



FERNANDA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO E
TECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE
QUEIJO MINAS ARTESANAL DA REGIÃO DA CANASTRA**

**LAVRAS - MG
2022**

FERNANDA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO E TECNOLÓGICO DE
BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJO MINAS ARTESANAL DA
REGIÃO DA CANASTRA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

**LAVRAS-MG
2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pereira, Fernanda.

Avaliação do potencial probiótico e tecnológico de bactérias
láticas isoladas de queijo minas artesanal da região da Canastra /
Fernanda Pereira. - 2022.

50 p.

Orientador(a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Lactobacillus plantarum. 2. Probióticos. 3. Queijos
artesanais. I. Piccoli, Roberta Hilsdorf. II. Título.

FERNANDA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO E TECNOLÓGICO DE
BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJO MINAS ARTESANAL DA
REGIÃO DA CANASTRA**

**EVALUATION OF THE PROBIOTIC AND TECHNOLOGICAL POTENTIAL OF
LATTIC BACTERIA ISOLATED FROM MINAS ARTISANAL CHEESE FROM THE
CANASTRA REGION**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 09 de fevereiro de 2022.

Dr^(a). Roberta Hilsdorf Piccoli, UFLA

Dr^(a). Rosane Freitas Schwan, UFLA

Dr^(a). Alcilene de Abreu Pereira, IFMG-Bambuú

Dr^(a). Monique Suela Silva, UFLA



Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
Orientadora

**LAVRAS-MG
2022**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela força, pelas graças recebidas, as dificuldades superadas, por me fazer acreditar que sou capaz e por mais esta vitória em minha vida em meio a pandemia do COVID-19.

À minha orientadora, professora Roberta, pela orientação, paciência, pelos conhecimentos transmitidos e todo apoio que foi dado. A você, minha eterna gratidão!

Aos meus pais, Delza e Silvio, pelo amor, apoio, orações, por me incentivarem a ir em busca dos meus sonhos e acreditarem em mim.

Ao meu marido Sávio, pelo apoio e companheirismo nessa jornada.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCA (UFLA), pelo convívio durante esses anos e um agradecimento especial ao Danilo e a Monique, que tanto me auxiliaram e me guiaram na execução desta pesquisa.

A todos meus familiares e amigos, pelo carinho, incentivo e orações.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola (PPGMA), pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

Aos professores do PPGMA, pelos ensinamentos transmitidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e concessão de bolsas.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste sonho, o meu muito obrigada!

RESUMO

Para ser considerado probiótico o microrganismo vivo, quando administrado em quantidades adequadas, deve conferir algum benefício à saúde do indivíduo. Esses microrganismos pertencem a diferentes gêneros e espécies, tanto de bactérias como leveduras, e têm sido associados a diversos efeitos benéficos. As bactérias lácticas (BAL) podem ser encontradas em diversas matrizes alimentares, como produtos lácteos, carnes, além de produtos de origem vegetal (bebidas fermentadas indígenas e cacau). A microbiota endógena dos Queijos Minas Artesanais (QMA), confere características organolépticas típicas, composta principalmente por bactérias lácticas e leveduras presentes no leite, no ambiente de processamento e principalmente no “pingo”. A seleção de microrganismos probióticos a partir de queijos artesanais é de interesse científico e industrial, devido ao potencial biotecnológico e funcional a ser explorado. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi isolar, identificar e avaliar as propriedades tecnológicas e probióticas de BAL isoladas a partir de QMA da região da Canastra-MG. Para tal, foi realizado isolamento e identificação das BAL pela análise proteômica, seguido dos testes de potencial probiótico por meio das análises de atividade antimicrobiana frente a microrganismos patogênicos, susceptibilidade a antibióticos e sobrevivência ao trato gastrointestinal simulado. Posteriormente, foram realizados os testes de potencial tecnológico através das análises de atividade proteolítica e lipolítica dos isolados. A espécie *Lactobacillus plantarum* foi identificada em 40% dos isolados. Entre os demais, 15 foram identificados apenas em nível de gênero, *Lactobacillus* spp. (33%) e o restante (26%), não resultou em identificação confiável. Quanto a atividade antimicrobiana, as espécies *L. plantarum* LP116, *L. plantarum* LP77, *L. plantarum* LP24 e *L. plantarum* LP48, demonstraram atividade inibitória contra todos os patógenos avaliados (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)). Os isolados que apresentaram os melhores resultados de atividade antimicrobiana, foram selecionados para o ensaio de simulação do trato gastrointestinal. Apenas o isolado *L. plantarum* LP24 apresentou taxa de sobrevivência moderada (59,26 %). Ao avaliar a susceptibilidade a antibióticos, todos os isolados avaliados foram sensíveis a pelo menos um antibiótico das classes inibidor de síntese proteica e de parede celular. Todos os isolados foram sensíveis à eritromicina e ampicilina, e resistentes à vancomicina, norfloxacin e cloranfenicol. Quanto ao potencial tecnológico, todos os isolados testados apresentaram alguma atividade proteolítica; onde, os isolados *L. plantarum* LP94 e LP24, e *Lactobacillus* spp. L105 e L88 resultaram na maior capacidade de degradar a caseína do leite. Dos isolados avaliados quanto a atividade lipolítica, os isolados *L. plantarum* LP48 e LP94 e *Lactobacillus* spp. L41 resultaram em atividade moderada. Dentre os isolados, *L. plantarum* LP24 exibiu interessantes propriedades probióticas e tecnológicas, tornando-se o candidato mais promissor do presente estudo. O gênero *Lactobacillus* é um dos mais avaliados quanto às características tecnológicas em queijos artesanais brasileiros e amplamente utilizado como cultura *starter* para a fabricação de uma gama de produtos fermentados. Este estudo mostra como o QMA da região da Canastra pode constituir um bom reservatório para novas cepas de BAL para indústria.

