessa. O tratamento com o uso de probióticos visa estabelecer uma mudança da microbiota inicial, formando uma microbiota menos agressiva e mais anti-inflamatória que pode de certa forma, atenuar a inflamação da mucosa. Além disso, as colites tendem a se caracterizar por doenças que ocorrem em nível de mucosa, portanto, um tratamento com probiótico que estimule a produção de mucinas e polissacarídeos pode ser benéfico para o controle da doença (Fedorak, 2010)
8. Estimulação da resposta imune (figura 3) uma fração dos probióticos ingeridos é capaz de interagir com as células epiteliais intestinais (CEI) e células dendríticas (CD), dependendo da atuação e dinamismo da camada de muco luminal. Os probióticos podem encontrar CD através de duas vias: CD que interagem com os probióticos por meio de ramificações celulares que perpassam as CEI até o lumen intestinal ou por transcitose exercida pelas células M, ocasionando um contato direto de um probiótico com o tecido linfóide associado ao intestino (TLAI) (Lebeer, Vanderleyden e Keersmaecker, 2010)

A interação das células do hospedeiro com os padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) que estão presentes na superfície de bactérias probióticas irão induzir uma determinada resposta molecular. Os receptores padrão de reconhecimento do hospedeiro (PRR) que podem sensorar sinais probióticos incluem os receptores do tipo Toll (TLR) e receptores de lectina tipo C (CCLR). A interação entre um PAMP e um PRR resulta em uma indução em cascata de sinais responsáveis por montar uma resposta molecular contra o microrganismo detectado. Essa



resposta pode incluir a produção de citocinas imunomodulatórias, quimiocinas, antimicrobianos ou fatores citoprotetores e moléculas co-estimulatórias. Algumas respostas moleculares das CEI's dependem do subtipo celular, como exemplo as células de Paneth que produzem defensinas enquanto as células de goblet produzem muco. Respostas imunes importantes de CD contra probióticos incluem a produção de citocinas, complexo maior de histocompatibilidade (MHC's) para apresentação de antígenos e moléculas co-estimulatórias que determinam a transformação de células T em células T auxiliaadoras ou células T regulatórias CD4+CD25+ nos linfonodos mesentéricos (LM's) ou TLAI (figura 3).

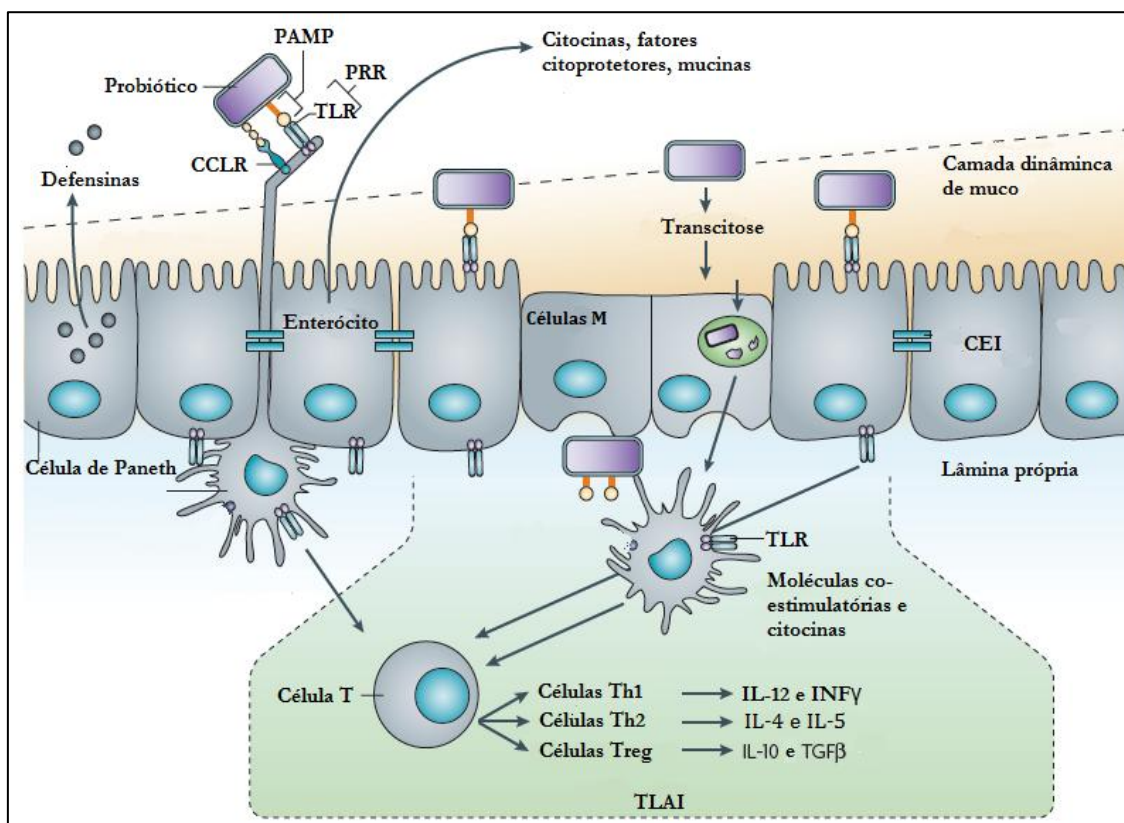


Figura 3. Principais mecanismos de ação dos probióticos. Adaptado de Lebeer, Vanderleyden e de Keersmaecker (2010)

### 3.3.3 Potenciais atributos e benefícios associados ao uso de probióticos

#### Ação probiótica de *Lactobacillus* contra *Salmonella* Typhimurium

Uma importante doença infecciosa é a salmonelose, uma enfermidade aguda, de distribuição mundial, com mais de 16 milhões de casos por ano, sendo, aproximadamente, seis milhões destes fatais. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium (ou *S. Typhimurium*) é uma bactéria patogênica, Gram negativo que, pela via oro-fecal, é responsável pelas seguintes síndromes: enterocolite (com diarreia) e/ou bacteremia (septicemia); podendo, em alguns casos, ser fatal para o hospedeiro. A salmonela, ao atingir o intestino delgado do hospedeiro, adere e transloca através do epitélio intestinal por três rotas: invasão ativa dos enterócitos, invasão das células M e por meio de células dendríticas (DC) ou macrófagos que intercalam as células epiteliais intestinais. A manifestação dos sinais clínicos e a gravidade da infecção dependem da

susceptibilidade do hospedeiro (da situação do seu sistema imunológico) e da virulência do sorovar de *Salmonella* sp. infectante (Coburn *et al.*, 2007).

Os camundongos infectados por *S. Typhimurium* desenvolvem uma doença sistêmica cuja cinética encontra-se bem estabelecida. Inicialmente, ocorre uma rápida eliminação de bactérias séricas havendo, então, instalação destas no fígado e baço, onde se replicam nas células fagocitárias, promovendo hepato e esplenomegalia, respectivamente. Posteriormente, há o reconhecimento do microrganismo por intermédio das células fagocíticas, pelo sistema imune inato por meio dos padrões moleculares associados aos patógenos (PAMP), o que resulta na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF $\alpha$ , IL1, IL6, IL12 e INF $\gamma$ ) e uma infiltração de monócitos e neutrófilos nos locais de inflamação. Na última fase do processo infeccioso, mecanismos efetores da imunidade adaptativa são gerados, fazendo intervir as células B e T, e os títulos de anticorpos anti-*Salmonella* aumentam (Grassl e Finlay, 2008).

O desafio experimental de *S. Typhimurium* em camundongos constitui um excelente modelo de estudo para compreensão da infectividade e patogenicidade deste enteropatógeno, uma vez que a patogenia da doença em camundongos se assemelha à manifestação clínica da Febre Tifóide nos humanos. Isso permite a identificação de fatores de virulência, bem como viabilizar as possíveis formas de prevenção e tratamento da salmonelose, tanto em animais quanto em seres humanos. (Santos *et al.*, 2001).

Diversos são os estudos que abordam o efeito inibitório de microrganismos probióticos em modelo murino. A produção de substâncias antagonistas, a inibição da adesão ao epitélio, a manutenção da microbiota intestinal indígena e a modulação da imunidade inata e adaptativa são os principais mecanismos de ação dos probióticos no combate às patogenias entéricas. Os principais efeitos benéficos relacionados à modulação do sistema imune envolvem o aumento da produção de IgA secretória na luz intestinal – diminuindo assim a translocação da salmonela para linfonodos mesentéricos e, conseqüentemente, ao baço e fígado (LeBlanc *et al.*, 2010); aumento do estímulo à fagocitose do patógeno – ativando a fagocitose do patógeno que parasita o macrófago intracelularmente e não é eliminado na ausência do tratamento probiótico, por impedir mecanismos de lise e apoptose da célula infectada (Bermudez-Brito *et al.*, 2012); modificação da expressão e produção de citocinas – reduzindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, e IL-8 e TNF- $\alpha$ , e aumentando níveis de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, mantendo dessa forma a integridade do epitélio intestinal (Castillo *et al.*, 2011).

As espécies *L. johnsonii* La1 e *L. rhamnosus* GG, que colonizam o intestino de camundongos gnotobióticos C3H/He/Oujco manifestaram atividade antibacteriana quando os animais foram infectados oralmente com *S. Typhimurium* C5, aumentando a taxa de sobrevivência dos camundongos, assim como as espécies *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* HN001, que foram capazes de conferir proteção em camundongos BALB/c também infectados via oral com *S. Typhimurium*. Animais infectados e tratados com os probióticos produziram maior taxa de anticorpos anti-*Salmonella* no trato intestinal, demonstrando um elevado contingente de sobrevivência, com menores contagens do patógeno no baço e fígado em detrimento aos controles. Além disso, leucócitos oriundos de líquido peritoneal coletados de camundongos alimentados com HN001 exibiram maior taxa *ex vivo* de capacidade fagocítica em relação aos animais do grupo controle (Bernet-Camard *et al.*, 1997; Filho-Lima, Vieira e Nicoli, 2000; Gill *et al.*, 2001).

### Propriedades anticarcinogênicas

Probióticos estão associados à redução dos níveis de  $\beta$ -glicuronidases, nitroreduases e azoredutases, enzimas que exibem grande potencial carcinogênico. Essa redução deve-se principalmente devido à ação competitiva dos probióticos frente as bactérias autóctones do TGI produtoras dessas enzimas. Tanto a exclusão competitiva quanto o antagonismo direto exercem papel importante para essa redução da microbiota indesejável (Kumar *et al.*, 2011).

### Produção de ácidos graxos de cadeia curta

As alterações benéficas da microbiota causada pelos probióticos envolvem primariamente a estimulação de fermentação intestinal por parte desses microrganismos. Dessa forma, a produção de ácido-graxos de cadeia curta (ACC) – como o propionato – é um dos principais fatores que envolvem a ação fermentativa de probióticos no TGI. Dentre os diversos mecanismos de ação dos ACC no hospedeiro, destaca-se o efeito promotor da hematopoiese na medula óssea e maturação de células dendríticas. Esse efeito pode ser local, atuando em tecidos linfóides associados ao intestino quanto sistêmico, podendo auxiliar na redução de processos alérgicos e inflamatórios no sistema respiratório, pelo recrutamento de células dendríticas e consequente ativação de linfócitos *Th2* no pulmão (Trompette *et al.*, 2014)

### Redução do colesterol

Diversos estudos já tentaram esclarecer quais os reais benefícios do probiótico na redução da colesterolemia. Os prejuízos causados por uma dieta pobre em fibra e rica em gordura são extensos. Dentre eles, pode-se citar a formação de placas ateromatosas nas principais artérias do sistema circulatório, envolvendo um aumento no risco de doenças coronarianas e de infarto agudo do miocárdio. Alguns pesquisadores conseguiram associar a redução de níveis de colesterol no sangue à presença de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. na dieta, por meio da assimilação do colesterol, desconjugação de sais biliares e ligação direta de colesterol à parede bacteriana (Pulusoni e Rao, 1983; Gilliland, Nelson e Maxwell, 1985; Gopal, Shah e Roginski, 1996; Diaz e Gibson, 2002).

### Outros efeitos benéficos causados pelos probióticos

Diversos estudos associam a obesidade e diabetes com a microbiota intestinal, de forma que o próprio metabolismo de determinados microrganismos autóctones ao hospedeiro exerça influência no ganho de peso e na resistência à insulina (causando diabetes tipo-2). Dessa forma, o uso de probióticos visa estabelecer um equilíbrio dinâmico dessa microbiota, reduzindo seus efeitos adversos no hospedeiro (Nagpal *et al.*, 2012).

A redução de processos alérgicos também é observada no tratamento com probióticos, tanto pelo desenvolvimento da função de barreira da mucosa quanto pelo estímulo microbiano adequado durante a primeira infância, resultando em um sistema imune mais adaptado e dinâmico. Assim sendo, os probióticos são capazes de atenuar a inflamação intestinal e as reações de hipersensibilidade em pacientes com alergia alimentar, funcionando como um meio de prevenção primária da alergia em indivíduos suscetíveis (Kopp- Hoolihan, 2001; Van de Water, 2003).

Outros efeitos causados pelo uso de probióticos incluem o auxílio à digestão da lactose, por meio da secreção de lactase no lúmen do TGI pelos microrganismos; detoxificação/excreção de metabólitos em virtude de uma mudança no perfil metabolizável dessa microbiota; controle e prevenção de infecções do trato urogenital, mediante adesão à mucosa genital gerando exclusão competitiva; prevenção de cárie e gengivite pelo efeito antagônico direto dos probióticos frente à *Streptococcus mutans*; e prevenção e modulação da Doença de Crohn, mediante a redução de citocinas pró-inflamatórias e do número de CD4+ dentre os linfócitos mesentéricos e tecido linfoide associado ao intestino (Nagpal *et al.*, 2012).

### **3.4. Critérios de seleção aplicados a potenciais microrganismos probióticos**

Critérios para a seleção de novas espécies probióticas incluem características relativas à segurança, funcionalidade e aspectos tecnológicos das culturas que serão utilizadas na composição do produto, seja ele um leite fermentado, um queijo ou qualquer outro derivado lácteo (Saarela *et al.*, 2000; Pancheniak, 2005).

Em relação à segurança, os microrganismos probióticos devem ser provenientes de animais saudáveis, habitantes normais do intestino, não devem ser tóxicos nem patogênicos e, além disso, é preferível que as cepas utilizadas sejam hospedeiro-específicas, para que se obtenha uma eficácia máxima do produto (Salminen *et al.*, 1998; Murarolli, 2008).

Os testes *in vitro* são fundamentais para avaliar a segurança dos microrganismos probióticos. Além disso, são úteis para obter conhecimentos sobre as culturas e os mecanismos do efeito probiótico (FAO/WHO, 2002). Para ser considerado probiótico, o micro-organismo deve obedecer a alguns requisitos, tais como: não apresentar patogenicidade; ser Gram positivo, catalase negativo, produtor de ácidos e resistente aos mesmos; ser resistente à bile; ser viável e/ou estável em seu veículo; e não ser capaz de transmitir genes de resistência a outros microrganismos (Santos *et al.*, 2001).

Outro aspecto importante na seleção de uma nova amostra probiótica é a observação de suas propriedades tecnológicas. Um probiótico deve conter cepas que apresentam rápido crescimento *in vitro*, fácil manipulação, boas condições de produção industrial e que sobrevivam no produto final conservando sua função (Pancheniak, 2005). Além disso, deve ser observada a habilidade da cultura em co-existir com a microbiota indígena do hospedeiro (FAO/WHO, 2002)

### **3.5. Identificação molecular de microrganismos de interesse probiótico**

A identificação fenotípica por meios bioquímicos de microrganismos de interesse, com destaque para bactérias do ácido lático que manifestam potencial probiótico, denota certa dificuldade devido aos inúmeros testes necessários para se identificar determinados grupos. Dessa forma, somente a avaliação fenotípica, por si só, não é suficiente para identificação dos microrganismos de interesse, tanto em gênero quanto em nível de espécie, sendo necessários outros métodos, como a aplicação de testes moleculares para caracterização genotípica (Singh *et al.*, 2009). A identificação precisa por métodos moleculares é exigência da WHO para que se caracterize como probiótico determinado microrganismo.

Várias técnicas moleculares foram desenvolvidas ao longo dos anos para identificação e classificação de microrganismos em nível de amostra, se apresentando mais consistentes,

rápidas, confiáveis e reproduzíveis, podendo ser divididas em abordagens não baseadas em PCR e abordagens baseadas em PCR.

As principais técnicas baseadas em métodos moleculares genéticos caracterizam-se pela amplificação e/ou sequenciamento de regiões altamente conservadas nos genes, tais como: amplificação da região intergênica espaçadora (ITS1) 16S-23S, sequenciamento do gene codificador do RNA ribossomal do gene 16S, amplificação utilizando sequências repetidas (GTG<sub>5</sub>) e restrição enzimática da região ITS 16S-23S. Outras técnicas também baseadas em restrições enzimáticas se caracterizam como: DNA polimórfico randomicamente amplificado (RAPD), fragmento randômico polimórfico amplificado (RFLP) e comprimento polimórfico amplificado (AFLP).

Todas essas metodologias podem ser aplicadas para identificação de BAL isoladas de produtos fermentados, bem como do TGI humano (McCartney, 2009; Singh *et al.*, 2009). Diferentemente das técnicas anteriores, que são dependentes de cultivo bacteriano, atualmente existem técnicas como a análise metagenômica, que se caracteriza por uma análise independente de cultivo, com o intuito de identificar microbiomas de diversos ambientes.

#### Amplificação da região intergênica espaçadora (ITS) 16S-23S rDNA

De acordo com Nour (1998), os genes dos operons *rrn* estão organizados na seguinte ordem: 5'-16S-ITS1-23S-ITS2-5S-3' (ITS - sigla em inglês para “espaçador interno transcrito”), sendo que a região ITS 1 pode apresentar a inserção de um gene de tRNA-Ala (espaçador médio), dos genes tRNA-Ala e tRNA-Ile (espaçador longo) ou nenhuma inserção (espaçador curto) (Magalhães, Floresta e Moraes, 2005). Assim, a amplificação da região intergênica dos genes 16S e 23S presentes no operon *rrn* permite a distinção entre os gêneros *Streptococcus/Lactococcus* (uma única ITS 1), *Enterococcus* (duas ITS 1 diferentes), *Lactobacillus/Pediococcus/Weissella* (três ITS 1 diferentes). Entretanto, a aplicação dessa técnica se limita apenas à identificação em nível de gênero, uma vez que por se tratar de espécies de alta filogenia, essa reação se torna imprecisa e pouco discriminatória (Gurtler e Stanisich, 1996).

Tilsala-Timisjarvi e Alatosava (1997) identificaram as espécies *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* e *Streptococcus thermophilus* por meio da técnica de sequenciamento do RNA ribossomal 16S e 23S.

