

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS E
PROPRIEDADES PROBIÓTICAS *IN VITRO* DE *Lactobacillus* spp.
ISOLADOS DE QUEIJO MINAS ARTESANAL DE ARAXÁ, MINAS
GERAIS**

JOSÉ GIVANILDO DA SILVA

**BELO HORIZONTE - MG
ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
2016**

JOSE GIVANILDO DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS E
PROPRIEDADES PROBIÓTICAS *IN VITRO* DE *Lactobacillus* spp.
ISOLADOS DE QUEIJO MINAS ARTESANAL DE ARAXÁ, MINAS
GERAIS**

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

Área de concentração:
Tecnologia e Inspeção de
Produtos de Origem
Animal.

Orientador: Marcelo
Resende de Souza

**BELO HORIZONTE - MG
ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
2016**

S586i Silva, José Givanildo da, 1989-
Identificação molecular de bactérias ácido lácticas e propriedades probióticas *in vitro*
de *Lactobacillus spp.* isolados de queijo Minas artesanal de Araxá, Minas Gerais / José
Givanildo da silva. – 2016.
82 p. : il.

Orientador: Marcelo Resende de Souza
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. Micro-organismos – Teses. 5. Probióticos – Teses. I. Souza,
Marcelo Resende de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
III. Título.


CDD – 637.3

FOLHA DE APROVAÇÃO

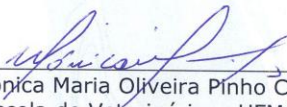
JOSÉ GIVANILDO DA SILVA

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.

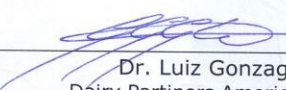
Aprovada em 11 de Janeiro de 2016, pela banca constituída pelos membros:



Prof. Marcelo Resende de Souza
Presidente - Orientador



Profª. Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira
Escola de Veterinária - UFMG



Dr. Luiz Gonzaga Guedes Neto
Dairy Partiners Americas Brasil - NESTLÉ S/A

Agradecimentos

A Deus, primeiramente por me conceder o dom da vida. Por me amar incondicionalmente, por se fazer presente em minha vida a todo instante e por permitir que eu chegasse até aqui.

A Nossa Senhora da Imaculada Conceição, minha grande intercessora que escuta minhas preces e as leva a Cristo e vibra com cada vitória minha.

A minha mãe, Maria, por ser a pessoa que mais acredita em minhas potencialidades, e pelo seu exemplo de força, fé, trabalho, persistência, coragem e acima de tudo amor. Tê-la como mãe é a maior benção que Deus poderia me conceder.

Ao meu avô, Francisco, pela dedicação, preocupação, ensinamentos e exemplo de homem que não precisou conhecer as letras para ensinar o que é ter caráter, coragem e determinação.

Ao meu pai, Givanildo, por estar a cada dia mais presente em minha vida, pelo amor imenso que tem por mim, sinto muito orgulho de ter o senhor como pai.

Aos meus irmãos, Fernando e Marcela, pelo apoio, cumplicidade, carinho, fraternidade e, acima de tudo, amor que têm me dado ao longo da vida. .

A todos os meus amigos de Barreiros, especialmente Rafael Luís, Maura Fernanda, Juliana Silva, Natalie Vasconcelos, Sarah Michelle, Bruna Mello, Edinaide Miranda, Antônio Marcos, Laércio Santos e Alice por estarem comigo apesar da distância.

A minha cidade natal, Barreiros-PE, você e seu povo foram os grandes responsáveis pelo homem que me tornei e pelo caráter que construí, espero um dia poder retribuir tudo o que esta cidade tem me proporcionado.

A Pernambuco, terra de poetas, músicos, culinária, de uma cultura ímpar e, principalmente de um povo guerreiro, forte e lutador. Sinto muito orgulho de ser pernambucano.

A todos os meus familiares pela ajuda, confiança e crédito e em especial ao meu tio Gilberto, as minhas avós Irene e Conceição e a minha prima Natália que estão torcendo por mim lá no céu.

Aos amigos que fiz ao longo do curso de graduação em Medicina Veterinária, especialmente Claudia, Majjora e Armele, por estarem sempre ao meu lado, me aconselhando, “puxando minha orelha” quando preciso e pelo amor de irmãos que criamos, jamais esquecerei o nosso “quarteto fantástico”;

A todos os professores do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, vocês me deram a chance de conhecer um novo mundo, de construir conhecimentos a respeito desta profissão tão grandiosa. Especialmente ao Professor Rinaldo Mota, pela orientação, carinho, amizade e por acreditar no meu trabalho, assumindo muitas vezes o papel de pai, irmão, tio e amigo.

A Professora Héli da de Mélo do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Pernambuco-*Campus* Barreiros, por ter despertado em mim a vontade ir além, de fazer um curso superior. E por ter se tornado uma grande amiga, alguém que confio e admiro bastante.

A todos os mineiros e membros da Escola de Veterinária da UFMG, vocês com seus “uai, trem, sô, aqui, garrado e cê” foram uma grande família que formei nesse estado tão especial, podem ter certeza que serei eternamente grato por tudo o que fizeram por mim, jamais esquecerei de vocês.

A UFMG, especialmente a Escola de Veterinária, por ter se transformado em minha casa no decorrer desses anos, todos os momentos sejam os bons ou os ruins foram extremamente importantes para minha formação.

Ao professor Marcelo Souza, meu orientador, por ter aceitado me orientar sem nem mesmo me conhecer. Pela orientação, disponibilidade, ensinamentos e amizade. Saiba sempre serei mais que um orientado, tenho o senhor como um amigo.

Aos meus amigos do laboratório de Microbiologia de Alimentos Cosme, Renatinha, Gabi, Letícia, Lívia, Felipe, Gilson, Carol, Romulo, Naiara, Gustavo, Carlos e Cinthia com toda a certeza vocês são a equipe mais unida e amiga com quem já trabalhei. Desejo muito sucesso e que Deus os abençoe sempre.

Aos professores do DTIPOA, em especial as professoras Claudia Penna e Mônica Cerqueira, pela disponibilidade, ensinamentos e exemplos de humanidade.

Aos técnicos do DTIPOA Cosme Barbosa, Maura Regina, Marco Antônio, César Victor e Miltinho pelos ensinamentos, auxílio e convivência harmônica.

Aos membros da banca examinadora, Luiz Guedes e Monica Pinho pela disponibilidade e contribuição na escrita e qualidade da dissertação

A todos dos laboratórios de Genética molecular de protozoários e parasitos e de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos do ICB/UFMG pelo auxílio na identificação molecular e caracterização probiótica.

Ao laboratório de Genética da Escola de Veterinária pela realização do sequenciamento genético das amostras.

A FAPEMIG pelo auxílio financeiro ao projeto e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Aos nordestinos, Ermilton, Mayra, Aranadia, Telissa e, especialmente Fernando pelo convívio, momentos compartilhados e me fazerem sentir mais perto da nossa terra.

Nessa vida algumas pessoas chegam “do nada” e nos marcam para sempre e assim aconteceu entre eu e vocês Cosme, Renatinha, Breno, Fernando e Danilo muito obrigado por tudo. Vocês são pessoas muito especiais para mim, verdadeiros irmãos que Minas Gerais e a UFMG me deram.

Ao meu amigo Marcus Vinicius (*in memoriam*) pela amizade curta, mas jamais esquecida, lembro-me do seu sonho em fazer veterinária e após sua partida prometi a mim mesmo e a você que realizaria seu sonho. Hoje estou o concretizando, dei o melhor de mim e espero ter cumprido essa promessa da melhor forma possível.

SUMÁRIO

	RESUMO	
	ABSTRACT	
1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVOS	16
2.1.	Objetivo geral	16
2.2.	Objetivos específicos	16
3.	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1.	Queijo	16
3.2.	Queijos artesanais no Brasil	18
3.2.1.	Queijo Minas Artesanal	10
3.2.1.1.	Histórico	20
3.2.1.2.	Aspectos legais da produção e comercialização do queijo Minas artesanal	20
3.2.1.3.	Microrregião de Araxá	22
3.3.	Bactérias ácido lácticas (BAL)	25
3.3.1.	Características gerais	25
3.3.2.	Processo fermentativo das BAL	25
3.3.3.	Identificação de BAL	27
3.3.4.	Biodiversidade de BAL em queijos artesanais	29
3.3.5.	<i>Lactobacillus</i> spp.	33
3.4.	Probióticos	33
3.4.1.	CrITÉrios de seleção e benefícios do uso de probióticos	33
3.4.2.	Mecanismos de ação dos probióticos	34
3.4.2.1.	Inibição de patógenos e restabelecimento da homeostase microbiana	34
3.4.2.2.	Proteção epitelial	35
3.4.2.3.	Modulação da imunidade	36
3.4.3.	Uso de probióticos na indústria de lácteos	37
3.4.4.	Propriedades probióticas de BAL isoladas de queijos artesanais	38
4.	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1.	Bactérias ácido lácticas	40
4.2.	Identificação molecular das BAL isoladas	40
4.2.1.	Pré-tratamento das células e extração do DNA genômico	40
4.2.2.	Amplificação do DNA por PCR: gene 16S rDNA	41
4.2.3.	Sequenciamento genético das amostras	41
4.2.4.	PCR espécie-específica para identificação das espécies <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> e <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	42
4.2.5.	PCR <i>multiplex</i> para identificação das espécies <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus paraplantarum</i> e <i>Lactobacillus pentosus</i>	42
4.3.	Propriedades probióticas <i>in vitro</i>	43
4.3.1.	Análise de susceptibilidade a antimicrobianos	43
4.3.2.	Resistência ao suco gástrico artificial	44
4.3.3.	Resistência aos sais biliares	45
4.3.4.	Produção de peróxido de hidrogênio	45
4.3.5.	Teste de antagonismo “ <i>spot on the lawn</i> ”	46
4.3.6.	Antagonismo em co-cultivo	47
4.4.	Análise estatística	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1.	Identificação molecular	48
5.2.	Propriedades probióticas <i>in vitro</i>	51
5.2.1.	Análise de susceptibilidade a antimicrobianos	52
5.2.2.	Resistência ao suco gástrico artificial e aos sais biliares	54
5.2.3.	Produção de peróxido de hidrogênio	56

5.2.4.	Teste de antagonismo “ <i>spot on the lawn</i> ”	58
5.2.5.	Antagonismo em co-cultivo	59
5.2.6.	Seleção de <i>Lactobacillus</i> spp. com potencial probiótico, isolados de queijo Minas artesanal de Araxá	62
6.	CONCLUSÕES	64
7.	REFERÊNCIAS	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Níveis de susceptibilidade a antimicrobianos de <i>Lactobacillus</i> spp. de acordo com os diâmetros médios dos halos de inibição (mm) no teste de difusão em ágar MRS	44
Tabela 2 -	Gêneros, espécies e frequência de identificação de BAL em queijo Minas artesanal de Araxá, coletados durante as épocas de chuva e seca, ao longo da maturação	48
Tabela 3 -	Caracterização das amostras de <i>Lactobacillus</i> spp. segundo a propriedade de origem e o período de maturação dos queijos Minas artesanais de Araxá coletados durante as épocas de chuva e seca	52
Tabela 4 -	Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de amostras de <i>Lactobacillus</i> spp. identificadas de queijo Minas artesanal de Araxá, coletados durante as épocas de chuva e seca, ao longo da maturação, em teste de difusão em ágar MRS	52
Tabela 5 -	Percentual de inibição e classificação quanto ao nível de tolerância ao suco gástrico artificial (pH 2.0) e aos sais biliares de amostras de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de queijo Minas artesanal da região de Araxá, coletados durante as épocas de chuva e seca, ao longo da maturação	55
Tabela 6 -	Médias dos halos de inibição (em mm) de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de queijo Minas artesanal de Araxá, coletados durante as épocas de chuva e seca, ao longo da maturação, contra bactérias reveladoras	57
Tabela 7 -	Valores médios das contagens (UFC/mL) em ágar MacConkey de <i>E. coli</i> ATCC 25922, após cultivo em caldo MRS e BHI com e sem a presença de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de queijo Minas artesanal de Araxá, coletados durante as épocas de chuva e seca, ao longo da maturação	59
Tabela 8 -	Valores médios das contagens (UFC/mL) em ágar MacConkey de <i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028, após cultivo em caldo MRS e BHI com e sem a presença de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de queijo Minas artesanal de Araxá, coletados durante as épocas de chuva e seca, ao longo da maturação	60
Tabela 9 -	Valores médios das contagens (UFC/mL) em ágar MacConkey de <i>Shigella flexneri</i> ATCC 25875, após cultivo em caldo MRS e BHI com e sem a presença de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de queijo Minas artesanal de Araxá, coletados durante as épocas de chuva e seca, ao longo da maturação	60
Tabela 10	Valores médios de pH após incubação a 37°C por 24h de caldo MRS com e sem inoculação de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de queijo Minas artesanal de Araxá, coletados durante as épocas de chuva e seca, ao longo da maturação e de caldo BHI com e sem inoculação de bactérias reveladoras	62
Tabela 11 -	Síntese dos resultados da caracterização probiótica <i>in vitro</i> de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de queijo Minas artesanal de Araxá coletados durante as épocas de chuva e seca, ao longo de sessenta dias de maturação	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição dos queijos artesanais brasileiros, por região de origem.	19
Figura 2 -	Mapa das regiões reconhecidas, pelo IMA, como produtoras de queijo Minas artesanal.	22
Figura 3 -	Mapa da microrregião produtora de queijo Minas Artesanal de Araxá.	23
Figura 4 -	Fluxograma de elaboração do queijo Minas artesanal de Araxá.	24
Figura 5 -	Representação das vias homo (a) e heterofermentativas (b).	26

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Gêneros, espécies e porcentagem de isolamento de BAL em queijo branco marroquino.	30
Quadro 2 -	Gênero, espécies e porcentagem de isolamento de BAL em queijo Minas artesanal da Serra da Canastra.	31
Quadro 3 -	Classificação de espécies de <i>Lactobacillus</i> spp. de acordo com o modo de fermentação.	32

LISTA DE ABREVIATURAS

BAL	Bactérias ácido lácticas
RNA	Ácido ribonucleico
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
a.C.	Antes de Cristo
IPHAN	Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
SIF	Sistema de Inspeção Federal
SISBI/POA	Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
cm	Centímetros
Kg	Quilograma
mm	Milímetros
%	Porcentagem
DHAP	Di-hidroacetona fosfato
GAP	Gliceraldeído-3-fosfato
°C	Graus Celsius
MRS	Man-Rogosa-Sharpe
ITS1	Região intergênica espaçadora
RAPD	DNA polimórfico randomicamente amplificado
RFLP	Fragmento randômico polimórfico amplificado
AFLP	Comprimento polimórfico amplificado
CO ₂	Dióxido de Carbono
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
GRAS	<i>Generally Recognised As Safe</i>
UFC	Unidades formadoras de colônias
ATP	Adenosina trifosfato
CEI	Células do epitélio intestinal
CD	Células dendríticas
MAMPs	Moléculas conservadas na parede celular destes micro-organismos
PRRs	Receptores de reconhecimento do hospedeiro
TLAI	Tecido linfóide associado ao intestino
MLNs	Nódulos linfáticos mesentéricos
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
pH	Potencial de hidrogênio
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
mL	Mililitro
mM	Milimolar
HCl	Ácido clorídrico
µL	Microlitros
H ₂ O	Água
ng	Nanogramas
Kb	Mil pares de bases
bp	Pares de base
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
NaCl	Solução salina
mg	Miligramas
OD	Densidade óptica
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
VRE	Enterococos resistentes a vancomicina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
MgCl	Cloreto de magnésio

RESUMO

O queijo Minas artesanal é elaborado a partir de leite cru com a adição de culturas iniciadoras endógenas. Durante o processo de maturação há o crescimento de bactérias ácido lácticas (BAL) que são essenciais para o sabor e contribuem benéficamente para a qualidade sanitária do produto. As BAL têm demonstrado propriedades probióticas, como antagonismo contra patógenos. Porém, há escassez de estudos que identifiquem a microbiota láctica desse queijo ao nível molecular e avaliem suas propriedades probióticas. Esse estudo objetivou identificar molecularmente BAL isoladas de queijo Minas artesanal da região de Araxá, Minas Gerais, durante sua maturação por até sessenta dias durante estações seca e chuvosa e avaliar suas propriedades probióticas *in vitro*. Ao todo, 263 amostras de BAL foram isoladas, 50 delas foram identificadas por sequenciamento do gene 16S rRNA. Foram identificadas bactérias dos gêneros *Lactobacillus* (74%), *Enterococcus* (24%) e *Bacillus* (2%). Dessas, dez amostras de *Lactobacillus* spp. foram selecionadas para testes *in vitro* do seu potencial probiótico. Somente *L. plantarum* (C0) foi sensível a todos os antimicrobianos testados, as outras amostras foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. *L. plantarum* (E5) apresentou a mais elevada frequência de resistência a antimicrobianos (60%). Seis amostras foram tolerantes ao suco gástrico artificial, com destaque para *L. brevis* A6, que apresentou crescimento. Na avaliação de resistência aos sais biliares, *L. brevis* A6, *L. casei* B5 e *L. plantarum* E5 foram consideradas tolerantes, tendo a última apresentado o menor índice de inibição, com 20,69%. Apenas *L. brevis* (E35) produziu peróxido de hidrogênio. Foi observada diferença ($p \leq 0,05$) entre as médias dos halos de inibição de *Lactobacillus* spp. contra duas bactérias reveladoras: *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 e *Lactobacillus plantarum* C24. Todas as amostras de *Lactobacillus* spp. inibiram *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* var. Typhimurium ATCC 14028 e *Shigella flexneri* ATCC 25875 no teste de co-cultivo ($p \leq 0,0001$), exceto *L. plantarum* (C0) que não inibiu *S. flexneri* ATCC 25875. Conclui-se que há elevada frequência de *Lactobacillus* spp. entre as BAL presentes no queijo Minas artesanal produzido na região de Araxá. A maioria delas demonstrou potencial probiótico *in vitro*. *L. brevis* (A6) foi selecionada para testes a fim de pesquisar seu potencial probiótico *in vivo* e utilização para a produção de queijos como micro-organismo benéfico e preservando a identidade do produto.

Palavras chave: *Lactobacillus* spp., queijo artesanal, micro-organismos benéficos, antibiograma, resistência ao suco gástrico e sais biliares, antagonismo

ABSTRACT

Minas artisanal cheese is made from raw milk added by endogenous starter cultures. During its ripening process, the growth and metabolic activities of lactic acid bacteria (LAB) are important to produce typical flavor and improve cheese safety. Probiotic properties of such LAB against pathogens have been demonstrated. However, few studies describe the microbiota and probiotic potential of LAB isolated from that cheese. This study aimed to molecularly identify LAB present in 84 samples of Minas artisanal cheese produced in Araxá region throughout ripening either at dry or at rainy seasons and evaluate their *in vitro* probiotic potential. A total of 263 samples of LAB were isolated and 50 of them were identified by the 16S rRNA gene sequencing. The following genus were identified: *Lactobacillus* (74%), *Enterococcus* (24%) e *Bacillus* (2%). From them, ten *Lactobacillus* samples were selected to be tested by *in vitro* probiotic potential. Only *L. plantarum* (C0) was sensitive to all tested antimicrobials. The other samples were resistant to at least one drug. *L. plantarum* (E5) showed the higher resistance index (60%). Six *Lactobacillus* samples were resistant to artificial gastric juice, especially *L. brevis* A6 which showed growth in that medium. *L. brevis* A6, *L. casei* B5 and *L. plantarum* E5 were resistant to bile salts, and the latter showed the lower index of inhibition (20.69%) Only *L. brevis* (E35) produced hydrogen peroxide. Mean inhibition haloes of *Lactobacillus* spp. against *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 and *L. plantarum* C24 were considered different ($p \leq 0.05$). All *Lactobacillus* spp. samples were able to antagonize the revealed bacteria in the spot-on-the-lawn test. All *Lactobacillus* spp. samples inhibited pathogens (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 and *Shigella flexneri* ATCC25875) in co-culture test ($p \leq 0.0001$), except *L. plantarum* (C0) which did not inhibited *S. flexneri*. Indeed, there is a high frequency of *Lactobacillus* spp. among the LAB present in Minas artisanal produced in Araxá region. The majority of them showed *in vitro* probiotic potential. *L. brevis* (A6) would be selected to be tested for searching its *in vivo* probiotic potential and use for cheesemaking as a beneficial microorganism, preserving cheese identity.

Key words: *Lactobacillus*, artisanal cheese, beneficial microorganisms, antibiogram, resistance to gastric juice, antagonism

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que a produção de queijos tenha sido iniciada a partir da domesticação dos animais e do aproveitamento de seus produtos (IPHAN, 2006). Atualmente, existem mais de mil tipos de queijos sendo este, o derivado lácteo de maior produção mundial, com perspectivas de comércio superior a 83,3 milhões de toneladas (FAO, 2009; DELAMARE et al., 2012; FAO, 2014).

No Brasil, a técnica de produção do queijo foi introduzida pelos colonizadores portugueses, com um modo de fabricação tipicamente artesanal (MINAS GERAIS, 2014). No decorrer da história do país, o queijo consolidou-se como um produto bastante apreciado pela população sendo produzido e/ou comercializado em praticamente todo território nacional.

Um exemplo disso é que cada região geográfica brasileira possui, pelo menos, um tipo de queijo artesanal. No Norte há produção do queijo Marajó; no Centro-Oeste, do queijo caipira; no Sul, do queijo serrano; no Nordeste, dos queijos de manteiga e coalho e no Sudeste, do queijo Minas artesanal (NOBREGA, 2012).

O queijo Minas artesanal é um dos mais antigos e tradicionais queijos produzidos no Brasil, sendo responsável pela geração de renda para um grande número de pequenos produtores rurais. A produção centenária é caracterizada pela utilização de leite cru e adição do fermento endógeno, conhecido popularmente com “pingo”, além do processo de maturação, que é realizado em propriedades rurais, cuja grande maioria tem como base à agricultura familiar (DORES e FERREIRA, 2012).

Além da não utilização de tratamentos térmicos, os queijos artesanais são produzidos sem o emprego de cultivos iniciadores comerciais, sendo os processos de acidificação e fermentação decorrentes do metabolismo de bactérias ácido lácticas (BAL) presentes no leite, no soro fermento e no ambiente das queijarias. Esses micro-organismos conferem ao produto características peculiares de sabor, aroma, textura, entre outros atributos sensoriais (COGAN et al., 1997; THOMÉ DA CRUZ e MENASCHE, 2009). Além disso, BAL têm demonstrado potenciais propriedades probióticas, como ação antagonista contra micro-organismos patogênicos (COSTA et al., 2013; ANDRADE et al., 2014).

Segundo definição da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um efeito benéfico à saúde do hospedeiro (FAO, 2002). O mercado dos produtos com apelo probiótico encontra-se em plena expansão, com isso a indústria alimentícia tem buscado desenvolver novos produtos para atender um consumidor que busca uma alimentação prática, sem a necessidade de preparações elaboradas que demandem tempo, e ao mesmo tempo saudáveis.

Nesse contexto, há um grande potencial tecnológico para a utilização de BAL isoladas a partir de produtos lácteos artesanais. Fato que tem resultado no interesse crescente por estudos que identifiquem a microbiota láctica, caracterizem as potenciais propriedades probióticas desses micro-organismos, bem como seu eventual uso na elaboração de novos produtos.

Como o estado de Minas Gerais é o maior produtor de queijo do Brasil e grande parte dessa produção é de queijo Minas artesanal, há interesse pela identificação da microbiota láctica bem como de suas possíveis propriedades probióticas. Das sete regiões oficialmente reconhecidas pelo estado como produtoras (Araxá, Canastra, Cerrado, Campo das Vertentes, Serro, Serra do Salitre e Triângulo) já foram identificadas BAL com propriedades probióticas *in vitro* nas regiões de Campo das Vertentes e Serra da Canastra (COSTA et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; SANT'ANNA, 2015). Na literatura consultada, não foram encontrados estudos que tenham identificado BAL com tais propriedades em queijo Minas artesanal produzido na região de Araxá. Sendo necessárias pesquisas que identifiquem a microbiota láctica presente no queijo elaborado nessa região, bem como avaliem possíveis propriedades probióticas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Identificar e avaliar o potencial probiótico *in vitro* de bactérias ácido lácticas (BAL) presentes em queijos Minas artesanais produzidos na região de Araxá

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Identificar molecularmente BAL presentes em queijos Minas artesanais produzidos na região de Araxá.
- ✓ Determinar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *Lactobacillus* spp. presentes em queijos Minas artesanais produzidos na região de Araxá.
- ✓ Avaliar a resistência ao suco gástrico e aos sais biliares de *Lactobacillus* spp. presentes em queijos Minas artesanais produzidos na região de Araxá.
- ✓ Avaliar a produção de peróxido de hidrogênio de *Lactobacillus* spp. presentes em queijos Minas artesanais produzidos na região de Araxá.
- ✓ Avaliar a atividade antagonista de *Lactobacillus* spp. presentes em queijos Minas artesanais produzidos na região de Araxá.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Queijo

O queijo é considerado um dos alimentos mais antigos que se tem registro na história da humanidade. Estima-se que a sua produção tenha sido iniciada há, aproximadamente, 10.000 a.C. (antes de Cristo) na região onde atualmente localiza-se o Iraque. Segundo os dados históricos, o queijo teria surgido a partir de uma combinação ao acaso de temperatura ideal, presença de bactérias ácido lácticas (BAL) e enzimas presentes no estômago de ruminantes, onde o leite foi acondicionado (IPHAN, 2006).

Há relatos de consumo de leite solidificado datando de 7.000 anos a.C. e achados arqueológicos revelam a existência de queijos feitos a partir de leite de vaca e de cabra 6.000 anos a.C. Murais em tumbas egípcias mostram cenas de fabricação de queijo no antigo Egito e a Bíblia cita este produto em mais de uma passagem do velho testamento. Ainda, nos escritos de Aristóteles, há referência a queijos feitos de leite de égua e jumenta (PERRY, 2004).

A partir do Império Romano, a produção de queijos foi aperfeiçoada, alcançando um alto padrão. Nessa época, a técnica de maturação já havia sido desenvolvida e as casas possuíam um espaço próprio para a fabricação e a maturação dos queijos. Estes eram servidos tanto à nobreza, quanto aos soldados das Legiões Romanas. A partir desses estados feudais e dos mosteiros, de onde os conhecimentos adquiridos eram passados para as gerações sucessoras, a produção de queijos foi realmente estabelecida (PAULA et al., 2009). Tal produção caracteriza-se, até hoje, como um processo de concentração do leite, no qual parte dos componentes sólidos, principalmente proteína e gordura, são concentrados na coalhada, enquanto as proteínas do soro, a lactose e os sólidos solúveis são removidos no soro.