Palavras-chave: *Lactobacillus plantarum*. Probióticos. Queijos artesanais.

ABSTRACT

To be considered a probiotic, a live microorganism, when administered in adequate amounts, must confer some benefit on the individual's health. These microorganisms belong to different genera and species, both bacteria and yeast, and have been associated with several beneficial effects. Lactic acid bacteria (LAB) can be found in various food matrices, such as dairy products, meat, as well as products of plant origin (indigenous fermented beverages and cocoa). The endogenous microbiota of Minas Artesanal Cheese (QMA) confers typical organoleptic characteristics, composed mainly of lactic acid bacteria and yeasts present in the milk, in the processing environment and mainly in the “pingo. The selection of probiotic microorganisms from artisanal cheeses is of scientific and industrial interest, due to the biotechnological and functional potential to be explored. In this context, the objective of the present study was to isolate, identify and evaluate the technological and probiotic properties of BAL isolated from QMA from the region of Canastra-MG. To this end, LAB isolation and identification was performed by proteomic analysis, followed by probiotic potential tests through analyzes of antimicrobial activity against pathogenic microorganisms, susceptibility to antibiotics and survival in the simulated gastrointestinal tract. Subsequently, tests of technological potential were performed through the analysis of proteolytic and lipolytic activity of the isolates. The species *Lactobacillus plantarum* was identified in 40% of the isolates. Among the others, 15 were identified only at the genus level, *Lactobacillus* spp. (33%) and the remainder (26%) did not result in reliable identification. As for antimicrobial activity, the species *L. plantarum* LP116, *L. plantarum* LP77, *L. plantarum* LP24 and *L. plantarum* LP48, showed inhibitory activity against all pathogens evaluated (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)). The isolates that showed the best results of antimicrobial activity were selected for the gastrointestinal tract simulation assay. Only the isolate *L. plantarum* LP24 showed a moderate survival rate (59.26%). When evaluating susceptibility to antibiotics, all isolates evaluated were sensitive to at least one antibiotic of the protein synthesis inhibitor and cell wall classes. All isolates were sensitive to erythromycin and ampicillin, and resistant to vancomycin, norfloxacin and chloramphenicol. As for the technological potential, all tested isolates showed some proteolytic activity; where, the isolates *L. plantarum* LP94 and LP24, and *Lactobacillus* spp. L105 and L88 resulted in the greatest ability to degrade milk casein. Of the isolates evaluated for lipolytic activity, the isolates *L. plantarum* LP48 and LP94 and *Lactobacillus* spp. L41 resulted in moderate activity. Among the isolates, *L. plantarum* LP24 exhibited interesting probiotic and technological properties, making it the most promising candidate in the present study. The *Lactobacillus* genus is one of the most evaluated regarding technological characteristics in Brazilian artisanal cheeses and is widely used as a starter culture for the manufacture of a range of fermented products. This study shows how the QMA from the Canastra region can constitute a good reservoir for new strains of LAB for industry.