#### Sequenciamento do rRNA 16S

Trata-se de uma técnica amplamente difundida e utilizada atualmente para identificação molecular de BAL. Uma simples reação de PCR permite a amplificação do gene 16S rRNA, empregando *primers* que são direcionados à regiões universalmente conservadas em ambas as regiões terminais do gene. O *amplicon* (de aproximadamente 1.5 kb) resultante dessa reação pode ser submetido à análises de sequenciamento por várias metodologias diferentes. Então, a análise sequencial pode ser comparada à diversas bases de dados que podem ser acessadas via web, a exemplo: ARB *package* (<http://www.arb-home.de/>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e RDP ([http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch\\_intro.jsp](http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp)) (O'Sullivan, 2000; Ben Amor *et al.*, 2007)

#### Amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)

Baseia-se na técnica de restrição enzimática da amplificação da região intergênica espaçadora (ITS) do rDNA 16S-23S. Pelo uso de enzimas de restrição específicas, obtém-se perfis de fragmentos digeridos discriminatórios o suficiente para a caracterização em nível de espécie para determinados microrganismos (Moreira et al., 2005; Markiewicz *et al.*, 2010). Sandes *et al.* (2014) identificaram que 64% das amostras de *Lactobacillus* spp. avaliadas pela técnica de ARDRA apresentaram perfis únicos de restrição enzimática, podendo ser classificados em nível de espécie.

#### Fingerprinting via rep-PCR - (GTG<sub>5</sub>)

O *fingerprinting* por rep-PCR é um método de alta reprodutibilidade sendo muito útil para uma identificação rápida e confiável no que tange a diferenciação de lactobacilos e outras bactérias do ácido láctico (Van Hoorde, Vandamme e Huys, 2008). Gevers, Huys e Swings (2001) validaram a técnica de (GTG<sub>5</sub>)-PCR para a caracterização e discriminação de uma série de BAL associadas a produtos fermentados, alcançando identificações em nível de espécie, subespécie e potencialmente ao nível de linhagens.

#### Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

AFLP é basicamente a combinação da técnica de PCR padrão com RFLP, baseado na amplificação PCR seletivo dos fragmentos de restrição do DNA digerido. Esses fragmentos são então separados via eletroforese em gel de poliacrilamida. É uma técnica é altamente reproduzível e permite uma rápida leitura do genoma pelos fragmentos polimórficos (Singh *et al.*, 2009) Diversos estudos descrevem tal metodologia aplicada à discriminação entre as espécies. Torriani *et al.* (1996) conseguiram discriminar as espécies de *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* e *L. paraplantarum* utilizando essa metodologia, ao passo que Vancanneyt *et al.* (2006) utilizaram essa técnica para caracterizar diferentes linhagens (avaliação intra-específica) pertencentes ao gênero *Lactobacillus* spp.

#### Análise de microbioma (metagenômica)

A análise metagenômica envolve o isolamento de DNA de uma amostra do ambiente, como solo, água, conteúdo intestinal, e que pode também ser aplicada a outros produtos como o queijo (justificando o uso dessa abordagem neste projeto). Esse DNA pode ser mapeado filogeneticamente por diversos marcadores, como genes *recA* e rRNA 16S ou 18S (Tilsala-Timisjärvi e Alatosava, 1997), tornando o processo dinâmico no que tange a amplificação inicial para a formação da biblioteca (cDNA) (Handelsman, 2004). Basicamente, ela pode ser dividida em dois tipos: análises de sequenciamento e análises funcionais metagenômicas. A primeira envolve necessariamente o sequenciamento completo do genoma bacteriano, permitindo estabelecer relações filogenéticas entre os diversos tipos de genes microbianos. As análises funcionais envolvem mapeamento metagenômico de bibliotecas em busca da expressão fenotípica de mecanismos de sobrevivência no queijo como a produção de bacteriocinas, tolerância a acidez e inibição de patógenos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Isolamento de bactérias do ácido láctico das amostras de silagem, leite, soro-fermento endógeno (pingo), água e queijo Minas artesanal e análises de triagem (morfologia, coloração por Gram e teste de catalase)

Foram colhidas amostras de silagem (diretamente do silo), água (proveniente da torneira da queijaria), leite (oriundo do tanque de expansão), soro fermento endógeno (obtido pelo processamento do queijo do dia anterior) e queijos em diferentes períodos de maturação (0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias) de diversos produtores presentes na região de Campo das Vertentes. Essas amostras foram provenientes de produtores cadastrados (n=3, nomeados como A, B e C) e não cadastrados (n=4, nomeados como D, E, F e G) pelo Programa de Queijo Minas Artesanal do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA). As amostras foram transportadas sob refrigeração para a realização do isolamento e análises de triagem, conduzidas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, da Universidade Federal de Minas Gerais.

O processamento e posterior diluição das amostras foram realizados de acordo com a metodologia empregada por Resende *et al.* (2011) em relação às amostras de água, leite, soro-fermento e queijo. Uma alíquota de 1 mL das amostras de água, silagem, leite soro-fermento e queijo foram então diluídas em 9 mL de solução salina peptonada (diluição de 10<sup>0</sup> UFC/mL) e semeados na superfície de placas de Petri contendo os meios de cultura ágar MRS de *Man, Rogosa e Sharpe* (*Difco*, Detroit, Michigan, Estados Unidos) e ágar M17 (*Difco*). As placas foram incubadas a 37°C, por 48 horas, em aerobiose.

A partir de colônias apresentando aspectos morfológicos diferentes de cada meio de cultura, foi realizado esfregaço em lâmina para coloração pelo método de Gram. Além disto, a partir dessas mesmas colônias foram feitos testes de catalase, nas próprias placas, utilizando-se H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%).

As colônias que apresentaram morfologia em coco ou bastonete, coloração Gram positivo e teste de catalase negativo foram então transferidas para tubos de ensaio contendo 5mL caldo MRS (*Difco*) e, em seguida, incubados em aerobiose a 37°C, durante 24 a 48 horas, período esse que foi determinado pela turbidez apresentada em cada tubo de ensaio com caldo MRS.

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.

### 4.2. Identificação molecular das amostras de BAL Gram positivo, catalase negativo de água, leite, soro-fermento e queijo Minas artesanal

A identificação molecular foi realizada no Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas (LGMPP), do Instituto de Ciências Biológicas, da UFMG. As amostras de BAL foram destinadas às análises de biologia molecular, utilizando *primer* específicos que, por meio do sequenciamento da região espaçadora dos genes 16S-23S do rDNA, elucidavam a detecção de bactérias do ácido láctico, conforme metodologia descrita por Tilsala-Timisjarvi e Alatosava (1997).

A extração do DNA total das amostras de BAL previamente isolados de ágar MRS e M17 (*Difco*) foi realizada a partir do cultivo recente em caldo MRS (*Difco*), incubado sob aerobiose, a 37°C, durante 24 a 48 horas.

#### Pré-tratamento das células e extração do DNA genômico

As amostras de BAL foram submetidas a um pré-tratamento com o intuito de obter células sem parede e membrana celular. Dessa forma, as culturas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugadas a 4.000 G/15min sendo descartado o sobrenadante. O *pellet* foi suspenso em 1 mL de LiCl (5M) e incubado em temperatura ambiente, sob agitação, por 90 minutos. Após duas lavagens sucessivas com água deionizada, as amostras foram centrifugadas a 4.000 G/15 min sendo descartado o sobrenadante.

O *pellet* foi tratado com 1 mL de lisozima suspenso em tampão protoplasmático (25 mM de sacarose, 50 mM de tris-HCl, pH 8,0) e incubado por 60 – 90 min, a 37°C. Após centrifugação a 8.000 G/15 min o sobrenadante foi descartado. O resultado final foi o DNA *pelletizado*.

O DNA total dos protoplastos obtidos de cada amostra foi extraído com auxílio do Kit *Wizard SV Genomic DNA Purification System* da companhia *Promega Corporation* (Madison, Wisconsin, Estados Unidos), segundo instruções do fabricante.

#### Amplificação do DNA por PCR: genes 16S-23S

A identificação dos microrganismos em nível de gênero foi realizada a partir da amplificação da região intergênica do rRNA 16S-23S. O espaçador interno transcrito 1 (ITS 1) foi amplificado utilizando-se um par de *primer* que se anelam a regiões conservadas dos genes 16S e 23S, 16-1<sup>a</sup> (5'GAATCGCTAGTAATCG 3') e 23-1B (5' GGGTTCCCCCAT TCGGA 3') (Tilsala Timisjarvi e Alatossava, 1997). Em seguida os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,4%) e visualizados com auxílio de transiluminador de UV Easycod 100 (BioAgency, São Paulo, Brasil), após coloração com brometo de etídio.

O programa utilizado para amplificação foi: 1 ciclo (95°C, por 2 minutos), 35 ciclos (95°C, por 30 segundos; 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e o último ciclo (72°C, por 5 minutos) em termociclador da marca Applied Biosystems® (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos da América).

#### Amplificação do DNA por rep-PCR-*fingerprinting*: (GTG)5

A diferenciação genotípica entre as amostras foi realizada pela metodologia descrita por Gevers, Huys e Swings (2001). O material genético extraído das amostras de BAL de interesse foi submetido a uma Reação em Cadeia da Polimerase baseada em Sequências Repetitivas (rep-PCR), utilizando o oligonucleotídeo (GTG)5 como *primer* (GTG)5 PCR 5' GTG GTG GTG GTG GTG-3'). Após amplificação no termociclador) os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (2,0%) e visualizados em transiluminador UV após coloração com brometo de etídio.

Os perfis de DNA obtidos pelo (GTG)5-PCR foram analisados pelo programa BioNumerics V6.5 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Os valores de similaridade genética calculadas pelo



coeficiente de Pearson foram utilizados para gerar um dendrograma de similaridade pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

A partir da análise de Pearson, foi estabelecido um limite mínimo de 90% de similaridade ( $\geq 90\%$ ), para que as amostras *clusterizadas* a partir desta porcentagem fossem consideradas de mesma linhagem. Dessa forma, apenas uma amostra de um agrupamento com  $\geq 90\%$  de similaridade foi selecionada para o sequenciamento, considerando que todas as outras pertenciam à mesma linhagem. Essa mesma metodologia foi aplicada em trabalho realizado por Van Hoorde, Vandamme e Huys (2008).

#### Sequenciamento genético das amostras

As amostras de BAL de interesse foram encaminhadas para sequenciamento no Laboratório Myleus Biotechnology (<http://www.myleus.com.br>). As amostras tiveram o gene 16S rRNA sequenciado pelo método de Sanger, utilizando-se um sequenciador automático MegaBACETM 1000 (GE HealthCare). Os *primers* usados foram o 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3') (Reysenbach, Longnecker, e Kirshtein, 2000). O resultado do sequenciamento foi verificado via software SeqScanner, da Applied Biosystems e os resultados foram comparados *online* com os bancos de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e RDP ([http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch\\_intro.jsp](http://rdp.cme.msu.edu/seqmatch/seqmatch_intro.jsp)), sendo estabelecido um percentual mínimo de 98% de similaridade entre as sequências.

#### Diferenciação entre os grupos *L. plantarum* e *L. casei* via PCR espécie-específica

Amostras de BAL de interesse do grupo *L. casei* que não apresentaram similaridade superior a 98% nos alinhamentos das sequências frente ao banco de dados NCBI e RDP foram submetidas às reações com os *primers casei*, *para* e *raham* (Ward e Timmins, 1999), a fim de caracterizá-las em nível de espécie. O mesmo foi realizado com as amostras do grupo *L. plantarum*, pelo uso de *primers* para reação em PCR multiplex de acordo com metodologia descrita por Torriani, Felis e Dellaglio (2001).

### **4.3. Avaliação *in vitro* do potencial probiótico de amostras de BAL isoladas de soro fermento, água, leite, silagem e queijo Minas artesanal com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação**

Apenas amostras identificadas como *Lactobacillus/Pediococcus* foram selecionadas, com o intuito de caracterizar o potencial probiótico desses microrganismos. Dessa forma, a resistência aos sais biliares foi o primeiro parâmetro estabelecido para a seleção, seguido de resistência ao suco gástrico, resistência aos antimicrobianos e posteriormente antagonismo *spot-on-the-lawn*. As demais análises – testes de co-cultivo, sobrenadante e produção de peróxido - foram realizadas concomitantes ao experimento *in vivo*, com o intuito de avaliar a resposta das amostras pré-selecionadas frente à *Salmonella* Typhimurium, tanto em testes *in vitro* quanto *in vivo*.

#### Análise *in vitro* de resistência de amostras de BAL isoladas de soro fermento, água, leite, silagem e queijo Minas artesanal com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação frente aos sais biliares

Para o teste de resistência a sais biliares utilizou-se metodologia adaptada de Silva *et al.* (2013). Os microrganismos previamente identificados e selecionados foram cultivados a 2% em caldo MRS (Difco) (v/v) e inoculados em MRS caldo puro (controle) e MRS contendo 0,3% (p/v) de sais biliares (Oxgall). A absorbância do cultivo foi determinada pela leitura de OD600nm, a cada 30 minutos, durante 6 horas de incubação no aparelho de espectrofotometria (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 – Molecular Devices), e a porcentagem de inibição de crescimento foi calculada utilizando o programa Graphpad Prism 5.0 pela fórmula  $(1 - SG/CT) \times 100$ , em que SG e CT correspondem a área sob a curva de crescimento das bactérias tratadas com sais biliares e do controle, respectivamente.

A análise foi realizada em triplicata, com duas repetições distintas.

#### Análise *in vitro* de resistência de amostras de BAL isoladas de soro fermento, água, leite, silagem e queijo Minas artesanal com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação frente ao ácido

A técnica utilizada foi adaptada de Neumann (1991) e Silva *et al.* (2013). As culturas de BAL foram distribuídas em dois microtubos e então diluídas 10X em solução salina 0,9%, pH 7.0 (controle) e em suco gástrico artificial (3g/L de pepsina, pH 2.0 e pH 1.5). Os microtubos foram incubados a 37°C, por 30 minutos e, posteriormente, foram centrifugados (13.000 G/1min.) o sobrenadante descartado e os *pellet* suspensos em caldo MRS (Difco).

A fim de avaliar a viabilidade das células, foram aplicados 200 µL/poço dos inóculos do controle e das amostras tratadas com suco gástrico artificial em uma microplaca de 96 poços que foi incubada em espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 - Molecular Devices) a 37°C. A absorbância do cultivo foi determinada pela leitura de OD620nm, a cada 30 minutos, durante 12 horas em incubação no aparelho de espectrofotometria, e a porcentagem de inibição de crescimento foi calculada utilizando o programa Graphpad Prism 5.0 pela fórmula  $(1 - SG/CT) \times 100$ , sendo que SG e CT correspondem a área sob a curva de crescimento das bactérias tratadas com suco gástrico artificial e do controle, respectivamente.

A análise foi realizada em triplicata, com duas repetições distintas.

#### Análise *in vitro* de susceptibilidade de amostras de BAL isoladas de soro fermento, água, leite, silagem e queijo Minas artesanal com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação frente aos antimicrobianos

O antibiograma foi realizado de acordo com o método adaptado de susceptibilidade a antimicrobianos exposto por Charteris *et al.* (1998). As amostras foram cultivadas em tubos contendo caldo MRS (Difco), incubados a 37°C, durante 24h, sob aerobiose. O repique foi realizado em placas de Petri com ágar MRS (Difco), incubadas a 37°C, durante 24h, sob aerobiose.

Cada amostra foi transferida para um tubo de ensaio com rosca contendo 3,5 mL de salina 0,9%, para se atingir a concentração de 0,5 na escala Mc Farland ( $10^8$  UFC/mL). *Swabs* foram mergulhados nos tubos e espalhados em toda extensão de placas de Petri de 14 cm de diâmetro, contendo ágar MRS (Difco).

Dez discos contendo antimicrobianos (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) foram distribuídos sobre o ágar MRS em cada placa de Petri. Foram usados as seguintes drogas com suas correspondentes concentrações: ceftazidime - CAZ (30 µg), clindamicina - DA (2 µg), ciprofloxacina - CIP (5 µg), eritromicina - E (15 µg), gentamicina - GN (10 µg), oxacilina - OX (1 µg), penicilina - PEN (10 UI), estreptomicina - S (25 µg), tetraciclina - TE (30 µg), vancomicina - VA (30 µg)

O controle de qualidade dos discos contendo os antimicrobianos foi realizado utilizando amostra de *Staphylococcus aureus* ATCC 2921, de acordo com técnica proposta por Charteris *et al.* (1998). Por fim, houve a leitura dos halos de inibição com paquímetro digital (Mitutoyo Digimatic Caliper). As amostras de BAL foram classificadas qualitativamente como resistente, moderadamente sensível e sensível às drogas antimicrobianas, de acordo com padrão proposto por Charteris *et al.* (1998).

A análise foi realizada em triplicata, com duas repetições distintas.

#### Teste de antagonismo *in vitro* de amostras de BAL isoladas de soro fermento, água, leite, silagem e queijo Minas artesanal com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação frente aos microrganismos patogênicos reveladores

O teste de antagonismo foi realizado em duplicata, com duas repetições para cada amostra, conforme a técnica adaptada relatada por Tagg, Dajami e Wannamaker (1976) Para a execução do antagonismo, as bactérias previamente identificadas foram denominadas produtoras, sendo testadas frente à microrganismos que foram denominados reveladores. Foram utilizadas seis culturas patogênicas como reveladoras (todas provenientes da *American Type Culture Collection* – ATCC): *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Salmonella enterica* var. Typhimurium ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 2921, *Shigella flexneri* ATCC 25875, assim como duas reveladoras oriundas do próprio queijo (*Staphylococcus aureus aureus*, *Escherichia fergusonii*) e duas BAL isoladas dos próprios queijos (*Lactobacillus plantarum 1* e *Lactobacillus plantarum 7*) com o objetivo de verificar se houve auto-inibição por parte das produtoras.

As amostras de BAL foram ativadas em tubos de ensaio com rosca contendo caldo MRS (Difco) e incubadas a 37°C, durante 24h, sob aerobiose. Após dois cultivos, 5µL de cada amostra foram depositados no centro de uma placa de Petri contendo ágar MRS (Difco), sendo incubadas a 37°C, por 48 h, sob aerobiose. O objetivo dessa etapa é formar o *spot*, que representa o crescimento da BAL produtora de possíveis substâncias de caráter antagonista. Em seguida, as bactérias produtoras foram eliminadas pela adição de clorofórmio às tampas das placas de Petri, sendo posteriormente mantidas sob a luz UV por 30 minutos.

As amostras reveladoras foram cultivadas duas vezes, e incubadas em caldo BHI (Difco). Para as bactérias reveladoras oriundas do próprio queijo, o crescimento foi 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). Os tubos com ágar semi-sólido contendo as bactérias reveladoras foram vertidos nas camadas de ágar solidificado após o tratamento com clorofórmio.

As placas foram incubadas a 37°C, por 24h, sob aerobiose. Dessa forma, foi aferido o halo de inibição proveniente de substâncias antagonistas oriundas dos *spots* das bactérias produtoras

frente as bactérias reveladoras por um paquímetro digital (Mitutoyo Digimatic Caliper, Mitutoyo Sul Americana Ltda, Suzano, São Paulo, Brasil).

O experimento de antagonismo *in vitro* foi realizado em duplicata com duas repetições distintas.