Porém, naquela época, as comunidades eram essencialmente auto-suficientes e conseqüentemente, ocorriam poucas viagens e troca de informações entre elas. Isso explica o fato da existência de centenas de variedades de queijos com características bem definidas, obtidos da mesma matéria-prima. A maioria dessas variedades surgiu de forma casual, devido à determinada circunstância local (composição do leite, microbiota endógena, espécie e raça do animal) ou por causa de um único evento acontecido durante a tentativa de produção ou estocagem do queijo (crescimento de mofos ou outros micro-organismos). Presumidamente, os eventos que provocaram tais mudanças desejadas na qualidade do queijo foram incorporados aos fluxogramas de fabricação que vêm sofrendo adaptações evolutivas ao longo dos anos (FOX et al., 2000).

Atualmente, estima-se que existam em torno de mil variedades de queijo e que 30% da produção mundial de leite destina-se à sua elaboração. Os queijos holandeses, suíços, de massa filada, Cheddar e Parmesão representam mais de 80% da produção mundial (PAULA et al., 2009). Dentro desse contexto, também há destaque para os queijos considerados artesanais.

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ), queijo é definido como o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, enzimas específicas de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (MAPA, 1996).

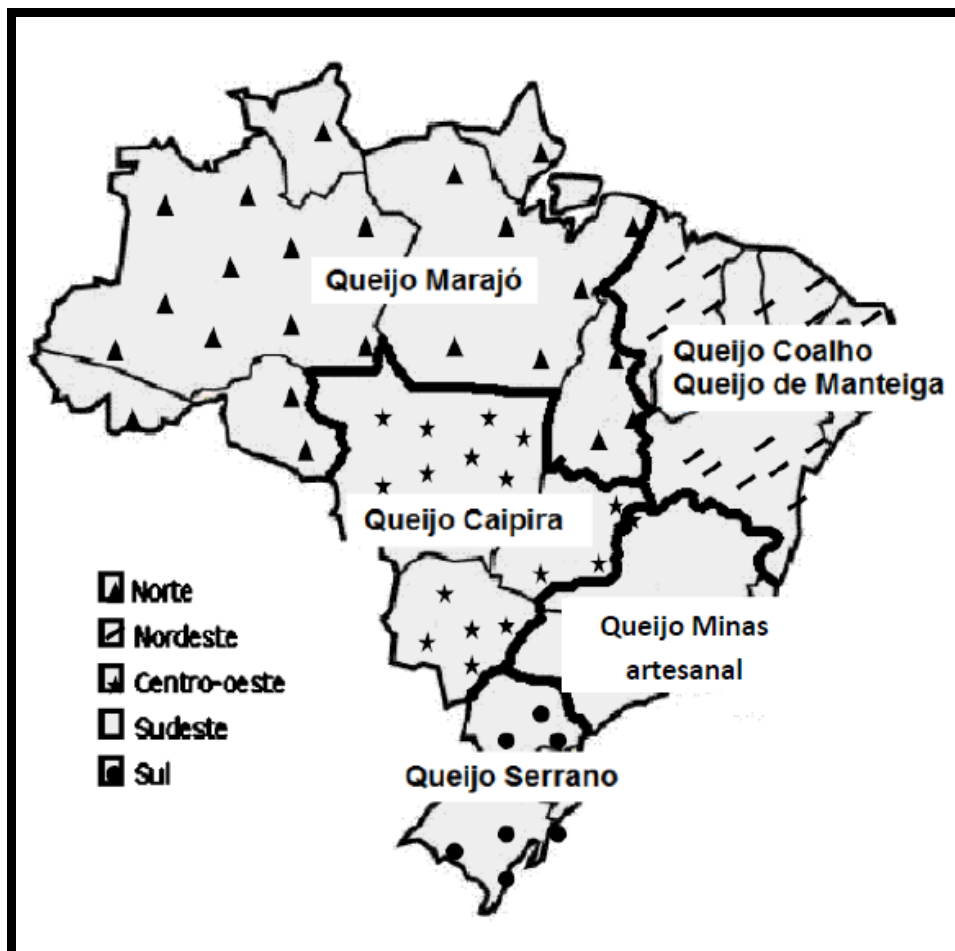
A denominação de artesanal é conferida em virtude do modo de produção dos queijos, seguindo técnicas tradicionais de elaboração que são repassadas ao longo de gerações entre famílias e comunidades. Utilizando, na maioria dos casos, leite cru e sem o emprego de cultivos iniciadores comerciais (COGAN et al., 1997; THOMÉ DA CRUZ e MENASCHE, 2009). Só no Brasil estima-se que 40% do volume total de queijos produzidos no país seja de produtos artesanais, com destaque para o queijo Minas artesanal que possui o maior volume de produção no país (SEBRAE, 2008).

3.2. Queijos artesanais no Brasil

No Brasil, a técnica de elaboração do queijo foi introduzida pelos colonizadores portugueses, logo nos primeiros anos da Colônia. Em 1534, Martim Afonso de Souza importou os primeiros bovinos, trazidos das Ilhas da Madeira e das Canárias. A criação desses animais no Brasil foi iniciada por Duarte Coelho, em Pernambuco. O leite proveniente do gado bovino trazido ao Brasil, além de alimento, foi utilizado para a produção do queijo tipicamente artesanal, porém há divergências se o modo de elaboração teve como base o do queijo da Serra da Estrela ou dos Açores (MINAS GERAIS, 2014).

Estima-se que o início da produção de queijos no Brasil tenha ocorrido em 1552, numa granja leiteira instalada no colégio jesuíta em São Salvador, Bahia (DIAS, 2010). Porém, somente em 1790 é que são datados os primeiros registros do comércio de carne seca, manteiga e queijos em certas regiões do país, como no Sudeste. A elaboração de queijo era realizada de forma rudimentar e em escala doméstica até meados do século XIX, quando algumas fazendas de Minas Gerais, situadas às margens do caminho para a capital do império, produziam queijo elaborado de modo simples, com pouca maturação e que teve boa aceitação no mercado do Rio de Janeiro. Esse produto ficou conhecido como “O queijo de Minas” (LEANDRO, 1987).

Com o passar da história do país, a produção de queijos artesanais foi difundida por todo o território nacional. Sendo produzido em cada região do país, pelo menos um tipo de queijo artesanal (Figura 1) (NOBREGA, 2012).



Adaptado de Nobrega (2012)

Figura 1. Distribuição dos queijos artesanais brasileiros, por região de origem

Cerca de 25% das mais de 32.000 toneladas de leite produzidas no Brasil em 2013, foram destinadas a elaboração de queijos. Desse total, 40% foi representada por queijos artesanais, o que demonstra a importância desses produtos para a economia nacional, a geração de emprego e renda e a fixação do homem no campo (SEBRAE, 2008; USDA, 2013).

A produção de queijos artesanais possui um importante papel econômico e social, pois é essencial para a subsistência de populações agrícolas pelo seu consumo e/ou comercialização, sendo, em alguns casos, a única fonte de renda para famílias inteiras. Estes queijos têm seu histórico de produção correlacionado com a vida dos produtores, que dizem ter apreendido o modo de elaboração com seus antecedentes (THOMÉ DA CRUZ & MENASCHE, 2009).

3.2.1. Queijo Minas Artesanal

Os números da cadeia produtiva do leite em Minas Gerais são bastante representativos. O estado é o maior produtor de leite do Brasil. Em 2013, foi responsável por 27,2% da produção nacional que, em números absolutos, corresponde a 9,3 bilhões de litros. Minas Gerais também é

considerado o maior produtor de queijo. Das 499 mil toneladas elaboradas em 2004, 200 mil saíram das queijarias mineiras. Além disso, metade da produção nacional de queijos é consumida no estado (PERRY, 2004; ABIQ, 2006; IBGE, 2013). Esses números demonstram a vocação histórica do estado pela pecuária leiteira.

3.2.1.1. Histórico

Segundo relatos históricos, a produção de queijo artesanal em Minas Gerais teve início no século XVIII a partir da busca pelo ouro no Brasil central. Os exploradores que se dirigiam a essa região do país levaram consigo a técnica de elaboração do queijo, baseada naquela utilizada para o queijo da Serra da Estrela. O queijo de Minas, como assim ficou conhecido o produto, era elaborado a partir de leite cru e encontrou nas condições serranas do estado um ambiente ideal que, somado a outros fatores, conferiram ao produto características peculiares, porém apenas o excedente do leite era destinado à elaboração do queijo (MARTINS, 2006).

Apenas no final do século XIX que surgiu a ideia de montar no Brasil a primeira indústria de queijos da América latina. Esta foi instalada em 1889 no município de Santos Dumont, zona da mata mineira, com a produção de um queijo adaptado do queijo do Edam, chamado de queijo reino (FURTADO, 2008).

Com a decadência da mineração, o queijo de Minas foi consolidado na economia do estado e seu modo de elaboração repassado ao longo de gerações, transformando-o numa herança cultural, gastronômica e econômica do estado (NOBREGA, 2012). Atualmente, o mercado de queijo Minas artesanal movimenta em torno de dez milhões de reais ao mês, empregando cerca de 30 mil famílias de pequenos produtores rurais em algumas regiões do estado (PERRY, 2004).

Segundo o Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN), o queijo Minas é, atualmente, uma das maiores expressões da chamada “mineiridade”, pois seu modo de produção vem sendo passado de geração a geração, fato que garantiu ao longo dos séculos a sustentabilidade das famílias. Essa foi uma das justificativas utilizadas para o registro do modo artesanal de elaboração do “Queijo de Minas” como patrimônio imaterial brasileiro (IPHAN, 2008).

3.2.1.2. Aspectos legais da produção e comercialização do queijo Minas artesanal

No processo de elaboração do queijo Minas artesanal, assim como de tantos outros queijos artesanais, é utilizado leite cru. Isto gera uma série de implicações legais e sanitárias, devido ao risco de veiculação de patógenos pelo consumo do alimento, caso esteja contaminado.

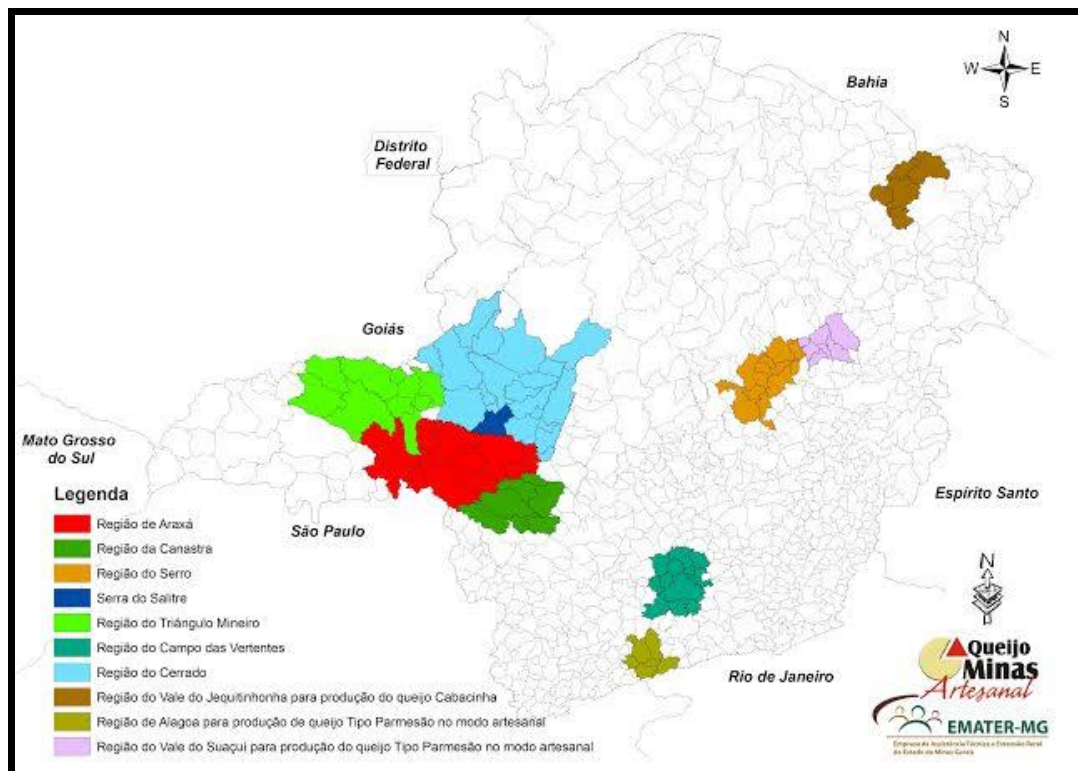
Em 1996, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), por intermédio da Portaria nº146, estabeleceu a pasteurização como tratamento térmico obrigatório a ser submetido o leite destinado a fabricação de queijos. Exceto o leite higienizado que se destine à elaboração dos queijos submetidos a um processo de maturação a uma temperatura superior aos 5° C, durante um tempo não inferior a 60 dias (MAPA, 1996).

Porém, essa determinação não pode ser seguida pelos produtores de queijos artesanais, em virtude do modo tradicional de elaboração desses produtos, que não inclui pasteurização, bem como a realização da maturação do produto, pois quando esta etapa é realizada não perdura por 60 dias ou mais. Com o impasse, estados com tradição na elaboração de queijos artesanais, como Minas Gerais e Pernambuco, criaram legislações próprias que, dentre outras premissas, permitiram a elaboração de queijo a partir de leite cru (PERNAMBUCO, 2007; MINAS GERAIS, 2012).

No ano 2000, o MAPA publicou a Resolução nº 07, que definiu o queijo Minas artesanal produzido com leite cru como algo excepcional, sendo permitida sua comercialização para o consumo após 60 dias de cura ou maturação em entreposto de laticínios registrado no Sistema de Inspeção Federal (SIF) (MAPA, 2001). Tal resolução gerou uma discussão entre os produtores e o MAPA, pois caso fosse seguido o período de maturação estabelecido o produto apresentaria modificações em propriedades organolépticas, como sabor e textura. Essas modificações poderiam, inicialmente, resultar em rejeição dos consumidores.

Com isso, o MAPA publicou a Instrução Normativa nº57/2011 que, dentre outras medidas, permitiu que os queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 dias, desde que estudos técnico-científicos comprovem que a redução do período de maturação não compromete a qualidade e a inocuidade do produto (MAPA, 2011a). Em 2013, o MAPA publicou uma nova Instrução Normativa permitindo que o novo período de maturação dos queijos artesanais seja estabelecido, após a avaliação dos estudos, pelo órgão estadual e/ou municipal de inspeção industrial e sanitária reconhecidos pelo Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SISBI/POA), anteriormente apenas o MAPA possuía esta prerrogativa (MAPA, 2013).

Como mencionado anteriormente, o estado de Minas Gerais dispõe de legislação própria sobre a produção e comercialização dos queijos artesanais. Tal legislação confere ao Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) a responsabilidade pelo estabelecimento de diretrizes para a produção de queijo Minas artesanal. Atualmente, são reconhecidas, pelo IMA, sete regiões produtoras de queijo Minas artesanal: Araxá, Canastra, Cerrado, Campo das Vertentes, Serro, Serra do Salitre e Triângulo (figura 2) (EMATER, 2009; IMA, 2009, 2014a, 2014b, 2014c). Cada uma delas produz queijos de sabor, textura e formato peculiares, resultado de características distintas de clima, solo, temperatura, pastagens, genética do gado, origem do coalho, soro fermento e técnicas particulares de produção dos queijos.



Fonte: EMATER (2015)

Figura 2. Mapa das regiões reconhecidas, pelo IMA, como produtoras de queijo Minas artesanal

Além do reconhecimento como região produtora, cabe ao IMA estabelecer o período mínimo de maturação do queijo Minas artesanal em cada região. Na Portaria nº1305, de abril de 2013, o órgão estabelece o período mínimo de 17 dias para a microrregião do Serro e de 22 dias para as microrregiões da Canastra, do Cerrado, de Araxá e do Campo das Vertentes, até que sejam realizadas novas pesquisas confirmando ou retificando os referidos tempos de maturação (IMA, 2013).

Porém, o estudo realizado por Sales (2015), analisando queijos Minas artesanais de seis propriedades da região de Araxá, cadastradas no IMA, durante 60 dias de maturação nas épocas de seca e chuva, concluiu que o prazo de 14 dias seria o período mínimo de maturação para atender os parâmetros da legislação vigente. Tal estudo poderá ser utilizado para estabelecimento de um novo prazo legal de maturação do queijo elaborado na região supramencionada.

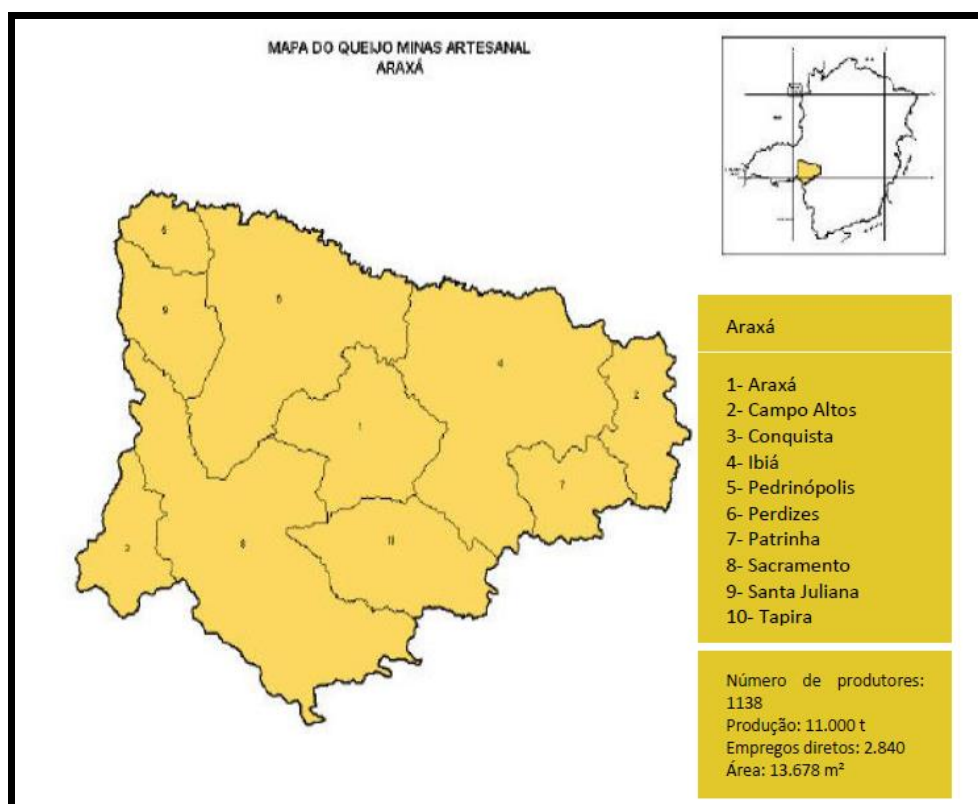
3.2.1.3. Microrregião de Araxá

Estima-se que a produção do queijo Minas artesanal da região de Araxá tenha sido iniciada no século XVIII, com a chegada dos primeiros moradores a região, atraídos pelo ouro. A instalação das primeiras fazendas também ocorreu no mesmo período, estimulada pela qualidade da água da região. (ARAUJO, 2004).

O queijo Minas artesanal produzido na região de Araxá seguiu os moldes do queijo São Jorge, produzido no arquipélago de Açores, território autônomo de Portugal. Entretanto, em Araxá, o

queijo adquiriu peculiaridades, em parte, devido a fatores edafoclimáticos (EMATER, 2003). E, apesar do tempo, a técnica de elaboração do queijo continua preservada tendo grande importância histórica e cultural para a região.

Atualmente, o queijo Minas artesanal da região de Araxá é elaborado nos municípios de Araxá, Campos Altos, Conquista, Ibiá, Pedrinópolis, Perdizes, Pratinha, Sacramento, Santa Juliana e Tapira, como observado na figura 3 (IMA, 2015). Estima-se que em toda região existam mais de seis mil criadores de bovinos e que 1338 se dediquem a produção de leite. De todo o leite obtido, 40% é destinado à elaboração de queijos, com uma produção anual de 11 mil toneladas, aproximadamente. Desse total, 70% são comercializados em São Paulo e 30% são divididos entre a demanda do comércio de quitandas, em especial para o pão de queijo (EMATER, 2003, ARAÚJO, 2014, SALES, 2015).



Adaptado de Araújo (2004)

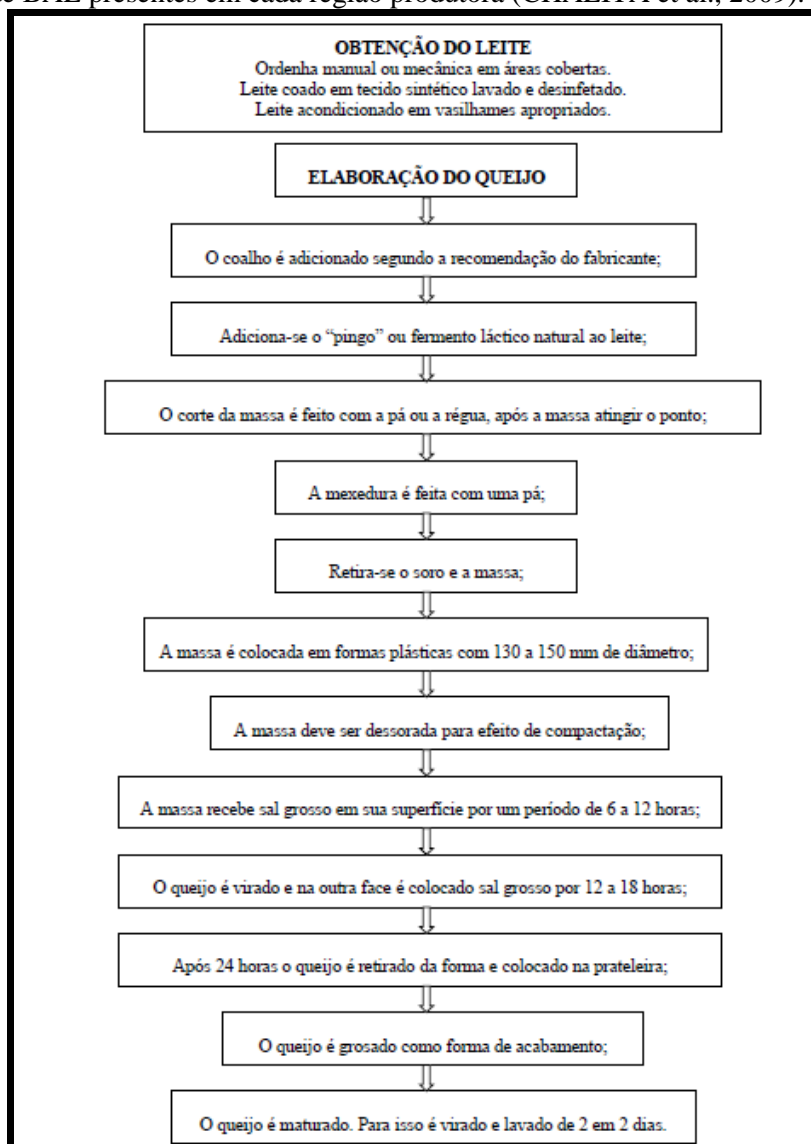
Figura 3. Mapa da microrregião produtora de queijo Minas artesanal de Araxá

Em toda região existem 27 produtores cadastrados no IMA, produzindo queijo conforme a legislação sanitária vigente. Também existe uma queijaria e um entreposto registrado no SISBI/POA, onde os queijos são submetidos à maturação exigida pela legislação e são comercializados nacionalmente (MINAS GERAIS, 2015).

O fluxograma de elaboração do queijo Minas artesanal da região de Araxá encontra-se na figura 4, onde é possível visualizar as etapas em que são adicionados seus ingredientes obrigatórios: o

leite cru de vaca, o fermento endógeno (também chamado de “pingo”), o coalho e o sal. Após elaboração, o queijo apresenta formato cilíndrico, diâmetro de 14-17 cm, altura de 4-7 cm e peso de 1,0-1,4 Kg. O queijo adquire textura compacta, coloração branca-creme homogênea, crosta fina sem trincas e sabor moderadamente ácido (ARAÚJO, 2014).

Um dos principais responsáveis pelas características peculiares do queijo Minas artesanal é o soro fermentado. Este fermento endógeno utilizado na preparação dos queijos consiste na fração de soro fermentado, originado do dessoramento de queijos produzidos no dia anterior, que é coletado e utilizado na elaboração de novos queijos (RESENDE, 2010). Essa prática permite que seja mantida a microbiota bacteriana da região, mantendo a característica do *terroir* e seu sabor único. O pingo é considerado a unidade identitária do produto por possuir, dentre outros, populações de BAL presentes em cada região produtora (CHALITA et al., 2009).



Fonte: EMATER (2003)

Figura 4. Fluxograma de elaboração do queijo Minas artesanal da região de Araxá.