Keywords: *Lactobacillus plantarum*. Probiotics. Artisanal cheeses.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	10
REFERÊNCIAS.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Local de condução do experimento.....	32
3.2 Amostragem.....	32
3.3 Análises microbiológicas.....	32
3.3.1 Isolamento de bactérias lácticas.....	32
3.3.2 Caracterização morfológica.....	33
3.3.3 Identificação de bactérias lácticas por proteômica.....	33
3.3.3.1 Preparação da amostra para Maldi-tof MS (<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight - mass spectroscopy</i>).....	33
3.3.3.2 Identificação das bactérias lácticas por Maldi-tof MS.....	34
3.4 Potencial Probiótico.....	34
3.4.1 Teste de sobrevivência aos sucos gástricos e intestinais	34
3.4.2 Atividade antimicrobiana	35
3.4.3 Suscetibilidade a antibióticos.....	35
3.5 Potencial Tecnológico.....	36
3.5.1 Atividade proteolítica e lipolítica.....	36
3.6 Análise estatística.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 Isolamento e caracterização das bactérias lácticas.....	37
4.2 Identificação das bactérias lácticas por Maldi-tof MS.....	37
4.3 Potencial probiótico.....	39
4.3.1 Atividade antimicrobiana.....	39
4.3.2 Sobrevivência aos sucos gástricos e intestinais.....	41
4.3.3 Suscetibilidade a antibióticos.....	41
4.4 Potencial Tecnológico.....	44
4.4.1 Atividade proteolítica e lipolítica.....	44
5 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

A alta demanda pelos consumidores, interessados em manter a saúde por meio de alimentos e suplementos dietéticos, gerou um mercado cada vez mais variado de alimentos e suplementos, principalmente aqueles contendo probióticos (BINDA et al., 2020). De acordo com a legislação brasileira, para ser considerado probiótico, o microrganismo vivo, quando administrado em quantidades adequadas, deve conferir algum benefício à saúde do indivíduo. Seu uso em alimentos requer a comprovação da sua segurança e benefícios à saúde (BRASIL, 2018). Esses microrganismos pertencem a diferentes gêneros e espécies, tanto de bactérias como leveduras, e têm sido associados a diversos efeitos benéficos.

As bactérias lácticas podem ser encontradas em diversas matrizes alimentares, como produtos lácteos, cárneos, além de produtos de origem vegetal como as bebidas fermentadas indígenas e o cacau (FONSECA et al., 2021). Dessa forma, tais fontes de alimentos são consideradas reservas potenciais de novas cepas probióticas. Os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* são membros importantes deste grupo (SHOKRYAZDAN et al., 2014)

A microbiota endógena, própria dos queijos minas artesanais (QMA), confere características organolépticas típicas, e é composta principalmente por bactérias lácticas e leveduras presentes no leite e no ambiente de processamento. A principal fonte dessa microbiota diversa é o “pingo”, que consiste em uma porção de soro fermentado originada da dessora de queijos produzidos no dia anterior, coletado para uso como fermento na produção do dia seguinte (MARGALHO et al., 2020). Portanto, a seleção de microrganismos probióticos a partir de queijos artesanais é de interesse científico e industrial, devido ao potencial biotecnológico e funcional a ser explorado.

Neste contexto, o isolamento de bactérias lácticas presentes na microbiota de QMA e o estudo de suas propriedades tecnológicas e probióticas, constitui-se um importante passo, tanto na obtenção de culturas microbianas, quanto na melhora da qualidade e padronização dos queijos minas artesanais. O objetivo do presente estudo foi isolar, identificar e avaliar as propriedades tecnológicas e probióticas de bactérias lácticas, a partir de Queijos Minas Artesanais oriundos da microrregião da Canastra, no estado de Minas Gerais.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Queijo Minas Artesanal

2.1.1 Tradição e relevância econômico-cultural

Dados históricos demonstram que o Queijo Minas Artesanal (QMA) é produzido e comercializado em várias regiões de Minas, desde o século XVIII. A sua produção nas fazendas mineiras é altamente relevante para a composição da renda dos produtores familiares, além de possuir grande importância social, bem como valor histórico e cultural. Dos 853 municípios mineiros, mais de 500 produzem queijo artesanal, seja de forma legal ou informal (MENESES, 2006). Sendo este, um elemento importante da economia e da cultura agropastoril mineira desde os tempos coloniais até os dias atuais (MENESES, 2006; CAMARGO et al., 2021).