Antagonismo *in vitro* em co-cultivo de amostras de BAL isoladas de soro fermento, água, leite, silagem e queijo Minas artesanal com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação –frente a *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* e *Shigella flexneri*

O teste de atividade antimicrobiana dos lactobacilos frente a salmonelas conhecido como teste de co-cultivo foi realizado para avaliar a capacidade de antagonismo direto da cultura produtora frente à cultura reveladora. Diferentemente da técnica *spot-on-the-lawn*, onde somente o antagonismo por substâncias produzidas pela cultura produtora frente a culturas reveladoras pode ser observado, o método em questão, proposto por Hütt *et al.* (2006), consiste em crescer as culturas de lactobacilos, pediococos e salmonela previamente ativadas (caldo MRS - Difco, para lactobacilos e BHI - Acumedia, para salmonela, a 37°C, 24 horas, em aerobiose), em inóculos de 1%, em caldos MRS e BHI, por 18 horas. Após esse período, plaqueou-se (por técnica de *spread plate*) as diluições seriadas de cada produto de co-cultivo em ágar MacConkey (Acumedia) por 24 horas, a 37°C, em aerobiose. O resultado desse plaqueamento foi então comparado com o crescimento controle da salmonela que não foi submetida ao co-cultivo com as culturas de lactobacilos produtoras.

O teste de antagonismo pelo sobrenadante das culturas, também proposto por Hütt *et al.* (2006), visou avaliar a importância de substâncias produzidas pelas culturas de lactobacilos no antagonismo a patógenos. As amostras de BAL duplamente cultivadas em caldo MRS (Difco) foram centrifugadas a 5.000g/5min, sendo posteriormente coletado o sobrenadante e esterilizado através de microfiltração em filtro de 0,22 µm (Millex, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Os microrganismos reveladores (*S. Typhimurium*, *S. flexneri* e *E. coli*) foram adicionados em um inóculo de 1% (após duplo cultivo em caldo BHI) aos sobrenadantes e incubados por 18 horas, a 37°C, em aerobiose. Suas diluições seriadas foram plaqueadas em ágar MacConkey e incubadas por 24 horas, a 37°C, em aerobiose. Os sobrenadantes das amostras em estudo foram também neutralizados (em pH 6,5, com solução de NaOH 1M) para avaliar, em experimento semelhante, a influência do ácido no antagonismo de BAL frente às bactérias reveladoras.

Os experimentos foram realizados em triplicata, com duas repetições distintas.

Avaliação de amostras de BAL isoladas de soro fermento, água, leite, silagem e queijo Minas artesanal com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação para capacidade de produção de peróxido de hidrogênio

A identificação dos microrganismos produtores de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foi realizada em triplicata, segundo adaptação do método colorimétrico descrito por Rabe e Hillier (2003). As amostras de BAL foram inoculadas em placas contendo meio ágar TMB-plus (43g de *Brucella* Agar, 0,25g de dihidroclorato de tetrametilbenzidina, 20g de amido, 10 mL de solução de hemina a 0,05%, 0,57g de sulfato de magnésio anidro, 0,12g de sulfato de manganês monohidratado, 10mL de solução de peroxidase a 0,1% e equino a 0,05%) e incubadas a 37°C, por 12h, em câmara de anaerobiose. Posteriormente, as placas foram expostas ao ar durante 30 minutos e a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qualitativamente categorizada como alta produção (+ + +) para

colônias marrons, media produção (+ +) para colônias azuis, baixa produção (+) para colônias azul-claras e ausência de produção (-).

#### **4.4. Análise *in vivo* do potencial probiótico de amostras de BAL isoladas de soro fermento, água, leite, silagem e queijo Minas artesanal com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação**

##### Aquisição dos animais

Foram utilizados camundongos convencionais, de 21 a 23 dias de idade, de ambos os sexos, da linhagem BALB/c, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB, UFMG. Um total de 24 animais foi dividido em quatro grupos com n=6 (seis) camundongos. Todos os animais convencionais foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia (de nível NB2) em mini-isoladores do modelo ALE.MIL.01.03 (Alesco, Monte Mor, São Paulo, Brasil). Os animais convencionais, durante a experimentação, receberam *ad libitum* ração sólida (Nuvilab Nuvital, Curitiba, Brasil) e água filtrada e foram mantidos em estante ventilada (Alesco), com controle de umidade (60-80%), de temperatura (22-24°C) e com ciclo diurno/noturno de 12 horas.

##### Manejo dos animais e aspecto ético

A manutenção e a experimentação nos animais foram conduzidas respeitando as normas do “Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” (COBEA, 2006). A realização da parte *in vivo* do experimento foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob o número 303 / 2014, com validade até 27/11/2019 (anexo 1).

##### Tratamento dos animais convencionais

Os 24 animais convencionais receberam inóculo diário de 0,1ml da cultura de cada amostra selecionada (LP4 e PA2) e como controle positivo uma amostra de *L. casei* isolada de leite fermentado de apelo comercial, contendo  $10^9$  UFC/ml. A padronização do inóculo foi realizada mediante diluição a  $10^{-6}$  do leite em solução salina peptonada e posterior plaqueamento em ágar MRS (Difco) para contagem das colônias. Os animais do grupo controle receberam 0,1ml de leite esterilizado não fermentado, via intragástrica (por gavagem – administração oral com acesso ao esôfago), dez dias antes do desafio com a bactéria patogênica e até o final do período experimental (Martins *et al.*, 2010).

##### Desafio dos animais convencionais com *S. Typhimurium*

O inóculo de *S. Typhimurium* foi feito a partir de uma cultura crescida por 18 horas, a 37°C, em aerobiose, contendo  $10^7$  UFC por via intragástrica. A confirmação da viabilidade do inóculo e as contagens bacterianas nas fezes dos animais foram feitas em ágar MacConkey (Difco) após 24 horas de incubação, a 37°C, em aerobiose (Martins *et al.*, 2010).

##### Determinação da mortalidade em decorrência da infecção experimental por *S. Typhimurium* em camundongos convencionais e acompanhamento do desenvolvimento ponderal

As amostras de BAL selecionadas foram testadas quanto à sua capacidade de proteger camundongos convencionais contra o desafio experimental por *S. Typhimurium*. A mortalidade

acumulada devido à inóculos intragástricos de *S. Typhimurium* foi determinada nos 24 animais convencionais desafiados no décimo dia após o tratamento com as respectivas amostras. Cada grupo foi constituído de seis animais cujo desenvolvimento ponderal no decorrer de 28 dias também foi avaliado (Silva *et al.*, 2004).

#### Análise estatística de antagonismo *in vitro* e determinação de mortalidade e desenvolvimento ponderal de camundongos convencionais infectados com *S. Typhimurium*

O programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA) foi utilizado para a realização de todas as análises estatísticas:

As médias dos tratamentos, considerando o valor dos halos (mm) de inibição para o teste de antagonismo *in vitro spot-on-the-lawn* foram analisadas pelo teste de Kruskal Wällis, com pós-teste de Dunn, em nível de significância de 5%. Já para a enumeração de enterobactérias (UFC/ml) em meio ágar MacConkey nos testes *in vitro* de co-cultivo e sobrenadante, foram analisadas em Two-way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, em nível de significância de 5%. As curvas de morte em animais convencionais tratados ou não com lactobacilos/pediococos, isolados de diferentes origens e desafiados com salmonela foram avaliadas pelo teste Log-Rank (Mantel-Cox), em nível de significância de 5%. Para a análise de ganho de peso em animais convencionais, foi utilizado o teste Two-Way ANOVA, com pós-teste de Bonferroni, em um nível de significância de 5%.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Isolamento, caracterização morfológica e identificação molecular das amostras de água, silagem, leite, soro fermento e queijo Minas artesanal com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação

De um total de 230 amostras plaqueadas em ágar MRS e M17 provenientes de água, silagem, leite, soro fermento endógeno e queijo, 94 amostras foram pré-selecionadas, atendendo aos requisitos estabelecidos: coloração Gram positivo, coco e/ou bastonete e teste de catalase negativo, conforme metodologia descrita por Resende *et al.* (2011). Dessa forma, essas 88 amostras foram submetidas à reação de amplificação intergênica do rDNA 16S-23S.

### 5.2. Amplificação da região intergênica espaçadora (ITS) 16S-23S rDNA

As 88 amostras de bactérias pré-selecionadas pela caracterização morfológica foram submetidas à identificação molecular por PCR dos espaçadores 16S-23S, a qual evidenciou a presença de quatro gêneros de BAL: *Streptococcus/Lactococcus* (n=11 ou 12,5%) , *Enterococcus* (n= 42 ou 47,7%) e *Lactobacillus/Pediococcus* (n=35 ou 39,7%) (figura 4).

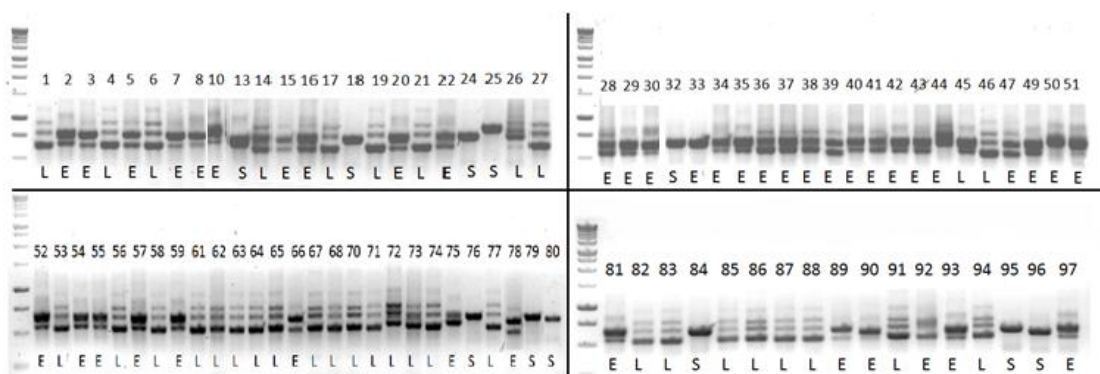


Figura 4. Resultado do PCR 16S-23S rDNA de amostras isoladas de silagem, água, soro fermento, leite, silagem e queijo Minas artesanal com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação. S – *Streptococcus*; E – *Enterococcus*; L- *Lactobacillus/Pediococcus* (bandas entre 500 e 750 bp)

A distinção destes gêneros é possível devido às duplicações e inserções de sequência presentes no espaçador interno transcrito 1 (ITS 1) da região 16S-23S do rRNA (Nour, 1998; Magalhães, Floresta e Moraes, 2005). *Streptococcus/Lactococcus* apresentam pelo menos uma região espaçadora, enquanto *Enterococcus* spp. possuem pelo menos dois espaçadores diferentes com pesos semelhantes e migração próxima dentro do gel, e as espécies de *Lactobacillus* e *Pediococcus* mostram três ITS 1 distintas (Dobson *et al.*, 2002).

As amostras 9, 11, 12, 23, 31, 60 e 69 não apresentaram bom rendimento de reação. Dessa forma, 36 das 90 amostras de BAL foram identificados como sendo pertencentes aos gêneros *Lactobacillus/Pediococcus*, 43 como pertencentes ao gênero *Enterococcus* e onze amostras pertencentes ao gênero *Streptococcus*. As amostras que apresentaram três bandas (*Lactobacillus/Pediococcus*) foram submetidas à reação *Fingerprinting* via rep-PCR - (GTG5). O resultado da reação foi expresso em forma de dendrograma (figura 5), via UPGMA. As amostras de BAL foram agrupadas em concordância com o resultado da análise de coeficiente de Pearson.

Conforme descrito anteriormente na metodologia, com o intuito de reduzir o número de amostras a serem sequenciadas, um único microrganismo de cada agrupamento em percentual de similaridade superior a 90% foi selecionado para a análise ~~de~~-via sequenciamento do gene rRNA 16S. Esse mesmo procedimento foi adotado por Van Hoorde, Vandamme e Huys (2008).



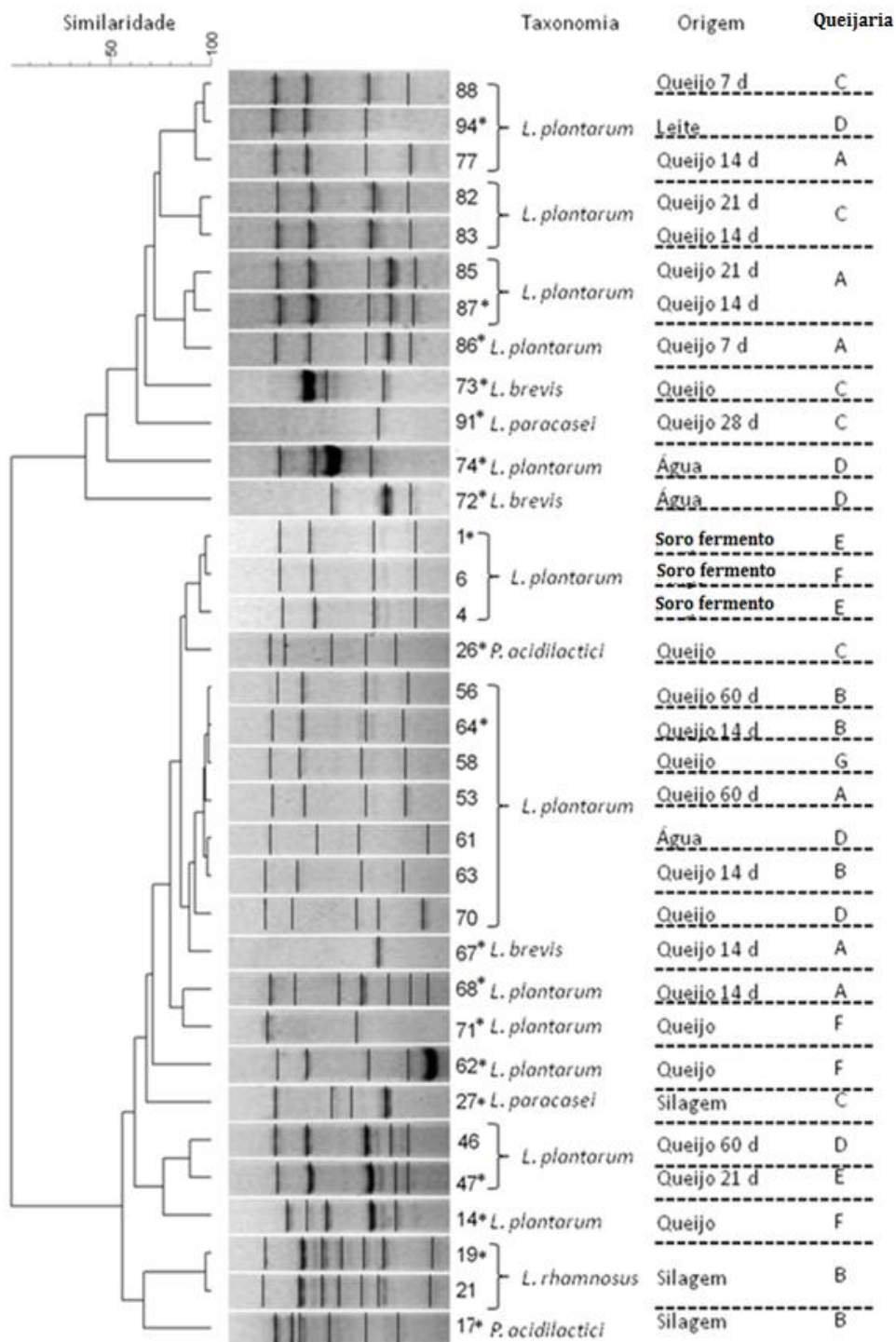


Figura 5 – Árvore filogenética das amostras de BAL isoladas de silagem, água, soro fermento e queijo Minas artesanal com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação, oriundas de sete queijarias da região de Campo das Vertentes. A análise UPGMA foi baseada no coeficiente de similaridade de Pearson e cada única amostra de agrupamentos acima de 90% foi sequenciado via rRNA16S (identificados com \*)

Amostras de BAL associadas a queijos produzidos a partir de leite cru são elementos cruciais que influenciam a qualidade do queijo, *flavour*, peculiaridade e autenticidade (Steele, Broadbent e Kok, 2013). Diversos fatores como a alimentação do gado, a composição do leite, as práticas artesanais de produção e características do ambiente e da região podem influenciar a diversidade e dinâmica de comunidades microbianas associadas à produção de queijos artesanais, suas propriedades sensoriais e de sua qualidade final. Como as características físico-químicas do queijo são diretamente proporcionais à atuação da microbiota láctica, torna-se mais do que importante caracterizar taxonomicamente linhagens e grupos de bactérias que potencialmente contribuem para as características do queijo (Fortina *et al.*, 2003; Moatsou *et al.*, 2001; Van Hoorde, Vandamme e Huys, 2008)

As amostras identificadas foram: *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. rhamnosus*, *L. paracasei* e *P. acidilactici*, com um predomínio de *L. plantarum* ao longo de toda a análise de *fingerprinting*, de diferentes origens e propriedades. Van Hoorde, Vandamme e Huys (2008) ao avaliarem dois queijos artesanais tradicionais produzidos a partir de leite cru (Bellie e Dulces – tipo gouda) identificaram por meio de rep-PCR - (GTG<sub>5</sub>) e rRNA 16S seq. predominância de *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus curvatus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans* e *Lactobacillus perolens*. Pogacic *et al.* (2013) avaliando Grana Padano, queijo artesanal também produzido a partir de leite cru e de soro-fermento endógeno aos moldes do “pingo” identificaram *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus* e *Pediococcus acidilactici* como microbiota predominante.

Analisando as amostras de BAL e suas respectivas origens (tabela 1) , observa-se que amostras de *L. plantarum* foram encontradas em quase todas as origens, exceto em queijo 28 dias e silagem, ao passo que foi a única espécie encontrada no leite. Esse resultado é um forte indicativo de que ocorre uma predominância desse microrganismo na região. As respostas variadas frente aos diferentes testes aos quais foram submetidos as espécies indicam que, apesar de taxonomicamente serem semelhantes, o efeito de amostra enquanto linhagem sobrepõe essa filogenia.

Tabela 1. Distribuição das amostras de *Lactobacillus plantarum*, *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. rhamnosus* e *Pediococcus acidilactici* isolados de silagem, água, soro fermento, leite e queijos Minas artesanais com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação nas sete queijarias da região de Campo das Vertentes

Origem	Espécies				
	<i>L. plantarum</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>P. acidilactici</i>
Queijo 0 d	D; F; G		C		F
Queijo 7d	A; C				
Queijo 14d	A; B; C		A		
Queijo 21d	A; C; E				
Queijo 28d		C			
Queijo 60d	A; B; D				
Soro Fermento	E; F				
Silagem				B	B
Água	D		D		
Leite	D				

Legenda: letras maiúsculas indicam queijarias distintas

Em relação ao queijo Minas artesanal, Borelli *et al.* (2011) observaram populações de BAL ao longo de todo o período de maturação do queijo Minas artesanal produzido em queijarias na região da Serra da Canastra (Minas Gerais). As espécies identificadas foram: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus acidilacticii* e *Weissella paramesenteroides*. Analisando parâmetros microbiológicos de queijos da Serra da Canastra, Nóbrega (2007), encontrou altas contagens de BAL como microbiota dominante do fermento endógeno. Apesar do crescimento bacteriano não ter apresentado diferença significativa nos períodos de água e seca, o pesquisador encontrou valores numéricos superiores de *Lactococcus* spp. para o período das águas e valores superiores de *Lactobacillus* spp.. Esses resultados corroboram os dados de Borelli *et al.* (2011), que também encontrou contagens elevadas de BAL, principalmente *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus casei*.