3.3. Bactérias Ácido Láticas

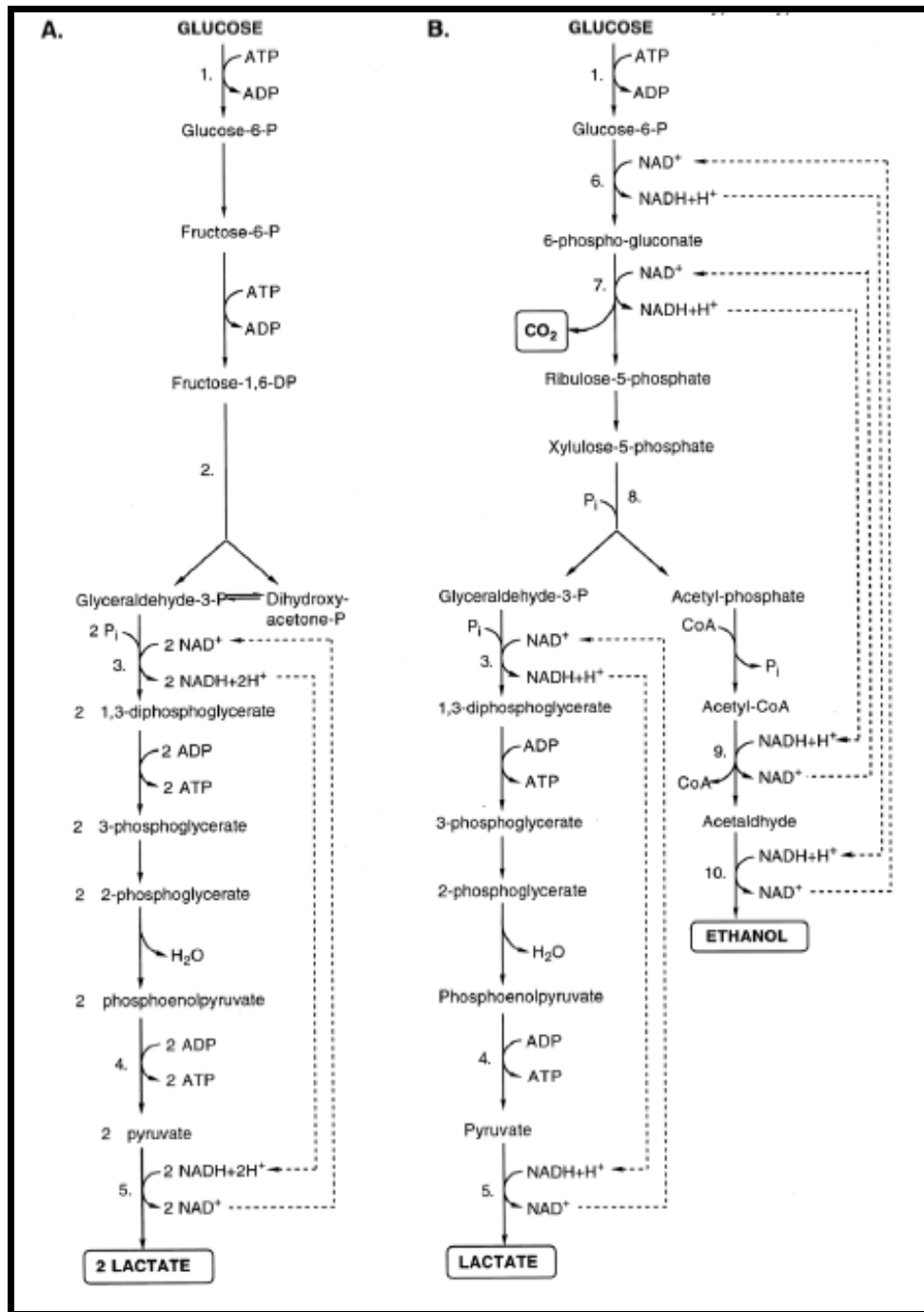
3.3.1. Características gerais

BAL constituem um grupo de bactérias Gram positivo que possuem características morfológicas, metabólicas e fisiológicas semelhantes. Tal grupo apresentam-se na forma de cocos, cocobacilo ou bacilos não formadores de esporos, tendo o ácido láctico como principal produto da fermentação dos carboidratos (HASSAN e FRANK, 2001; SALMINEN et al., 2004).

As BAL fazem parte da microbiota dos tratos gastrintestinal, respiratório superior e urogenital inferior de diferentes espécies animais, sendo naturalmente encontradas em *habitats* nutritivos, como vegetais, grãos, leite, carne e seus derivados (TANNOCK et al., 1999; RESENDE, 2011). O grupo é formado por treze gêneros bacterianos: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (LEISNER, 2000; JAY et al., 2005). Esses gêneros recebem a denominação de BAL devido ao principal produto de seu processo fermentativo, o ácido láctico.

3.3.2. Processo fermentativo das BAL

A produção do ácido láctico ocorre a partir da utilização da principal fonte de nutrientes dessas bactérias que geralmente são os carboidratos, como a glicose (IKEDA et al., 2013). As BAL tem enorme capacidade de degradar diferentes carboidratos, resultando predominantemente em ácido láctico. Estima-se que 50% de todo o carboidrato consumido por essas bactérias seja convertido nesse ácido. Essa conversão ocorre por duas vias metabólicas conhecidas como homo e heterofermentativas (Figura 5).



Fonte: Salminen et al. (2004)

Figura 5. Representação das vias homo (a) e heterofermentativas (b).

Na via homofementativa, também conhecida como Embden-Meyerhof-Parnas ou glicolítica, há produção quase que exclusiva de ácido láctico. Essa via é caracterizada pela formação da frutose-1-6-difosfato que é clivada, por uma aldeose, em di-hidroacetona fosfato (DHAP) e gliceraldeído-3-fosfato (GAP). Tanto o GAP quanto o DHAP (oriunda do GAP) são convertidos

em piruvato que, em condições normais (excesso de carboidratos e pouco oxigênio), é reduzido a ácido láctico. A via heterofermentativa, que também é conhecida como 6-fosfogluconato/fosfocetolase ou via das pentoses fosfatos, é caracterizada por uma desidrogenação inicial que resulta na formação de 6-fosfogluconato, seguida de uma descarboxilação. A pentose remanescente é clivada em GAP e acetil fosfato. O GAP é metabolizado resultando na formação de ácido láctico enquanto que o acetil é reduzido a etanol por intermédio de reduções de acetil-CoA e acetoaldeído. Nesse processo, ocorre produção de outras substâncias, como dióxido de carbono e ácido acético (SALMINEN et al., 2004; FUGELSANG e EDWARDS, 2007).

De acordo com o processo fermentativo desempenhado, essas bactérias são classificadas em homofermentativas obrigatórias, heterofermentativas facultativas e heterofermentativas obrigatórias. Dentro de um mesmo gênero, podem existir espécies com comportamento distintos, a exemplo de *Lactobacillus* spp., em que *L. acidophilus*, *L. casei* e *L. brevis* são homofermentativas obrigatórias, heterofermentativas facultativas e heterofermentativas obrigatórias, respectivamente (JAY, 2005).

Outra divisão do gênero é estabelecida quanto à atmosfera de crescimento. As BAL podem apresentar-se como aeróbias, microaerófilas ou anaeróbias facultativas necessitando, de acordo com a espécie, de aminoácidos, purinas, ácido fólico e ácido nicotínico, entre outros nutrientes (FUGELSANG & EDWARDS, 2007). As BAL também podem ser classificadas de acordo com a temperatura de crescimento, em mesófilas (26-41°C), tendo como representantes bactérias dos gêneros *Lactococcus* e *Leuconostoc* e termófilas (42°C), como *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus* spp (JAY, 2005).

3.3.3. Identificação

A identificação de BAL pode ser realizada mediante o crescimento em meios de cultura seletivos, com posterior identificação do gênero e/ou espécie utilizando técnicas bioquímicas, fisiológicas e moleculares ou exclusivamente utilizando métodos moleculares, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (EMBRAPA, 2009; RESENDE, 2011).

O método clássico de identificação das BAL é a microbiologia tradicional, na qual é necessário o isolamento bacteriano que é realizado por meio do cultivo microbiológico. Para isso, há uma série de meios de cultura disponíveis; porém, os mais utilizados são o ágar M17 e o ágar Rogosa acidificado ou o ágar MRS, para isolamento de bactérias com morfologia de cocos e bacilos, respectivamente (HASSAN e FRANK, 2001; CARVALHO, 2007). Após o isolamento, são realizadas provas bioquímicas e fisiológicas, como a coloração de Gram e a prova da catalase para identificação mais detalhada dos micro-organismos cultivados. Entretanto, Quere et al. (1997) relataram que a identificação exclusiva por meio de testes fisiológicos e bioquímicos apresenta limitações, pois algumas espécies de BAL são fenotipicamente relacionadas e, muitas vezes, esses testes não permitem a separação genética de subespécies, como no caso de *Lactococcus lactis*, que podem pertencer às subespécies *lactis* ou *cremoris*. Uma alternativa para realizar uma identificação com maior acurácia são as técnicas moleculares.

Com o advento da biologia molecular, diversos métodos, como a PCR, têm sido desenvolvidos para identificar e classificar de forma mais fidedigna os micro-organismos. Tais métodos podem

ser utilizados tanto para confirmar a identificação bioquímica e fisiológica quanto para identificação de amostras de micro-organismos coletadas diretamente do alimento, independentemente de cultivo.

Segundo Sant'anna (2015), as principais técnicas para identificação de BAL baseadas em métodos moleculares caracterizam-se pela amplificação e/ou sequenciamento de sequências altamente conservadas nos genes, tais como: amplificação da região intergênica espaçadora (ITS1) 16S-23S, amplificação utilizando sequências repetidas (GTG5), restrição enzimática da região ITS 16S-23S e sequenciamento do gene codificador do RNA ribossomal do gene 16S.

A amplificação do gene codificador do RNA ribossomal do gene 16S com posterior sequenciamento gênico é um método de identificação molecular de BAL realizado com sucesso. Neste caso são utilizados nucleotídeos de uma região conservada em diversos micro-organismos. Após amplificação, o produto da PCR é submetido a plataformas de sequenciamento que realizam a análise sequencial. Os resultados são comparados em bases de dados que são 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) (O'SULLIVAN, 2000; BEN AMOR et al., 2007; SANT'ANNA, 2015).

Entretanto, essa técnica apresenta algumas limitações como é o caso da identificação dos grupos de *Lactobacillus casei* e *L. plantarum*, em que o sequenciamento é utilizado como técnica de triagem. Isso ocorre devido à elevada similaridade filogenética (varia de 65 a mais de 99%) existente entre as espécies que constituem ambos os grupos. Além disso, o sequenciamento do gene 16S rDNA utiliza *primers* que tem por alvo as regiões terminais do gene que são universalmente conservadas, não considerando as diferenças gênicas existentes entre esses dois grupos (COLLINS et al., 1989; WARD e TIMMINS, 1999; TORRIANI et al., 2001).

Neste contexto, a PCR espécie-específica tem sido utilizada como técnica de identificação definitiva das espécies que constituem os dois grupos. Nesse tipo de PCR, uma pequena sequência de nucleotídeos, específica da espécie de interesse, é escolhida e utilizada como molde para o desenho de *primers* para identificação do micro-organismo. Na literatura existe uma ampla variedade de protocolos de PCR para identificação de BAL, como *E. faecalis*, *E. faecium*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *Streptococcus thermophilus* (LICK et al., 1996; BEIMFOHR et al., 1997; CHENG et al., 1997; LLEO et al., 1999; SONG et al., 2000; GUARNERI et al., 2001; ARASU et al., 2015).

No caso do grupo *Lactobacillus casei*, formado pelas espécies *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*, a diferenciação entre as espécies ocorre pela amplificação da região VI do gene 16S rRNA, resultando em produtos com diferentes pares de bases para cada espécie (KLIJN et al., 1991; WARD e TIMMINS, 1999). Para o grupo *Lactobacillus plantarum*, formado pelas espécies *L. plantarum*, *L. pentosus* e *L. paraplantarum*, a identificação de cada espécie pode ser realizada pela amplificação do gene *recA*, que é utilizado como marcador de relações filogenéticas e encontra-se bem conservado no genoma bacteriano. Assim como no grupo *L. casei*, após a amplificação, são visualizados produtos com diferentes tamanhos de pares de bases para cada espécie (EISEN, 1995; TORRIANI et al., 2001).

Segundo Ventura e Zink (2002), também podem ser utilizadas técnicas baseadas em restrições enzimáticas como: DNA polimórfico randomicamente amplificado (RAPD), fragmento

randômico polimórfico amplificado (RFLP) e comprimento polimórfico amplificado (AFLP), que são ferramentas rápidas e confiáveis para realizar o *fingerprinting* molecular, tendo como objetivo identificar e distinguir várias espécies de BAL seja de origem clínica, fecal, intestinal ou de alimentos. No ultimo caso, a aplicação da restrição enzimática permite a seleção, identificação, caracterização e rastreamento de BAL presentes em vários produtos alimentícios, a exemplo dos queijos artesanais (SANT'ANNA, 2015).

3.3.4. Biodiversidade em queijos artesanais

Nos queijos artesanais que geralmente são produzidos a partir de leite cru e não recebem culturas iniciadoras comerciais, as BAL, existentes no soro fermento, são responsáveis por todo o processo fermentativo do produto (COGAN et al., 1997). Essas BAL desempenham duas funções principais: a de culturas iniciadoras, por meio da fermentação da glicose e consequente produção de ácidos orgânicos, como o ácido láctico; e como culturas adjuntas que são responsáveis pelo processo de maturação (BERESFORD et al., 2001; SETTANI e MOSCHETTI, 2010). Tais bactérias são imprescindíveis, para o desenvolvimento de características peculiares do produto, como sabor e aroma (CARR et al., 2002; BRASIL, 2009). Com isso, diversos estudos, apresentados a seguir, vêm sendo realizados em várias regiões do mundo com o intuito de identificar a microbiota láctica presente em queijos artesanais.

Cogan et al. (1997) realizaram um dos estudos mais amplos para caracterização da microbiota láctica presente em derivados lácteos artesanais, tendo identificado, a partir de provas bioquímicas, 4379 amostras de BAL em 35 produtos, sendo 24 queijos produzidos na Espanha, França, Grécia, Irlanda, Itália e Portugal. No caso específico dos queijos, as BAL identificadas foram *Lactococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus* mesofílicos, *Leuconostoc* spp. e *Lactobacillus* termofílicos. Segundo os autores, os queijos utilizados no estudo eram recém-elaborados e não tinham sido submetidos a um longo processo de maturação, tendo como população dominante as bactérias responsáveis pela produção de ácido.

Na Espanha, o queijo Manchego é considerado o queijo artesanal mais popular do país, sendo produzido com leite cru ou pasteurizado. Ballesteros et al. (2006) identificaram BAL neste tipo de queijo por meio de provas bioquímicas. Bactérias do gênero *Lactobacillus* foram identificadas com maior frequência (30%) com destaque para a espécie *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, identificada em 20% das amostras. Também foram identificadas BAL dos gêneros *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*. Segundo os autores, a heterogeneidade da microbiota existente no produto é determinante para o desenvolvimento de características organolépticas particulares, como sabor e textura.

Kongo et al. (2007) estudaram a microbiota láctica presente no queijo São Jorge, um típico produto artesanal do arquipélago de Açores, território autónomo de Portugal. Os gêneros de BAL identificados, por métodos bioquímicos e ribotipagem, foram *Lactobacillus* (41%), *Enterococcus* (40%), *Leuconostoc* (16%), *Pediococcus* (5%) e *Lactococcus* (4%). Dentre as espécies, *Lactobacillus paracasei* apresentou maior frequência de identificação, 27% das amostras de micro-organismos isolados. Os autores sugeriram que a presença dessas BAL está relacionada com a acidificação e o aroma desenvolvidos nesse queijo.

Ainda na Europa, Grana Padano e Parmigiano Reggiano são tradicionais queijos italianos. Belletti et al. (2009) isolaram 141 amostras de *Lactobacillus* spp. desses queijos no período de 1980 a 2008. *Lactobacillus rhamnosus* (60,28%), *Lactobacillus helveticus* (24,82%), *Lactobacillus delbrueckii* spp. *lactis* (7,09%) e *Lactobacillus casei* (7,8%) foram as espécies identificadas. Segundo os autores, as espécies *L. delbrueckii* spp. *lactis* e *L. helveticus* são culturas *starter* responsáveis pelo início do processo de fermentação do queijo. Enquanto que, *L. casei* e *L. rhamnosus* são culturas não *starter* que auxiliam no processo de maturação do produto.

Comlek Peyniri é um queijo tradicional e muito comum na região da Anatólia Central, Turquia. Bulut et al. (2005) realizaram a identificação de 107 amostras de BAL, por meio de provas bioquímicas e PCR-RFLP. No total, 50,47% das amostras eram *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*; 19,63% *Enterococcus faecium*; 14,02% *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*; 9,35% *Enterococcus* spp.; 2,8% *Enterococcus faecalis*; 1,87% *Enterococcus durans* e 1,87% *Lactobacillus casei*. Para os autores, os resultados obtidos demonstraram a variedade existente na microbiota láctica do produto.

No Marrocos, o queijo branco é um produto secular, bastante apreciado e produzido no país. A biodiversidade de BAL presentes neste tipo de queijo, produzido em oito regiões daquele país, foi estudada por Ouadghiri et al. (2005). Um total de 16 espécies foram identificadas, por provas bioquímicas e moleculares, nas 157 amostras de BAL (quadro 1). Segundo os autores, a ampla microbiota láctica presente nesse queijo pode estar relacionada com as diferentes regiões em que o mesmo é produzido.

Gênero	Espécie	% de isolamento
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	22,2
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4,5
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	3,2
	<i>Lactobacillus brevis</i>	2,6
	<i>Lactobacillus buchneri</i>	0,6
<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	26,1
	<i>Lactococcus garvieae</i>	0,6
	<i>Lactococcus raffinolactis</i>	0,6
<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	13,3
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	10,2
	<i>Leuconostoc citreum</i>	2,6
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus durans</i>	5,1
	<i>Enterococcus faecalis</i>	1,9
	<i>Enterococcus saccharominimus</i>	1,2
	<i>Enterococcus faecium</i>	0,6
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus</i> sp.	1,2
Sem identificação	-	1,2

Fonte: Ouadghiri et al. (2005)

Quadro 1. Gêneros, espécies e porcentagem de isolamento de BAL em queijo branco marroquino.

No Brasil, onde também há tradição na elaboração de queijos artesanais, estudos têm identificado a biodiversidade da microbiota láctica presente nesses produtos.

O queijo de coalho é o derivado lácteo de maior produção e consumo na região Nordeste do país. Carvalho (2007) identificou, utilizando provas bioquímicas, 643 amostras de BAL isoladas de queijo de coalho comercializado no estado do Ceará. Micro-organismos pertencentes aos gêneros *Enterococcus* (59,6%), *Lactobacillus* (22%), *Streptococcus* (12,8%), *Lactococcus* (1,7%) e *Leuconostoc* (0,6%) foram identificados. De acordo com o autor, a variedade de gêneros identificados retrata a diversidade da microbiota láctica dos queijos analisados.

O queijo serrano, produto artesanal típico da Região Sul do Brasil, assim como diversos outros produtos artesanais, possui alta aceitação no mercado, tendo importante papel social para a subsistência de pequenos produtores. Delamare et al. (2012) identificaram a microbiota láctica presente em 20 amostras de queijo Serrano comercializadas no estado do Rio Grande do Sul. Foram identificadas, por análises bioquímicas e moleculares, 278 amostras de BAL. Destas, 57,7% eram *Lactobacillus plantarum*, 19,2% *L. paracasei*, 7,7% *L. rhamnosus*, 7,7% *L. acidophilus*, e 3,8% *L. curvatus* e *L. fermentum*. Os autores relatam que em algumas amostras de queijo foram identificadas populações mistas de *L. plantarum* e *L. paracasei* que podem contribuir positivamente para as características sensoriais do produto, como o desenvolvimento do sabor.

Resende et al. (2011), utilizando PCR ARDRA 16S-23S rDNA, identificaram as populações de 158 amostras de BAL presentes em amostras de queijo Minas artesanal elaborado na região da Serra da Canastra, Minas Gerais. *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* foram as principais espécies identificadas, além de *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp. e outras espécies de *Lactobacillus* (quadro 2).

Gênero	Espécie	% de isolamento
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	13
	<i>Lactobacillus casei</i>	11,4
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	11
	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	2,5
	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	0,7
<i>Weissella</i>	<i>Weissella paramesenteroides</i>	0,7
<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus</i> spp	34,2
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus</i> spp.	21,5
Sem identificação	-	1,3

Fonte: Resende et al. (2011)

Quadro 2. Gênero, espécies e porcentagem de isolamento de BAL em queijo Minas artesanal da Serra da Canastra.

A Serra do Salitre é outra região com tradição da elaboração do queijo Minas artesanal. Lima et al. (2009) identificaram a microbiota de BAL presente em leite, soro fermento, coágulo formado após a ação do agente coagulante e queijo frescal, provenientes de dez fazendas daquela região, por meio de provas bioquímicas. As espécies de bactérias lácticas mais frequentes foram *Lactococcus lactis*, *Enterococcus* spp., *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus agalactiae*. Os autores concluíram que a caracterização das culturas lácticas, presentes nos queijos produzidos de maneira artesanal, pode possibilitar a seleção de culturas para iniciar o processo de elaboração desses produtos artesanais.

Castro (2015) identificou, por meio de PCR e sequenciamento da região 16S do rDNA, as BAL presentes em 21 amostras de queijo Minas artesanal elaborado na região de Campos das Vertentes, estado de Minas Gerais. Foram identificadas as espécies *Enterococcus faecalis* (42,86%), *Lactococcus lactis* (28,57%), *Lactobacillus plantarum* (14,28%), *Enterococcus faecium* (4,76%), *Lactobacillus rhamnosus* (4,76%), *Lactococcus garvieae* (4,76%). De acordo com o autor, a identificação em grande proporção de *E. faecalis* não é desejável, pois indicar práticas inadequadas de higiene durante o processamento do produto.

Os resultados dos trabalhos citados, demonstram a ampla biodiversidade de BAL presente em queijos artesanais. Indicam que, nesses queijos, a microbiota lática interfere diretamente nas características sensoriais dos produtos, fazendo com que cada um apresente características únicas. Também é possível observar que dentre os gêneros que constituem o grupo das BAL, aqueles que apresentam maior frequência de isolamento em queijos artesanais são *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp. e *Lactobacillus* spp. Este último foi identificado em todos os trabalhos da literatura consultada, com exceção do trabalho de Lima et al. (2009), indicando que esse gênero bacteriano está presente no ambiente de ordenha, elaboração e maturação dos queijos nas mais diversas partes do mundo.

3.3.5. *Lactobacillus* spp.

Lactobacillus spp. são classificados taxonomicamente como micro-organismos procariotos, do gênero *Lactobacillus*, filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales* e família *Lactobacillaceae*, agrupados na mesma família que *Paralactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp. (GARRITY et al., 2004). As bactérias desse gênero são caracterizadas como, Gram positivo, microaerófilas, não formadoras de esporos, com morfologia variável de pequenos bastonetes a cocobacilos e, geralmente, catalase negativo. (FUGELSANG e EDWARDS, 2007).

O primeiro isolamento de *Lactobacillus* spp. foi realizado em 1900, a partir de fezes de lactentes amamentados com leite materno, sendo denominado de *Bacillus acidophilus*, uma denominação genérica de lactobacilos intestinais (BADARÓ et al., 2008). Atualmente, o gênero possui mais de 100 espécies que são classificadas em três grupos, com base no modo de fermentação dos carboidratos. O grupo I é formado pelas espécies homofermentativas obrigatórias que fermentam carboidratos (hexoses) para obtenção de ácido láctico. No segundo, estão os lactobacilos heterofermentativos facultativos, que fermentam carboidratos para obtenção de ácido láctico, CO₂, etanol e H₂O₂. No grupo III estão às espécies heterofermentativas obrigatórias que utilizam, obrigatoriamente, hexoses e pentoses como fonte de carbono (LAHTINEN et al., 2012). No quadro três estão exemplificadas algumas espécies pertencentes aos três grupos.

Homofermentativos Obrigatórios	Heterofermentativos facultativos	Heterofermentativos obrigatórios
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>

Fonte: Fox et al. (2000), Embrapa (2009) e Lahtinen et al. (2012)

Quadro 3. Classificação de espécies de *Lactobacillus* spp. de acordo com o modo de fermentação.

Esses micro-organismos são largamente encontrados na natureza, nos chamados “ambientes nutritivos”. Fazem parte da microbiota natural de seres humanos e animais, colonizando os tratos gastrointestinal e urogenital, a cavidade oral e a pele. Ainda são encontrados em diversos gêneros alimentícios como bebidas, frutas, vegetais, massas, carnes fermentadas e produtos lácteos (FELIS e DELLAGLIO, 2007). Os lácteos fermentados são os principais alimentos onde *Lactobacillus* spp. são encontrados, estando presentes em uma variedade de queijos, iogurtes, bebidas lácteas, kefir, entre outros, nos quais são utilizados como culturas *starter* e/ou adjuntas do processo fermentativo (LAHTINEN et al., 2012).

Além de seu uso tecnológico, muitas amostras de *Lactobacillus* spp. são utilizadas comercialmente como probióticos nas mais diversas apresentações, tais como suplementos, cápsulas, iogurtes e sucos. Esse gênero é o mais frequentemente utilizado como probiótico, principalmente por ser considerado *GRAS* (*Generally Recognised As Safe*), o que lhe confere o *status* de seguro, não patogênico e incapaz de transmitir fatores de resistência para bactérias patogênicas (LEE et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2012).

Dentre as espécies de *Lactobacillus* spp., aquelas que usualmente possuem amostras empregadas como probióticos são: *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei* ssp. *paracasei* e ssp. *tolerans*, *L. delbreuckii* subsp. *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius* (COLLINS et al., 1998; SAAD, 2006).

3.4. Probióticos

O termo “probiótico” tem origem grega e significa “para a vida”. Ao longo dos anos esse termo recebeu diversas definições, as mudanças ocorreram, principalmente, pelos avanços promovidos pela pesquisa científica que permitiram melhor compreensão entre a saúde intestinal e o bem estar adquirido pela administração dos probióticos (LEE e SALMINEN, 2009).

Inicialmente, os probióticos foram definidos como um fator de origem microbiana que estimula o crescimento de outros micro-organismos (LILLY e STILLWELL, 1965). Posteriormente, foram denominados de organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal (PARKER, 1974). Tais definições foram sendo modificadas até que em 2002 a Organização Mundial de Saúde divulgou o conceito atual. Segundo o órgão, probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem algum efeito benéfico à saúde do hospedeiro (FAO, 2002).

3.4.1. Critérios de seleção e benefícios do uso de probióticos

Para que um produto seja comercializado com apelo probiótico é necessário que a cultura microbiana utilizada atenda a uma série de requisitos que incluem a resistência frente ao suco gástrico e aos sais biliares, a capacidade de aderir e colonizar à mucosa intestinal, ao menos temporariamente, e produzir compostos antimicrobianos (GARDINER et al., 1998). Ainda há aspectos de segurança para uso humano, como não apresentar histórico de patogenicidade, nem associação a doenças tais como endocardite, além da ausência de genes determinantes da resistência aos antimicrobianos (OLIVEIRA et al., 2002).

Além disso, é imprescindível que a cultura apresente uma concentração mínima de células viáveis ao ser consumido (VINDEROLA et al., 2000; KALAVROUZIOTI et al., 2005). De acordo com a legislação brasileira, para ser considerado probiótico, o micro-organismo deve apresentar uma concentração de 10^8 a 10^9 UFC (unidades formadoras de colônias) em uma porção de consumo diário. Tal concentração deve permanecer inalterada até o final do prazo de validade do alimento, pois as ações do suco gástrico e dos sais biliares tendem a reduzir essa concentração a valores em torno de 10^6 a 10^7 UFC, quantidade necessária para que gerar efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (ANVISA, 2008).

Dentre os efeitos benéficos de produtos contendo micro-organismos probióticos destaca-se a manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal, decorrente de sua competição por sítios de adesão, nutrientes e produção de compostos antimicrobianos. Também, é observada modificação no metabolismo microbiano, pelo aumento ou diminuição da atividade enzimática (SANDERS e O'SULLIVAN, 2003; SAAD, 2006). Além de contribuírem para as defesas contra infecções, pela produção de bacteriocinas (peptídeos com ação antimicrobiana), ácido lático e peróxido de hidrogênio (Redondo, Cook e Sobel, 1990; Klebanoff et al., 1991; Boris e Barbes, 2000).

De acordo com Meira et al. (2010), o consumo de probióticos está relacionado a efeitos benéficos como alívio da intolerância à lactose; prevenção e redução dos sintomas de diarreia associada a antimicrobianos e causadas por rotavírus. Também existem relatos de benefícios em casos de infecções intestinais, doença inflamatória intestinal e alergia devido à adição de amostras selecionadas para produtos alimentares, muitas vezes em conjunto com prebióticos (oligossacarídeos que possuem o potencial de estimular seletivamente o crescimento de micro-organismos) (LJUNGH e WADSTROM, 2006).

3.4.2. Mecanismos de ação dos probióticos

Segundo Oelschlaeger (2010), os probióticos podem exercer seus efeitos benéficos no organismo partir de três mecanismos de ação: modulação da imunidade, inibição de patógenos e restabelecimento da homeostase microbiana e proteção da barreira epitelial.

3.4.2.1. Inibição de patógenos e restabelecimento da homeostase microbiana

Os micro-organismos probióticos produzem uma variedade de compostos como bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos voláteis, ácido lático e acético que exercem ação antimicrobiana direta (VALLOR et al., 2001; LEBEER et al., 2008; OELSCHLAEGGER, 2010). Bacteriocinas são peptídeos cujas principais funções são atividade bactericida, prevenção do crescimento de bactérias nocivas na fermentação e preservação dos produtos lácteos (LJUNGH e WADSTROM, 2006). Esses peptídeos ou proteínas sintetizados pelos ribossomos bacterianos apresentam estabilidade térmica, alto ponto isoelétrico e são rapidamente digeridos no trato gastrointestinal dos humanos (CHEN e HOOVER, 2003). Geralmente, as bacteriocinas agem induzindo a permeabilidade da membrana, resultando na saída de moléculas da bactéria alvo. Existem na literatura diversos estudos que descrevem a ação antagonista dessas substâncias contra patógenos, tais como *Clostridium perfringens*, *Clostridium sporogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*

enteritidis, *Staphylococcus aureus*, dentre outros (JAMUNA et al., 2005; GARCIA, 2006; TODOROV e DICKS, 2007; TODOROV, 2009). Porém, dentre as bacteriocinas já identificadas, apenas a nisina tem aplicação industrial, tendo seu uso em lácteos autorizado no Brasil desde 1996. Ela é produzida por determinadas amostras de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e apresenta atividade antimicrobiana contra várias bactérias Gram positivo, particularmente sobre formas esporuladas termorresistentes (MAPA, 1996; JAY, 2005).

Outros compostos de ação antimicrobiana são os ácidos orgânicos, bem como os ácidos láctico e acético, que são produtos decorrentes do processo fermentativo realizado pelos probióticos. Desta forma, é gerado um efeito antimicrobiano dos ácidos. Isso está relacionado a vários fatores, tais como: queda do pH, o que irá causar uma redução tanto no pH do meio quanto no pH intracelular, pois a entrada de ácido através da membrana celular irá alterar o metabolismo da célula, resultando em um aumento do consumo de adenosina trifosfato (ATP) celular. O efeito ocorre com a finalidade de bombear para o meio externo esse excesso de ácido, através dos canais, modificando assim a permeabilidade celular devido à interferência das proteínas de membrana, responsáveis pelo transporte ativo de nutrientes e redução da eficiência de produção de ATP. A redução no pH, além de inibir o crescimento de patógenos, favorece o desenvolvimento de bactérias probióticas, principalmente *Lactobacillus* spp., que são altamente adaptados a ambientes ácidos (SALMINEN e VON WRIGHT, 1993; GARCIA, 2006; LEBEER et al., 2008).

Além da produção de ácidos, alguns probióticos produzem peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que na presença de oxigênio possuem ação antimicrobiana, decorrente da sua atividade oxidante, sendo importante para a manutenção do equilíbrio da microbiota pela inibição de bactérias patogênicas (PRIDMORE et al., 2008). O H₂O₂ produzido por algumas amostras de *Lactobacillus* spp. que participam da colonização da mucosa vaginal tem demonstrado ação contra de patógenos, sugerindo que possa estar relacionados com os mecanismos de defesa daquela região (VALLOR et al., 2001).

3.4.2.2. Proteção epitelial

A competição por nutrientes e/ou competição entre linhagens patogênicas e micro-organismos probióticos pelos mesmos sítios de adesão (exclusão competitiva), além da indução da síntese de defensas e muco são as principais propriedades que os probióticos utilizam para promover a proteção do epitélio intestinal (FULER, 1989; OELSCHLAEGGER, 2010).

A exclusão competitiva, como o próprio nome diz, ocorre pela competição entre os micro-organismos probióticos e os patógenos por sítios de adesão na mucosa. A exemplo da competição entre *E. coli*, e *Lactobacillus* spp. por sítios de receptores de oligossacarídeos. Neste caso, são produzidas algumas proteínas chamadas de adesinas que permitem a adesão de *Lactobacillus* spp., impedindo ou diminuindo a área disponível para *E. coli* com consequente queda na sua população no intestino (LEBEER et al., 2008).

Na maioria das vezes, os probióticos são selecionados a partir de bactérias da microbiota indígena, o que aumenta as chances de obtenção de bactérias com melhor capacidade adaptativa às condições intestinais do hospedeiro, principalmente a disponibilidade de nutrientes. Isso faz com que, os micro-organismos probióticos realizem no intestino uma rápida metabolização de substratos, como carboidratos, vitaminas, aminoácidos e proteínas, impedindo que eles estejam

disponíveis para os patógenos resultando, conseqüentemente, na redução da proliferação destes (FERREIRA e KUSSAKAWA, 2015).

Além disso, probióticos promovem aumento da proteção das mucosas contra patógenos, pois estimulam a produção de mucinas e defensivas. No primeiro caso, há melhora da expressão gênica nas células caliciformes, responsáveis pela produção do muco que reveste o trato gastrointestinal, resultando no aumento da camada mucosa que auxilia na proteção contra translocação e na eliminação de patógenos (LEBBER et al., 2010).

A produção de defensinas, que são peptídeos antimicrobianos, decorre da ligação com as células de Paneth, nas quais os probióticos estimulam a expressão de mRNA da β -defensina, resultando na produção da substância (LEBBER et al., 2010; ISLI, 2013).

3.4.2.3. Modulação da imunidade

O sistema imunológico dos mamíferos apresenta dois tipos de resposta: a resposta imunológica inata (ou imediata e não específica) e a resposta imunológica adquirida (ou adaptativa e específica). Os probióticos interagem com as duas respostas em receptores específicos associados com as células do que revestem o trato gastrointestinal. A ativação desses receptores inicia um efeito em cascata de sinais imunes resultando em diferentes respostas (SAAD, 2006; ISLI, 2013).

As células do epitélio intestinal (CEI) e células dendríticas (CD) são as principais desencadeadoras da imunomodulação gerada pelos probióticos. A interação de moléculas conservadas na parede celular destes micro-organismos (MAMPs) com receptores de reconhecimento do hospedeiro (PRRs) é o mecanismo sinalizador para a resposta imune, cujo tipo irá depender do probiótico ingerido e do tipo de célula ao qual ele se ligou, podendo resultar na produção de citocinas imunomoduladoras, quimiocinas, fatores antimicrobianos ou citoprotetores e moléculas co-estimuladoras, (LEBEER et al., 2010).

Para que ocorra a interação com as CD, os probióticos precisam encontra-las. Isso ocorre por meio de duas vias: por prolongações entre as células epiteliais intestinais e pela transcitose mediada pelas células M, ocasionando um contato direto de um probiótico ao tecido linfóide associado ao intestino (TLAI) (LEBEER et al., 2010). Decorrido o contato, a presença do probiótico desencadeia respostas importantes das CD contra esses micro-organismos. A principal delas ocorre pela produção de citocinas, grandes moléculas do complexo de histocompatibilidade para apresentação de antígenos, e moléculas co-estimuladoras que polarizam as células T em células T auxiliares ou células T CD4 + CD25 + células T reguladoras nos nódulos linfáticos mesentéricos (MLNs) ou cúpula subepitelial do tecido linfóide associado. Esse processo também estimula as populações de linfócito B a produzirem IgA, protegendo o epitélio intestinal contra patógenos entéricos e toxinas (LEBEER et al., 2008).

É importante salientar que um único probiótico pode não atuar com esses três modos de ação. O mecanismo a ser utilizado vai depender das propriedades metabólicas do micro-organismo utilizado, da interação com o organismo do hospedeiro e com o seu modo de uso.

3.4.3. Uso de probióticos na indústria de lácteos

Os produtos lácteos estão entre os principais alimentos de veiculação de micro-organismos probióticos. Um dos fatores que contribuem para essa predileção da indústria pelos lácteos é o fato de o leite ser um meio rico do ponto de vista nutricional, sendo necessária, em alguns casos, a adição de alguns fatores de crescimento que diminuem o tempo de fermentação das bactérias (OLIVEIRA et al., 2012).

Os queijos são considerados ótimos produtos para a adição de micro-organismos probióticos, quando comparados com outros derivados lácteos (KASIMOGLU et al., 2004). Isso se deve a algumas características como: serem uma matriz densa (produto sólido) e apresentarem alto teor de gordura e proteínas que favorecem a manutenção dos micro-organismos probióticos durante o período de estocagem. Além disso, essas características favorecem a sobrevivência dos probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal (FELICIO, 2014).

Há descrições da adição de micro-organismos probióticos no desenvolvimento de vários produtos lácteos como *buttermilk*; *frozen yogurt*; bebida láctea e queijos (ANTUNES et al. 2007; BRASILb, 2008; GONÇALVES e EBERLE, 2008; VIEGAS, 2008; ARAUJO, 2009; RIBEIRO et al., 2009; DIAS, 2012; JARDIM, 2012; SONGISEPP et al., 2012). Em queijos, um dos derivados lácteos de maior produção e consumo mundial, as bactérias probióticas presentes no produto devem manter-se viáveis durante o processamento, maturação e estocagem. Portanto, a forma, o momento de adição do fermento probiótico e os parâmetros de processamento e estocagem são fatores importantes para a sobrevivência desses micro-organismos (BRASILb, 2008).

Dentre os micro-organismos probióticos, as BAL (a exemplo de *Lactobacillus* spp.) e *Bifidobacterium* spp., são mais comumente utilizados (KOMATSU, 2008). Tais bactérias são isoladas do trato gastrointestinal dos seres humanos saudáveis, principalmente do cólon, no caso de *Bifidobacterium* spp., e do íleo terminal, no caso de *Lactobacillus* spp., resultando em um maior envolvimento nos mecanismos metabólicos do organismo (BARRETO et al., 2003; SAAD, 2006).

No Brasil, o órgão responsável pela autorização da comercialização de produtos com apelo probiótico é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que considera como micro-organismos probióticos *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade rhamnosus, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium* (ANVISA, 2008).

Contudo, a simples identificação de bactérias pertencentes a algumas das espécies citadas anteriormente não garante que esta apresente propriedades probióticas, sendo necessária a realização de testes que comprovem a existência de tais propriedades. Para este fim, diversos fabricantes desenvolvem suas próprias bactérias probióticas. Com isso, há uma busca frequente por novas linhagens bacterianas, oriundas de diversas fontes, que possam ser utilizadas em alimentos (DALY et al., 1998; OLIVERA et al., 2012).

Há evidências de que uma das fontes para identificação dessas linhagens sejam os produtos artesanais, como os queijos. Segundo Tulin et al., (2013), os queijos artesanais podem veicular

naturalmente bactérias com propriedades probióticas. Neste contexto, faz-se necessária a realização de estudos que venham a comprovar a hipótese levantada pelo autor, ou seja, a existência de bactérias probióticas nesses produtos.

3.4.4. Propriedades probióticas de BAL isoladas de queijos artesanais

Na literatura é possível encontrar trabalhos que avaliaram algumas propriedades probióticas de BAL isoladas de queijos artesanais produzidos em várias partes do mundo.

Camara (2012) avaliou o potencial bioativo e tecnológico de 37 amostras de *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp. isoladas de queijo do Pico artesanal. O autor submeteu as amostras a testes como antagonismo contra patógenos, resistência aos sais biliares e susceptibilidade a antimicrobianos. Os resultados revelaram que todas as amostras de BAL foram capazes de inibir o crescimento de *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Em relação à susceptibilidade a antimicrobianos, foi observado que das 37 amostras, 35 foram sensíveis a amoxicilina+ácido clavulônico, carbenicilina, cloranfenicol, penicilina, piperacilina e sulfametomidazol+trimetopin. Porém nenhuma amostra demonstrou resistência aos sais biliares. Com base nos resultados dos testes, as amostras *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (L1B1E3), *Lactobacillus plantarum* (L1C1E6) e *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* (L1C1R5) foram consideradas como culturas promissoras para ensaios futuros.

Bactérias do gênero *Lactobacillus* estão entre as mais frequentemente utilizadas como culturas probióticas. Neste sentido, Hassanzadazar et al. (2012) avaliaram as propriedades probióticas *in vitro* (antagonismo contra micro-organismos patogênicos de referência e resistência ao suco gástrico e aos sais biliares) de 28 amostras de *Lactobacillus* spp. das espécies *L. casei* (duas amostras), *L. delbrukii* (sete amostras) e *L. plantarum* (19 amostras) isoladas do queijo Koozeh, comercializado no Iran. Os resultados dos testes indicaram que apenas uma das amostras, pertencente a espécie *L. casei*, foi resistente ao suco gástrico, aos sais biliares e apresentou atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*. Segundo os autores são necessários estudos mais detalhados para identificação de amostras com potencial probiótico nesse queijo.

Solieri et al. (2014) avaliaram as propriedades probióticas *in vitro* (resistência ao suco gástrico, aos sais biliares, hidrofobicidade e susceptibilidade a antimicrobiano) de 47 amostras de bactéria dos gênero *Lactobacillus*, sendo 22 *L. rhamnosus*, 18 *L. paracasei*, 3 *L. casei*, 2 *L. fermentum* e 2 *L. harbinensis*, isoladas de amostra de queijo Parmigiano Reggiano. Os resultados indicaram que as amostras apresentavam de 50 a 70% de hidrofobicidade. Todas as amostras de *Lactobacillus* spp. foram sensíveis a ampicilina, cloranfenicol, eritromicina e tetraciclina e resistentes a vancomicina. Foi observada variação entre as amostras nos níveis de resistência aos sais biliares e ao pH ácido do suco gástrico artificial. Os autores concluíram que as amostras *L. casei* PRA205 e *L. rhamnosus* PRA172 são culturas candidatas para uso em alimentos funcionais.

Em queijos artesanais brasileiros estudos têm identificado BAL com propriedades probióticas. De acordo com tais estudos, esses micro-organismos são encontrados naturalmente nesses produtos (GUEDES NETO et al., 2005; COSTA et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; SANT'ANNA, 2015).

Guedes Neto et al. (2005) isolaram e identificaram quatro amostras de *Lactobacillus* spp. (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum* e *L. rhamnosus*) e duas de *Lactococcus* spp. (*L. lactis* e *L. raffinolactis*) a partir de amostras de queijo de coalho artesanal e industrial, produzidas e comercializadas no estado de Pernambuco. Os autores avaliaram o potencial de inibição dessas amostras contra *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Weissella confusa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. isoladas dos mesmos queijos e amostras de patógenos de referência (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 12228). A partir dos resultados dos testes, os autores concluíram que as amostras do gênero *Lactobacillus* spp., apresentaram melhor atividade antagonista frente a bactérias indesejáveis, como *Staphylococcus* spp. e *E. coli* isoladas do mesmo tipo de queijo, sendo recomendada a utilização dessas BAL para melhoria da qualidade sanitária do produto avaliado.

Costa et al. (2013) avaliaram o potencial probiótico *in vitro* (susceptibilidade a antimicrobianos, antagonismo contra micro-organismos patogênicos de referência e BAL e sensibilidade a pH gástrico e sais biliares) de 12 amostras de BAL, isoladas de queijo Minas artesanal produzido na Serra da Canastra. A partir do resultado das análises os autores observaram atividade antagonista de todas as BAL apenas contra as bactérias patogênicas. As BAL foram resistentes ao pH gástrico (2.0), porém apresentaram variação nos níveis de resistência aos sais biliares. No teste de susceptibilidade a antimicrobianos, todas as amostras de BAL foram sensíveis a clindamicina, eritromicina e tetraciclina e resistentes a vancomicina. Os autores concluíram que o queijo Minas artesanal da Serra da Canastra pode veicular micro-organismos com potencial probiótico para os consumidores. E que as amostras *Lactobacillus rhamnosus* B4 e D1 e *Weissella paramesenteroides* C10 seriam candidatas à elaboração de novas culturas lácteas para produção de produtos lácteos fermentados potencialmente funcionais.

O potencial probiótico *in vitro* de *Lactobacillus* spp., isolados de queijo Minas artesanal produzido na Serra da Canastra foi avaliado por Andrade et al. (2014). Os autores observaram que todas as amostras testadas apresentaram resistência ao ácido gástrico e aos sais biliares, bem como atividade antagonista contra bactérias reveladoras. Além disso, todas as amostras foram sensíveis à eritromicina e tetraciclina e resistentes à ciprofloxacina, gentamicina, oxacilina, estreptomina e vancomicina. *L. plantarum* (B17) apresentou melhor potencial probiótico, pois obteve resultados satisfatórios em todas as propriedades avaliadas. Os autores concluíram que as amostras de *Lactobacillus* spp. isoladas de queijos Minas artesanal produzido na Serra da Canastra atenderam a alguns critérios de seleção *in vitro* de probióticos.

BAL isoladas de água, leite, silagem, soro fermento endógeno e queijo Minas artesanal de sete propriedades da região de Campo das Vertentes, tiveram suas propriedades probióticas *in vitro* avaliadas por Sant'anna (2015). A partir do resultado dos testes *in vitro* foram selecionadas duas amostras, das 26 testadas, para realização de testes *in vivo* frente à infecção por *Salmonella* Typhimurium. A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que as BAL isoladas de queijos Minas artesanais da região de Campo das Vertentes possuem potencial probiótico *in vitro*. No entanto, esses micro-organismos não mostraram potencial probiótico *in vivo* na proteção contra infecção por *Salmonella* Typhimurium.

A partir dos resultados obtidos nos estudos citados acima é possível observar que BAL com propriedades probióticas são encontradas naturalmente em queijos artesanais, produzido em diferentes regiões do mundo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Bactérias ácido lácticas

O isolamento e enumeração das BAL utilizadas neste estudo foram realizados por Sales (2015), a partir de amostras de queijo Minas artesanal de seis propriedades cadastradas no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), localizadas na região de Araxá, em épocas distintas (seca e chuva). As amostras de queijo foram coletadas no dia da fabricação e, posteriormente nos dias 7, 14, 22, 29, 43 e 57 de maturação, que foi realizada nas queijarias. As coletas foram repetidas, da mesma forma, nos dois períodos, totalizando 84 queijos analisados.

Para o isolamento e enumeração das BAL, a partir das amostras de queijo, foram utilizados os ágaros Man-Rogosa-Shape (MRS) e M17, com incubação das placas em aerobiose por 48h a 37°C. Decorrido esse período, foram realizados testes para identificação das características morfo-tintoriais das colônias (prova da catalase e coloração de Gram). As colônias que apresentaram características indicativas de BAL (Gram positivo, cocos ou bacilos) foram congeladas a -18°C em glicerol a 20% para estudo em nível molecular.

4.2. Identificação molecular das BAL isoladas

No estudo realizado por Sales (2015), foram identificadas 263 amostras de BAL. Para a realização deste trabalho, foram selecionadas 50 amostras que apresentaram morfologia de bastonete no teste de coloração de Gram, para a identificação molecular, por meio do sequenciamento do gene 16S.

A identificação molecular dos micro-organismos isolados foi realizada no Laboratório de Genética de Protozoários Parasitas do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A extração do DNA foi realizada a partir do cultivo recente das BAL em caldo MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos), incubado sob aerobiose, a 37°C, durante 24 a 48 horas.

4.2.1. Pré-tratamento das células e extração do DNA genômico

As BAL foram submetidas a um pré-tratamento com o intuito de obter células sem parede e membrana celular de acordo com a metodologia descrita por Acúrcio et al. (2014). Dessa forma, as culturas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL e centrifugadas a 4000 x g/15min, sendo descartado o sobrenadante. Os *pellets* obtidos foram suspensos em um mL de LiCl (5M) e incubados a temperatura ambiente, sob agitação, por 90 minutos. Após duas lavagens sucessivas com água deionizada, as amostras foram novamente centrifugadas a 4000 x g/15min sendo descartado o sobrenadante.

Em seguida, os *pellets* foram submetidos ao tratamento com um mL de lisozima suspensa em tampão protoplasmático (25 mM de scarose, 50 mM de tris-HCl, pH 8,0) e incubados por 60 –

90 min a 37°C. Decorrido esse período, foi realizada uma nova centrifugação a 8000 x g/15min, sendo descartados os sobrenadantes e obtidos os pellets contendo DNA.

Posteriormente, foi realizada a extração do DNA total dos protoplastos utilizando-se o Kit *Wizard SV Genomic DNA Purification System* da companhia *Promega Corporation*[®] (Madison, Wisconsin, Estados Unidos), segundo instruções do fabricante. Ao término da extração, o DNA obtido de cada amostra foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop[®] 2000-2000c).

4.2.2. Amplificação do DNA por PCR: gene 16S rDNA

A Reação em Cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para a amplificação da região 16S do rDNA. Os pares iniciadores utilizados foram 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'), descritos por Lane (1991). As reações de amplificação foram realizadas utilizando 10 pmols de cada *primer*, 20 ng de DNA molde e PCR *Master Mix* (Promega Corporation, Madison, Estados Unidos), com 0,2mM de cada desoxiribonucleotídeo trifosfato, 1,5mM de MgCl₂, 1,5 U de Taq DNA polimerase.

As etapas utilizadas na PCR consistiram de 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), de acordo com Moreira et al. (2005).

Decorrida a PCR, para verificar da amplificação de cada amostra, 10 µL de cada amostra foram misturados em 2 µL de tampão (glicerol adicionado de azul de bromofenol) e, então, submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, adicionado de 10 µL de brometo de etídeo, utilizando 100 V, durante 90 minutos. Ao término da corrida, os géis foram visualizados com auxílio de luz ultravioleta e documentados por intermédio de fotografias, para observação das regiões amplificadas.

4.2.3. Sequenciamento genético das amostras

As amostras amplificadas na PCR foram submetidas ao sequenciamento genético pelo método de Sanger, para identificação das bactérias ao nível de espécie, utilizando-se um sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare, Piscataway, Estados Unidos), conforme metodologia proposta por Reysenbach et al., (2000). Para isso, foi realizada, inicialmente, a purificação do DNA por meio do kit *Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega Corporation, Madison, Estados Unidos), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, as amostras foram encaminhadas para sequenciamento do gene 16S rDNA no Laboratório de Genética do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG.

As sequências obtidas foram comparadas com aquelas depositadas no GenBank, disponível no portal do Centro Nacional para Informação em Biotecnologia (NCBI - *National Center of Biotechnology Information* – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Sendo estabelecido um percentual mínimo de 98% de similaridade entre as sequências (SANT'ANNA, 2015).

Amostras de bactérias identificadas pelo sequenciamento do gene 16S como pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, mas que não apresentaram similaridade $\geq 98\%$ foram submetidas a PCR espécie-específica dos grupos *L. plantarum* e *L. casei*.

4.2.4. PCR espécie-específico para identificação das espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*

A diferenciação entre *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* foi realizada por meio da amplificação da região VI do gene 16S rRNA, seguindo a técnica de PCR descrita por Ward e Timmins (1999).

Cada amostra de *Lactobacillus* spp. em que o resultado do sequenciamento indicou como pertencente ao grupo *L. casei*, foi submetida a três reações, cada uma contendo um par distinto de *primers*, nas seguintes combinações: Y2/*casei*; Y2/*para*; Y2/*rham*. Todas as reações, foram realizadas utilizando 10 pmols dos primers Y2 5'-CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3', *casei* 5'-TGCACTGAGATTCGACTTAA-3', *para* 5'-CACCGAGATTCAACATGG-3' ou *rham* 5'-TGCATCTTGATTTAATTTTG-3, 100 ng de DNA e PCR *Master Mix* (Promega Corporation, Madison, Estados Unidos), com 0,2mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato, 1,5mM de MgCl₂ e 1,5 U de *Taq* DNA polimerase. O programa utilizado para amplificação foi: 1 ciclo (94°C por 3 minutos), 30 ciclos (94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto) e o último ciclo (72°C por 5 minutos).

Decorrida a PCR, 10 µL de cada amostra foram misturados a 2 µL de tampão (glicerol adicionado de azul de bromofenol) e, então, submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%), adicionado de 20 µL de brometo de etídeo, utilizando 100 V, durante 90 minutos. Em cada gel foi utilizado um marcador de peso molecular de 1 Kb (mil pares de bases). Ao final da corrida, os géis foram visualizados em luz ultravioleta e documentados por intermédio de fotografias. Foram considerados *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* os amplicons que apresentaram fragmentos de 290, 850 e 550 bp, respectivamente.

4.2.5. PCR multiplex para identificação das espécies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* e *Lactobacillus pentosus*

A diferenciação entre *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* e *Lactobacillus pentosus* foi realizada a partir da amplificação do gene *recA* por meio da PCR *multiplex* descrita por Torriani *et al.* (2001).