Arcuri *et al.* (2013) avaliaram o perfil de bactérias do ácido lático de queijos provenientes de 4 mesorregiões (Serro, Cerrado, Serra da Canastra e Araxá). Utilizando a amplificação da região V3 do rDNA 16S, seguido de análise DGGE, os pesquisadores encontraram perfis de bandas homólogos a microrganismos como *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus*. No estudo, a 65% de similaridade, a análise do *cluster* de padrões via DGGE revelou uma clara separação de amostras do queijo Minas artesanal relacionados à sua origem. As amostras de queijo em cada *cluster* foram idênticas ou muito próximas em semelhança, indicando uma ocorrência de baixa diversidade bacteriana. Além disso, os padrões via DGGE determinaram uma clara diferença entre amostras oriundas do queijo Minas artesanal e queijos produzidos em escala industrial (que foram usados como controles). Essa mesma separação de amostras pode ser verificada no dendrograma estabelecido, onde se observa a formação de dois grandes agrupamentos a um baixo percentual de similaridade (<10%), indicando grande divergência das possíveis linhagens subsequentes.

Sendo assim, observa-se que as amostras de BAL, como *L. plantarum* oriundas de queijarias cadastradas (A, B e C) podem ser observadas nos dois grandes grupos, ao passo que amostras de BAL das queijarias não-cadastradas (D, E, F e G) apresentaram amostras restritas a um único grande grupo. Embora o segundo grande grupo tenha apresentado maior diversidade bacteriana, muito se deve justamente às amostras provenientes de queijarias cadastradas. Isso é um forte indicativo de que as essas propriedades possuem maior diversidade bacteriana em detrimento às queijarias não-cadastradas. Esses dados reforçam a ideia de que BAL são necessárias tanto para caracterização sensorial desses queijos quanto para uma possível redução de microbiota patogênica e/ou contaminante dos queijos Minas artesanal.

*Pediococcus acidilactici* foi isolada em amostras de queijo da queijaria C e silagem da queijaria B, ambas apresentando agrupamentos isolados, porém dentro do segundo grande agrupamento. O isolamento de *P. acidilactici* ainda não havia sido observado em outros estudos envolvendo o queijo Minas artesanal, embora diversos outros trabalhos envolvendo queijos artesanais já descreveram a presença desse microrganismo. Settanni e Moschetti (2010) abordaram dados interessantes envolvendo a detecção de *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *P. acidilactici* no que diz respeito ao papel destes como BAL não iniciadoras (*Non starter LAB* – NSLAB), que atuam em estágios de maturação mais avançados do queijo, porém ambos os microrganismos foram isolados de silagem e de queijo fresco. Dessa forma, a silagem pode ter atuado como um agente inoculador de NSLAB, que pode ser demonstrado com amostras de silagem e queijo de 28 dias da queijaria C, onde isolou-se *L. paracasei*. Entretanto, são necessários estudos mais aprofundados envolvendo a dinâmica microbiana desses queijos. De acordo com Pogacic *et al.* (2013) essas espécies de NSLAB representam uma pequena parte da população em ambientes com grande diversidade microbiana, como leite e queijo, sendo, portanto, difícil estabelecer uma evidência sólida que extrapole para o conceito de comunidade desses microrganismos.

Verifica-se que as amostras de *L. plantarum*, *L. paracasei* e *L. brevis* foram detectadas na água, leite, soro fermento endógeno e, no caso específico de *L. plantarum*, em diversas fases de maturação do queijo de diferentes propriedades, o que pode ser explicado graças à característica desses microrganismos de serem NSLAB, atuando principalmente na proteólise e produção de *flavour*, bem como atuando como inibidores de microrganismos patogênicos.

A detecção de *L. plantarum* no soro fermento endógeno pode ser contrastada com o experimento realizado por Poveda, Cabezas e McSweeney (2004), que inocularam uma cultura iniciadora adicionada de *L. plantarum* em queijos Manchego e observaram maior concentração de aminoácidos na massa em contraste aos queijos com cultura comercial. Terzic-Vidojevic *et al.* (2013) identificaram que amostras de *L. plantarum* oriundos de queijo de cabra artesanal feito com leite cru na região da Sérvia demonstraram importantes propriedades físico-químicas (como produção de exopolissacarídeo - EPS e alta atividade proteolítica), podendo ser aplicados em culturas iniciadoras para a fabricação desses queijos.

Esses resultados indicam que o soro fermento endógeno é importante tanto por trazer culturas iniciadoras como também por inocular microrganismos que atuam na maturação do produto, assim como ocorre na silagem.

### **5.3. Avaliação *in vitro* do potencial probiótico de amostras de BAL isoladas de soro fermento, água, leite, silagem e queijo Minas artesanal com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação**

Análise *in vitro* de resistência de amostras de BAL isoladas de soro fermento, água, leite, silagem e queijo Minas artesanal com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação frente aos sais biliares

A bile é um importante componente antimicrobiano do sistema digestivo formada por várias substâncias, dentre as quais se destacam os sais biliares que são moléculas capazes de promover danos na membrana e na estrutura do DNA bacteriano (Merritt e Donaldson, 2009). Portanto, a tolerância a estes compostos é fundamental para sobrevivência do probiótico no trato gastrointestinal (Lebeer, Vanderleyden, e De Keersmaecker, 2010).

As 34 amostras de BAL isoladas de soro fermento, água, leite, silagem e queijo Minas artesanal com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação pré-selecionadas pelas análises morfológicas e moleculares de *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus acidilactici* foram então submetidas à avaliação de resistência aos sais biliares (0,3% Oxgall). A tabela 2 ilustra a resposta das amostras frente a resistência aos sais biliares

Tabela 2. Percentuais de inibição de amostras de bactérias do ácido lático isoladas de silagem, água, soro fermento, leite e queijos Minas artesanais com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação frente aos sais biliares (0,3% oxgall)

Amostra	Sais biliares 0,3% oxgall	Amostra	Sais biliares 0,3% oxgall
LP16*	-1%	LP71*	22%
LB1*	3%	LP19*	23%
LP5*	5%	LP12*	23%
LP19*	7%	LP14*	24%
LP15*	9%	LPC2*	24%
LP4*	9%	LP13*	25%
LP3*	10%	LP10	26%
LP14*	10%	LP00	27%
LP61*	13%	LB2	28%
LP9*	14%	LR1	28%
LP2*	15%	LP22	29%
PA1*	15%	LP00	29%
LP7*	15%	LR2	30%
LP17*	15%	LP21	31%
LPC1*	16%	LP25	32%
LP1*	16%	LB3	33%
PA2*	17%	LP23	34%
LP11*	21%	LP24	34%

Legenda: LP – *Lactobacillus plantarum*; LB – *Lactobacillus brevis*; LPC – *Lactobacillus paracasei*; PA – *Pediococcus acidilactici*; LR – *Lactobacillus rhamnosus*.

\* Amostras selecionadas para o teste de resistência aos ácidos

A resistência dos lactobacilos à ação dos sais biliares está associada à presença ou não de uma enzima hidrolase de sais biliares (denominada *biliary salts hidrolase* - BSH), que desconjuga os sais biliares e impede a sua ação detergente após um *stress* inicial causado pelos mesmos. Porém, como algumas amostras de lactobacilos não conseguem produzir essa enzima e ainda assim sobrevivem em ambiente intestinal, outros mecanismos de resistência ainda pouco elucidados devem ser utilizados por esses microrganismos (Vinderola e Reinheimer, 2003)

Observa-se que todas as amostras de BAL apresentaram percentual de resistência inferior a 35%. Segundo Acurcio (2011), Alvim (2011), Silva *et al.* (2013) e Andrade *et al.* (2014), todas as amostras poderiam ser consideradas resistentes uma vez que esses pesquisadores basearam seus resultados num limite máximo de <40% de inibição.

Entretanto, com o intuito de selecionar amostras com melhor potencial probiótico, de acordo com a metodologia adotada, foi estabelecido um percentual <25% de inibição em sais biliares. Dessa forma, foram selecionadas 24 amostras de BAL para o teste de resistência ao suco gástrico.

Avaliando a resistência aos sais biliares de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos da região da Serra da Canastra, Andrade *et al.* (2014) verificaram que todas as amostras (n=7) foram

tolerantes por apresentarem menos de 40% de inibição ao Oxgall (BD) 0,3%. Algumas amostras apresentaram percentual de inibição negativo, como também foi observado com *Lactobacillus plantarum* 16 (LP16). O mesmo pode ser observado em trabalho realizado por Costa *et al.* (2013) que, ao avaliarem o potencial probiótico de bactérias do do ácido lático isoladas de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, verificaram que a amostra que obteve melhor desempenho no teste foi *L. plantarum* B19, apresentando inibição menor que 15%. As amostras *L. plantarum* B7 e *L. plantarum* D13 obtiveram bom desempenho, com inibição menor que 50%.

Ribeiro *et al.* (2014) avaliando resistência aos sais de amostra de *Pediococcus acidilactici* B14 encontraram percentual de inibição próximo a 28% em Oxgall 0,3%, durante 180 minutos de incubação.

Diversos trabalhos na literatura indicam que as diferenças adaptativas nas curvas de crescimento de BAL desafiadas com Oxgall é dependente da linhagem e não de sua espécie (Jacobsen *et al.*, 1999; Mirlohi *et al.*, 2009; Ruiz-Moyano *et al.*, 2008). Isso pode ser observado nos resultados de resistência aos sais biliares, uma vez que amostras da mesma espécie não apresentaram resultados semelhantes de inibição. Entretanto, o que também foi observado no presente trabalho ao associar a origem e a linhagem de determinado microrganismo frente ao dendrograma pré-estabelecido, foi que até mesmo linhagens semelhantes podem manifestar potencial diferente de resposta.

#### Análise *in vitro* de resistência de amostras de BAL isoladas de soro fermento, água, leite, silagem e queijo Minas artesanal com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação frente ao ácido

A resistência à ação do ácido clorídrico é importante porque o mesmo difunde-se através da membrana celular e no citoplasma, dissociando-se e liberando prótons. O acúmulo de prótons no meio intracelular pode interferir no funcionamento da membrana celular, prejudicando processos essenciais à sobrevivência celular (Guchte *et al.*, 2002).

A resistência a ácidos orgânicos por lactobacilos está relacionada com a sua capacidade de remover prótons do ambiente intracelular para o extracelular por meio de um complexo enzimático que consome ATP, denominada H<sup>+</sup>-ATPase. Este processo, apesar de eficiente, é energeticamente dispendioso para a célula, por isso, outro mecanismo, mediado por um gene para a resposta de tolerância ao *stress* ácido (conhecido como ATR), é tão ou mais importante para a resistência ao ácido por lactobacilos. Tal gene comanda a saturação dos ácidos graxos da membrana mediante *stress* ácido, diminuindo a sua fluidez e impedindo o afluxo de prótons H<sup>+</sup> para o interior da célula, reduzindo assim seu gasto energético e retardando a acidificação do citoplasma (Broadbent *et al.*, 2010).

As 24 amostras que apresentaram melhor percentual de inibição frente aos sais biliares foram submetidas ao teste de resistência ao suco gástrico. A metodologia descrita por Silva (2013) foi adaptada para um intervalo de incubação de 30 minutos. De acordo com Yu, Crison e Amidon (1996) o tempo médio de esvaziamento gástrico-intestinal pode variar de 30 a 570 minutos. O limite de 30 minutos foi adotado com o intuito de avaliar condições de pH mais severas. Dessa forma, estipulou-se a avaliação em dois valores distintos de pH: 2.0 e 1.5 (tabela 3)

Tabela 3. Percentuais de inibição de amostras de bactérias do ácido láctico isoladas de soro fermento, água, leite, silagem e queijo Minas artesanal com 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias de maturação frente aos ácidos (pH 1.5 e pH 2.0)

Amostra	pH	
	1.5	2.0
LP4*	42%	-18%
LP2*	48%	-24%
PA2*	48%	-8%
LP3*	53%	-13%
PA1*	54%	-4%
LPC1*	55%	-23%
LP1*	58%	-7%
LP7*	59%	-14%
LP13	59%	0,8%
LP19	60%	2,3%
LP6	61%	-11%
LB	62%	11%
LP18	64%	0,5%
LP5	64%	4,44%
LP16	65%	-15%
LP9	65%	-0,25%
LP14	67%	11%
LP11	67%	16%
LP61	68%	-17%
LPC2	69%	4%
LP15	70%	1%
LP19	70%	13%
LP12	71%	1%
LP8	72%	21%
LP71	79%	-3%

Legenda: LP – *Lactobacillus plantarum*; LB – *Lactobacillus brevis*; LPC – *Lactobacillus paracasei*; PA – *Pediococcus acidilactici*;

\* Amostras selecionadas para o teste de antagonismo *in vitro*

Observa-se que treze de um total de 25 amostras (52%) apresentaram percentuais negativos de inibição em pH 2.0, indicando que a curva de crescimento de amostras submetidas ao *stress* ácido foi superior à curva controle, sendo de fato resistentes ao ácido. Ademais, o percentual máximo de inibição alcançado pelas amostras de BAL foi de 15,82% (amostra LP12). Esses dados podem ser comparados aos resultados alcançados por Andrade *et al.* (2014) que, ao avaliarem a resistência ao ácido de *Lactobacillus* spp. provenientes de queijos da região da Serra da Canastra, identificaram como percentual máximo de inibição 13,92%, ao passo que também foram observados percentuais negativos de inibição provenientes para *L. casei* (-



1,55%) e *L. plantarum* (-19,88%). Costa *et al.* (2013) também observaram alta frequência de *Lactobacillus* spp. provenientes de queijos da região da Serra da Canastra resistentes ao ácido em pH 2.0, sendo o maior percentual de inibição 19,68% (*L. casei* A21). Além disso, os pesquisadores também observaram que 33% das BAL (4/12) apresentaram percentual nulo ou negativo de inibição. Todos os trabalhos identificaram que as amostras de *Lactobacillus plantarum* apresentaram melhores resultados de resistência, o que também pode ser observado no presente estudo em ácido a pH 2.0, muito em virtude de sua maior representatividade perante as outras amostras isoladas.

Ribeiro *et al.* (2014) avaliaram a resistência ao suco gástrico de amostra de *Pediococcus acidilactici* B14 em 3 níveis de pH diferentes (pH 1.3, pH 2.5 e pH 4.0) e encontraram percentual de inibição de 51,9%, 29,1% e 11.4 %, respectivamente.

Sendo assim, seguindo o critério adotado pela metodologia inicial, os dados obtidos pela análise de resistência ao ácido em pH 2.0 foram pouco discriminatórios no que tange o quesito seleção de amostras. Conforme descrito anteriormente pela literatura, diversas amostras de BAL apresentam resistência ou até mesmo crescimento em ambientes ácidos. Isso se deve ao fato de que BAL com potencial probiótico apresentam maior resistência a pH baixo que outras bactérias do do ácido lático (Vinderola e Reinheimer, 2003).

Desta forma, as amostras de BAL foram submetidas ao teste de resistência em pH 1.5 (tabela 3), com o intuito de atenuar o efeito adaptativo em ambientes ácidos dos microrganismos para estabelecer um critério de seleção de amostras.

De acordo com os resultados expostos, observa-se um alto percentual de inibição das BAL em pH 1.5. Diferente dos resultados observados em pH 2.0, nenhuma amostra foi capaz de exibir percentual negativo de inibição (indicativo de resistência e adaptação). Entretanto, as oito amostras (8/25) que apresentaram percentual de inibição menor que 60% foram as mesmas que apresentaram percentual negativo de inibição em pH 2.0, indicando que podem ser amostras extremamente resistentes a ambientes ácidos. Um importante critério de seleção de probióticos diz respeito à sua tolerância a altos valores de acidez, que podem ser observados no estômago de humanos. O menor pH já identificado foi de 1.5 (Huang e Adams, 2004; Lin *et al.*, 2006). De acordo com Fernandez *et al.* (2003), potenciais microrganismos probióticos devem tolerar ao menos um valor próximo ao pH 3.0. Altas concentrações de ácido podem alcançar o valor de pH 1.5 durante o processo de ingestão de alimentos, conforme descrito por Sahadeva *et al.* (2011). Dessa forma, a análise de resistência em pH 1.5 pode não ser adequada se adotados altos períodos de incubação (3 horas), conforme observado por Sahadeva *et al.* (2011) e Mandal *et al.* (2006). Entretanto, conforme metodologia adotada para o experimento, a seleção inicial estabelecida pela resistência aos sais biliares, seguida de análise de resistência ao ácido utilizando um intervalo de 30 minutos de incubação associando valores distintos de pH (2.0 e 1.5 respectivamente) permite seleção discriminatória de BAL com potencial probiótico. Diversos estudos indicam que ácido e bile possuem efeitos separados e combinados no crescimento de bactérias. O *stress* causado pela bile acontece após o *stress* exercido pelo ácido no estômago Leyer e Johnson (1993) e Lin *et al.* (2006) postularam que microrganismos que sofreram injúrias sub-letais podem manifestar diferentes e imprevisíveis mecanismos de resistência a novos fatores de *stress*. Além disso, assim como foi constatado por Ruiz-Moyano *et al.* (2008), as linhagens com melhor desempenho no teste resistência aos ácidos foram as que mostraram boa sobrevivência na presença de sais biliares.

Dessa forma, foram selecionados oito amostras de BAL que apresentaram menor percentual de inibição para sais biliares e ácido (pH 2.0 e 1.5). A tabela 4 descreve as BAL e seus respectivos resultados frente aos critérios de seleção adotados.

Tabela 4. Percentuais de inibição das amostras de *Lactobacillus plantarum*, *L. paracasei* e *Pediococcus acidilactici* isolados de soro fermento endógeno, silagem e queijos com 0, 21 e 60 dias de maturação da região de Campo das Vertentes frente aos testes de resistência a sais biliares e ácido (pH 2.0 e 1.5)

Amostra	Percentual de inibição		
	Sais biliares	Ácido	
		pH 2.0	ph 1.5
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP1 (pingo)	16%	-7%	58%
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP2 (pingo)	15%	-24%	48%
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP3 (pingo)	10%	-13%	53%
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP4 (queijo 21 dias)	9%	-18%	42%
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP7 (queijo 60 dias)	15%	-14%	59%
<i>Lactobacillus paracasei</i> LPC1 (silagem)	16%	-23%	59%
<i>Pediococcus acidilactici</i> PA1 (silagem)	15%	-4%	54%
<i>Pediococcus acidilactici</i> PA2 (queijo 0 dia)	17%	-8%	48%

Teste de antagonismo *in vitro* de amostras de BAL isoladas de silagem, água soro fermento e queijo Minas artesanal com 0, 21 e 60 dias de maturação via *spot-on-the-lawn* frente aos microrganismos reveladores

As oito amostras de *Lactobacillus plantarum*, *L. paracasei* e *Pediococcus acidilactici* isolados de soro fermento endógeno, silagem e queijos com 0, 21 e 60 dias de maturação previamente selecionadas foram submetidas ao antagonismo via *spot-on-the-lawn*, com o intuito de avaliar o potencial inibitório frente a microrganismos patogênicos. Para as reveladoras, foram utilizadas seis amostras de origem conhecida, oriundas da *American Type Culture Collection* (ATCC), duas reveladoras oriundas do próprio queijo e identificadas molecularmente via sequenciamento do gene rRNA 16S, e outras duas BAL oriundas do próprio isolamento, visando avaliar a ocorrência de auto-inibição por parte das amostras. Dessa forma, o resultado está expresso nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Médias dos halos de inibição (mm), de duas repetições em duplicata, do teste de antagonismo *in vitro* das amostras de *Lactobacillus plantarum*, *L. paracasei* e *Pediococcus acidilactici* isolados de silagem, soro fermento endógeno e queijos com 0, 21 e 60 dias de maturação, da região de Campo das Vertentes, contra cada bactéria reveladora

Reveladora	Média do halo de inibição (mm)	Desvio-padrão	Coefficiente de variação (%)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	28 <sup>a, e, f</sup>	5,76	20
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	41,99 <sup>a, d, f</sup>	7	16
<i>Lactobacillus plantarum</i> (LP1)	2,85 <sup>b, c</sup>	4,325	185
<i>Lactobacillus plantarum</i> (LP7)	0,8 <sup>b, c</sup>	1,48	150
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	28,82 <sup>c, d, f</sup>	3,4	12
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	29,87 <sup>c, d, f</sup>	3,8	13
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 25875	51,28 <sup>a, f</sup>	8,45	16
<i>Escherichia fergusonii</i> (queijo)	38,28 <sup>a, f</sup>	9,9	26
<i>S. aureus aureus</i> (queijo)	14,64 <sup>b, c, e</sup>	9,3	63
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 2921	30,2 <sup>c, d, f</sup>	5,16	17

Legenda: letras distintas indicam resultados estatisticamente diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ) e pós-teste de Dunn.