As reações de amplificação foram realizadas utilizando 2 pmols dos *primers* paraF (59-GTC ACAGGCATTACGAAAAC-39), pentF (59-CAGTGGCGCGGTTGATATC-39), planF (59-CCGTTTATGCGGAACACCTA-39), e prev (59-TCGGGATTACCAAACATCCA-39), 100 ng de DNA e PCR *Master Mix* (Promega Corporation, Madison, Estados Unidos), com 0,2mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato, 1,5mM de MgCl₂ e 1,5 U de *Taq* DNA polimerase. O programa utilizado para amplificação foi: 1 ciclo (94°C por 3 minutos), 30 ciclos (94°C por 30 segundo, 56°C por 10 segundos e 72°C por 30 segundos) e o último ciclo (72°C por 5 minutos). Decorrida a PCR, 10 µL de cada amostra foram misturados a 2 µL de tampão (glicerol adicionado de azul de bromofenol) e, então, submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%), adicionado de 20 µL de brometo de etídeo, utilizando 100 V, durante 90 minutos. Em cada gel foi utilizado um marcador de peso molecular de 1 Kb (mil pares de bases). Ao final da corrida, os géis foram documentados por intermédio de fotografias, para visualização das regiões amplificadas. Foram considerados *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* e

Lactobacillus paraplantarum os amplicons que apresentaram fragmentos de 318, 218 e 107 bp, respectivamente.

4.3. Propriedades probióticas *in vitro*

Para avaliação das propriedades probióticas *in vitro*, as amostras de *Lactobacillus* spp. foram submetidas aos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, resistência ao suco gástrico e aos sais biliares, produção de peróxido de hidrogênio, antagonismo “*spot on the lawn*” e antagonismo em co-cultivo. Todos os testes foram realizados em triplicada com duas repetições.

Antes da realização de cada teste as amostras de *Lactobacillus* spp. foram previamente ativadas duas vezes em tubos contendo caldo MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) incubados a 37°C, durante 24h, sob aerobiose. Exceto no teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, no qual foi realizada ativação em caldo MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos), seguida de plaqueamento, por esgotamento, em placas de Petri contendo ágar MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) que foram incubadas sob aerobiose, a 37°C, durante 24h. As bactérias reveladoras patogênicas utilizadas nos testes de antagonismo “*spot on the lawn*” e antagonismo em co-cultivo foram ativadas duas vezes em tubos contendo caldo BHI (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) incubados a 37°C durante 24h, sob aerobiose.

4.3.1. Análise de susceptibilidade a antimicrobianos

O teste de susceptibilidade a antimicrobianos foi realizado de acordo com o princípio de difusão da droga, utilizando discos contendo os medicamentos e, posteriormente, medindo o diâmetro dos halos de inibição, conforme proposto por Charteris et al. (1998).

Alíquotas de cada amostra de *Lactobacillus* spp. ativada foram transferidas para um tubo de ensaio contendo 3,5 mL de solução salina (NaCl) a 0,9%, até ser atingida a concentração de 0,5 na escala Mc Farland (10^8 UFC/mL). Em seguida, *swabs* foram imersos nos tubos e espalhados em toda extensão de placas de Petri contendo ágar MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos).

Posteriormente, foram distribuídos sobre a superfície do ágar MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) em cada placa de Petri dez discos contendo antimicrobianos (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra) dos seguintes grupos:

- ✓ β -lactâmicos: penicilina - PEN (10 UI) e oxacilina - OX (1 μ g);
- ✓ Glicopeptídeos: vancomicina - VA (30 μ g);
- ✓ Cefalosporina de terceira geração: ceftazidime - CAZ (30 μ g);
- ✓ Macrolídeos: eritromicina - E (15 μ g);
- ✓ Tetraciclina: tetraciclina - TE (30 μ g);
- ✓ Aminoglicosídeos: gentamicina - GN (10 μ g) e estreptomicina - S (30 μ g);
- ✓ Lincosamidas: clindamicina - DA (2 μ g);
- ✓ Quinolonas de terceira geração: ciprofloxacina - CIP (5 μ g)

Decorrida a aplicação dos discos, as placas foram incubadas sob aerobiose, durante 48h, a 37°C. O controle de qualidade dos discos contendo os antimicrobianos foi realizado utilizando amostra de *Escherichia coli* ATCC 25922, de acordo com técnica descrita por Charteris et al. (1998).

A leitura dos halos de inibição foi realizada com paquímetro digital (Mitutoyo Digimatic Caliper). De acordo com o padrão proposto por Charteris et al. (1998), as amostras foram classificadas como resistentes, moderadamente sensíveis ou sensíveis aos antimicrobianos, conforme observado na tabela 1:

Tabela 1. Níveis de susceptibilidade a antimicrobianos de *Lactobacillus* spp. de acordo com os diâmetros médios dos halos de inibição (mm) no teste de difusão em ágar MRS

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

Fonte: Charteris et al. (1998)

4.3.2. Resistência ao suco gástrico artificial

Para avaliação da resistência das amostras de *Lactobacillus* spp. isoladas de queijo Minas artesanal de Araxá ao suco gástrico, foram utilizadas as técnicas descritas por Neumann (1991) e Silva et al. (2013).

As culturas de *Lactobacillus* spp. foram distribuídas em dois microtubos tipo *Eppendorf*® 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). Os microtubos foram incubados a 37°C por três horas e, posteriormente, centrifugados (13000 x g/1minuto). O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram suspensos em caldo MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos).

A viabilidade das células foi avaliada a partir da aplicação de 200 µL/poço dos inóculos do controle e das culturas tratadas com suco gástrico artificial em uma microplaca de 96 poços que foi incubada em espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer System 47 SpectraMax 340 - Molecular Devices, Sunnyvale, Estados Unidos) a 37°C por 12 horas.

A absorbância do cultivo foi determinada pela leitura de OD_{620nm} a cada 30 minutos 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 às áreas sob a curva de crescimento das bactérias tratadas com suco gástrico artificial e do controle, respectivamente.

A interpretação dos resultados, segundo a porcentagem de inibição, seguiu o critério proposto por Acúrcio et al. (2014), segundo o qual as amostras testadas foram consideradas tolerantes quando apresentaram porcentagem de inibição <40%, moderadamente tolerantes quando a porcentagem foi de 40-80% e sensíveis quando superior a 80%.

4.3.3. Resistência aos sais biliares

A avaliação da resistência das amostras de *Lactobacillus* spp. isoladas de queijo Minas artesanal de Araxá aos sais biliares foi realizada segundo as metodologias descritas por Walker e Gilliland (1993) e Silva et al. (2013).

As culturas de *Lactobacillus* spp. foram distribuídas em microtubos tipo *ependorf*® na diluição de 4% (v/v) em caldo MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos). Em seguida, 100 µL foram transferidos para um poço da microplaca de 96 poços contendo 100 µL de caldo MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) e outros 100 µL para um poço contendo caldo MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) com 0,6% (p/v) de sais biliares (Oxgall®). Posteriormente, a microplaca foi incubada em espectrofotômetro (Microplate Spectrophotometer System SpectraMax 340 - Molecular Devices, Sunnyvale, Estados Unidos) a 37°C. A absorbância do cultivo foi determinada pela leitura de OD_{620nm} a cada 30 minutos, durante 12 horas.

A porcentagem de inibição de crescimento foi calculada utilizando o programa Graphpad Prism 5.0 pela fórmula $(1-SB/CT) \times 100$, sendo que SB e CT correspondem às áreas sob a curva de crescimento das bactérias tratadas com sais biliares e o controle, respectivamente. A interpretação dos resultados, segundo a porcentagem de inibição, seguiu o critério proposto por Acúrcio et al. (2014), segundo o qual as amostras testadas foram consideradas tolerantes quando apresentaram porcentagem de inibição <40%, moderadamente tolerantes quando a porcentagem foi de 40-80% e sensíveis quando superior a 80%.

4.3.4. Produção de peróxido de hidrogênio

A síntese de peróxido de hidrogênio das amostras de *Lactobacillus* spp. isoladas de queijo Minas artesanal de Araxá foi avaliada segundo o método colorimétrico descrito por Rabe e Hillier (2003).

As culturas de *Lactobacillus* spp. foram inoculadas em placas contendo meio TMB-plus (ágar Brucella 43,0g, Tetrametilbenzidina Dihidroclorito 0,25g, amido 20,0g solução de hemina (0,05%), 10,0mL, MgSO₄ 0,57g, MgSO₄.H₂O 0,12g, Solução de Peroxidase (0,1%) 10 mL e soro de equino, 50mL em 1 litro de água destilada) e mantidas por 18 horas a 37°C em anaerobiose, sendo em seguida expostas ao ar durante 30 minutos.

Foram consideradas produtoras de peróxido de hidrogênio as culturas de *Lactobacillus* spp. que apresentaram tons azulados e/ou marrons devido à atividade oxidante da substância produzida. As mesmas foram classificadas como de alta produção (+ + +) para colônias marrons, média produção (+ +) para colônias azuis, baixa produção (+) para colônias azul-claras e ausência de produção (-).

4.3.5. Teste de antagonismo “spot on the lawn”

Esta análise tem o objetivo de avaliar a produção de substâncias inibitórias produzidas pelas BAL. Na técnica proposta por Tagg et al. (1976), é possível verificar o antagonismo entre a cultura probiótica e os micro-organismos indicadores, chamados de produtoras e reveladoras respectivamente. As culturas são separadas umas das outras por uma camada de ágar semi-sólido, o que impede o contato direto entre elas. Desta forma, qualquer substância inibidora deve difundir-se no ágar para exercer seu efeito sobre a bactéria indicadora, ou seja, deve ser extracelular e difusível (PEREIRA e GOMES, 2007).

O teste de antagonismo “spot on the lawn” das amostras de *Lactobacillus* spp. isoladas de queijo Minas artesanal de Araxá foi realizado conforme a técnica descrita por Tagg et al. (1976).

Para a execução do antagonismo, as bactérias do gênero *Lactobacillus* foram previamente identificadas sendo denominadas produtoras, essas foram testadas contra outros micro-organismos denominados reveladores. Para isso, foram utilizadas seis culturas patogênicas, de referência, como reveladoras: *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Salmonella enterica* var. Typhimurium ATCC 14028, *Shigella flexneri* ATCC 25875 e *Staphylococcus aureus* N315 e duas culturas de BAL reveladoras oriundas dos mesmos queijos, *L. plantarum* C24 e *L. rhamnosus* A23 (identificadas pelo sequenciamento de gene 16S rDNA, segundo a mesma metodologia utilizada para identificação das bactérias produtoras), com o objetivo de comparar as atividades antagonistas das amostras produtoras contra reveladoras presentes nos próprios queijos dos quais as primeiras foram isoladas.

Cinco µL de cada bactéria produtora foram inoculados no centro de uma placa de Petri contendo ágar MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos), formando *spots*. As placas foram incubadas sob aerobiose a 37°C por 48 h. Decorrido esse período, as placas foram retiradas da estufa, distribuídas sobre a superfície do fluxo laminar onde foi adicionado um mL de clorofórmio em suas tampas deixando agir por 30 minutos. Posteriormente, as placas foram abertas e mantidas sob a luz ultravioleta por 30 minutos, para eliminação do clorofórmio residual. O objetivo desta etapa era inativar as bactérias crescidas dentro do “spot”. Assim, a atividade antagonista de prováveis substâncias de caráter antagonista, produzidas pelas bactérias produtoras, foi testada pela medição do halo de inibição frente às reveladoras, utilizadas conforme descrição seguinte.

Em seguida, dez µL de cada cultivo das reveladoras, ativadas duas vezes em caldo BHI (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos), sob aerobiose, foram adicionados em tubos contendo 3,5mL de ágar semi-sólido (0,75% de Bacto ágar, Difco®, em caldo BHI, Difco® para as amostras de patógenos ou MRS, Difco® para as amostras de BAL) e vertidos sobre os “spots” após tratamento com clorofórmio e luz ultravioleta.

Após solidificação do ágar semi-sólido, as placas foram incubadas a 37°C por 48h, sob aerobiose. Em seguida, foi medido o halo de inibição (mm) proveniente de substâncias antagonistas oriundas dos “spots” das produtoras frente às reveladoras com auxílio de um

paquímetro digital (Mitutoyo Digimatic Caliper, Mitutoyo Sul Americana Ltda, Suzano, São Paulo, Brasil).

4.3.6. Antagonismo em co-cultivo

O teste de antagonismo direto (co-cultivo) da cultura de *Lactobacillus* spp. produtora contra à cultura patogênica reveladora foi realizado conforme a técnica descrita por Hütt et al. (2006).

As amostras de *Lactobacillus* spp. foram denominadas produtoras. Elas foram testadas contra outros micro-organismos denominados reveladores. Para isso, foram utilizadas como bactérias reveladoras as seguintes culturas patogênicas de referência: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* var. Typhimurium ATCC 14028 e *Shigella flexneri* ATCC 25875.

Após ativação, as culturas produtoras e reveladoras foram distribuídas na diluição de 1% (v/v) em caldo MRS (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos) e BHI (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos), em microtubos tipo *eppendorf*® sendo incubados a 37°C por 18h. Decorrido esse período, foram realizadas diluições seriadas de cada co-cultivo em solução salina a 0,9% seguido de plaquemamento em ágar MacConkey (Difco Laboratories Inc., Detroit, Estados Unidos), incubado por 24 horas, a 37°C, em aerobiose. Posteriormente, foi realizada a leitura das placas pela contagem das colônias crescidas no meio de cultura.

Foi realizado, também, controle do pH dos meios de ativação das culturas produtoras e reveladoras. Para isso, o pH dos meios MRS e BHI foi medido em pHmetro digital (mPA-210, Piracicaba, São Paulo, Brasil) após incubação sob aerobiose, a 37°C, durante 24h.

O resultado do plaquemamento do co-cultivo foi então comparado com o crescimento controle de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella enterica* var. Typhimurium ATCC 14028 e *Shigella flexneri* ATCC 25875 sem a presença das culturas produtoras.

4.4. Análise estatística

As médias dos halos de inibição do teste de antagonismo “*spot on the lawn*” e das contagens do teste de co-cultivo foram submetidas à análise de normalidade. A comparação entre as médias das variáveis citadas anteriormente foi realizada por intermédio do teste de Kruskal-Wallis no nível de significância de 5% para o primeiro e de Friedman no nível de significância de 0,0001% para o segundo (Sampaio, 2015), pois as mesmas não demonstraram comportamento normal.

As análises estatísticas dos dois testes foram realizadas no programa estatístico InfoStat/Professional versão 2015.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na literatura consultada, não foram encontrados trabalhos que tenham realizado a identificação da microbiota láctica de queijo Minas artesanal da região de Araxá e avaliado suas propriedades probióticas. Com isso, foram utilizados como parâmetros de discussão estudos realizados em queijo Minas artesanal produzido em outras regiões de Minas Gerais, com queijos artesanais

elaborados no Brasil e em outros países e estudos que tenham utilizado metodologia semelhante à deste trabalho, mas com matrizes diversas.

5.1. Identificação molecular

Foi observada amplificação em todas as 50 amostras submetidas a PCR do gene 16S rDNA, que foram encaminhados ao sequenciamento para determinação do gênero e/ou espécies. Os gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Bacillus* foram identificados por meio das técnicas moleculares, tendo o primeiro, com 74%, a maior frequência de identificação, presente em 37/50 das amostras (tabela 2).

Tabela 2. Gêneros, espécies e frequência de identificação de BAL em queijo Minas artesanal de Araxá, coletados durante as épocas de chuva e seca, ao longo da maturação

Gênero	Espécie	Frequência de identificação % (n)
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	8 (4)
	<i>Lactobacillus casei</i>	4 (2)
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	18 (9)
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	18 (9)
	<i>Lactobacillus</i> spp.	26 (13)
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	12 (6)
	<i>Enterococcus rivorum</i>	2 (1)
	<i>Enterococcus</i> spp.	10 (5)
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	2 (1)
Total		100 (50)

A identificação de bactérias do gênero *Lactobacillus* no queijo Minas artesanal da região de Araxá era esperada, pois segundo Siezen e Vlieg (2011), esses micro-organismos constituem o maior grupo dentre as bactérias ácido lácticas (BAL), apresentando ampla distribuição em ambientes ricos em carboidratos como os lácteos fermentados. Em estudos que identificam a microbiota láctica de queijos artesanais é comum que *Lactobacillus* spp. estejam entre os micro-organismos mais frequentes. Câmara (2012) identificou a presença desse gênero em 54,04% das amostras de BAL a partir de amostras do queijo do Pico, em Portugal. Resultados superiores foram relatados por Nikolic et al. (2012), que identificaram a presença desse gênero em 87,27% das amostras do queijo bukuljac, na Sérvia. Porém, estudos realizados por Lima et al. (2009) e Castro (2015) com queijo Minas artesanal, produzidos nas regiões mineiras da Serra do Salitre e Campos das Vertentes, respectivamente, *Lactobacillus* spp. não foi identificado como o gênero de maior frequência, tais resultados podem indicar que na região de Araxá existam condições mais favoráveis, como clima e nutrientes, ao desenvolvimento desse gênero (LIMA et al., 2009; CASTRO, 2015). Segundo Wouters et al. (2002), *Lactobacillus* spp. são essenciais para o desenvolvimento de características típicas no queijo durante a maturação. Além disso, algumas amostras desse gênero têm apresentado propriedades probióticas, sugerindo que a sua ingestão veiculada por alimento possa conferir benefícios à saúde do consumidor (LEE et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2012).

Dentre as espécies de *Lactobacillus* spp., quatro foram identificadas no queijo Minas artesanal da região de Araxá, *L. brevis*, *L. casei*, *L. plantarum* e *L. rhamnosus* sendo que as duas últimas apresentaram maior frequência de identificação, com 18% cada uma. *L. casei*, *L. plantarum* e *L.*

rhamnosus são comumente identificados em queijo Minas artesanal (RESENDE, 2011; CASTRO, 2015; SANT'ANNA, 2015) e outros queijos artesanais no Brasil e de outros países (OUADGHIRI et al., 2005; BELLETTI et al., 2009; DELAMARE et al., 2012). Todas as quatro espécies identificadas são consideradas culturas de BAL não *starter* altamente desejáveis na elaboração de queijos, pois auxiliam na acidificação e desenvolvimento de características sensoriais durante a maturação (HOLZAPFEL et al., 2001; WOUTERS et al. 2002).

Os resultados do sequenciamento do gene 16S rDNA indicaram que 20 amostras de *Lactobacillus* spp. necessitavam ser submetidas à PCR espécie-específica para diferenciação entre os grupos *L. casei* (11 amostras) e *L. plantarum* (9 amostras), pois apresentavam altos níveis de similaridade (94,5-99%) entre duas ou mais espécies de cada grupo. Há consenso, na literatura, de que as espécies constituintes de cada um desses dois grupos apresentam uma similaridade filogenética que varia de 65 a mais de 99%, tornando sua identificação pelo sequenciamento não conclusiva em alguns casos (COLLINS et al., 1989; EISEN, 1995; KLIJN et al., 1991). Com isso, a amplificação da região VI do gene 16S rRNA para o grupo *L. casei*, e do gene *recA* para o grupo *L. plantarum*, propostas por Ward e Timmins (1999) e por Torriani et al. (2001) respectivamente, são as metodologias mais confiáveis para identificação desses micro-organismos, pois geram *amplicons* em pares de base específicos para cada espécie.

Os dados obtidos na literatura consultada indicam que esta é a terceira identificação de *L. brevis* em queijo Minas artesanal. Os relatos anteriores foram descritos por Borelli (2006), em queijo Minas artesanal da Serra da Canastra, e por Sant'anna (2015), em queijo Minas artesanal da região de Campos das Vertentes. Segundo Guarneri et al. (2001), *L. brevis* é encontrado em bebidas fermentadas, massas, silagem, olivas verdes fermentadas, leite e queijos. Essa espécie faz parte do grupo III de *Lactobacillus* spp., os heterofermentativos obrigatórios, tendo como principais produtos do seu processo fermentativo ácido lático, CO₂, acetato/etanol, contribuindo para o sabor dos produtos fermentados. Além do uso tecnológico, algumas amostras de *L. brevis* têm demonstrado potencial probiótico, como forte atividade antimutagênica, de acordo com o relatado por Park et al. (1998).

Em 13 amostras de *Lactobacillus* spp., apesar da repetição do processo de amplificação e sequenciamento, não foi possível a identificação ao nível de espécie. O sequenciamento dessas amostras indicou similaridade entre duas ou mais espécies do gênero *Lactobacillus* spp. Dessas, quatro chamaram a atenção, pois apresentaram duplicidade de resultados com bactérias nunca relatadas em queijo Minas artesanal. Uma apresentou similaridade com *L. pentosus*, *L. plantarum* e *L. xiangfangensis*, a segunda com *L. fabifermentans* e *plantarum*, a terceira e a quarta apresentaram similaridade com *L. brevis* e *L. zymae*. De acordo com Gu et al. (2012), as espécies *L. fabifermentans*, *L. pentosus*, *L. plantarum* e *L. xiangfangensis* pertencem ao grupo *L. plantarum* apresentando, entre si, similaridade filogenética de 98,5-98,8%. Da mesma forma, as espécies *L. brevis* e *L. zymae* apresentam similaridade genética entre 85-99% (VANCANNEYT et al, 2006, PARK et al., 2014). Esses altos graus de similaridade podem estar diretamente relacionados com os resultados inconclusivos no sequenciamento do gene 16S rDNA verificados neste trabalho, sendo necessários estudos mais aprofundados para real identificação das amostras em questão.

O segundo gênero de BAL identificado no queijo Minas artesanal da região de Araxá foi *Enterococcus* spp. Esse gênero já foi identificado no queijo Minas artesanal produzido nas

regiões de Campo das Vertentes, Serra da Canastra e Serra do Salitre, indicando ampla distribuição pelo estado de Minas Gerais (LIMA et al., 2009; RESENDE et al., 2011; CASTRO, 2015). *Enterococcus* spp. também estão presentes em queijos artesanais produzidos em outras partes do mundo como Europa, Marrocos, Turquia e outros estados brasileiros (COGAN e tal., 1997; BULUT et al., 2005; OUADGHIRI et al., 2005; DELAMARE et al., 2012). Esse gênero de BAL é composto por mais de 40 espécies, que estão associadas a uma série de *habitats* como solo, plantas, água, trato gastrointestinal de humanos e animais, rumem, silagem e alimentos (LATHINEN et al., 2012; SANTOS, 2012).

Enterococcus spp. são amplamente utilizados na elaboração de produtos cárneos e lácteos fermentados, como queijo. Em lácteos está presente principalmente em leites fermentados conferindo sabor e textura peculiares nesses produtos. A associação de *Enterococcus* spp. com outras BAL, como aquelas do gênero *Lactobacillus*, produz acidez que contribui, dentre outros, para o sabor do produto (AO et al., 2012). Além disso, algumas amostras de *Enterococcus* spp. têm demonstrado atividade probiótica, como efeito antagonista contra alguns patógenos como *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* enteroagregativa e coliformes (BHARDWAJ et al., 2010; MIYAZAKI et al., 2010). Segundo Foulquie et al. (2006), o antagonismo de amostras de *Enterococcus* spp. contra patógenos está relacionado a sua capacidade de produzir bacteriocinas cujas as funções são atividade bactericida e preservação dos produtos lácteos.

Porém, o fato de o trato intestinal de seres humanos ser considerado como *habitat* dessas bactérias, torna a presença de *Enterococcus* spp. um indicador de saneamento. Segundo Jay, (2005) quanto menor o nível de saneamento básico, mais precárias são as condições higiênico-sanitárias, resultando em maior probabilidade de contaminação por micro-organismos do gênero *Enterococcus*. De acordo com Hutkins (2006), a identificação desses micro-organismos em alimentos é muitas vezes indesejável, pois eles são utilizados como indicadores de contaminação fecal.

O uso de *Enterococcus* spp. em alimentos é bastante discutido, pois algumas amostras são consideradas patogênicas, podendo causar infecções em animais e humanos. Nos ruminantes, *Enterococcus* spp. pode ser agente causador da mastite e, em humanos é comumente relacionado a casos de infecções do trato urinário como cistite, urolitíase, prostatite que, em sua maioria, são transmitidas por meio de relações sexuais, além de infecções associadas ao uso de cateter (QUINN, et al., 1999; SCHAECHTER, 2006). Em alguns países, a utilização de *Enterococcus* spp. como probiótico é questionada devido a aspectos de segurança nos alimentos e ao risco de transferência de genes de resistência a antimicrobianos, como a vancomicina (LJUNGH e WADSTROM, 2006). Segundo Lee e Salminen (2009), tal resistência associada ao potencial de produção de toxinas e fatores de virulência, presentes em algumas amostras de *Enterococcus* spp. pode causar sérias infecções em humanos.

Enterococcus faecalis foi identificado em 12% das amostras de BAL no queijo Minas artesanal da região de Araxá. A presença dessa espécie em queijos não é desejável, pois compõe a microbiota intestinal de mamíferos e aves, e sua presença pode indicar falhas nas condições higiênico-sanitárias durante a elaboração do produto. Além disso, *E. faecalis* possui grande importância para a saúde pública, visto que o primeiro conjugado de plasmídeo em uma bactéria Gram positivo foi identificado nessa espécie. Esse conjugado possuía genes de resistência à vancomicina (SCHAECHTER, 2006).

Atualmente, amostras de *Enterococos* Resistentes a Vancomicina (VRE) são frequentemente associadas a infecções hospitalares. Diversos surtos de VRE foram relatados em vários países como Brasil, China, Coréia do Sul e França (PALAZZO et al., 2011; LIU et al., 2012; PARK et al. 2012). Em queijos, também já foram identificadas amostras de VRE. *E. faecalis* e *E. faecium* são as espécies que apresentam maior frequência de resistência a vancomicina. Esses relatos científicos servem de alerta para as autoridades de saúde pública devido ao risco de transmissão de genes de resistência via alimento (GIRAFFA et al., 2000; TOGAY et al., 2010).

Uma amostra foi identificada como *Enterococcus rivorum*. Não foram encontrados, na literatura consultada, relatos da presença dessa espécie em queijos, sugerindo que este seja o primeiro relato nesse produto. Niemi et al. (2012) realizaram o primeiro isolamento e identificação dessa espécie, a partir de amostras de água de rios na Finlândia. Segundo os autores, a espécie faz parte do mesmo grupo genético que *E. faecalis* e sua identificação pode ser realizada a partir do sequenciamento do gene 16S rDNA. *E. rivorum* é Gram positivo, não formador de esporos, anaeróbico facultativo e catalase negativo, tolerando 60°C por 30 minutos, tendo como temperatura ótima de crescimento a faixa de 35-37°C. Contudo, são necessários estudos mais aprofundados para melhor caracterização do micro-organismo, bem como, dos atributos que pode conferir ao queijo.

Bacillus cereus foi identificado em uma amostra. Possivelmente, este é o primeiro relato em queijo Minas artesanal, uma vez que, não foram encontrados trabalhos, na literatura consultada, que tenham identificado esse patógeno nesse produto. A presença desse micro-organismo em queijos é totalmente indesejável, pois são considerados um dos principais micro-organismos formadores de esporos (MORADI-KHATOONABADI et al., 2014). A presença de *B. cereus* em queijo pode resultar em sérios problemas na indústria de lácteos, pois esse micro-organismo sobrevive à pasteurização e, quando submetido a altas temperaturas, pode produzir enterotoxinas (TE GIFFEL, 2003; JAY, 2005). A ingestão de alimentos contendo toxinas elaboradas por *B. cereus* pode desencadear quadros graves de intoxicação alimentar, caracterizado principalmente por vômitos e diarreia (VIEIRA et al., 2008).

5.2. Propriedades probióticas *in vitro*

A partir dos resultados da identificação molecular, foi selecionada uma amostra de *Lactobacillus* spp., isoladas de queijos nos diferentes períodos de maturação, em cinco das seis propriedades (na sexta propriedade não foram identificadas amostras pertencentes ao gênero *Lactobacillus* spp.) participantes do trabalho desenvolvido por Sales (2015). Nasquelas propriedades em que foram identificadas mais de uma espécie de bactérias do gênero *Lactobacillus*, foi selecionada uma amostra de cada espécie, totalizando dez amostras que foram submetidas à avaliação de seu potencial probiótico (tabela 3).

Tabela 3. Caracterização das amostras de *Lactobacillus* spp. segundo a propriedade de origem e o período de maturação dos queijos Minas artesanais de Araxá coletados durante as épocas de chuva e seca

Amostra de <i>Lactobacillus</i> spp.	Propriedade	Município	Tempo de maturação do queijo (dias)	Época do ano
<i>L. rhamnosus</i> A1	A	Campos Altos	7	Chuva
<i>L. brevis</i> A6	A	Campos Altos	57	Chuva
<i>L. brevis</i> B16	B	Araxá	57	Chuva
<i>L. casei</i> B5	B	Araxá	43	Chuva
<i>L. plantarum</i> B206	B	Araxá	57	Seca
<i>L. plantarum</i> C0	C	Ibiá	0	Chuva
<i>L. rhamnosus</i> C5	C	Ibiá	43	Seca
<i>L. plantarum</i> D4	D	Tapira	22	Chuva
<i>L. plantarum</i> E5	E	Sacramento	43	Chuva
<i>L. brevis</i> E35	E	Sacramento	43	Chuva

5.2.1. Análise Susceptibilidade a antimicrobianos

Os resultados do teste de susceptibilidade a antimicrobianos de amostras de *Lactobacillus* spp. identificadas de queijo Minas artesanal da região de Araxá podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de amostras de *Lactobacillus* spp. identificadas de queijo Minas artesanal de Araxá, coletados durante as épocas de chuva e seca, ao longo da maturação, em teste de difusão em ágar MRS

Amostras	Antimicrobianos									
	GN	OX	VA	S	TE	CAZ	PEN	DA	CIP	E
<i>L. rhamnosus</i> A1	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S
<i>L. brevis</i> A6	S	R	R	S	S	S	S	S	MS	S
<i>L. brevis</i> B16	S	R	R	R	MS	MS	MS	R	R	S
<i>L. casei</i> B5	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R
<i>L. plantarum</i> B206	R	R	R	R	S	MS	S	S	MS	S
<i>L. plantarum</i> C0	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>L. rhamnosus</i> C5	R	R	R	R	S	R	S	S	MS	S
<i>L. plantarum</i> D4	S	R	S	MS	MS	R	S	MS	S	S
<i>L. plantarum</i> E5	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R
<i>L. brevis</i> E35	S	R	R	R	S	MS	MS	R	R	S

Legenda: ceftazidime (CAZ), clindamicina (DA), ciprofloxacina (CIP), eritromicina (E), gentamicina (GN), oxacilina (OX), penicilina (PEN), estreptomicina (S), tetraciclina (TE), vancomicina (VA). R – resistência/ M.S – moderada susceptibilidade/ S – susceptibilidade, segundo Charteris et al. (1998).

De acordo com os valores médios dos halos de inibição, apenas *L. plantarum* C0 foi sensível a todos os antimicrobianos testados. As demais amostras de *Lactobacillus* spp. foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. Os resultados do presente trabalho diferem de outros relatos (COSTA et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; SANT'ANNA, 2015) que avaliaram a susceptibilidade a antimicrobianos de BAL isoladas de queijo Minas artesanal, produzido nas regiões de Campos das Vertentes e da Serra da Canastras, onde não foram encontradas amostras sensíveis a todas as drogas testadas, tornando o resultado de *L. plantarum* C0 inédito. Segundo Souza (2006), a sensibilidade a todos os antimicrobianos testados é uma característica ideal e

desejável de um micro-organismo candidato a probiótico, pois diminui o risco de introdução de elementos que conferem a resistência em um ecossistema novo, no caso o trato gastrointestinal do consumidor. Entretanto, a amostra *L. plantarum* E5 apresentou uma elevada porcentagem de resistência aos antimicrobianos, 60% (6/10), sendo esta a maior frequência de resistência observada entre as amostras testadas. A resistência de BAL isoladas de alimentos de origem animal a múltiplos antimicrobianos é cada vez mais relatada na literatura científica. Existe uma grande preocupação no que diz respeito à aquisição de resistência não intrínseca a certos antimicrobianos por essas bactérias e, principalmente, com relação à transmissão dessa resistência a micro-organismos patogênicos.

Os maiores percentuais de sensibilidade a antimicrobianos das amostras testadas foram verificados em relação à eritromicina, penicilina e tetraciclina, todos com 80% (8/10). Com exceção da penicilina, os resultados encontrados para os outros dois antimicrobianos corroboram com os relatados por Costa et al. (2013), Andrade et al. (2014) e Sant'anna (2015), que avaliaram a susceptibilidade a antimicrobianos de BAL isoladas de queijo Minas artesanal, produzido nas regiões da Serra da Canastras e de Campos das Vertentes. Em relação à penicilina, os resultados descritos neste trabalho são semelhantes aos relatos descritos por Danielsen e Wind (2003). Segundo esses autores, *Lactobacillus* spp. apresentam sensibilidade a estes e a outros antimicrobianos de uso clínico humano. Porém, 90% (9/10) das BAL foram resistentes à oxacilina. Apenas *L. plantarum* C0 foi sensível a este antimicrobiano, o que pode estar associado a uma resistência intrínseca, conforme relatado por Danielsen e Wind (2003) e por Mathur e Singh (2005).

Alguns autores têm sugerido que os gêneros *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., e *Pediococcus* spp. possuem resistência intrínseca a vancomicina (ELISA e COURVALIN, 1995; TEUBER et al., 1999; OUOBA et al., 2008). Porém, três amostras *L. casei* B5, *L. plantarum* C0 e *L. plantarum* D4 apresentaram sensibilidade ao antimicrobiano, contrariando aos resultados de outros estudos que identificaram 100% de resistência à vancomicina em amostras de BAL isoladas de queijo Minas artesanal (COSTA et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; SANT'ANNA, 2015). Porém, os achados deste estudo reforçam os resultados relatados por Mannu et al. (2003); Herreros et al. (2005), Belletti et al. (2009) e Acúrcio et al. (2014) que identificaram amostras de BAL sensíveis a vancomicina. A partir dos resultados encontrados neste e em outros trabalhos, sugere-se a realização de estudos mais aprofundados que venham contribuir para o real entendimento do mecanismo de resistência das BAL ao antimicrobiano em questão.

Neste contexto, a FAO relata que as informações disponíveis na literatura são insuficientes para detalhar em quais situações ocorrem modificações nos elementos genéticos responsáveis pela resistência, bem como quando ela pode vir a ser um problema clínico para indivíduos que, constantemente, entram em contato com bactérias portadoras de genes de resistência a antimicrobianos. Ainda, segundo a organização, há uma preocupação quanto ao uso, em alimentos, de bactérias probióticas portadoras de genes codificadores de resistência a drogas, não sendo recomendado seu uso. Uma vez que há indícios da existência de plasmídeos que codificam genes de resistência a antimicrobianos em *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., principalmente em amostras obtidas de intestino (FAO, 2001).

5.2.2. Resistência ao suco gástrico artificial e aos sais biliares

A resistência ao suco gástrico e aos sais biliares é considerada um dos critérios mais relevantes para seleção de micro-organismos probióticos, principalmente daqueles que serão administrados pela via oral (OUWEHAND et al., 2009). Segundo a ANVISA (2008), para que um produto seja comercializado no Brasil com a denominação de probiótico, é necessário apresentar resultados que comprovem a resistência da cultura utilizada a essas barreiras naturais (suco gástrico e sais biliares). Considera-se essencial que o micro-organismo apresente uma quantidade de células viáveis suficientes para desempenhar suas funções benéficas ao organismo do consumidor ao atingir o intestino.

Os resultados dos percentuais de inibição, bem como a classificação quando ao nível de tolerância ao suco gástrico artificial (pH 2.0) e aos sais biliares das amostras de *Lactobacillus* spp., isolados de queijo Minas artesanal da região de Araxá, encontram-se descritos na tabela 5.

Tabela 5. Percentual de inibição e classificação quanto ao nível de tolerância ao suco gástrico artificial (pH 2.0) e aos sais biliares de amostras de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo Minas artesanal da região de Araxá, coletados durante as épocas de chuva e seca, ao longo da maturação

Amostra	Percentual de inibição pH 2,0	Percentual de inibição sais biliares 0,3% sais biliares
<i>L. rhamnosus</i> A1	34,93 (T)	70 (MT)
<i>L. brevis</i> A6	-0,38 (T)	36,13 (T)
<i>L. brevis</i> B16	78,15 (MT)	79,95 (MT)
<i>L. casei</i> B5	97,00 (S)	25,40 (T)
<i>L. plantarum</i> B206	27,69 (T)	66,22 (MT)
<i>L. plantarum</i> C0	75,84 (MT)	78,21 (MT)
<i>L. rhamnosus</i> C5	73,60 (MT)	61,16 (MT)
<i>L. plantarum</i> D4	34,81 (T)	64,68 (MT)
<i>L. plantarum</i> E5	6,39 (T)	20,69 (T)
<i>L. brevis</i> E35	9,42 (T)	53,31 (MT)

Legenda: Tolerante (T); Moderadamente tolerante (MT); Sensível (S), segundo critérios propostos por ACÚRCIO et al. (2014).

Na tabela é possível observar que 60% (6/10) das amostras foram tolerantes, 30% (3/10) foram moderadamente tolerantes e 10% (1/10) foram sensíveis ao suco gástrico artificial. Os resultados descritos neste estudo são bastante relevantes, pois apenas uma amostra de *Lactobacillus* spp. foi sensível ao suco gástrico. Além disso, *L. brevis* A6 apresentou a melhor tolerância às condições ácidas, comparando-se todos os *Lactobacillus* spp. testados. Resultados semelhantes foram descritos por Costa (2013); Andrade (2014) e Sant'anna (2015), sendo que 100% das amostras de *Lactobacillus* spp. isoladas de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra e de Campos das Vertentes, foram resistentes ao suco gástrico e, nos dois últimos estudos, também foram observadas amostras com crescimento microbiano.

A resistência de *Lactobacillus* spp. ao pH ácido é uma característica comum desse gênero. Segundo Jay (2005), algumas espécies de *Lactobacillus* spp. apresentam crescimento em meio ácido, a exemplo de *L. brevis*, que é capaz de crescer em pH de 3,16. E, de acordo com Dunne et al. (1999), essa resistência a acidez é potencializada nas amostras probióticas que, de modo

geral, são mais resistentes ao pH ácido quando comparadas com amostras probióticas de micro-organismos de outros gêneros. A hipótese levantada pelos autores pode explicar o percentual de inibição negativo encontrado em *L. brevis* A6.

De certa forma, a resistência das amostras utilizadas neste estudo era esperada, pois são provenientes de um ambiente em que a acidez é predominante. Para Resende et al. (2011), em todo o processo de produção de queijos, o pH baixo é frequente, com isso é esperado que os micro-organismos presentes sejam adaptados às condições de estresse gerado pela elevada acidez.

Em relação à resistência aos sais biliares, possível determinar que 30% (3/10) das amostras eram tolerantes aos sais biliares e 70% (7/10) eram moderadamente tolerantes, como descrito na tabela 5. Nenhuma das amostras foi considerada sensível. *L. plantarum* E5 apresentou o menor percentual de inibição aos sais biliares, com 20,69%, enquanto que *L. brevis* B16 foi a amostra com maior porcentagem de inibição (79,95%).

Os níveis de resistência aos sais biliares encontrados nas amostras de *Lactobacillus* spp., identificadas em queijo Minas artesanal A da região de Araxá, são inferiores aos relatados por Andrade et al. (2014) e Sant'anna (2015). Os autores supramencionados descreveram percentuais de resistência aos sais biliares em 100% das amostras de BAL isoladas de queijo Minas artesanal produzido nas regiões da Serra da Canastra e Campos das Vertentes, respectivamente. Além disso, os autores relatam que alguns micro-organismos apresentaram percentuais negativos de inibição. Porém, os resultados deste trabalho são superiores aos descritos por Costa et al. (2013) que relataram grande variação nos níveis de resistência (14,82-89,73) aos sais biliares, com identificação de amostras sensíveis em BAL provenientes de queijo Minas artesanal da Serra da Canastra.

Na literatura consultada é possível observar grande variabilidade em relação à resistência aos sais biliares de amostras de BAL oriundos das mais diversas fontes como leite de ovelha, fezes de cães, mucosas de suínos, entre outros. Em um mesmo estudo são observadas amostras tolerantes, moderadamente tolerantes e sensíveis nos mais diversos percentuais, indicando que BAL provenientes de uma fonte em comum apresentam comportamento diverso no teste (ALVIM, 2011; SANDES, 2013; SILVA et al., 2013; ACURCIO et al., 2014).

O fato de a amostra *L. plantarum* E5 ter apresentado o menor percentual de inibição dentre as amostras testadas é corroborado pelos resultados descritos por Costa et al. (2013), Andrade et al. (2014) e Sant'anna (2015), que encontraram resultados semelhantes de inibição aos sais biliares em amostras da mesma espécie. Entretanto, não se pode estabelecer uma correlação entre *L. plantarum* e a resistência aos sais biliares, pois outras amostras da mesma espécie apresentaram resultados bem diversos, conforme observado na tabela 6. Segundo Ruiz-Moyano et al. (2008), os resultados de BAL frente ao teste de resistência aos sais biliares é dependente da linhagem e não da espécie de origem do micro-organismo.

Mesmo com a grande variabilidade nos níveis de resistência aos sais biliares, os resultados obtidos foram satisfatórios, pois nenhuma amostra foi classificada como sensível. É importante ressaltar que os sais biliares são importantes na eliminação de bactérias patogênicas devido a sua ação detergente sobre a parede plasmática desses micro-organismos; porém, esse processo

não é seletivo e também afeta as bactérias probióticas. Ainda não se sabe, ao certo, os mecanismos que estão envolvidos na resistência dos probióticos aos sais biliares. Acredita-se que há participação de uma enzima hidrolase que os desconjuga, impedindo a ação detergente dos sais, além de outros mecanismos que ainda não foram estudados (VINDEROLA e REINHEIMER, 2003).

5.2.3. Produção de peróxido de hidrogênio

A produção de peróxido de hidrogênio por amostras de *Lactobacillus* spp. tem sido indicada como um importante mecanismo antimicrobiano, devido ao seu papel antagonista contra patógenos, como *Salmonella* spp. (LEBEER et al., 2008; PREDMORE et al., 2008). Amostras de *Lactobacillus* spp. produtoras de peróxido são frequentemente isoladas da vagina de mulheres saudáveis (VALLOR et al., 2001, SERVIN, 2004). Estima-se que 94-95% das amostras de *L. crispatus* e *L. jensenii*, espécies mais frequentes na mucosa vaginal, sejam produtoras de peróxido (ANTONIO et al., 1999).

No presente estudo, de todas as amostras testadas apenas, *L. brevis* E35 produziu peróxido (10%), sendo classificado como de baixa produção (+). Resultado semelhante foi descrito por Sant'anna (2015), que relatou apenas uma amostra de *Lactobacillus* spp. produtora de peróxido, com média produção. Segundo o autor, essa avaliação pode constituir uma etapa importante do processo de seleção, uma vez que a atividade antagonista de determinado isolado pode ser exercida pela produção de peróxido de hidrogênio. Estudos realizados com BAL isoladas de outras fontes, como as mucosas orais e intestinais de bovinos, encontraram percentuais variáveis (8-92,8%) de bactérias produtoras de peróxido, indicando que o *habitat* do micro-organismo pode influenciar a incidência de amostras produtoras da substância (SANDES, 2013; SILVA et al., 2013).

5.2.4. Teste de antagonismo “spot on the lawn”

Na tabela 7 é possível observar os resultados do teste de antagonismo “spot on the lawn” das amostras de *Lactobacillus* spp. isoladas de queijo Minas artesanal da região de Araxá contra bactérias reveladoras e a comparação das médias dos halos de inibição pelo teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

Tabela 6. Médias dos halos de inibição (em mm) de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo Minas artesanal de Araxá, coletados durante as épocas de chuva e seca, ao longo da maturação, contra bactérias reveladoras

Amostras	Bactérias reveladoras							
	EC	EF	LM	ST	SF	SA	LP C24	LR A23
LR A1	57,13	28,86 ^a	24,57	46,68	43,52	31,11	28,20 ^{a, b}	0,00
LB A6	45,59	6,27 ^{b, c}	22,68	51,92	49,00	36,96	27,80 ^{a, b}	0,00
LB B16	42,49	5,79 ^{b, c}	21,93	40,76	51,74	32,74	5,87 ^c	8,96
LC B5	56,28	16,08 ^{a, b, c}	4,51	25,82	25,14	0,00	20,60 ^{b, c}	0,00
LP B206	34,08	26,76 ^{a, b}	26,02	44,74	50,22	32,67	26,12 ^{a, b, c}	0,00
LP C0	17,11	0,00 ^c	24,70	33,72	9,82	4,21	17,91 ^{a, b, c}	0,00
LR C5	52,00	26,86 ^{a, b}	25,21	44,64	45,98	28,47	29,14 ^a	0,00
LP D4	21,63	0,00 ^c	6,72	0,00	23,80	0,00	0,00 ^c	0,00
LP E5	55,80	17,73 ^{a, b, c}	18,13	28,24	29,57	0,00	23,55 ^{a, b, c}	0,00
LB E35	45,06	5,85 ^{b, c}	22,73	42,80	47,64	28,87	23,15 ^{a, b, c}	0,00

Legenda: Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna indicam resultados diferentes pelo teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$). EC – *Escherichia coli* ATCC 25922; EF – *Enterococcus faecalis* ATCC 19433; LM – *Listeria monocytogenes* ATCC 15313; ST – *Salmonella enterica* var. Typhimurium ATCC 14028; SF – *Shigella flexneri* ATCC 25875; SA – *Staphylococcus aureus* N315, LB-*Lactobacillus brevis*, LC-*Lactobacillus casei*, LP-*Lactobacillus plantarum*, LR-*Lactobacillus rhamnosus*.

A análise estatística indicou variação relevante entre as médias dos halos de inibição de *Lactobacillus* spp. contra duas bactérias reveladoras, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 e *Lactobacillus plantarum* C24. De acordo com o teste estatístico utilizado, *E. faecalis* ATCC 19433 foi mais inibido por *L. rhamnosus* A1 que por *L. plantarum* C0 e D4. Enquanto que *L. plantarum* C24 foi mais inibido por *L. rhamnosus* C5 que por *L. plantarum* D4 e *L. brevis* B16. Os resultados indicam que houve diferença ($p < 0,05$) no comportamento antagonista de *Lactobacillus* spp. contra outras BAL, pois apesar de ser um patógeno emergente e ter seu uso em alimentos questionado, *E. faecalis* também compõe esse grupo. Resultados semelhantes foram relatados por Alexandre et al. (2002), Guedes Neto et al. (2005) e Andrade et al. (2014), que observaram atividade antagonista de BAL isoladas de queijo Minas artesanal do Serro, queijo de coalho e queijo Minas artesanal da Serra Canastra, respectivamente.

O ideal seria que BAL não interferissem na atividade de outras bactérias desejáveis do mesmo grupo. Mas os resultados encontrados neste e em outros trabalhos, citados anteriormente, indicam que o antagonismo entre elas é frequente, apesar de não se saber ao certo quais os mecanismos envolvidos nesse antagonismo (ALEXANDRE et al., 2002; GUEDES NETO et al., 2005 e ANDRADE et al., 2014). Caso essas amostras estivessem sendo selecionados para utilização em alimentos fermentados com a utilização de culturas mistas, o uso de *L. plantarum* D4 seria recomendado, pois foi a amostra que apresentou menor atividade antagonista ($p \leq 0,05$) contra outras BAL.

Também foi possível observar que, dentre as amostras, *L. brevis* B16 foi o único micro-organismo que apresentou halos de inibição contra *L. rhamnosus* A23. Porém, como não houve diferença ($p \leq 0,05$) entre as médias ambas poderiam ser utilizadas em associação com outras BAL, pois provavelmente não interferem no desempenho de suas funções (COSTA et al., 2013). Como observado na tabela 7, todas as amostras de *Lactobacillus* spp., apresentaram halos de inibição contra as bactérias patogênicas *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli*

ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313; *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Shigella flexneri* ATCC 25875 e *Staphylococcus aureus* N315. Exceto *L. plantarum* CO e D4, que não apresentaram halos de inibição contra *E. faecalis* ATCC 19433. *L. plantarum* D4 também não apresentou halos contra *Staphylococcus aureus* N315 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. *L. casei* B5 e *L. plantarum* E5 que não apresentaram halos contra *S. aureus* N315. Embora tenham ocorrido exceções, os resultados indicam ampla atividade antagonista das amostras e são semelhantes às observações descritas em outros trabalhos que demonstraram inibição de BAL isoladas de leite e queijos artesanais contra amostras bacterianas de referência (GUEDES NETO et al., 2005; CASTILHO et al., 2013; COSTA et al., 2013; ACURCIO et al., 2014; ANDRADE et al., 2014; SANT'ANNA, 2015).

A ausência de formação de halos de inibição contra *Staphylococcus aureus* N315 por três amostras de *Lactobacillus* spp. (*L. casei* B5, *L. plantarum* D4 e E5), pode estar relacionada com os resultados das análises microbiológicas do queijo Minas artesanal da região de Araxá realizadas por Sales (2015), de onde foram isoladas as BAL utilizadas no presente estudo. Segundo o autor, dentre os micro-organismos patogênicos pesquisados, *Staphylococcus* spp. apresentou as maiores populações, atingindo $3,8 \times 10^7$ UFC/g. Esses valores das contagens de *Staphylococcus* spp. podem estar relacionados com recontaminação dos queijos durante o processo de maturação, decorrente da manipulação que o produto é submetido. Com isso, são necessários estudos mais aprofundados que venham a contribuir no entendimento da relação entre as BAL e o patógeno.

Como mencionando anteriormente, o teste de antagonismo verifica a existência de substâncias inibidoras produzidas pelas BAL. Tais substâncias podem ser bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos voláteis, ácido láctico e acético que são considerados os principais mecanismos antagonista contra patógenos (LEBEER et al., 2008; OELSCHLAEGER, 2010). Na amostra *Lactobacillus brevis* E35 foi identificada a produção de peróxido de hidrogênio, sugerindo que essa substância possa estar envolvida na atividade antagonista verificada. Para as demais amostras não foi possível identificar a(s) substância(s) envolvida(s) na atividade antagonista.

Há grande probabilidade de que as amostras de *Lactobacillus* spp. utilizadas, neste estudo, produzam ácido láctico e que este ácido esteja envolvido na atividade antagonista contra patógenos, desenvolvida por essas bactérias. Tal hipótese decorre do fato dos queijos de onde as amostras foram isoladas serem maturados e, durante o processo de maturação é observada redução no pH, decorrente do metabolismo das BAL com conseqüente produção de ácido láctico. Quando o ácido láctico é produzido por esses micro-organismos, ocorre uma alteração no metabolismo das bactérias sensíveis, podendo resultar em efeito bacteriostático ou bactericida (GRAJEK et al., 2005). Outros estudos que avaliaram a atividade antagonista de BAL isoladas de queijos artesanais também sugeriram que esse ácido possa ser responsável pela inibição de patógenos (COSTA et al., 2013; SANT'ANNA, 2015). Bacteriocinas produzidas pelas BAL também podem ser responsáveis por essa inibição, uma vez que há na literatura estudos que demonstram a atividade antagonista dessas substâncias contra alguns dos micro-organismos (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*), utilizados como reveladores no teste de antagonismo “spot on the lawn” (JAMUNA et al., 2005; GARCIA, 2006; TODOROV e DICKS, 2007; TODOROV, 2009).

A partir dos resultados é possível inferir que as amostras *L. rhamnosus* A1, por ter apresentado maior atividade antagonista contra *E. faecalis* ATCC 19433. *L. brevis* A6 e B16, *L. plantarum* B206 e *L. brevis* E35 por terem apresentado halos de inibição contra patógenos, além de pouca ou nula atividade antagonista contra *Lactobacillus* spp. isolados dos mesmos queijos foram os micro-organismos que apresentaram os melhores resultados no teste de antagonismo “spot on the lawn”.

5.2.5. Antagonismo em co-cultivo

Ao contrário do teste de antagonismo “spot on the lawn”, em que não há o contato direto entre as bactérias, além da inativação da cultura produtora pelo clorofórmio, no teste de antagonismo em co-cultivo é avaliado o efeito inibitório da bactéria produtora contra a reveladora. Isso é realizado por meio do cultivo direto de ambas em dois meios distintos, caldos BHI (favorável ao crescimento da cultura reveladora) e MRS (favorável ao crescimento da cultura produtora) com posterior plaqueamento em ágar MacConkey.

Os resultados apresentados nas tabelas 8, 9 e 10 indicam que houve redução nas contagens, com diferença ($p \leq 0,0001$), entre os meios cultura MRS e BHI em todos os antagonismos em co-cultivo de *Lactobacillus* spp. contra as amostras reveladoras (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Shigella flexneri* ATCC 25875). A única exceção foi o antagonismo entre *Lactobacillus plantarum* C0 e *Shigella flexneri* ATCC 25875, embora ter ocorrido redução nas contagens de *S. flexneri* ATCC 25875 não foi verificada diferença ($p \leq 0,0001$).