Tabela 6. Médias dos halos de inibição (mm) do teste de antagonismo *in vitro* de cada amostra de *Lactobacillus plantarum*, *L. paracasei* e *Pediococcus acidilactici* isolados de soro fermento endógeno, silagem e queijos com 0, 21 e 60 dias de maturação, da região de Campo das Vertentes, contra cada bactéria reveladora

Amostra	Reveladoras (média do halo de inibição em mm)									
	SF	EC	EF(q)	EF	LM	ST	SA	SA(q)	LP1	LP7
LP1	50,95	42,08	39,36	25,45	27,13	24,95	28,79	5,98	0,00	0,00
LP2	52,39	36,29	31,51	24,91	27,58	27,33	22,06	9,09	4,20	0,00
LP3	42,49	33,45	34,42	29,41	27,62	29,43	23,08	3,89	0,00	0,00
LP4	63,27	49,58	49,64	26,45	30,71	35,38	33,60	11,32	7,77	0,00
LP7	59,63	47,77	46,51	31,01	29,82	34,75	33,30	10,99	0,00	0,00
LPC1	39,27	33,01	18,75	19,00	23,66	26,10	30,94	23,69	0,00	0,00
PA1	56,74	44,79	43,12	35,84	35,45	31,65	35,62	23,31	0,00	3,13
PA2	45,57	48,96	42,96	35,92	28,63	29,43	34,28	28,87	10,09	3,25

Legenda: Valores do halo de inibição por cada amostra de BAL frente a bactérias reveladoras. Legenda: SF – *Shigella flexneri* ATCC 25875; EC – *Escherichia coli* ATCC 25922; EF(q) – *Escherichia fergusonii* isolado de queijo; EF – *Enterococcus faecalis* ATCC 19433; LM – *Listeria monocytogenes* ATCC 15313; ST – *Salmonella enterica* var. Typhimurium ATCC 14028; SA – *Staphylococcus aureus* ATCC 2921; SA(q) – *Staphylococcus aureus* ssp. *aureus* isolado de queijo; LP – *Lactobacillus plantarum* 1; LPC – *Lactobacillus paracasei*; PA – *Pediococcus acidilactici*

Não foram observadas diferenças significativas entre a capacidade de inibição por parte das amostras de BAL, apenas a susceptibilidade de cada reveladora, como pode ser verificado na tabela 7. Dessa forma, todas as amostras de BAL se caracterizaram como boas inibidoras de microrganismos patogênicos.

Tabela 7. Médias dos halos de inibição (mm) das amostras de *Lactobacillus plantarum*, *L. paracasei* e *Pediococcus acidilactici* isolados de silagem, soro fermento endógeno, e queijos com 0, 21 e 60 dias de maturação da região de Campo das Vertentes, contra bactérias reveladoras

Reveladora	Média do halo de inibição (mm)	Desvio-padrão	Coefficiente de variação (%)
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP1	24,47	5,578	22,80
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP2	23,53	4,978	21,15
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP3	22,38	4,879	21,80
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP4	21,44	5,639	26,30
<i>Lactobacillus plantarum</i> LP7	30,77	4,634	15,06
<i>Lactobacillus paracasei</i> LPC1	29,38	4,091	13,92
<i>Pediococcus acidilactici</i> PA1	30,96	6,385	20,62
<i>Pediococcus acidilactici</i> PA2	30,79	6,376	20,71

Todas as amostras foram capazes de produzir halo de inibição frente aos microrganismos reveladores. Observa-se que *S. flexneri*, *E. coli* e *E. fergusonii* apresentaram diferença significativa de inibição frente a *S. aureus aureus* (isolada de queijo), e às duas BAL (LP1 e LP7). Dessa forma, os microrganismos reveladores do gênero *Staphylococcus* (ATCC e isolado do queijo) foram os que apresentaram menor halo de inibição. Resultados semelhantes foram encontrados por Costa *et al.* (2013), que encontraram baixos valores de inibição de *Lactobacillus* spp. frente a *S. aureus* ATCC 29313. Esse fato pode ter relação com resultados das análises microbiológica dos queijos Minas artesanais da Serra da Canastra estudados (Resende *et al.*, 2011) visto que, dos microrganismos patogênicos pesquisados, apenas *Staphylococcus* spp. foi encontrado em elevadas concentrações ( $1,7 \times 10^8$  UFC/g). Tendo em vista que as amostras de *Staphylococcus aureus* ssp. *aureus* foram isoladas de queijos ou produtos associados ao queijo (como soro fermento), sugere-se que possa ocorrer uma adaptação do patógeno frente ao potencial de inibição dos *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus acidilactici*. Entretanto, Oliveira (2013), avaliando a presença de genes codificadores de toxinas em amostras de *Staphylococcus* isoladas de queijos Minas artesanais da região da Serra da Canastra, concluiu que nenhuma das cepas apresentavam os genes necessários para a codificação de enterotoxinas.

Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) nos halos de inibição de LP1 e LP7, indicando baixo índice competitivo entre as produtoras e reveladoras, observado pelos baixos valores de halos de

inibição quando avaliadas frente às BAL produtoras. Este fato possibilita a utilização dessas bactérias testadas associadas com outras bactérias do ácido lático, ampliando, assim, a sua ação inibitória contra outros microrganismos. (Costa *et al.*, 2013). Devido ao fato de apresentarem baixos valores de inibição em comparação às outras bactérias reveladoras, houve grande influência da média desse resultado no coeficiente de variação dessas duas reveladoras.

Em trabalho avaliando potencial antimicrobiano de BAL provenientes de queijo Minas artesanal, Alexandre *et al.* (2002) verificaram que, das 192 cepas previamente isoladas e caracterizadas como BAL, 48 (25%) foram capazes de inibir o crescimento de bactérias reveladoras: *Lactobacillus sake*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus carnosus*. Quanto à atividade antimicrobiana direta frente à *Listeria monocytogenes*, 29 cepas (15,1%) apresentaram capacidade de inibição a esse microrganismo. Foram encontrados valores de inibição de 83,3% contra *Salmonella enterica* subsp. *enterica* var. *Typhimurium*, 33,3% contra *Lactobacillus sake*, 56,2% contra *Staphylococcus aureus*, 66,6% contra *Listeria innocua* e 58,3% contra *Listeria monocytogenes*.

Ao avaliar o potencial probiótico de BAL previamente isoladas de queijo Minas artesanal por Resende *et al.* (2011), Andrade *et al.* (2014) observou que a amostra *L. plantarum* (B17) foi a única que inibiu a bactéria reveladora patogênica *Salmonella* Typhimurium. No presente estudo, todas as produtoras foram capazes de inibir *S. Typhimurium*, embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas nos halos. Costa *et al.* (2013) também detectaram atividade antagonista de *Lactobacillus* spp. contra *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, e pouca inibição contra microrganismos do próprio queijo, *L. rhamnosus* e *L. fermentum*.

#### Análise *in vitro* de amostras de BAL isoladas de soro fermento, silagem e queijo Minas artesanal com 0, 21 e 60 dias de maturação da região de Campo das Vertentes frente a susceptibilidade aos antimicrobianos

As oito amostras de BAL oriundas de soro fermento, silagem e queijo Minas artesanal com 0, 21 e 60 dias foram submetidas ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, com o intuito de verificar possível resistência por parte dos microrganismos frente antibióticos empregados na medicina. A tabela 8 demonstra o resultado da inibição das amostras de BAL frente aos diferentes antimicrobianos usados.

Tabela 8. Níveis de susceptibilidade aos antimicrobianos avaliados em duas repetições em triplicata, das amostras de *Lactobacillus plantarum*, *L. paracasei* e *Pediococcus acidilactici* isolados de soro fermento endógeno, silagem e queijos com 0, 21 e 60 dias de maturação, da região de Campo das Vertentes

Antibiótico	Amostra							
	LP1	LP2	LP3	LP4	LP7	LPC1	PA1	PA2
GN	R	S	S	R	R	R	R	R
OX	R	R	R	R	R	R	R	R
VA	R	R	R	R	R	R	R	R
S	M.S	R	R	R	R	R	R	R
TE	S	M.S	S	S	S	S	S	S
CAZ	S	S	S	S	S	M.S	M.S	M.S
PEN	M.S	M.S	M.S	M.S	M.S	S	S	S
DA	S	S	S	S	S	S	S	S
CIP	M.S	R	R	R	R	R	R	R
E	S	S	S	S	S	S	S	S

Legenda: ceftazidime - CAZ (30 µg), clindamicina - DA (2 µg), ciprofloxacina - CIP (5 µg), eritromicina - E (15 µg), gentamicina - GN (10 µg), oxacilina - OX (1 µg), penicilina - PEN (10 UI), estreptomicina - S (25 µg), tetraciclina - TE (30 µg), vancomicina - VA (30 µg) / LP - *Lactobacillus plantarum*; LPC - *Lactobacillus paracasei*; PA - *Pediococcus acidilactici*. R - resistência/ M.S - moderada susceptibilidade/ S. - susceptibilidade (Charteris, 1998)

Todas as amostras de BAL (100%) testadas foram sensíveis à clindamicina e eritromicina. Em relação à tetraciclina, 87,5% das amostras de BAL apresentaram susceptibilidade, com exceção da amostra LP2 que apresentou moderada susceptibilidade. Andrade *et al.* (2014) também observaram moderada sensibilidade de *L. plantarum* em relação à tetraciclina. Esses resultados também foram observados por Costa *et al.* (2013), detectando total susceptibilidade das amostras testadas no experimento dos pesquisadores. Em contrapartida, Klare *et al.* (2007) identificaram resistências múltiplas de *Lactobacillus* frente aos antimicrobianos clindamicina, eritromicina e tetraciclina, porém em baixos níveis de detecção (4% das amostras).

A resistência à vancomicina tem sido demonstrada como sendo intrínseca às bactérias do ácido láctico, sendo que estudos com *Lactobacillus* spp. isolados de diferentes origens apontaram resistência em 100% das linhagens testadas (Teuber, Meile e Schwarz, 1999; Mathur e Singh, 2005; Ouoba, Lei e Jensen, 2008). Microrganismos pertencentes a outros gêneros de BAL (*Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Weissella*) também foram destacados como portadores desta resistência intrínseca à vancomicina (Wright, Holman e Walsh, 1993), (Mathur e Singh, 2005). Acurcio (2011), Costa *et al.* (2013) e Andrade *et al.* (2014) também constataram resistência intrínseca de *Lactobacillus* spp. frente à vancomicina. Em relação à oxacilina, pode-se considerar que as amostras de BAL também apresentam resistência intrínseca, uma vez que esse antimicrobiano não é citado na literatura como sendo transmitido via plasmídeo por BAL (Mathur e Singh, 2005; Silva *et al.*, 2013).

Observa-se que 25% (2/8) das amostras apresentaram susceptibilidade à gentamicina e 12,5% (1/8) apresentou moderada susceptibilidade à estreptomicina. Klare *et al.* (2007) identificaram altos níveis de resistência de *Lactobacillus* à estreptomicina. Costa *et al.* (2013) e Andrade *et al.* (2014) também verificaram altos níveis de resistência à estreptomicina e gentamicina. Charteris *et al.* (1998a) relataram que todas as amostras avaliadas foram resistentes a estes antimicrobianos. Com relação ao antimicrobiano ciprofloxacina, houve elevada taxa de resistência (87,5% das amostras). Charteris *et al.* (1998) e Ouoba, Lei e Jensen (2008) relataram resultado semelhante, corroborando os resultados encontrados no presente estudo.

Tankovic, Leclercq e Duval (1993) constataram que amostras de *P. acidilactici* e *P. pentosaceus* testados apresentaram resistência a tetraciclina e moderada sensibilidade à penicilina G, em contraste às BAL do presente estudo que manifestaram susceptibilidade à ambos antimicrobianos. Ribeiro *et al.* (2014), avaliando resistência aos antimicrobianos de *Pediococcus acidilactici* B14, encontraram altos níveis de susceptibilidade à eritromicina e clindamicina, moderada susceptibilidade à penicilina G e tetraciclina e resistência intrínseca do gênero *Pediococcus* à vancomicina.

#### Critério de seleção de amostras de BAL isoladas de soro fermento, silagem e queijo Minas artesanal com 0, 21 e 60 dias de maturação da região de Campo das Vertentes para outras análises *in vitro* e análise *in vivo*

A observação do comportamento *in vitro* específico da linhagem que se pretende utilizar como probiótico tem sido eficiente como um processo de seleção preliminar (Morelli, 2000; FAO/WHO, 2002; Mirlohi *et al.*, 2009). Assim, os critérios utilizados neste trabalho para seleção de estirpes probióticas foram baseados na avaliação *in vitro* dos isolados de água, silagem, soro-fermento, leite e queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes. Observa-se que todas as oito amostras de BAL apresentaram bons índices de resistência aos sais biliares (em 0,3% de Oxgall) e ácido gástrico em dois valores de pH diferentes (pH 2.0 e pH 1.5), bem como apresentaram níveis de susceptibilidade e resistência compatíveis com a literatura. Embora sejam necessários estudos mais aprofundados visando a detecção de genes e plasmídeos de resistência antimicrobiana, pode-se dizer que todas as amostras de BAL são potenciais candidatos que se encaixam nos critérios de seleção adotados durante todas as análises *in vitro*. Sendo assim, como não houve diferença significativa entre as produtoras frente à inibição de microrganismos reveladores e não foram observadas discrepâncias em relação à susceptibilidade aos antimicrobianos, decidiu-se por selecionar dois microrganismos de espécies diferentes. A amostra LP4 (oriunda de queijo Minas artesanal com 21 dias de maturação) foi escolhida dentre os representantes do gênero *Lactobacillus*, uma vez que essa amostra apresentou melhores índices de resistência aos sais biliares e ácido (pH 2.0 e 1.5). A amostra PA2 (oriunda de queijo Minas artesanal com 0 dia de maturação) foi escolhida como representante do gênero *Pediococcus*, como candidata para testes de co-cultivo e testes *in vivo*. Embora a amostra PA1 tenha apresentado maior halo de inibição em relação à amostra PA2, sua origem foi de silagem e sendo um ambiente que diverge de leites fermentados ou queijo, optou-se pela segunda amostra de *P. acidilactici*. Destaca-se que para as análises *in vivo* seria necessária uma pré-adaptação da amostra oriunda de silagem para sua utilização em administração oral via leite fermentado. Além disso, PA2 apresentou melhores resultados de resistência aos sais biliares e ácido (pH 2.0 e 1.5) em detrimento a PA1. Os testes *in vitro* subsequentes foram realizados utilizando três reveladoras: *Shigella flexneri*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*, uma vez que as duas primeiras reveladoras foram as mais

significativamente inibidas no antagonismo *in vitro* via *spot-on-the-lawn*. Para os testes *in vivo* foi utilizada apenas a *S. Typhimurium* em virtude do reduzido número de animais adquiridos.

Antagonismo *in vitro* via co-cultivo e sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* (LP4) isolada de queijo Minas artesanal com 21 dias de maturação e *Pediococcus acidilactici* (PA2) isolado de queijo Minas artesanal com 0 dia de maturação em frente a *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* e *Shigella flexneri*

O resultados de co-cultivo estão expressos na tabela 9 onde se observam diferenças entre as amostras co-cultivadas em BHI e em MRS.

Tabela 9. Contagens de *S. Typhimurium* (ST), *E. coli* (EC) e *S. flexneri* (SF) em ágar MacConkey ( $\log_{10}$  UFC/ml) em cultura pura ou no co-cultivo (18h) com *L. plantarum* (LP4) isolada de queijo Minas artesanal com 21 dias de maturação e *P. acidilactici* isolada de queijo Minas artesanal com 0 dia de maturação, da região de Campo das Vertentes

Meio	Co-cultivo								
	ST	PA2 + ST	LP4 + ST	EC	PA2 + EC	LP4 + EC	SF	PA2+ SF	LP4+ SF
BHI	9,03	9,13 <sup>a</sup>	8,63 <sup>a</sup>	9,07	9,01 <sup>a</sup>	8,83 <sup>a</sup>	8,95	9,01 <sup>a</sup>	8,65 <sup>a</sup>
MRS	8,50	4 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	8,13	4,33 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	7,81	4 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>

Legenda: letras distintas na coluna indicam diferença significativa pelo teste Two-way anova ( $p < 0,0101$  e pós-teste de Bonferroni ( $n=3$ )).

Conforme pode ser observado na tabela 10 LP4 e PA2, quando em meio (MRS), produzem substâncias (em grande maioria ácidos orgânicos, pela maior capacidade de acidificação do meio MRS, embora a produção de bacteriocinas e de  $H_2O_2$  também tenham de ser levadas em consideração), com habilidade de antagonizar *S. Typhimurium*, *S. flexneri* e *E. coli*. O mesmo não acontece quando o meio é modificado visto que, quando em meio (BHI), as amostras não foram capazes de inibir o crescimento das bactérias patogênicas. Em experimento semelhante de Hütt *et al.* (2006), diversas amostras de lactobacilos conhecidamente probióticos apresentaram, de acordo com uma escala elaborada pelos próprios autores, atividade antagonista média no teste de co-cultivo (representada por uma variação em até 5,9 ciclos log na redução da contagem média de salmonela). LP4 e PA2 apresentaram atividade antagonista satisfatória no teste de co-cultivo, por reduzirem a contagem de *S. Typhimurium*, *S. flexneri* e *E. coli* entre 4 e 5 ciclos log (tabela 10).



Tabela 10. Contagens em ágar MacConkey ( $\log_{10}$  UFC/ml) de *S. Typhimurium*, *S. flexneri* e *E. coli*, após cultivo (18h) em meio MRS LP4 a pH 3,85; meio MRS PA2 em pH 3,9 e meio MRS a pH 6,5

Amostra	Reveladora		
	ST	EC	SF
LP4 (pH 3.85)	4 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>
PA2 (pH 3.9)	4 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>
MRS (pH 6.5)	8,54 <sup>b</sup>	7,48 <sup>b</sup>	7,34 <sup>b</sup>

Legenda: sobrenadante de *L. plantarum* em pH 3,85; PA2: sobrenadante de *P. acidilactici* em pH 3,9; MRS: sobrenadante de LP4 e PA neutralizado a pH 6,5; ST: *S. Typhimurium*, EC: *E. coli*, SF: *S. flexneri*. Letras distintas na coluna diferem pelo teste: Two-way anova ( $p < 0,001$ ) e pós-teste de Bonferroni ( $n=3$ )

Os resultados do teste de antagonismo por sobrenadante de LP4 e PA2 frente a *S. Typhimurium*, *S. flexneri* e *E. coli* evidenciam o efeito antagônico direto dos ácidos orgânicos e/ou bacteriocinas produzidos pelas bactérias do ácido lático contra o enteropatógeno em questão, uma vez que as reveladoras apresentaram bom crescimento em meio MRS próximo da neutralidade. Hütt *et al.* (2006) observaram relação positiva entre o antagonismo a enteropatógenos e a produção de ácido lático, assim como relação inversa entre o valor de pH do sobrenadante com a atividade antagonista. Dessa forma, uma possível explicação para o efeito antagônico pode ser baseada na produção de ácidos orgânicos e/ou de bacteriocinas que possuem melhor atividade inibitória em meios ácidos. Owusu-Kwarteng *et al.* (2013) identificaram efeito inibitório do sobrenadante de *P. acidilactici* frente *Staphylococcus aureus* ATCC 19095 produtor de toxina A, inibindo 52% do crescimento da reveladora e também de *B. cereus* PA24, *E. coli* SKN 54 e *E. faecalis* 103907 CIP.

De acordo com estudos realizados por Sip *et al.* (2012), o efeito inibitório de BAL frente *Listeria monocytogenes* se deve sumariamente à produção de ácidos orgânicos (22,5% das amostras testadas) e apenas 2,5% produziram efeitos inibitórios em virtude de outros mecanismos. Owusu-Kwarteng *et al.* (2013) verificaram que bacteriocinas produzidas por *L. reuteri* e *P. acidilactici* manifestaram melhor potencial em ambientes ácidos em detrimento de ambientes alcalinos. No presente estudo, não foram pesquisadas possíveis bacteriocinas produzidas por ambas as amostras, embora o ambiente ácido possa estar influenciando tanto direta quanto indiretamente a ação inibitória de LP4 e PA2. Teixeira *et al.* (2014), identificaram que apenas duas amostras de *P. pentosaceus* (de um total de 226 BAL) foram capazes de inibir *L. monocytogenes* por meio de sobrenadante neutralizado. Albano *et al.* (2007) isolaram duas bacteriocinas de *P. acidilactici* provenientes de linguiça fermentada e observaram redução completa da atividade anti-*L. innocua* com sobrenadante neutralizado e tratado com proteinase K, pronase e tripsina, o que favorece um ambiente ácido, corroborando com os dados aqui apresentados.

#### Produção de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) por *L. plantarum* (LP4) e *P. acidilactici* (PA2)

A produção de  $H_2O_2$ , pela metodologia adotada neste trabalho, é qualitativamente categorizada como alta produção para colônias marrons, media produção para colônias azuis, baixa produção para colônias azul-claras e ausência de produção para as colônias que se apresentaram transparentes ou apenas com bordas azuis. Sendo assim, LP4 e PA2 apresentaram média produção devido à coloração azul atribuída à colônia (anexo 1). Desta forma, avaliar a produção de  $H_2O_2$  de LP4 e PA2 que podem vir a ser empregados como probióticos, pode-se constituir em

uma etapa importante do processo de seleção, uma vez que a atividade antagonista-é pode estar sendo exercida pela produção de peróxido de hidrogênio (Ruiz-Moyano *et al.*, 2008; Desland *et al.*, 2012). A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por *Lactobacillus* spp. é uma característica dominante entre as espécies do gênero isoladas de vaginas de mulheres saudáveis (Eschenbach *et al.*, 1989; Boris e Barbes, 2000), sendo associados à uma microbiota saudável que contribuem para as defesas contra a infecção por patógenos, pela produção de bacteriocinas, ácido lático e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Redondo, Cook e Sobel, 1990; Klebanoff *et al.*, 1991; Boris e Barbes, 2000).

No presente trabalho, ambas as amostras apresentaram média produção para peróxido de hidrogênio, apresentando bons níveis inibitórios frente aos microrganismos reveladores. Silva *et al.* (2013) detectaram baixo percentual (8%) de *Lactobacillus* spp. produtores de peróxido de hidrogênio oriundos de fezes de filhotes de cães, embora tenham observados bons índices inibitórios frente a microrganismos patogênicos. Pridmore *et al.* (2008) constataram que das dez cepas de *Lactobacillus* spp. analisadas, todas eram capazes de produzir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Resultados semelhantes também foram encontrados em linhagens de BAL isoladas de diferentes mucosas de aves e bovinos, constatando síntese de peróxido de hidrogênio em 75% e 80% dos casos, respectivamente (Moreira *et al.*, 2005; Sandes, 2014). Pridmore *et al.* (2008) identificaram que amostras de *L. gasseri* e *L. johnsonii* produtoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram capazes de inibir *S. Typhimurium in vitro*. Esse dado corrobora com os resultados obtidos no presente estudo, sendo que ambas as amostras foram capazes de inibir *S. Typhimurium in vitro* pelo método de cultivo e sobrenadante.

#### 5.4. Antagonismo *in vivo* de *Lactobacillus plantarum* (LP4) isolado de queijo Minas artesanal com 21 dias de maturação e *Pediococcus acidilactici* isolado de queijo Minas artesanal com 0 dia de maturação, da região de Campo das Vertentes contra *Salmonella Typhimurium*

Curva de sobrevivência de animais convencionais tratados com *L. plantarum* (LP4), *P. acidilactici* (PA2) e *L. casei* (LC) ou não e desafiados com *S. Typhimurium*

A curva de sobrevivência dos animais convencionais tratados ou não com amostra controle de *L. casei*, *L. plantarum* (LP4) e *P. acidilactici* (PA2) e desafiados com *S. Typhimurium* podem ser observados nas figura 6, 7 e 8.

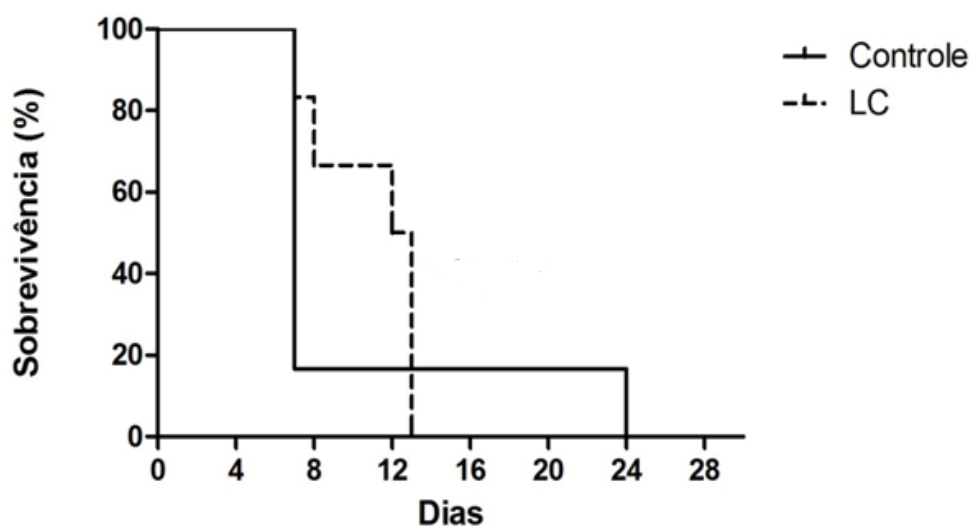


Figura 6. Sobrevivência (%) de camundongos convencionais (BALB/c) tratados ou não com *L. casei* e desafiados dez dias depois com *S. Typhimurium* (inóculo de  $10^5$  UFC). \*( $p < 0,05$ ). Teste Log-rank (Mantel-Cox) ( $n=6$ ).

A amostra *L. casei* foi capaz de proteger parcialmente os animais convencionais contra o desafio de *S. Typhimurium* (em inóculo de  $10^5$  UFC), visto que os animais desse grupo apresentaram um tempo médio de sobrevivência (11 dias) superior ao controle negativo (9,8 dias) (somente desafiado com o enteropatógeno), com uma taxa de 50% de sobrevivência, embora não tenha havido diferença ( $p > 0,05$ ).

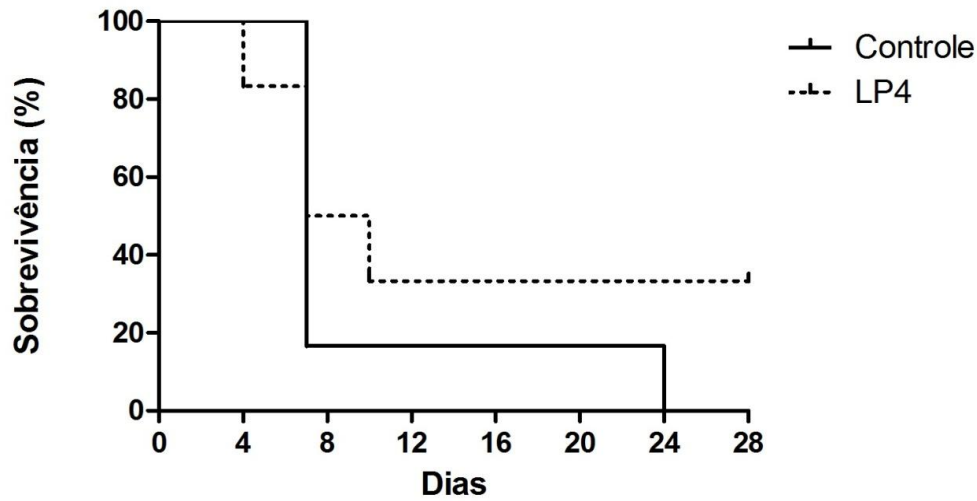


Figura 7. Sobrevivência (%) de camundongos convencionais (BALB/c) tratados ou não com *L. plantarum* (LP4) e desafiados dez dias depois com *S. Typhimurium* (inóculo de  $10^5$  UFC). Teste Log-rank (Mantel-Cox) (n=6).

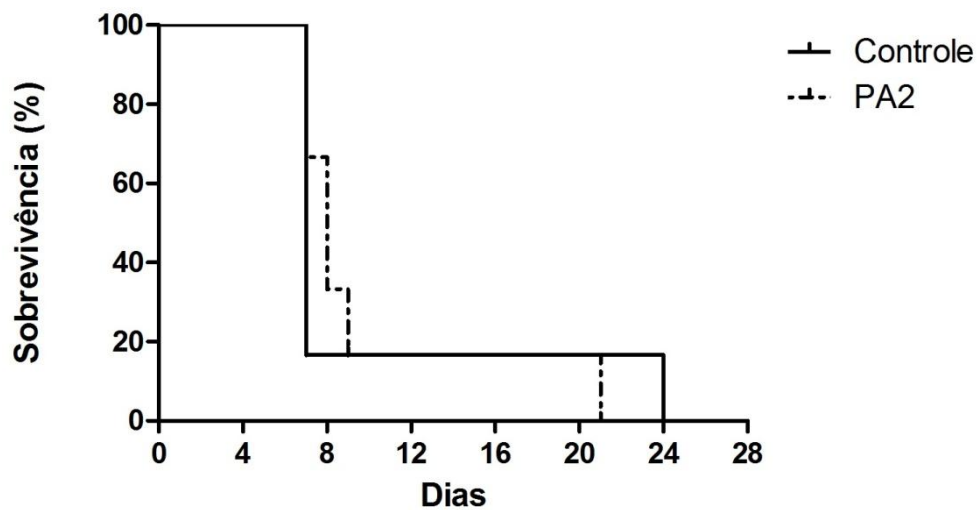


Figura 8. Sobrevivência (%) de camundongos convencionais (BALB/c) tratados ou não com *P. acidilactici* (PA2) e desafiados dez dias depois com *S. Typhimurium* (inóculo de  $10^5$  UFC). Teste Log-rank (Mantel-Cox) (n=6).

Conforme os resultados, não foram observadas diferenças ( $p>0,05$ ) entre os grupos tratados com LP4 e PA2 e o grupo controle. O grupo LP4 apresentou um tempo médio de sobrevivência de 14 dias com uma taxa de sobrevivência de 33%, sendo que o grupo PA2 apresentou tempo médio de sobrevivência de oito dias com uma taxa de sobrevivência de 16% e o grupo controle apresentou tempo médio de sobrevivência de 10 dias com percentual semelhante ao grupo PA2, de 16%. O resultado não indica um efeito protetor favorável no que tange a prevenção da letalidade causada pelo patógeno. Apesar disso, o grupo tratado com *L. casei*, um microrganismo isolado de leite fermentado de apelo comercial também não apresentou resultado favorável, embora apresentasse tendência à proteção.

Resultados alcançados por Frizzo *et al.* (2010) por meio de administração oral de cultura mista de *L. plantarum* e *P. pentosaceus* em camundongos de linhagem Swiss desafiados com *Salmonella* Dublin ( $10^5$  UFC), comprovaram taxas de 68% de sobrevivência no grupo de animais tratados e 50% no grupo de não tratados, apresentando diferença ( $p<0,01$ ). Além disso, os autores observaram que as mortes se iniciaram nove dias após a administração do patógeno. No presente estudo, os grupos PA2 e controle apresentaram a primeira morte próxima ao oitavo dia pós-infecção. Embora *S. Typhimurium* e *S. Dublin* apresentem características de patogenicidade distintas, esses dados podem ser importantes no que tange a dinâmica da invasão dos patógenos, sendo retardados pelos probióticos.

Ishikawa *et al.* (2010) estudaram o efeito inibitório de *S. Typhimurium* por *L. plantarum* b240 por meio da administração oral em camundongos C57BL e avaliaram que, com inóculos de  $10^4$  UFC de *S. Typhimurium*, os animais começaram a morrer no sétimo dia pós-infecção apresentando uma taxa de mortalidade de 58,3% em doses a 1 mg de b240 e 50% em doses de 10 mg de b240 ao vigésimo dia. Entretanto, os autores afirmam que quando foi utilizado um inóculo de  $10^5$  UFC de *S. Typhimurium*, a amostra de b240 não promoveu nenhum efeito protetor. Esses dados permitem inferir que uma dose infectante de  $10^4$  UFC do enteropatógeno nos camundongos tratados com LPA4 e PA2 permitiria a observação de um possível efeito protetor por parte dos microrganismos pesquisados.

De acordo com Reid e Burton (2002) e Servin *et al.* (2004) resultados positivos alcançados em análises *in vitro* nem sempre são observados nos testes *in vivo* em animais convencionais. Isso pode ser explicado em virtude de diversos fatores como a microbiota residente e produção de muco, movimentos peristálticos e o fluxo contínuo da mucosa intestinal que podem consideravelmente modificar ou até mesmo abolir efeitos da microbiota ácido láctica exógena administrada. Além disso, não existem muitos trabalhos abordando o uso das espécies *L. plantarum* e *P. acidilactici* elucidando seus efeitos protetores *in vivo*, especialmente em modelos murinos infectados com *Salmonella* Typhimurium, tornando difícil caracterizar a resposta aqui obtida por esses microrganismos.

#### Desenvolvimento ponderal de animais convencionais tratados ou não com *L. plantarum* (LP4), *P. acidilactici* (PA2) e *L. casei* (LC) e desafiados com *S. Typhimurium*

As figuras 9 e 10 ilustram o ganho de peso dos animais dos grupos LP4, PA2, LC e controle em virtude do ganho de peso ao longo do período de infecção pelo enteropatógeno.

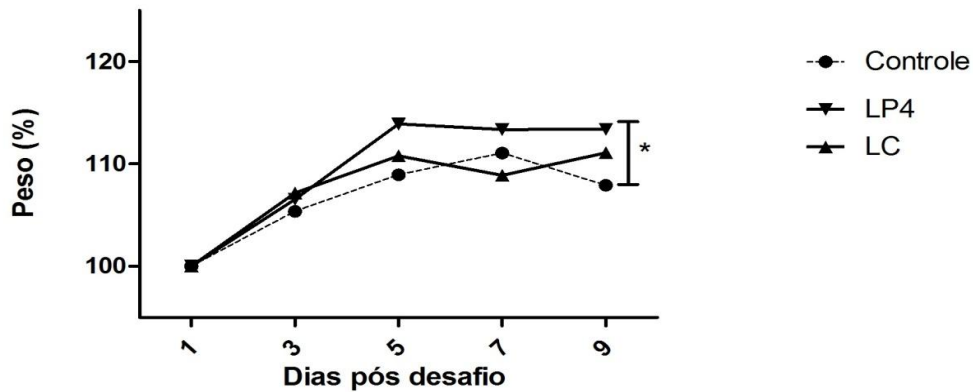


Figura 9. Peso relativo (%) de camundongos convencionais (BALB/c) antes e depois do tratamento ou não com *L. plantarum* LP4 e *L. casei*, e desafio dez dias depois com *S. Typhimurium* (inóculo de  $10^5$  UFC). \*( $p < 0,05$ ). Teste Two-way Anova, pós-teste de Bonferroni (n=6)

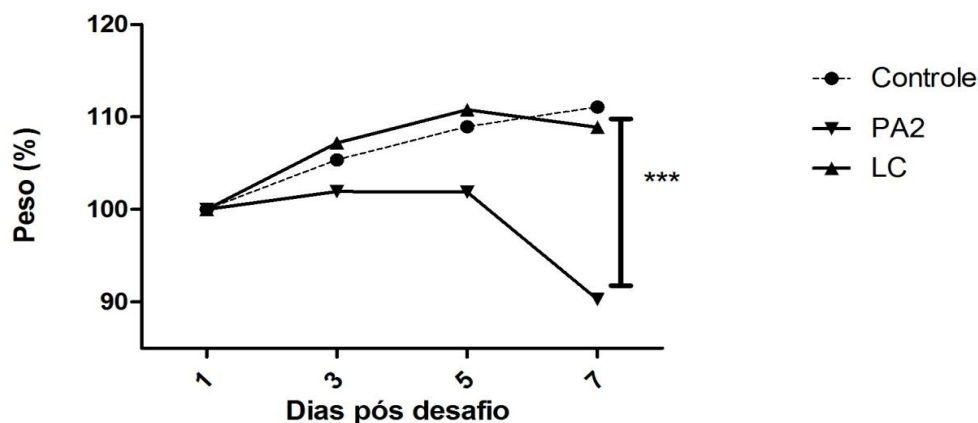


Figura 10. Peso relativo (%) de camundongos convencionais (BALB/c) antes e depois do tratamento ou não com *P. acididactici* PA2 e *L. casei*, e desafio dez dias depois com *S. Typhimurium* (inóculo de  $10^5$  UFC). \*\*\*( $p < 0,001$ ). Teste Two-way Anova, pós-teste de Bonferroni (n=6).