Tabela 7. Valores médios das contagens (UFC/mL) em ágar MacConkey de *E. coli* ATCC 25922, após cultivo em caldo MRS e BHI com e sem a presença de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo Minas artesanal de Araxá, coletados durante as épocas de chuva e seca, ao longo da maturação

Co-cultivo	MEIO	
	BHI	MRS
EC	1,18 x 10 ^{10a}	3,83 x 10 ^{5b}
A1+ EC	4,25 x 10 ^{9a}	-- ^b
A6+ EC	3,25 x 10 ^{9a}	-- ^b
B16+ EC	2,49 x 10 ^{9a}	8,83 x 10 ^{5b}
B5+ EC	5,42 x 10 ^{9a}	0,33 x 10 ^{5b}
B206+ EC	7,50 x 10 ^{9a}	-- ^b
C0+ EC	6,5 x 10 ^{10a}	3 x 10 ^{6b}
C5+ EC	5,16 x 10 ^{9a}	-- ^b
D4+ EC	9,17 x 10 ^{9a}	1,33 x 10 ^{5b}
E5+ EC	1,16 x 10 ^{9a}	1 x 10 ^{5b}
E35+ EC	1 x 10 ^{9b}	1,78 x 10 ^{6b}

Legenda: letras distintas na mesma linha indicam resultados diferentes pelo teste de Friedman ($p \leq 0,0001$). EC – *Escherichia coli* ATCC 25922; A1 - *Lactobacillus rhamnosus*, A6 - *Lactobacillus brevis*, B16 - *Lactobacillus brevis*, B5 - *Lactobacillus casei*, B206 - *Lactobacillus plantarum*, C0 - *Lactobacillus plantarum*, C5 - *Lactobacillus rhamnosus*, D4 - *Lactobacillus plantarum*, E5 - *Lactobacillus plantarum*, E35 - *Lactobacillus brevis*.

Tabela 8. Valores médios das contagens (UFC/mL) em ágar MacConkey de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, após cultivo em caldo MRS e BHI com e sem a presença de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo Minas artesanal de Araxá, coletados durante as épocas de chuva e seca, ao longo da maturação

Co-cultivo	MEIO	
	BHI	MRS
ST	1,11 x 10 ^{10a}	0,5 x 10 ^{5b}
A1+ST	1,54 x 10 ^{10a}	-- ^b
A6+ST	6,25 x 10 ^{9a}	-- ^b
B16+ST	1,3 x 10 ^{10a}	-- ^b
B5+ST	9,58 x 10 ^{9a}	0,5 x 10 ^{5b}
B206+ST	7,50 x 10 ^{9a}	-- ^b
C0+ST	1,17 x 10 ^{10a}	1 x 10 ^{5b}
C5+ST	1,39 x 10 ^{10a}	-- ^b
D4+ST	3,59 x 10 ^{9a}	0,33 x 10 ^{5b}
E5+ST	1,3 x 10 ^{10a}	1 x 10 ^{5b}
E35+ST	7,41 x 10 ^{9a}	-- ^b

Legenda: letras distintas na mesma linha indicam resultados estatisticamente diferentes pelo teste de Friedman ($p \leq 0,0001$). ST - *Salmonella enterica* var. Typhimurium ATCC 14028; A1 - *Lactobacillus rhamnosus*; A6 - *Lactobacillus brevis*; B16 - *Lactobacillus brevis*; B5 - *Lactobacillus casei*; B206 - *Lactobacillus plantarum*; C0 - *Lactobacillus plantarum*; C5 - *Lactobacillus rhamnosus*; D4 - *Lactobacillus plantarum*; E5 - *Lactobacillus plantarum*; E35 - *Lactobacillus brevis*.

Tabela 9. Valores médios das contagens (UFC/mL) em ágar MacConkey de *Shigella flexneri* ATCC 25875, após cultivo em caldo MRS e BHI com e sem a presença de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo Minas artesanal de Araxá, coletados durante as épocas de chuva e seca, ao longo da maturação

Co-cultivo	MEIO	
	BHI	MRS
SF	4 x 10 ^{9a}	1,66 x 10 ^{5b}
A1+ SF	9,16 x 10 ^{9a}	-- ^b
A6+ SF	5,25 x 10 ^{9a}	-- ^b
B16+ SF	1 x 10 ^{10a}	-- ^b
B5+ SF	1 x 10 ^{10a}	-- ^b
B206+ SF	5 x 10 ^{9a}	-- ^b
C0+ SF	3,92 x 10 ⁹	1,50 x 10 ⁵
C5+ SF	6,58 x 10 ^{9a}	-- ^b
D4+ SF	1,4 x 10 ^{9a}	-- ^b
E5+ SF	5,50 x 10 ^{9a}	-- ^b
E35+ SF	9,33 x 10 ^{9a}	0,17 x 10 ^{5b}

Legenda: letras distintas na mesma linha indicam resultados estatisticamente diferentes pelo teste de Friedman ($p \leq 0,0001$). SF - *Shigella flexneri* ATCC 25875; A1 - *Lactobacillus rhamnosus*, A6 - *Lactobacillus brevis*, B16 - *Lactobacillus brevis*, B5 - *Lactobacillus casei*, B206 - *Lactobacillus plantarum*, C0 - *Lactobacillus plantarum*, C5 - *Lactobacillus rhamnosus*, D4 - *Lactobacillus plantarum*, E5 - *Lactobacillus plantarum*, E35 - *Lactobacillus brevis*.

Também foi observada diferença ($p \leq 0,0001$) entre as contagens das bactérias reveladoras, nos dois meios de cultura, mesmo quando elas não foram desafiadas contra *Lactobacillus* spp. A diminuição nas contagens no meio MRS em relação ao BHI pode estar relacionada à constituição de ambos. Uma vez que o MRS favorece o crescimento de BAL, pois apresenta na sua constituição nutrientes como aminoácidos, vitaminas do complexo B e bases purinas e pirimidinas essenciais para o crescimento desses micro-organismo, que não são encontrados na constituição do BHI (JAY, 2005).

Mesmo assim, os resultados demonstram que a queda nas contagens das bactérias reveladoras, no caldo MRS, foi mais acentuada na presença de *Lactobacillus* spp., indicando que a atividade antagonista foi exercida quando o ambiente era favorável ao desenvolvimento dessas bactérias. Resultados semelhantes foram descritos por Sant'anna (2015), que observou queda nas contagens, entre os meios BHI e MRS, das mesmas bactérias reveladoras quando submetidas ao desafio contra amostras de *L. plantarum* e *Pediococcus acidilactici*. Segundo o autor, quando em meio MRS as BAL produzem substâncias capazes de antagonizar as bactérias reveladoras, o que pode ser causado principalmente pela produção de ácidos orgânicos, decorrente da maior capacidade de acidificação do meio MRS. Fenômeno semelhante não seria observado se as bactérias fossem testadas no meio BHI, pois esse meio não possui capacidade de redução do pH. Hutt et al. (2006) observaram atividade antagonista de amostras de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., conhecidos como probióticos, contra *E. coli*, *Salmonella enterica* spp. *enterica* e *Shigella sonnei*. Os autores relatam que a atividade antagonista de BAL é favorecida em meio líquido pela rápida difusão de compostos antimicrobianos, como os ácidos orgânicos. Garcia (2006) também sugeriu que há associação entre a atividade antagonista de *Lactobacillus* spp., com a produção de ácidos orgânicos, resultando em queda no pH do meio onde as bactérias estejam realizando essa atividade.

Apesar de não terem sido realizados testes que verificassem a produção de ácidos orgânicos, há grande possibilidade que esses compostos estejam envolvidos no antagonismo apresentado por *Lactobacillus* spp., pois essas bactérias foram isoladas de queijos artesanais, nos quais participam do processo fermentativo com a degradação da glicose e consequente produção de ácidos orgânicos, como o ácido láctico, podendo promover uma proteção *in situ* no produto contra patógenos (BERESFORD et al., 2001; SETTANI e MOSCHETTI, 2010).

Além disso, foi verificada redução acentuada no pH do meio caldo MRS após o crescimento de todas as amostras de *Lactobacillus* spp. utilizadas neste estudo. Isso demonstra que as bactérias promoveram acidificação no meio, tal resultado pode ser observado na tabela 10. Na mesma tabela é possível observar redução no pH do meio caldo BHI, após o crescimento das bactérias reveladoras patogênicas, porém em valores menos acentuados que os verificados no meio caldo MRS.

Tabela 10. Valores médios de pH após incubação a 37°C por 24h de caldo MRS com e sem inoculação de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo Minas artesanal de Araxá, coletados durante as épocas de chuva e seca, ao longo da maturação e caldo BHI com e sem inoculação de bactérias reveladoras

Amostra	pH do caldo MRS
<i>L. rhamnosus</i> A1	3.86
<i>L. brevis</i> A6	3.83
<i>L. brevis</i> B16	4.15
<i>L. casei</i> B5	4.65
<i>L. plantarum</i> B206	3.72
<i>L. plantarum</i> C0	4.38
<i>L. rhamnosus</i> C5	3.72
<i>L. plantarum</i> D4	3.96
<i>L. plantarum</i> E5	4.62
<i>L. rhamnosus</i> A1	4.74
Controle*	6.24
pH do caldo BHI	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6.73
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	6.76
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 25875	6.77
Controle**	7.25

Legenda: * tubo controle de caldo MRS sem inoculação de micro-organismos; ** tubo controle de caldo BHI sem inoculação de micro-organismos.

Ao comparar os valores do pH do caldo MRS com o resultado da inibição no teste de co-cultivo, foi possível observar que *L. rhamnosus* A1 e C5, *L. brevis* A6 e *L. plantarum* B206 apresentaram os menores valores de pH após o crescimento no caldo MRS. Essas mesmas bactérias inibiram totalmente o crescimento das três bactérias reveladoras. Isso reforça a hipótese de que a produção de ácidos orgânicos esteja diretamente relacionada com o antagonismo dos *Lactobacillus* spp. contra os patógenos. Uma vez que, *E. coli*, *S. Typhimurium* e *S. flexneri* requerem, para seu crescimento, pH mínimo de 4.5, 4.5. e 5.5, respectivamente. (JAY, 2005; CARDOSO e CARVALHO, 2006).

Dentre as amostras utilizadas, *L. rhamnosus* A1 e C5, *L. brevis* A6 e *L. plantarum* B206 apresentaram os melhores resultados, pois inibiram totalmente o crescimento das três bactérias reveladoras; seguidos por *L. brevis* B16 que inibiu totalmente o crescimento de *S. flexneri* ATCC 25875 e *S. Typhimurium* ATCC 14028; *L. casei* B5, *L. plantarum* D4 e *L. plantarum* E5 que inibiram totalmente o crescimento de *S. flexneri* ATCC 25875; *L. brevis* E35 que inibiu totalmente o crescimento de *S. Typhimurium* ATCC 14028 e *L. plantarum* C0 que, mesmo tendo reduzido as contagens das três bactérias reveladoras, não inibiu totalmente o crescimento de nenhuma delas. Em resumo, o teste de antagonismo direto em co-cultivo demonstrou que *Lactobacillus* spp., isolados de queijo Minas artesanal da região de Araxá apresentaram efeito antagonista contra as bactérias reveladoras, quando cultivados em meio favorável ao seu crescimento.

5.2.6. Seleção de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo Minas artesanal da região de Araxá, considerando potencial probiótico *in vitro*

Para avaliação das propriedades probióticas *in vitro*, as dez amostras de *Lactobacillus* spp., isoladas de queijo Minas artesanal da região de Araxá, foram submetidas a seis análises:

susceptibilidade a antimicrobianos, resistência ao suco gástrico artificial e aos sais biliares, produção de peróxido de hidrogênio, antagonismo “*spot on the lawn*” e antagonismo em co-cultivo. A síntese dos resultados está apresentada na tabela 11.

Tabela 11. Síntese dos resultados da caracterização probiótica *in vitro* de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo Minas artesanal da região de Araxá coletados durante as épocas de chuva e seca, ao longo de sessenta dias de maturação

Identificação	RA	SGA	SB	H ₂ O ₂	AS	AC
<i>L. rhamnosus</i> A1	50	34,93	70	-	+	+
<i>L. brevis</i> A6	20	-0,38	36,13	-	+	+
<i>L. brevis</i> B16	50	78,15	79,95	-	+	-
<i>L. casei</i> B5	50	97,00	25,40	-	-	-
<i>L. plantarum</i> B206	40	27,69	66,22	-	+	+
<i>L. plantarum</i> C0	0	75,84	78,21	-	-	-
<i>L. rhamnosus</i> C5	50	73,60	61,16	-	-	+
<i>L. plantarum</i> D4	20	34,81	64,68	-	-	-
<i>L. plantarum</i> E5	60	6,39	20,69	-	-	-
<i>L. brevis</i> E35	50	9,42	53,31	+	+	-

Legenda: RA – Resistência aos antimicrobianos; SGA – Resistência ao suco gástrico artificial; SB – Resistência aos sais biliares; H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio; AS - Antagonismo “*spot on the lawn*”; AC - antagonismo em cocultivo. Valores de RA, SGA e SB estão expressos em porcentagem.

Na tabela 11 é possível observar que 60% das amostras apresentaram elevada resistência a antimicrobianos ($\geq 50\%$). Com isso, as amostras que apresentaram os melhores resultados foram *L. plantarum* C0, *L. brevis* A6, *L. plantarum* B206 e *L. plantarum* D4, com 0, 20, 20 e 40 % de resistência, respectivamente.

Na avaliação de resistência ao suco gástrico artificial, as amostras que apresentaram menores índices de inibição, sendo considerados tolerantes foram *L. rhamnosus* A1, *L. brevis* A6, *L. plantarum* B206, *L. plantarum* D4, *L. plantarum* E5 e *L. brevis* E35. Com destaque para *L. brevis* A6 que apresentou crescimento sob condições de acidez mimetizando o suco gástrico. Em relação à resistência aos sais biliares, *L. brevis* A6, *L. casei* B5 e *L. plantarum* E5 foram consideradas tolerantes, tendo a última apresentado o menor índice de inibição, com 20,69%. Apenas *L. brevis* E35 foi capaz de produzir peróxido de hidrogênio.

No antagonismo “*spot on the lawn*” *L. rhamnosus* A1, por ter apresentado maior atividade antagonista contra *E. faecalis* ATCC 19433; *L. brevis* A6 e B16, *L. plantarum* B206 e *L. brevis* E35 por terem apresentado halos de inibição contra patógenos, além de pouca ou nula atividade antagonista contra *Lactobacillus* spp., isolados dos próprios queijos, foram os micro-organismos que apresentaram os melhores resultados. A partir disso, e para tornar a interpretação didática, receberam o símbolo “+” na tabela 11.

L. rhamnosus A1 e C5, *L. brevis* A6 e *L. plantarum* B206 apresentaram os melhores resultados no antagonismo em co-cultivo, pois inibiram totalmente o crescimento das três bactérias reveladoras no meio MRS. Com isso, essas amostras receberam o símbolo “+” na tabela 11.

A partir da sumarização dos resultados de todos os testes, *L. brevis* A6 demonstrou o melhor potencial probiótico entre as dez amostras testadas, pois apresentou baixa resistência aos

antimicrobianos, tolerância ao suco gástrico artificial e aos sais biliares e antagonismo contra patógenos de referência. *L. brevis* A6 é uma amostra candidata a elaboração de novas culturas lácticas para elaboração de produtos probióticos tanto artesanais quanto industriais, sendo necessário a avaliação de suas propriedades probióticas *in vivo* e testes sensoriais para complementar a caracterização dessa amostra realizada neste trabalho.

6. CONCLUSÕES

Bactérias do gênero *Lactobacillus*, identificadas molecularmente, apresentaram frequência mais elevada dentre as bactérias ácido-láticas isoladas de queijo Minas artesanal da região de Araxá, maturado por até 60 dias, nas épocas de seca e chuva. As espécies *L. plantarum* e *L. rhamnosus* apresentaram as maiores frequências de identificação.

Lactobacillus spp. apresentaram propriedades probióticas *in vitro*, quando submetidos aos testes susceptibilidade a antimicrobianos, resistência ao suco gástrico e aos sais biliares, produção de peróxido de hidrogênio e atividade antagonista.

L. brevis A6 apresentou o melhor potencial probiótico *in vitro* dentre as amostras de *Lactobacillus* spp. testadas. Estudos mais aprofundados para caracterização de propriedades probióticas *in vivo* e análises sensoriais de produtos lácteos fermentados por essa amostra são necessários para possível utilização em produtos com apelo probiótico.

7. REFERÊNCIAS

- ACURCIO, L. B.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C. *et al.* Isolation, enumeration, molecular identification and probiotic potential evaluation of lactic acid bacteria isolated from sheep milk. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 66, n. 3, p. 940-948, 2014.
- ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, M. R. *et al.* Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo de minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.54, p.424-428, 2002.
- ALVIM, L. B. *Identificação molecular e seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico isoladas de diferentes mucosas de suínos*. 2011. 76f. Dissertação (Mestrado em Genética)_Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- ANDRADE, C. R. G.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M. *et al.* Propriedades probióticas *in vitro* de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra – MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 66, n. 5, p.1592-1600, 2014.
- ANTONIO, M. D.; HAWES, S. E.; HILLIER, S. L. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J Infect. Dis.*, v. 180, p.1950–1956, 1999.
- ANTUNES, A. E. C.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I. *et al.* Desenvolvimento de *buttermilk* probiótico. *Cienc. Tec. Alim.*, v. 27, n. 1, p. 83-90, 2007.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. VIII - Lista das alegações aprovadas*. Brasília, 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecnico_lista_alega.htm. Acesso em: 11/03/2014.
- ANZALDÚA-MORALES, A. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. *Zaragoza: Acribia*, p. 198, 1994.
- AO, X.; ZHANG, X.; SHI, L. *et al.* Identification of lactic acid bacteria in traditional fermented yak milk and evaluation of their application in fermented milk products. *J. Dairy Sci.*, v. 95, p. 1073–1084, 2012.
- ARASU, M. V.; AL-DHABI, N. A.; REJINIEMON, T. S. *et al.* Identification and characterization of *Lactobacillus brevis* P68 with antifungal, antioxidant and probiotic Functional Properties. *Indian J. Microbiol.*, v. 55, n. 1, p. 19-28, 2015.
- ARAUJO, E. A.; CARVALHO, A. F.; LEANDRO, E. S.; *et al.* Produção de queijo tipo cottage simbiótico e estudo de sobrevivência das células probióticas quando expostas a diferentes estresses. *Pesq. Agrop. Trop.*, v. 39, n. 2, p. 111-118, 2009.
- ARAUJO, R. A. B. M. *Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros*

físico-químicos e microbiológicos do Queijo Minas Artesanal da região de Araxá. 2004. 136f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)_ Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG..

ASSIS, B. S. *Efeito de Lactobacillus rhamnosus e de Lactococcus lactis isolados de queijo de coalho na viabilidade e produção de enterotoxina B por Staphylococcus aureus FRI-S6 em queijo*. 2010. 30 f. Dissertação (mestrado em Ciência Animal)_ Escola de Veterinária- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

Associação Brasileira da Indústria de Queijos (ABIQ). *Produção brasileira de produtos lácteos e estabelecimentos sob inspeção federal*. Disponível em: http://www.abiq.com.br/abiq_noticias_ler.asp?codigo=861&codigo_categoria=2&codigo_subcategoria=16. Acesso em: 24/11/2015.

BADARÓ, A. C. L.; GUTTIERRES, A. P. M.; REZENDE, A. C. V. *et al.* Alimentos probióticos: Aplicações como promotores da saúde. *Rev. Dig. Nut.*, v. 2, n. 3, p. 1-29, 2008.

BARRETO, G. P. M., SILVA, N., SILVA, E. N. *et al.* Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. *Braz. J. Food Tec.*, v. 6, n. 1, p. 119-126. 2003.

BALLESTEROS, C., POVEDA, J. M., GONZALES-VINAS, M. A. *et al.* Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Con.*, v. 17, p.249–255, 2006.

BEIMFOHR, C.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Rapid genotypic differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies and biovar. *Syst. App. Microb.*, v. 20, n. 2, p. 216-221, 1997.

BELLETTI, N., GATTI, M., BOTTARI, B. *et al.* Antibiotic resistance of Lactobacilli isolated from two Italian hard cheeses. *J. Food Prot.*, v. 72, n. 10, p. 2162-2169, 2009.

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, p. 259–274, 2001.

BHARDWAJ, A.; GUPTA, H.; KAPILA, S. *et al.* Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* KH 24 strain under in vitro and in vivo conditions. *Int. J. Food Microb.*, v. 141, p.156–164, 2010. .

BORELLI, B. M. *Caracterização das bactérias lácticas, leveduras e das populações de Staphylococcus enterotoxigênicos durante a fabricação do queijo Minas curado produzido na Serra da Canastra – MG*. 2006. 120f. Tese (Doutorado em Microbiologia)_Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

BORIS, S.; BARBES, C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal

pathogens. *Microb. Infec.*, v. 2, p. 543–546, 2000.

BRASIL. *Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal*. Decreto nº 30.691 de 29/03/1952. *Publicado no diário oficial da união de 07 de Julho de 1952*.

BULUT, C.; GUNES, H.; OKUKLU, B. *et al.* Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, Comlek peyniri from Cappadocia region. *J. Dairy Res.*, v. 72, p. 19–24, 2005.

CAMARA, S. P. A. *Estudo do potencial bioactivo e tecnológico de bactérias do ácido láctico isoladas de queijo do pico artesanal*. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar)_Universidade dos Açores. 2012.

CARDOSO, T. G.; CARVALHO, V. M. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* spp. *Rev. Inst. Ciênc. Saúde.*, v. 24, n. 2, p. 95-101, 2006.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The acid lactic bacteria: A literature survey. *Crit. Rev. Microb.* v. 28, n. 4, 2002.

CARVALHO, J. D. G. *Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas*. 2007. 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)_Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

CASTILHO, N. P. A.; CUNHA, A. F.; ARAUJO, M. M. P. Qualidade de leites fermentados brasileiros e atividade antagonista *in vitro* de suas bactérias ácido lácticas. *Bol. Ceppa*, v. 31, n. 2, p. 207-214, 2013.

CASTRO, R. D. *Queijo Minas artesanal fresco de produtores não cadastrados da mesorregião de campo das vertentes – mg: qualidade microbiológica e físico-química em diferentes épocas do ano*. 2015. 89-90 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

CHALITA, M. A. N.; SILVA, R. O. P.; PETTI, R. H. V. *et al.* Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no mercado de queijos no brasil. *Inf. Econ.*, v. 39, n. 6, 2009.

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

CHEN, H.; HOOVER, D. G. Bacteriocins and their food applications. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.*, v. 2, p. 81-100. 2003.

CHENG, S.; MCCLESKEY, F. K.; GRESS, M. J. *et al.* A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microb.* v. 35, n. 5, p. 49-56, 1997.

COGAN, T. M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E. *et al.* Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy Products. *J. Dairy Res.*, v. 64, 409-421, 1997.

- COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. O. Selection of probiotic strains for human applications. *Int. Dairy J.*, v.8, p.487-490, 1998.
- COLLINS, M. D.; PHILLIPS, B. A.; ZANONI, P. Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bact.*, v. 39, n. 2, p. 105-108, 1989.
- COSTA, H. H. S.; SOUZA, M. R.; ACURCIO, L. B. *et al.* Potencial probiótico *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-Minas artesanal da Serra da Canastra, MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v.65, n.6, p.1858-1866, 2013.
- DALY, C.; GERALD, F. F.; O'CONNOR, L. *et al.* Technological and health benefits of dairy starter cultures. *Int. Dairy J.*, v.8, p.195-205, 1998.
- DANIELSEN, M.; WIND, A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agentes. *Int. J. Food Microb.*, v.82, p. 1-11, 2003.
- DELAMARE, A. P. L.; ANDRADE, C. C. P.; MANDELLI, F. *et al.* Microbiological, physico-chemical and sensorial characteristics of Serrano, an artisanal Brazilian cheese. *Food Nut. Sci.*, v. 3, p. 1068-1075. 2012.
- DIAS, A. S. G. M. *Potencial probiótico do queijo da ilha de São Jorge e do parmesão*. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar)_Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2012.
- DIAS, J. C. *Uma longa e deliciosa viagem*. Editora Barleus, p. 168, 2010.
- DORES, M. T.; FERREIRA, C. L. L. F. Queijo minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. *Rev. Bras. Agrop. Sust.*, v.2, n.2, p.26-34, 2012.
- DUNNE, C.; MURPHY, L.; FLYNN, S. *et al.* Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Ant. Leeu.*, v.76, p.279-292, 1999.
- EISEN, J. A. The *recA* protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: comparison of trees of *recAs* and 16S rRNAs from the Same Species. *J. Mol. Evol.*, v. 41, p. 1105-1123, 1995.
- ELISA, B. G.; COURVALIN. Analysis of genes encoding D-alanine:D-alanine ligase-related enzymes in *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus* spp. *Gene*, v.152, p. 79-83, 1995.
- EMATER, Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais. *Caracterização da microrregião de Araxá como produtora tradicional de queijo Minas artesanal*. Araxá, MG. 2003. Disponível em http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/queijo_historico/caracteriza%C3%A7%C3%A3o%20arax%C3%A1.pdf. Acesso em 25 de novembro de 2015.

EMATER, Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural de Minas Gerais. *Queijo Minas artesanal-Guia técnico para a implantação de boas práticas de fabricação em unidades de produção de Queijo Minas artesanal*, p. 68, 2009.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Documento 124-Microbiota láctica de queijos artesanais*, p. 9-22, 2009.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. *Produção de queijos probióticos para agregação de valor ao leite caprino*. Documento 83. 2008.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. *WHO- Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food*. London, Ontario, Canada, 2002.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. *Perspectivas dos Alimentos - uma Análise dos Mercados Mundiais (leite e produtos lácteos)*. 2009. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/011/ai474e/ai474e10.htm>. Acesso em: 11/ 03/ 2013.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. *Produção de leite e seus produtos-tipos e características*. Disponível em: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-and-milk-products/types-and-characteristics/en/#.Uxsnuz9dVyw>. Acesso em: 08/03/2014.

FARIA, C. P.; BENEDET, H. D.; GUERROUE, J. Parâmetros de produção de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei*. *Pesq. Agrop. Bras.*, v.41, n.3, p.511-516, 2006.

FELICIO, T. L. Desenvolvimento de tecnologia de queijo minas frescal probiótico, reduzido em sódio adicionado de arginina. 2014. 19f. Dissertação (Mestrado profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos)_Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ.

FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Cur. Iss. in Int. Microb.*, v. 8, p 44 - 61, 2007.

FERREIRA, F. A. B.; KUSSAKAWA, K. C. K. Uso de probióticos na alimentação de frangos de corte. *Biotec. Cienc. & Des.*, v. 38, p. 40-43, 2015.