O ganho de peso que pode ser observado no grupo controle deve-se ao fato de que, antes da infecção, os animais ainda apresentaram ganho de peso satisfatório, permitindo que essa variação fosse menos severa após a infecção pelo enteropatógeno. Embora não tenha apresentado diferença ( $p > 0,05$ ) em relação ao grupo tratado *L. casei*, observa-se que o grupo tratado com LP4 apresentou maior ganho de peso ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle. O grupo tratado com PA2 apresentou menor ganho de peso em relação ao controle e ao grupo LC, indicando resultados desfavoráveis tanto em relação ao efeito protetor quanto para ganho de peso. Frizzo *et al.* (2010) observaram baixo ganho de peso de grupo tratado com mix de *L. plantarum* e *P. pentosaceus* desafiados com *S. Dublin*, apresentando menores valores no quarto

a sétimo dia pós-infecção. No presente estudo, o grupo tratado com LP4 sempre manteve níveis altos de ganho peso, mesmo após o desafio com o enteropatógeno. Esse dado indica que um possível tratamento profilático de LP4 seja interessante, haja vista que exibiu maior ganho de peso durante o processo infeccioso.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram isolar de amostras de água, leite, silagem, soro fermento endógeno e queijo Minas artesanal com períodos de maturação de 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias, oriundos de diferentes queijarias localizadas na região de Campo das Vertentes, um total de 94 amostras de BAL as quais foram identificadas ao nível molecular como pertencentes aos gêneros *Lactobacillus/Pediococcus*. A espécie *Lactobacillus plantarum* foi a mais abundante dentre as BAL (76% de todas as amostras), apresentando amostras filogeneticamente próximas, independentemente da origem. As amostras de *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus acidilactici* apresentaram resultados satisfatórios nas análises *in vitro*, sendo resistentes aos ácidos e sais biliares, exercendo atividade antagonista contra microrganismos patogênicos e apresentaram percentuais satisfatórios de resistência aos antimicrobianos, de acordo com a literatura. *L. plantarum* LP4 (oriundo de queijo Minas artesanal com 21 dias de maturação) e *Pediococcus acidilactici* PA2 (oriundo de queijo Minas artesanal com 0 dia de maturação) apresentaram características funcionais desejáveis, cumprindo os requisitos estabelecidos no processo de seleção *in vitro*, sendo resistentes aos sais biliares e ácidos, além de desempenhar atividade antagonista contra microrganismos reveladores. Embora a amostra PA2 não tenha apresentado resultados satisfatórios a proteção contra *Salmonella* Typhimurium em camundongos, a amostra LP4 exibiu resposta favorável em relação ao ganho de peso e não apresentou diferença ( $p < 0,05$ ) em relação a taxa de letalidade comparando-a com amostra de *L. casei*, oriunda de um leite fermentado de apelo comercial.

Bactérias do ácido lático isoladas de queijos Minas artesanais da região de Campo das Vertentes possuem potencial probiótico *in vitro*. No entanto, esses microrganismos não mostraram potencial probiótico *in vivo* na proteção contra infecção por *Salmonella* Typhimurium.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O modelo de infecção experimental por *S. Typhimurium* em camundongos pode não ser adequado para avaliar potencial probiótico *in vivo* de *Pediococcus* spp. e isso pode ser constatado pelos poucos relatos na literatura. O bom desempenho da amostra LP4 nos testes de seleção probiótica *in vitro*, sugere a necessidade de se investigar por quais mecanismos este microrganismo exerce efeitos desejáveis em experimentos futuros. Sendo assim, o queijo Minas artesanal pode ser considerado um produto promissor no que diz respeito à pesquisa e seleção de amostras com potencial probiótico favorável.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACURCIO, L.B. Isolamento, enumeração, identificação molecular e avaliação de propriedades probióticas de *Enterococos* isolados de leite de ovelha. 2011. 79f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ALBANO, H., TODOROV, S. D., VAN REENEN, C. A., HOGG, T., DICKS, L. M., TEIXEIRA, P. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. *Int. J. Food Microbiol.*, p.10, v.239–247, 2007.
- ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, M. R. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias do ácido láctico isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a micro organismos indicadores. *Arq. Bras. Med. Vet. Zool.*, v.54, p.424-428, 2002.
- ALVIM, L. B. Identificação molecular e seleção de bactérias do ácido láctico com potencial probiótico isoladas de diferentes mucosas de suínos. 2011. 76f. Dissertação (Mestrado em Genética). Inst. Cienc. Biol., Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- ANDRADE, C.R.G., SOUZA, M. R., PENNA, C.F.A.M., ACURCIO, L. B., SANT'ANNA, F. M., CASTRO, R. D., OLIVEIRA, D.L.S. 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.
- ARCURI, E. F., EL SHEIKHA, A. F., RYCHLIK, T., PIRO-MÉTAYER, I., & MONTET, D. Determination of cheese origin by using 16S rDNA fingerprinting of bacteria communities by PCR–DGGE: Preliminary application to traditional Minas cheese. *Food Control*, v.30, n.1, p.1–6, 2013.
- BARRONS, R., PHARMD, B.C.P.S., PHARMD, D. Use of *Lactobacillus* Probiotics for Bacterial Genitourinary Infections in Women: A Review. *Clin. Ther.* v.30, n.3, 2008.
- BEN AMOR, K., VAUGHAN, E. E., DE VOS, W. M. Advanced Molecular Tools for the Identification of Lactic Acid Bacteria. *J. Nut.*, v.137, p. 741-747, 2007.
- BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L. et al.. Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* v.11, n. 4-7, p. 259-274, 2001.
- BERMUDEZ-BRITO, M.; MUÑOZ-QUEZADA, S.; GOMEZ-LLORENTE, C.; MATENCIO, E.; BERNAL, M.J.; ROMERO, F.; GIL, A. Human intestinal dendritic cells decrease cytokine release against *Salmonella* infection in the presence of *Lactobacillus paracasei* upon TLR activation. *PLOS One*, v.7, p.1-11, 2012.
- BERNET-CAMARD, M.F., LIEVIN, V., BRASSART, D., NEESER, J.R., SERVIN, A.L., HUDAULT, S. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 63, p. 2747–2753, 1997.
- BHOWMIK, T., MARTH, E.H. Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: A review. *J. Dairy Sci.*, v.73, p.859–866, 1990.
- BHUNIA, A. K., JOHNSON, M.C., RAY, B., BELDEN, E. L. Antigenic property of pediocin AcH produced by *Pediococcus acidilactici* H. *J Appl Bacteriol.* v.69, n.2, p.21-25, 1990.



- BORELLI, B. M., LACERDA, I.C.A; BRANDÃO, L. R., VIANNA, C. R., FERREIRA, M, C., ;GOMES, F.C.O., CARMO, L.S.,; HENEINE, L.G.D., Rosa, C.A. Identification of *Staphylococcus* spp. isolated during the ripening process of traditional Minas cheese. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.* v. 63, n. 2, p. 481-487, 2011.
- BORIS, S., BARBES, C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes Infect.* v.2, p.543–546, 2000.
- BROADBENT, J.R.; LARSEN, R.L.; DEIBEL, V.; STEELE, J.L. Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress. *J. Bacteriol.*, v.192, p.2445-2458, 2010.
- CASTILLO, N.A.; PERDIGÓN, G.; LEBLANC, A.M. Oral administration of a probiótico *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *BMC Microbiol.* v.11, p.1-12, 2011.
- CHALITA, M.A.N.; SILVA, R.O.P.; PETTI, R.H.V.; SILVA, C.R.L. Algumas Considerações sobre a fragilidade de concepções de qualidade no mercado de queijos no Brasil. *Info. Econ.*, v.39, n.6, 2009.
- CHARTERIS, A. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food Prot.*, v. 61, n. 12, p. 1636-1643, 1998.
- CHARTERIS, W.P., KELLY, P.M., MORELLI, L., COLLINS, J.K. Development and application of na *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.*, v. 84, n. 5, p. 759-768, 1998.
- COBEA. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios Éticos. Disponível em: <[http://www.cobea.org.br/index.php?option=com\\_content&view=article&id=102&Itemid=119](http://www.cobea.org.br/index.php?option=com_content&view=article&id=102&Itemid=119)>. Acesso em 12 de fev. 2013.
- COBURN, B.; GRASSL, G.A.; FINLAY, B.B. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immuno Cell Bio.*, v.85, p.112-118, 2007.
- COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. *Int. Dairy J.*, Amsterdam, v.8, p.487-490, 1998.
- COSTA, H.H.S.; SOUZA, M.R.; ACURCIO, L.B.; CUNHA, A.F.; RESENDE, M.F.S.; NUNES, A.C. Potencial probiótico *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.*, v.65, p.1858-1866, 2013.
- COTTER P. D., HILL, C., ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* v.3, n.10, p.777–788, 2005.
- DABOUR, N., ZIHLER A., KHEADR E., LACROIX, C. Ismail Fliss. In vivo study on the effectiveness of pediocin PA-1 and *Pediococcus acidilactici* UL5 at inhibiting *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.*, v.133, p.225–233, 2009
- DAVE, R., SHAH, N.P. Viability of probiotic bacteria in yoghurt made from commercial starter cultures. *Int Dairy J.* v.7, p. 31–41, 1997.
- DESLAND, F. Commonly asked question about probiotics and the potential benefits for your health. *Inst. Food Agric. Scie. (IFAS)*, p. 1-7, 2012.

- DIAZ, P., GIBSON, G. R. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.68, p. 4689–4693, 2002.
- DOBSON, C. M., DENEER, H., LEE, S., HEMMINGSEN, S., GLAZE, S., S., ZIOLA, B. Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus*, including *Pediococcus clausenii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from beer. *Int. J. System. Evolutio. Microbiol.* v. 52, p. 2003–2010, 2002.
- EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MINAS GERAIS (EMATER-MG). Caracterização da microrregião da Canastra como produtora de queijo Minas artesanal. 2004. 19p. EMATER-MG, Belo Horizonte.
- ESCHENBACH, D.A., DAVICK, P.R., WILLIAMS, B.L., KLEBANOFF, S.J., YOUNGSMITH, K., CRITCHLOW, C.M., HOLMES, K.K. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* v.27, p.251–256,1989.
- FAO/WHO. Food and Agricultural Organization/World Health Organization. *Guidelines for the evaluation of probiotics in food*. London: FAO/WHO, 2002. 11p.
- FEDORAK, R. N. Probiotics in the management of ulcerative colitis. *Gastroent. Hep.*, v.6, p. 688-690, 2010
- FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Cur. Iss. Intest. Microbiol.*, v. 8, p 44 - 61, 2007
- FERNANDEZ, M.F, BORIS, S., BARBES, C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal. *Tract. J. Appl. Microbiol.*, v.94, p. 449-455, 2003.
- FIJAN, S. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, v. 11, p.4745-4767, 2014.
- FILHO-LIMA, J., VIEIRA, E., NICOLI, J. R. Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii*, and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp. typhimurium in gnotobiotic mice. *J. Appl. Microbiol.*, v. 88, p. 365–370, 2000.
- FORTINA M.G., RICCI G., ACQUATI A., ZEPPA G., GANDINI A., MANACHINI P.L., Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese, *Food Microbiol.*, v. 20, p. 397– 404, 2003.
- FRIZZO, L.S., ZBRUN, M.V., SOTO, L.P., BERTOZZI, E., SIGNORINI, M.L., SEQUEIRA, G.J., MARTI, L.E., DALLA, R., SANTINA R., PERDIGON, G., ROSMINI, M.R. Protective Effect of an Inoculum of Lactic Acid Bacteria from Bovine Origin Against *Salmonella* Serotype Dublin in the Intestinal Tract of Mice. *J. Animal Vet. Advan.*, v.9, p.2113-2122, 2010.
- FULLER, R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* v.66. p. 65–378, 1989.
- FURTADO, M.M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 35, n. 210, p. 33-36, 1980.
- GEVERS, D., HUYS, G., SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiol Lett.* v.27, n.205, p.31-36, 2001.

- GILL, H.S., SHU, Q., LIN, H., RUTHERFURD, K.J., CROSS, M.L. Protection against translocating *Salmonella typhimurium* infection in mice by feeding the immuno-enhancing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001. *Med. Microbiol. Immunol.*, v. 190, p. 97–104, 2001.
- GILLILAND, S. E., NELSON, C. R., MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.49: 377–381, 1985.
- GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. *Bol. Biotec. de Alim.*, n. 64, p. 12 - 22, 1999.
- GOPAL, A., SHAH, N. P., ROGINSKI, H. Bile tolerance, taurocholate and cholesterol removal by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Milchwiss.*, v.51, p.619–622., 1996.
- GRASSL, G. A.; FINLAY, B. B. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. *Cur. Opin. Gastroent.*, v. 24, p. 22-26, 2008.
- GUARNER, F., MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. *Lanc., Lon.*, v.360, p.512-518, 2003.
- GUCHTE, M.; SERROR, P.; CHERVAUX, C.; SMOKVINA, T.; EHRLICH, S.D.; MAQUIN, E. Stress responses in lactic acid bacteria. *Anto. van Leeu. J.*, v.82, p.187-216, 2002
- GURTLER, V., STANISICH, V. A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S–23S rDNA spacer region. *Microbiol. Rev.*, v.142, p. 3–16, 1996.
- HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Mic. Mol. Bio. Rev.*, v.64, n. 4, p. 669–685, 2004.
- HUANG, Y., ADAMS, M.C. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *Int. J. Food Microbiol.* v.91, p.253-260, 2004.
- HUDSON, J.A., CAI, Y., CORNER, R.J., MORVAN, B., JOBLIN, K.N. Identification and enumeration of oleic acid and linoleic acid hydrating bacteria in the rumen of sheep and cows. *J. Appl. Microbiol.*, v.88, p.286–292, 2000.
- HÜTT, P.; SHCHEPETOVA, J.; LÕIVUKENE, K.; KULLISAAR, T.; MIKELSAAR, M. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. *J. Appl. Microbiol.*, v.100, p.1324-1332, 2006.
- ISHIKAWA, I., KUTSUKAKE, E., FUKUI, T., SATO, I., SHIRAI, T., KURIHARA, T., OKADA, N., DANBARA, H., TOBA, M., KOHDA, N., MAEDA, Y., MATSUMOTO, T. Oral administration of heat-killed *Lactobacillus plantarum* strain b240 protected mice against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 74, n. 7, p.1338-1342, 2010.
- JACOBSEN, C. N., ROSENFELDT NIELSEN, V., HAYFORD, A.E., MOLLER, P.L., MICHAELSEN, K.F., PAERREGAARD, A., SANDSTROM, B., TVEDE, M., JAKOBSEN, M. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl. Env. Microbiol.*, v. 65, n. 11, p. 4949 - 4956, 1999.

TANKOVIC, J., LECLERCQ, R., DUVAL, J. Antimicrobial Susceptibility of *Pediococcus* spp. and Genetic Basis of Macrolide Resistance in *Pediococcus acidilactici* HM3020. *Antimic. Agen. Chemother.*, v.37, n.4, p. 789-792, 1993.

JAY, J.M. *Modern Food Microbiology*. 7 ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2005. 635p.

KANDLER, O.; WEISS, N. Regular, non-sporing gram-positive rods. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v.2, p. 1208-1234. Baltimore: Williams and Wilkins. 1986.

KANTOR, A., MONTVILLE, T.J., METT, A., SHAPIRA, R. Molecular characterization of the replicon of the *Pediococcus pentosaceus* 43200 pediocin A plasmid pMD136. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.151, p.237-244, 1997.

KAUR, I.P., CHOPRA, K., SAINI, A.. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Euro J. Pharm. Scien.* v.15, p. 1-9, 2002.

KLARE, I., KONSTABEL, C., WERNER, G., HUYS, G., VANKERCKHOVEN, V., KAHLMETER, G., V., HILDEBRANDT, B., MÜLLER-BERTLING, S., WITTE, W., GOOSSENS, H.. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J. Antimic. Chemother.* v.59, p.900- 912, 2007.

KLEBANOFF, S.J., HILLIER, S.L., ESCHENBACH, D.A., WALTERSDORPH, A.M. Control of the microbial flora of the vagina by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- generating lactobacilli. *J. Infect. Dis.* v.164, p.94-100, 1991.

KNORR, D. Technological aspects related to microorganisms in functional foods. *Trends Food Sci. Technol.*, v.9, p.295-306, 1998.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J. Am. Diet. Assoc.*, v.101, p.229-241, 2001.

KULLEN, M.J., AMANN M. M., O'SHAUGHNESSY, M. J., O'SULLIVAN, D. J., BUSTA, F.F, BRADY, L.J. Differentiation of ingested and endogenous bifidobacteria by DNA fingerprinting demonstrates the survival of an unmodified strain in the gastrointestinal tract of humans. *J. Nutr.* v.127, p.89- 94, 1997.

KUMAR, M., VERMA, V., NAGPAL, R., KUMAR, A., BEHARE, P. V., SINGH, B., AGGARWAL P. K. Anticarcinogenic effect of probiotic fermented milk and Chlorophyllin on aflatoxin-B1 induced liver carcinogenesis in rats. *Br J Nutr.*, v. 107, p. 1006-1016, 2011.

LEBEER S.; VANDERLEYDEN J.; DE KEERSMAECKER S. C. J. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Ver. Microbiol.*, v.8, p.171 - 184, 2010.

LEBLANC, A.M.; CASTILLO, N.A.; PERDIGON, G. Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Int. J. Food Microbiol.*, v.138, p.223-231, 2010.

LEE, Y.K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. Handbook of probiotics. New York: Wiley, 1999. 211p

LEYER, G. L. AND JOHNSON, E.A. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* v.59, p. 1842, 1993.

- LIN, W. H., HWANG, C. F., CHEN, L. W., TSEN, H. Y. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiol.*, v. 23, p.74-81, 2006.
- LUCHANSKY, J.B., GLASS, K.A., HARSONO, K.D., DEGNAN, A.J., FAITH, N.G., CAUVIN, B., BACCUS-TAYLOR, G., ARIHARA, K., BATER, B., MAURER, A.J., CASSENS, R.G. Genomic analysis of *Pediococcus* starter cultures used to control *Listeria monocytogenes* in Turkey summer sausage. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.58, p.3053–3059, 1992.
- MACKOWIAK, P.A. Recycling metchnikoff: Probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. *Front. Pub. Health.* v.1, p. 52, 2013.
- MAGALHÃES, J. T.; FLORESTA, F.; MORAES, C. A. Partial characterization of ribosomal operons of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20. *Braz. Journ. Micro.*, v. 36, p. 177 - 183, 2005.
- MANDAL, S., PUNIYA, A.K. AND SINGH, K. Effect of alginate concentration on survival of encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *Int. Dairy J.*, v. 16, p. 1190-1195, 2006.
- MARKIEWICZ, L. H., BIEDRZYCKA, E., WASILEWSKA E., BIELECKA, M. Rapid Molecular Identification and Characteristics of *Lactobacillus* Strains. *Folia Microbiol.* v.55, n.5, p.481–488, 2010.
- MARTINS, A.K.S.; MARTINS, F.S.; GOMES, D.A., ELIAN, S.D.A.; VIEIRA, A.T.; TEIXEIRA, M.M.; CARA, D.C.; NARDI, R.M.D.; NICOLI, J.R. Evaluation of *in vitro* antagonism and of *in vivo* immune modulation and protection against pathogenic experimental challenge of two probiotic strains of *Bifidobacterium animalis* var. *lactis*. *Arch. Microbiol.*, v. 192, p. 995-1003, 2010.
- MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 105, p. 281-295, 2005.
- MAYO, B., SINDEREN, V.D., VENTURA, M. Genome Analysis of Food Grade Lactic Acid-Producing Bacteria: From Basics to Applications. *Cur. Gen.*, v.9, p. 169-183, 2008.
- MCCARTNEY, A. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *Br J Nutr.*, v.88, p. 29–37, 2009.
- MENESES, J. N. C. Queijo artesanal de Minas: Patrimônio cultural do Brasil. Dossê interpretativo, v.1 Belo Horizonte, 2006.
- MERRITT, M. E., DONALDSON, J. R. Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. *J. Medic. Microbiol.*, v. 58, p. 1533 - 1541, 2009.
- MINAS GERAISa. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria 594 de 10 jun. 2003. Disponível em: <[http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc\\_details/244-portaria-594](http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/244-portaria-594)>. Acesso em: 05 dez. 2014.
- MINAS GERAISb. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria 591 de 26 mai. 2003. Disponível em: <[http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc\\_details/242-portaria-591](http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/242-portaria-591)>. Acesso em: 05 dez. 2014.
- MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria 694 de 17 nov. 2004. Disponível em: <[http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc\\_details/276-portaria-694](http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/276-portaria-694)>. Acesso em: 05 dez. 2014.

- MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria 874 de 2 out. 2007. Disponível em: <[http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc\\_details/355-portaria-874](http://www.ima.mg.gov.br/component/docman/doc_details/355-portaria-874)>. Acesso em: 05 dez. 2014.
- MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria 1022 de 3 nov. 2009. Disponível em: <[http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/legis/portarias\\_pdf/1022.pdf](http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/legis/portarias_pdf/1022.pdf)>. Acesso em: 05 dez. 2014.
- MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Lei 20.549 de 18 dez. 2012. Disponível em: <[http://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=14185&comp=&ano=2002&aba=js\\_textoAtualizado#texto](http://www.almg.gov.br/consulte/legislacao/completa/completa.html?tipo=LEI&num=14185&comp=&ano=2002&aba=js_textoAtualizado#texto)>. Acesso em: 05 dez. 2014.
- MINAS GERAISa. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria 1397 de 13 fev. 2014. Disponível em: <[http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc\\_details/1315-portaria-no-1397-de13-de-fevereiro-de-2014](http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_details/1315-portaria-no-1397-de13-de-fevereiro-de-2014)>. Acesso em: 05 out. 2014.
- MINAS GERAISb. Instituto Mineiro de Agropecuária. INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria 1428 de 29 ago. 2014. Disponível em: <[http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc\\_details/1556-portaria-no-1428-de-29-de-agosto-de-2014](http://www.ima.mg.gov.br/portarias/doc_details/1556-portaria-no-1428-de-29-de-agosto-de-2014)>. Acesso em: 05 out. 2014.
- MIRLOHI, M., SOLEYMANIANZAD, S., DOKHANI, S.H., SHEYKH ZEYN ALDIN, M., ABGHARI, A. Investigation of acid and bile tolerance of native lactobacilli isolated from fecal samples and commercial probiotics by growth and survival studies. *Ira. J. Biotech.*, v. 7, n. 4, p. 233 - 240, 2009.
- MOATSOU G., KANDARAKIS I., MOSCHOPOULOU E., ANIFANTAKIS E., ALICHANIDIS E., Effect of technological parameters on the characteristics of kasseri cheese made from raw or pasteurized ewes' milk. *Int. J. Dairy Technol.* v.54, p.69–77, 2001.
- MOREIRA, J.L.S., MOTA, M.R., HORTA, M.F., SANTUZA, M.R., NEUMANN, E., NICOLI, J.R., NUNES, A.C. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. *BMC Microbiol.*, v. 5, p. 1-9, 2005.
- MORELLI, L. *In vitro* selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Curr. I. Intest. Microbiol.*, v. 1, n. 2, p. 59 - 67, 2000.
- MURAROLLI, V. D. A. Efeito de prebiótico, probiótico e simbiótico sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte. 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Produção Animal). Fac. Med. Vet. Zoo. Univ. São Paulo, Pirassununga, 2008.
- NAGPAL, R., KUMAR, A., KUMAR, M., BEHARE, P. V., JAIN, S., YADAV, H. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.334, p.1–15, 2012.
- NEUMANN, E. Comportamento “in vitro” de estirpes de *Lactobacillus acidophilus* sensível e resistente à bacteriocina sob condições do trato digestivo. 1991. 86 f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1991.
- NIGATU, A., AHRNE, S., GASHE, B.A., MOLIN, G. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for discrimination of *Pediococcus pentosaceus* and *Ped. acidilactici* and rapid grouping of *Pediococcus* isolates. *Let. Appl. Microbiol.*,v.26, p.412–416, 1998.

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

NOUR, M. 16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions of lactobacilli: nucleotide sequence, secondary structure and comparative analysis. *Res. Micro., Amsterdam*, v. 149, p. 433 - 448, 1998.

O’SULLIVAN, D.J. Methods for Analysis of the Intestinal Microflora. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, v.1, n.2, p.39-50, 2000.

OLIVEIRA, D. L. S. *Staphylococcus* spp. isolados de queijo artesanal da Serra da Canastra: identificação bioquímica e molecular, detecção de genes para produção de toxinas, susceptibilidade a antimicrobianos e atividade antagonista *in vitro* frente a *Lactobacillus* spp. 47f. 2013. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OLIVEIRA, M. N., SIVIERI, K., ALEGRO, J.H.A., SAAD.,S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Rev. Bras. Cien.Farm.*, v. 38, n. 1, p. 1 - 21, 2002

O'TOOLE, P. W., COONEY, J. C. Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota *Interdisc. Persp. Infectio. Dise.* v.2008, 9p., 2008.

OUOBA, L. I. I; LEI, V.; JENSEN, L. B. Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 121, p. 217-224, 2008.

OWUSU-KWARTENG, J., TANO-DEBRAH, K., AKABANDA, F., NIELSEN, D.S, JESPERSEN, L. Partial Characterization of Bacteriocins Produced by *Lactobacillus reuteri* 2-20B and *Pediococcus acidilactici* 0-11A Isolated from Fura, a Millet-Based Fermented Food in Ghana. *J. Food Res.* V.2, n.1, 2013.

PANCHENIAK, E. F. R. Isolamento, seleção, caracterização bioquímica e molecular para produção e avaliação do potencial probiótico de *lactobacillus reuteri* LPB P01-001 em suínos. 2005. 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

POGACIC, T., MANCINI, A., SANTARELLI, M., BOTTARI, B., LAZZI, C., NEVIANI, E., GATTI, M. Diversity and dynamic of lactic acid bacteria strains during aging of a long ripened hard cheese produced from raw milk and undefined natural starter. *Food Microbiol.*, v.36, p. 207-215, 2013.

POVEDAA, J. M., CABEZASA, L., MCSWEENEY, P. L. H. Free amino acid content of Manchego cheese manufactured with different starter cultures and changes throughout ripening. *Food Chem.*, v.84, p.213–218, 2004.

PRIDMORE, R. D., PITTET, A.C. PRAPLAN, F., CAVADINI, C. Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-Salmonella activity. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.283, p.210–215, 2008.

PULUSONI, S. R., RAO, D. R. Whole body, liver and plasma cholesterol levels in rats fed *Thermophilus bulgaricus* and *acidophilus* milks. *J. Food. Sci.* v.48, p.280–281, 1983.

- PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMANCALDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. *Tren. Food Scie. Tech.*, v.13, p.3-11, 2002.
- RABE, L. K.; HILLIER, S. L. Optimization of Media for Detection of Hydrogen Peroxide Production by *Lactobacillus* Species. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, p. 3260-3264, 2003.
- REDONDO-LOPEZ, V., COOK, R.L., SOBEL, J.D. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev. Infect. Dis.* v.12, p.856–872,1990.
- REID, G. AND BURTON, J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect.*, v.4, p.319–324, 2002.
- RESENDE, M.F.S., COSTA, H.H.S., ANDRADE E.H.P., ACURCUI L.B., DRUMMOND A.F., CUNHA A.F., NUNES, A.C., MOREIRA J.L.S., PENNA, C.F.A.M., SOUZA, M.R. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidoláticas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.*, v. 63, n. 6, p.1567-1573, 2011.
- REYSENBACH, A. L.; LONGNECKER, K.; KIRSHTEIN, J. Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a mid-atlantic ridge hydrothermal vent. *Appl. Env. Micro*, Washington, v. 66, n. 9, p. 3798 - 3806, 2000.
- RIBEIRO, M.C.O., VANDENBERGHE, L.P.S., SPIER, M.R., PALUDO, K.S., SOCCOL, C.R.,SOCCOL, V.T. Evaluation of probiotic properties of *Pediococcus acidilactici* B14 in association with *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 for application in a soy based aerated symbiotic dessert. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, Curitiba, v. 57, n. 5, Oct. 2014.
- RIJKERS, G.T.; DE VOS, W.M.; BRUMMER, R.J.; MORELLI, L.; CORTIER, G.; MARTEAU, P. Health benefits and health claims of probiotics: Bridging science and marketing. *Br. J. Nutr.* v.106, p. 1291–1296, 2011.
- RODRIGUEZ, J.M., MARTINEZ, M.I., KOK, J., 2002. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. *Crit. Ver. Food Sci. Nut.*, v.42, p.91–121, 2002.
- RUIZ-MOYANO, S., MARTÍN, A., BENITO, M.J., NEVADO, F.P., DE GUÍA CÓRDOBA, M. Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Scie.*, v. 80, p. 715 - 721, 2008.
- RYAN, K. A., DALY, P., LI, Y., HOOTON, O'TOOLE, C. P. W. Strain-specific inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus salivarius* and other lactobacilli. *J. Antimic. Chemo.*, v.61, n.4, p. 831–834, 2008.
- SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Rev. Bras. Ciên. Farm.*, v. 42, n.1, p. 1-16, 2006.
- SAARELA, M. et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol.*, v. 84, p. 197 - 215, 2000.
- SAHADEVA, R.P.K., LEONG, S.F., CHUA, K. H., TAN, C.H., CHAN, H.Y., TONG, E.V., WONG, S.Y.W. AND CHAN, H.K. Survival of commercial probiotic strains to pH and bile *Int. Food Res. J.*, v.18, n.4, p.1515-1522, 2011.



- SALMINEN, S. Demonstration of safety of probiotics - a review. *Int. J. Food Microbiol.*, v.44, p.93-106, 1998.
- SALMINEN, S., ISOLAURI, E., SALMINEN, E., Clinical uses of probiotics for stabilising gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Ant. Van Lee.* v. 70, p. 347–358, 1996.
- SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. *Lactic Acid Bacteria*. New York: Marcel Dekker, 1993. 442p.
- SANDERS, M.E.; KLAENHAMMER, T.R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J. Dairy Sci.*, v.84, p.319-331, 2001.
- SANDES, S.H.C, ALVIM, L. B., SILVA, B.C, ZAMIRATI, D. F., JUNG, L.R.C., NICOLI, J.R., NEUMANN, E., NUNES, A.C. *Lactobacillus* species identification by amplified ribosomal 16S-23S rRNA restriction fragment length polymorphism analysis. *Benefi. Micro.*, v.5, n.4, p.471-481, 2014.
- SANTOS, M.T.M.; PINHEIRO, A.J.R.; SOUZA, L.R.P.; OLIVEIRA, L.M. Queijo Minas: Efeito do tratamento térmico do leite sobre as características físico-químicas e sensoriais do queijo de Minas. *Rev. Inst. Lat. Cãn. Tos.*, v. 47, n. 279-281, p. 28-31, 1992.
- SANTOS, R. L. ZHANG, S., TSOLIS, R.M., KINGSLEY, R.A., ADAMS, L.G., BÄUMLER, A.J Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. *Microbes Infect*, v. 3, p.1335–1344, 2001.
- SERVIN, A.L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.*, v.28, p.405–440, 2004.
- SETTANNI, L., MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol.* v.27, p.691-697, 2010.
- SHAH, N. P.; Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dai. Scien.*, v. 83, p. 894-907, 2000.
- SHARPE. M. E. The genus *Lactobacillus*, in *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria*. Berlin: Springer-Verlag, 1981.
- SILVA, A.M.; BARBOSA, F.H.F.; DUARTE, R.; VIEIRA, L.Q.; ARANTES, R.M.E.; NICOLI, J.R. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. *J. Appl. Microbiol.*, v. 97, p. 29-37, 2004.
- SILVA, B.C.; JUNG, L.C.R.; SANDES, S.H.C.; ALVIM, L.B.; BOMFIM, M.R.Q.; NICOLI, J.R.; NEUMANN, E.; NUNES, A.C. *In vitro* assessment of functional properties of lactic acid bacteria isolated from faecal microbiota of healthy dogs for potential use as probiotics. *Benef. Microb.*, v.4, p.267-275, 2013.
- SINGH, S., GOSWAMI, P., SINGH, R., J. HELLER, K. J. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *LWT - Food Sci. Tech.*, v.42, p.448–457, 2009.
- SIP, A., WIECKOWICZ, M., OLEJNIK-SCHMIDT, A., GRAJEK, W. Anti-*Listeria* activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland. *Food Cont.* v.26, p.117-124, 2012.

SLOVER, C. M., PHARM, L. D. D., PHARM, L. D. *Lactobacillus*: a Review *Clin. Microbiol. Newslett.*, v.30, n. 4, p. 23–27, 2008.

STEELE, J., BROADBENT, J., KOK, J. Perspectives on the contribution of lactic acid bacteria to cheese flavour development. *Curr. Opin. Biotechn.* v. 24, p. 135-141, 2013.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food. Micro.*, v. 36, p. 1-29, 1997.

TAGG, J. R.; DAJAMI, A. S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocin of Gram positive bacteria. *Bact. Rev.*, v. 40, n. 3, p. 722-756, 1976.

TAMIME, A.Y. *Prob. Dai. Prod.*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2005, 216p.

TANKOVIC, J., LECLERQ, R., DUVAL, J. Antimicrobial susceptibility of *Pediococcus* spp. and genetic basis of macrolide resistance in *Pediococcus acidilactici* HM3020. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.37, p.789–792, 1993.

TEIXEIRA, P., ALBANO, H., OLIVEIRA, M., AROSO, R., CUBERO, N., HOGG, T. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from “Alheiras” (traditional Portuguese fermented sausages): In situ assays. 2014. 5f. Escola Superior Biotecnologia, Universidade Catolica Portuguesa, Portugal.

TERZIC-VIDOJEVIC, A., TOLINACKI, M., NIKOLIC, M., VELJOVIC, K., JOVANOVIC, S., MACEJ, O., TOPISIROVIC, L. Artisanal Vlasina Raw Goat's Milk Cheese: Evaluation and Selection of Autochthonous Lactic Acid Bacteria as Starter Cultures. *Food Technol. Biotechnol.* v.51, n.4, p.554–563, 2013.

TEUBER, M.; MEILE, L.; SCHWARZ, F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Anto. Lee. J.*, v. 76, p.115-137, 1999.

TILSALA-TIMISJÄRVI, A; ALATOSSAVA, T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Int.l J. Food. Micro.*, v. 35, n. 1, p. 49–56, 18 mar. 1997.

TORRIANI, S., FELIS, G.E., DELLAGLIO, F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Appl. Env. Microbiol.* v.67, p.3450-3454, 2001.

TORRIANI, S., VAN REENEN, G. A., KLEIN, G., REUTER, G., DELLAGLIO, F., DICKS, L. M. *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* subsp. nov. and *Lactobacillus curvatus* subsp. *melibiosus* subsp. nov. and *Lactobacillus sake* subsp. *sake* subsp. nov. and *Lactobacillus sake* subsp. *carnosus* subsp. nov., new subspecies of *Lactobacillus curvatus* Abo-Elnaga and Kandler 1965 and *Lactobacillus sake* Katagiri, Kitahara, and Fukami 1934 (Klein et al. 1996, emended descriptions), respectively. *Int J Syst Bacteriol.* , v.46, n.4, p.1158-1163, 1996.

TROMPETTE, A., GOLLWITZER, E. S., YADAVA, K., SICHELSTIEL, A. K., SPRENGER, N., NGOM-BRU, BLANCHARD, C., JUNT, T., NICOD, L. P., HARRIS, N. L., MARSLAND, B. J. Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis. *Nat. Med.*, v.20, n.2, 2014.

VAN DE WATER, J. Yogurt and immunity: the health benefits of fermented milk products that contain lactic acid bacteria. In: FARNWORTH, E.R., ed. Handbook of fermented functional foods. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.113-144.

VAN HOORDE, K., VANDAMME P., HUYS, G. Molecular identification and typing of lactic acid bacteria associated with the production of two artisanal raw milk cheeses. *Dai., Scie. Tech.*, v. 88, p. 445–455, 2008.

VANCANNEYT, M., HUYS, G., LEFEBVRE, K., VANKERCKHOVEN, V., GOOSSENS, H., SWINGS, J. Intraspecific Genotypic characterization of *Lactobacillus rhamnosus* strains intended for probiotic use and isolates of human origin. *App. Enviro. Microbiol.*, v.72, p. 5376–5383, 2006.

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 Resea. Int.*, v.36, p.895–904, 2003.

WARD, L.J.H., TIMMINS, M.J. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* v. 29, p.90-92, 1999.

WRIGHT, G. D., HOLMAN, T. R., WALSH, C. T. Purification and characterization of VanR and the cytosolic domain of VanS: a two-component regulatory system required for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147. *Biochem.*, v.32, p.5057–5063, 1993.

YU, L.X.; CRISON, J.R.; AMIDON, G.L. Comportamental transit and dispersion model analysis of small intestinal transit flow in humans. *Int. J. Pharmaceut.*, v.140, p.111-118, 1996.

## 9. ANEXOS

### Anexo 1. Certificado de experimentação animal

 <b>UFMG</b>	<b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b> <b>CEUA</b> <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b>
<b>CERTIFICADO</b> Certificamos que o Protocolo nº. 303 / 2014, relativo ao projeto intitulado "Avaliação do efeito protetor de lactobacilos de queijo Minas artesanal na infecção experimental por Salmonella Typhimurium", que tem como responsável Marcelo Resende de Souza, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 27/11/2014. Este certificado expira-se em 27/11/2019.	
<b>CERTIFICATE</b> We hereby certify that the Protocol nº. 303 / 2014, related to the Project entitled "Evaluation of lactobacilli's from Minas artisanal cheese protector effect on a experimental infection by Salmonella Typhimurium", under the supervision of Marcelo Resende de Souza, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 27/11/2014. This certificates expires in 27/11/2019.	
Suellen Cristina Moreira de Sales Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 27/11/2014.	
Atenciosamente.	
Sistema CEUA-UFMG <a href="https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/">https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</a>	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/cetea">www.ufmg.br/bioetica/cetea</a> - <a href="mailto:cetea@prpq.ufmg.br">cetea@prpq.ufmg.br</a>	

### Anexo 2. Produção de peróxido de hidrogênio por LP4 e PA2