FOULQUIE, M. R. M.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E. *et al.* The role and application of enterococci in food and health-Review. *Int. J. Food Microb.*, v. 106, p. 1-24, 2006.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M. *et al.* *Fundamentals of cheese science*. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, p. 544, 2000.

FUGELSANG, K. C.; EDWARDS, C. G. Lactic acid bacteria. *Win. Microb. Pract. Applic. Proced.*, v. xx, p. 2-44. 2007.

- FUNCK, G. D.; HERMANN, G.; VICENZI, R. *et al.* Atividade antagonista de bactérias ácido-láticas isoladas de leite *in natura* e queijos artesanais frente a *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium* e *L. monocytogenes*. In: XI ENCONTRO DE PÓS GRADUAÇÃO-UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 2009, Pelotas, RS, *Anais...*
- FURTADO, M. R. R. *Caracterização, histórico, tecnologia de fabricação, características físico-químicas, sensoriais, perfil de textura e de comercialização do queijo reino*. 2008. 8-10 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos)_Universidade Federal de Lavras. Lavras-MG.
- GALLINA, D. A.; ALVES, A. T. S.; TRENTO, F. K. H. S. *et al.* Caracterização de leites fermentados com e sem adição de probióticos e prebióticos e avaliação da viabilidade de bactérias lácticas e probióticas durante a vida-de-prateleira. *UNOPAR Cient. Cien. Biol. Saúde*, v. 13, n.4, p. 239-244, 2011.
- GARCIA, G. R. Inhibition of the growth of pathogenic bacteria by *Lactobacillus acidophilus*. *Rev. Port. Cienc. Vet.*, v. 101, p. 263 - 268, 2006.
- GARDINER, G.; ROSS, R. P.; COLLINS, J. K. *et al.* Development of a probiotic cheddar cheese *paracasei* strains containing human-derived *Lactobacillus*. *Appl. Env. Microb.*, v. 64, n.6, p. 2192-2099, 1998.
- GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2^a edition, Release 5.0, Springer-Verlag, New York. 2004.
- GIRAFFA, G.; OLIVARI, A. M.; NEVIANI, E. Isolation of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from Italian cheeses. *Food Microb.*, v. 17, p. 671-677, 2000.
- GONÇALVES, A. A.; EBERLE, I. R. *Frozen yogurt com bactérias probióticas*. *Alim. Nut.*, v. 19, n. 3, p. 291-297, 2008.
- GRAJEK, W.; OLEJNIK, A.; SIP, A. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *Acta Biochim. Pol.*, v.52, p.665-671, 2005.
- GU, T. C.; WANG, F.; LI, C. Y. *et al.* *Lactobacillus xiangfangensis* sp. nov., isolated from Chinese pickle. *Int. J. Syst. Evol. Microb.*, v. 62, 860-863, 2012.
- GUARNERI, T.; ROSSETTI, L.; GIRAFFA, G. Rapid identification of *Lactobacillus brevis* using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microb.*, v. 33, p. 377-381, 2001.
- GUEDES NETO, L. G.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C. *et al.* Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, supl. 2, p. 245-250, 2005.
- HASSAN, A. N.; FRANK, J. F. Starter cultures and their use. *Applied Dairy Microbiology*, 2^a ed. New York: Marcel Decker, 2001.

HASSANZADAZAR, H.; EHSANI, A.; MARDANI, K.; HESARI, J. Investigation of antibacterial, acid and bile tolerance properties of lactobacilli isolated from Koozeh cheese. *Vet. Res. Forum.*, v. 3, n.3, p. 181-185, 2012.

HERREROS, M. A.; SANDOVAL H.; GONZÁLEZ, L. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). *J. Food Microb.*, v. 22, n. 5, p. 455-459, 2005.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in foods and nutrition. *Americ. J. Clin. Nut.*, v. 73, p.365-373, 2001.

HUTKINS, R. W. *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. 1^a ed. Blackwell Publishing, p. 23, 2006.

HUTT, P.; SHCHEPETOVA, J.; LÕIVUKENE, K.; KULLISAAR, T.; MIKELSAAR, M. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli and bifidobacteria against entero- and uropathogens. *J. Appl. Microb.*, v.100, p.1324-1332, 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção da Pecuária Municipal em 2013*, v. 41, p. 24-25, 2013.

IDF. International Dairy Federation. *Milk and milk products: Enumeration of coliforms- colony count technique and most probable number technique at 30°C*. *Bulletin of the International Dairy Federation*, n.73 A, p.1- 8, 1985.

IDF. International Dairy Federation. *Yogurt: Determination of titratable acidity*. *Bulletin of the International Dairy Federation*, n.150, p. 1-2, 1991.

IDF. International Dairy Federation. *Yogurt: enumeration of characteristics micro-organisms count technique at 37°C*. *Bulletin of the International Dairy Federation*, n.117, p.1-4, 1988.

IKEDA, D. M.; WEINERT JUNIOR, E.; CHANG, K. C. S.; *et al.* Natural Farming: Lactic Acid Bacteria. *College of Tropical Agriculture and Human Resources-University of Hawai'i at Mānoa*. 2013.

IMA, Instituto Mineiro de Agropecuária. *Portaria nº 1022, de 03 de novembro de 2009. Identifica a microrregião do Campo das Vertentes como produtora do Queijo Minas Artesanal*, 2009.

IMA. Instituto Mineiro de Agropecuária. *Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013. Estabelece diretrizes para a produção do queijo minas artesanal*, 2013.

IMA, Instituto Mineiro de Agropecuária. *Portaria nº 1307, de 13 de fevereiro de 2014. Identifica a microrregião do Campo das Vertentes como produtora do queijo Minas Artesanal*, 2014a.

IMA, Instituto Mineiro de Agropecuária. *Portaria nº 1428, de 29 de agosto de 2014. Identifica a microrregião da Serra do Salitre como produtora do queijo Minas Artesanal*, 2014b.

IMA, Instituto Mineiro de Agropecuária. *Portaria nº 1453, de 01 de dezembro de 2014. Identifica a região da Alagoa como produtora de queijo tipo parmesão no modo artesanal*, 2014c.

IMA, Instituto Mineiro de Agropecuária. *Queijo Minas Artesanal*. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/certificacao/queijo-minas-artesanal-link>. Acesso em: 25/11/2015.

IPHAN. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. *Queijo Artesanal de Minas Patrimônio Cultural do Brasil*. p.16-17, 2006.

IPHAN, Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. *Queijo artesanal de Minas vira patrimônio cultural*. Disponível em: <http://portal.iphan.gov.br/portal/montarDetalheConteudo.do?id=13927&sigla=Noticia&retorno=detalheNoticia>. Acesso em: 05/03/2015.

ISLI. International Life Sciences Institute. *Probióticos, prebióticos e a microbiota intestinal*, p. 1-30, 2013.

JACKSON, K. A.; BIGGERSTAFF, M.; TOBIN-D'ANGELO, M. *et al.* Multistate Outbreak of *Listeria monocytogenes* Associated with Mexican-Style Cheese Made from Pasteurized Milk among Pregnant, Hispanic Women. *J. Food Prot.*, v. 74, n. 6, p. 949-953. 2011.

JAMUNA, M.; BABUSHA, S.T.; JEEVARATNAM, K. Inhibitory efficacy of nisin and bacteriocins from *Lactobacillus* isolates against food spoilage and pathogenic organisms in model and food systems. *J. Food Microb.*, v. 22, p. 449 - 454, 2005.

JARDIM, F. B. B. *Desenvolvimento de bebida láctea probiótica carbonatada: características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais*. 2012. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição)_Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho".

JAY, J. M. *Modern Food Microbiology*. 7. ed. New York: Springer, p. 39-790. 2005.

KALAVROUZIOTI, I.; HATZIKAMARI, M.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. *et al.* Production of hard cheese from caprine milk by the use of two types of probiotic cultures as adjuncts. *Int. J. Dairy Tech.*, v. 58, n.1, p. 30-38, 2005.

KASIMOGLU, A.; GONCUOGLU, A.; AKGUN, S. Probiotic White Cheese with *Lactobacillus acidophilus*. *Int. Dairy J.*, v.14, n. 12, p. 1067-1073, 2004.

KLEBANOFF, S. J.; HILLIER, S. L.; ESCHENBACH, D. A.; *et al.* Control of the microbial flora of the vagina by H₂O₂- generating lactobacilli. *J. Infec. Dis.*, v. 164, p. 94-100, 1991.

KLIJN, N.; WEERKAMP, A. H.; VOS, W. M. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Appl. Env. Microb.*, v. 57, n. 11, p. 3390-3393, 1991.

- KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. *Rev. Bras. Cienc. Far.*, v. 44, n. 3, 2008.
- KONGO, J. M.; HO, A. J.; MALCATA, F. X. *et al.* Characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from São Jorge cheese, using biochemical and ribotyping methods. *J. Appl. Microb.*, v. 103, n. 5, p. 1838-1844, 2007.
- LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. *et al.* *Lactic Acid Bacteria- Microbiological and Functional Aspects*. 4 ed. New York, CRC Press, p. 2; 40; 77-92, 2012.
- LANE D. J. *16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, p.115-175, 1991.
- LEANDRO, J. J. *Queijos: origens, tipos, fabricação, conservação e usos*. Editora Summus, p. 151, 1987.
- LEBEER S.; VANDERLEYDEN J.; DE KEERSMAECKER S. C. J. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev. Microb.*, v. 8, p. 171 – 184, 2010.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microb. Mol. Biol. Rev.*, v. 72, n. 4, p. 728 - 764, 2008.
- LEE, Y. K.; SALMINEN, S. *Handbook of Probiotics and Prebiotics*, p. 77-95. 2009.
- LEE, Y. K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S. *et al.* *Handbook of probiotics*. New York: Wiley, p. 211, 1999.
- LEISNER, J. J.; VANCANNEYT, M.; GORIS, J. *et al.* Description of *Paralactobacillus selangorensis* gen. nov., sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from chili bo, a Malaysian food ingredient. *Int. J. Syst. Evol. Microb.*, v. 50, p. 19-24, 2000.
- LEITE, M. O. *Isolamento e seleção de culturas lácticas nacionais resistentes a bacteriófagos para elaboração de queijo Minas curado*. 1993, 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)_Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- LEUCAS, H. L. B. *Efeitos benéficos de micro-organismos envolvidos na produção de leite fermentado*. 2012. 23-24f. Monografia (Especialização em Microbiologia)_ Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- LICK, S.; KELLER, M.; BOCKELMANN, W. *et al.* Rapid identification of *Streptococcus thermophilus* by primer-specific PCR amplification based on its *lacZ* gene. *Syst. Appl. Microb.*, v.19, p. 74-77, 1996.
- LILLY, D. M.; STILLWEL, R. H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, v. 471, n. 3659, p. 747–749, 1965.

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

LLEO, M. M.; TAFI, M. C.; SIGNORETTO, C. *et al.* Competitive polymerase chain reaction for quantification of nonculturable *Enterococcus faecalis* cells in lake water. *FEMS Microb. Ecol.*, v. 30, n. 4 p. 345-353, 1999.

LIU, Y.; CAO, B.; GU, L. *et al.* Successful control of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* nosocomial outbreak in a teaching hospital in China. *Americ. J. Infec. Cont.*, v. 40, p. 568-571, 2012

LJUNGH, A., WADSTROM, T. Lactic acid bacteria as probiotics. *Curr.t Iss. Int. Microb.*, v. 7, n.2, p. 73-89, 2006.

MAC FADDIN, J. F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2 ed., p. 527, 1980.

MANNU, L.; PABA, A.; DAGA, E. *et al.* Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int. J. Food Microb.*, v. 88, n. 2, p. 291-304, 2003.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Regulamento Técnico Geral para a Fixação dos Requisitos Microbiológicos de Queijo*. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. *Diário Oficial da União de 11 de março de 1996*.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução nº 7, de 28 de novembro de 2000. *Oficialização dos Critérios de Funcionamento e de Controle da Produção de Queijarias, para seu Relacionamento junto ao Serviço de Inspeção Federal*. Publicado no *Diário Oficial da União em 02 de Janeiro de 2001*.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº57 de 15 de dezembro de 2011. *Estabelecimento de critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais*. Publicado no *Diário Oficial da União em 16 de dezembro de 2011a*.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. *Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do leite Cru Refrigerado*. Publicada no *Diário Oficial da União em 30 de dezembro de 2011*.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº30 de 7 de agosto de 2013. *Estabelecimento de critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais*. Publicado no *Diário Oficial da União em 8 de agosto de 2013*.

MARTINS, J. M. *Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da região do Serro*. 2006. 158f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)_Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

- MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. *Int. J. Food Microb.*, v. 105, p. 281-295, 2005.
- MEIRA, S. M. M.; HELFER, V. E.; VELHO, R. V.; *et al.* Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha. *Braz. J. Food Tech.*, v.12, p. 75-80, 2010.
- MENDES, D. P. G.; SOUZA, M. R.; GALLETTI JUNIOR, M.; *et al.* Quality of fermented milks produced with *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus fermentum* isolated from artisanal cheeses. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.4, p.1291-1295, 2014.
- MENESES, J. N. C. *Queijo Minas Artesanal: Dossiê Interpretativo*. Belo Horizonte: IPHAN, p. 139, 2006.
- MINAS GERAIS. Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais. *História do Queijo*. Disponível em: <http://www.iepha.mg.gov.br/component/content/article/16/28-historico>. Acesso em: 27/04/2014.
- MINAS GERAIS. *Lei nº 20.549, dispõe sobre a Produção e a Comercialização dos Queijos Artesanais de Minas Gerais. Diário oficial do estado de 18 de dezembro de 2012.*
- MINAS GERAIS. *Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais*. Disponível em: <http://www.ruralminas.mg.gov.br/banco-de-noticias/407-programas-e-acoes-da-secretaria-de-agricultura-sao-apresentados-na-expoaraxa->. Acesso em: 26/11/2015
- MIYAZAKI, Y.; KAMIYA, S.; HANAWA, T. *et al.* Effect of probiotic bacterial strains of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Enterococcus* on enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Infect. Chem.*, v. 16, p.10–18, 2010.
- MORADI-KHATOONABADI, Z.; EZZATPANAH, H.; MAGHSOUDLOU, Y. *et al.* Tracking *Bacillus cereus* in uf-feta cheese processing line. *Int. Dairy J.*, v. 39, p. 47-52, 2014.
- MOREIRA, J. L. S.; MOTA, R. M.; HORTA, M. F. 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 Microb.*, v. 5, p. 5-15, 2005
- NEAL, C. E.; CALBERT, H. E. The use of 2, 3, 5 – triphenyltetrazolium chloride as a test for antibiotic substances in milk. *J. Food Protec.*, v. 38, n. 6, p. 629-633, 1955.
- NEUMANN, E. *Comportamento “in vitro” de estirpes de Lactobacillus acidophilus sensível e resistente à bacteriocina sob condições do trato digestivo*. 1991. 86f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)_Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- NIEMI, R. M.; OLLINKANGAS, T.; PAULIN, L. *et al.* *Enterococcus rivorum* sp. nov., from water of pristine brooks, *Int. J. Syst. Evol. Microb.*, v. 62, p. 2169–2173, 2012.

- NIKOLIC, M.; TERZIC-VIDOJEVIC, A.; JOVCIC, B. *et al.*. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *Int. J. Food Microb.*, v. 122, p. 162-170, 2008.
- NOBREGA, J. E. *Biodiversidade microbiana, descritores físico químicos e sensoriais dos queijos artesanais fabricados nas regiões da Serra da Canastra e Serro, Minas Gerais*. 2012. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)_Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- O'SULLIVAN, D.J. *Methods for Analysis of the Intestinal Microflora. Curr. Iss. Intest. Microbiol.*, v.1, n.2, p.39-50, 2000.
- OELSCHLAEGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions – a review. *Int. J. Med. Microb.*, v. 300, p. 57 - 62, 2010.
- OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A. *et al.* Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Rev. Bras. Cienc. Far.*, v. 38, n. 1, 2002.
- OSTLIE, H. M.; TREIMO, J.; NARVHUS, J. A. Effect of temperature on growth and metabolism of probiotic bacteria in milk. *Int. Dairy J.*, v. 15, n. 10, p. 989-997, 2005.
- OUADGHIRI, M.; AMAR, M.; VANCANNEYT, M. *et al.* Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS Microb. Lett.*, v. 251, p. 267–271, 2005.
- 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 Microb.*, v. 121, p. 217–224, 2008.
- OUWEHAND, A. C.; KIRJAVAINEN, P. V.; SHORTT, C. *et al.* Probiotics: mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.*, v. 9, p. 43-52, 1999.
- PALAZZO, I. C. V.; PITONDO-SILVA, A.; LEVY, C. E. *et al.* Changes in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* causing outbreaks in Brazil. *J. Hosp. Infect.*, v. 79, p. 70-74, 2011.
- PARK, J. Y.; JEONG, S.; KIM, J. H. Characterization of a glutamate decarboxylase (GAD) gene from *Lactobacillus zymae*. *Biotec. Lett.*, v. 36:1791–1799, 2014.
- PARK, K. Y.; KIM, S. H.; SON, T. J. Antimutagenic activities of cell wall and cytosol fractions of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *J. Food Sci. Nut.*, v. 3, p. 329–333, 1998.
- PARK, S. Y.; KANG, J. H.; KIM, J. *et al.* Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreak caused by patient transfer in 2 separate intensive care units. *Americ. J. Infect. Cont.*, v. 40, p. 565-567, 2012

- PARKER, R. B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Ani.l Nut. Health*, v. 29, p. 48, 1974.
- PAULA, J. C. J.; CARVALHO, A. F.; FURTADO, M. M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. *Rev. Inst. Lat. "Cândido Tostes"*, v. 64, n. 367/368, p. 19-25, 2009.
- PEREIRA, V. G.; GOMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra micro-organismos patogênicos veiculados por alimentos. *Semina: Cienc. Agr.*, v. 28, n. 2, p. 229-240, 2007.
- PERNAMBUCO. *Lei nº 13.376, dispõe sobre o processo de Produção do Queijo Artesanal e dá outras providências. Diário oficial do estado de 20 de dezembro de 2007.*
- PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos, *Quim. Nov.*, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.
- PREDMORE, R. D.; PITTET, A.; PRAPLAN, F. *et al.* Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC533 And its role in anti *Salmonella* activity. *FEMS Microb. Lett.*, v. 283, p. 210–215, 2008.
- QUERE, F.; DESCHAMPS, A.; URDACI, M. C. DNA probe and PCR-specific reaction for *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microb.*, v.82, n. 6, p. 783-790, 1997.
- QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E. *et al.* *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Editora Blackwell Science, p.53-54, 1999.
- RABE, L. K.; HILLIER, S. L. Optimization of media for detection of hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species. *J. Clin. Microb.*, 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.
- RESENDE, M. F. S. *Queijo minas artesanal da serra da canastra: influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas* 17f, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)_Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- RESENDE, M. F. S.; COSTA, H. H. S.; ANDRADE, E. H. P. *et al.* Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias ácido lácticas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.63, n.6, p.1567-1573, 2011.
- REYSENBACH, A. L.; LONGNECKER, K.; KIRSCHTEIN, J. Novel bacterial and archaeal lineages from an in situ growth chamber deployed at a mid-atlantic ridge hydrothermal vent. *Appl. Env. Microb.*, v. 66, n. 9, p. 3798-3806, 2000.

RIBEIRO, E. P.; SIMOES, L. C.; JURKIEWICZ, C. H. Desenvolvimento de queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. *Cienc. Tecnol. Alim.*, v. 29, n. 1, p. 19-23, 2009.

RUIZ-MOYANO, S.; MARTIN, A.; BENITO, M. J. *et al.* Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Sci.*, v. 80, p. 715 - 721, 2008.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: estado da arte. *Braz. J. Pharm. Sci.*, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SALES, G. A. *Caracterização microbiológica e físico-química de queijo Minas artesanal da microrregião de Araxá - MG durante a maturação em diferentes épocas do ano.* 2015. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)_Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. *Lactic Acid Bacteria.* Marcel Dekker. p. 1-63. 1993.
SAMPAIO, I. B. M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal.* 2. ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, p. 265 2002.

SANDERS, M. E.; O'SULLIVAN, D. J. Probiotics: Considerations for human health. *Nut. Rev.*, v. 61, n. 3, p. 9-91, 2003.

SANDES, S. H. C. *Seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico para uso como promotor de crescimento ou como adjuvante imune em vacinas de mucosa na pecuária bovina.* 2013. 42 f. Dissertação (Mestrado em Genética)_Universidade Federal de Minas Gerais,

SANT'ANNA, F. M. *Bactérias do ácido láctico de silagem, água, leite, soro fermento endógeno e queijo Minas artesanal da região de Campo das Vertentes: isolamento, identificação molecular, avaliações in vitro e in vivo do potencial probiótico,* 2015, 53-94f,.. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)_Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

SANTOS, V. S. *Diversidade microbiana, susceptibilidade a antibióticos e fatores de virulência em Enterococcus spp.* Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) _ Universidade de Lisboa, p. 3, 2012.

SCHAECHTER, M. *The Desk Encyclopedia of Microbiology.* Elsevier Academic Press, p. 31-282, 2006.

SEAB. *Secretaria de estado da agricultura e abastecimento-Governo do estado do Paraná. Cultura-Análise da Conjuntura Agropecuária ano 2012/2013-Leite.* Disponível em: http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/leite_2012_13.pdf. Acesso em: 05/03/2015

SEBRAE. Serviço brasileiro de apoio as micro e pequenas empresas. *Estudos de mercado do SEBRAE- Queijos nacionais.* p. 1. 2008.

- SERVIN, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microb. 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 Microb.*, v. 27, p. 691-697, 2010.
- SIEZEN, R. J.; VLIEG, J. E. H. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum* a natural metabolic engineer. *Microb. Cell Fact.*, v. 10, p. 1-13, 2011.
- SILVA, B. C.; JUNG, L. C. R.; SANDES, S. H. C. *et al.* *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.
- SOLIERI, L.; BIANCHI, A.; MOTTOLESE, G. *et al.* Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by *in vitro* screening and principal component analysis. *Food Microb.*, v. 38, p. 240-249, 2014.
- SONG, Y.; KATO, N.; LIU, C. *et al.* Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific *primers* derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microb. Lett.* v.187, n. 2, p. 167-173, 2000.
- SONGISEPP, E.; HUTT, P.; RATSEP, M. *et al.* Safety of a probiotic cheese containing *Lactobacillus plantarum* tensia according to a variety of health indices in different age groups. *J. Dairy Sci.*, v. 95, p. 5495-5509, 2012.
- SOUZA, M. R. *Identificação molecular e propriedades probióticas de bactérias ácido lácticas isoladas de cecos de gallu gallus domesticus "caipira" e de granja.* 2006. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)_Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, v. 40, n. 3, p. 722-756, 1976.
- TANNOCK, G. W.; TILSALA-TIMISJARVI, A.; RODTONG, S. *et al.* Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastro-intestinal tract, silage and yoghurt by the 16S-23S rDNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Appl. Env. Microb.*, v. 65, n. 9, p. 4264-4267, 1999.
- TE GIFFEL, M. C. *Good hygienic practice in milk processing. Dairy Processing improving quality*, p. 68-80, Woodhead publishing limited, 2003.
- TEUBER, M.; MEILE, L.; SCHWARZ. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Ant. Leeuw.*, v. 76, p. 115–137, 1999.

THOMÉ DA CRUZ, F.; MENASCHE, F. Entre a cultura e a lei: a produção de queijos artesanais tradicionais no Brasil. XI Encontro de Pós Graduação-Universidade Federal de Pelotas. *Anais...* 2009.

TILSALA-TIMISJARVI, 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. J. Food Microb.*, v. 35, n. 1, p. 49-56, 1997.

TODOROV, S. D. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* - production, genetic organization and mode of action. *Braz. J. Microb.*, v. 40, p. 209-221, 2009.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* st712bz isolated from boza. *Braz. J. Microb.*, v. 38, p. 166-172, 2007.

TOGAY, S. O.; KESKIN, A. C.; ACIK, L. *et al.* Virulence genes, antibiotic resistance and plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from naturally fermented Turkish foods. *J. Appl. Microb.*, v. 109, p. 1084-1092, 2010

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. Microb.*, v. 67, n. 8, p. 3450-3454, 2001.

TULINI, F. L.; WINKELSTROTTER, L. K.; MARTINIS, E. C. P. *Lactobacillus paraplantarum* FT259, a bacteriocinogenic strain isolated from Brazilian semi-hard artisanal chesse. *Anaerobe*, v.22, p. 57-63, 2013.

USDA. *Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Linha de produção, fornecimento e distribuição.* Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/psdonline/>. Acesso em: 05/03/2015.

VALLOR, A. C.; ANTONIO, M. A. D.; HAWES, A. E. *et al.* Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: role of hydrogen peroxide production. *J. Infect. Dis.*, v. 184, n. 11, p. 1431-1436, 2001.

VANCANNEYT, M.; NASER, S. M; ENGELBENN, K. *et al.* Reclassification of *Lactobacillus brevis* strains LMG 11494 and LMG 11984 as *Lactobacillus parabrevis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microb.*, v. 56, p. 1553-1557, 2006.

VENTURA, M.; ZINK, R. Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microb. Lett.*, v. 217, n. 2 p. 141-154, 2002.

VIEGAS, R. P. *Leites fermentados probióticos produzidos a partir de bactérias ácido-lácticas e adicionados de concentrado protéico de soro lácteo: características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais.* 2008, 18f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)_Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária..

VIEGAS, R. P.; SOUZA, M. R.; FIGUEIREDO, T. C. *et al.* Qualidade de leites fermentados funcionais elaborados a partir de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijo de coalho. *Arq. Bras. Med. Vet Zootec*, v.62, n.2, p.460-467, 2010.

VIEIRA, K. P.; LEDESMA, M. M.; ROSA, C. M. *et al.* Contaminação de queijo Minas frescal por bactérias patogênicas: um risco à saúde. *Consc. Saude*, v. 7, n. 2, p. 201-206, 2008.

VINDEROLA, C. G.; PROSELLO, W.; GHIBERTO, D. *et al.* Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian fresco cheese. *J. Dairy Sci.*, v. 83, p. 1905-1911, 2000.

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 Res. Int.*, v.36, p.895–904, 2003.

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

WARD, L. J. H.; TIMMINS, M. J. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett. in Appl. Microb.*, v.29, n.2, p.90–92, 1999.

WOUTERS, J. T. M.; AYAD, E. H. E.; HUGENHOLTZ, J. *et al.* Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.*, v. 12, p.91-109, 2002.