Os Queijos Minas Artesanais se diferenciam dos queijos industriais pela tradição no modo de fabricação, mantendo suas características únicas, muitas vezes associada a presença de uma microbiota endógena específica de cada região de produção. Essa microbiota é responsável por conferir aos queijos características organolépticas distintas de aroma, sabor e cor. A diversidade microbiana pode ser originária do leite cru, do ambiente (utensílios e manipuladores de alimentos), entretanto a principal fonte de biodiversidade é o “pingo”. O pingo, nada mais é, que a porção do soro fermentado proveniente do processo da dessora dos queijos que foram produzidos no dia anterior e então, recolhido para ser utilizado na produção do dia seguinte (MENESES, 2006; KAMIMURA et al., 2019). É composto por bactérias lácticas típicas de cada região, considerado um acervo bacteriano e responsável pelo padrão característico de cada região onde é produzido, refletindo suas especificidades (MENESES, 2006).

A produção de QMA diferencia-se da industrial pelo uso de processos manuais de produção, ausência de pasteurização do leite, e por ter a obrigatoriedade do emprego do pingo. A quantidade de pingo utilizado varia em função da quantidade de leite, do produtor e da época do ano (MONTEIRO, 2018). Além da ausência de pasteurização, não são utilizadas etapas de padronização do produto, como o acréscimo de fermento industrial, aumento da temperatura de coagulação, uso de equipamentos industriais (prensas, tanques com camisa de vapor). Além

disso, deve-se considerar a grande variação na composição do leite e conseqüentemente, do pingo (EPAMIG, 2019).

2.1.2 Produção e maturação do Queijo Minas Artesanal

A legislação mineira, Lei Estadual 20.549/2012, em seu Art. 4º descreve o processo de produção do Queijo Minas Artesanal (QMA) em 10 fases:

O processo de produção do queijo minas artesanal compreende as seguintes fases: I filtração do leite; II adição de cultura láctica e coalho; III coagulação; IV corte da coalhada; V mexedura; VI dessoragem; VII enformagem; VIII prensagem manual; IX salga seca; X maturação (MINAS GERAIS, 2012).

Devido a regionalidade característica do QMA, podem existir pequenas variações na técnica de elaboração entre as regiões tradicionalmente produtoras. A fabricação de queijos artesanais depende de uma série de fatores, dentre eles os principais são: composição do queijo; temperatura de maturação e umidade relativa do ar (EPAMIG, 2019). Estes fatores interferem diretamente no aspecto sensorial do queijo pronto, fazendo com que cada produto seja único. Na Figura 1, é apresentado o fluxograma com as etapas de fabricação do QMA da Serra da Canastra.

O processo de fabricação do QMA até o início da maturação tem duração média de três dias. No primeiro dia ocorre a coagulação do leite recém-ordenhado com adição do coalho e do pingo (MENESES, 2018). A microbiota nativa presente no leite cru, no soro-fermento (pingo), no ambiente e em utensílios, é responsável pela acidificação e formação do sabor e odor característicos do produto final. É composta principalmente de bactérias lácticas (BAL) e alguns fungos filamentosos e leveduras (MACHADO et al., 2004; NÓBREGA, 2007).

Durante a etapa de fermentação do queijo, o pH deve diminuir, para que a maturação ocorra normalmente e o queijo adquira as características sensoriais desejáveis, evitando a formação de uma massa com textura “borrachenta”. De maneira geral, a coagulação ocorre com o leite entre 32 °C a 34 °C, já que o mesmo não é aquecido, sendo então fabricados logo após a ordenha, aproveitando a temperatura em que o leite sai do úbere para a coagulação (EPAMIG, 2019). A temperatura de coagulação do leite pode variar dependendo do tempo de espera do leite para ser coagulado ou da temperatura ambiente da região de produção, sendo que o

processamento deverá ser iniciado até noventa minutos após o começo da ordenha (BRASIL, 2018).

Figura 1 – Fluxograma de produção do Queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra. Mapa da microrregião da Canastra e respectivos municípios.



Fonte: Da autora (2022).

Outro aspecto importante no processo de produção do QMA é a qualidade e inocuidade da matéria prima, o leite. Os principais problemas de qualidade do leite são devido a presença de mastite no rebanho, resíduos de antibióticos ou a contagem de bactérias totais (CBT) elevada. Além disso, agentes causadores de zoonoses, como tuberculose e da brucelose podem ser transmitidos pelo leite (EPAMIG, 2019). O controle da brucelose e tuberculose é feito por programas do governo federal de controle de diagnóstico e de vacinação, em que o produtor deve seguir para garantir a sanidade do rebanho. Já o controle da mastite bovina, está relacionado a assistência veterinária e aos cuidados do produtor, principalmente seguindo as boas práticas agropecuárias para obtenção higiênica do leite (EPAMIG, 2019). Conforme o Art. 3º da Portaria IMA Nº 1.937/19:

Art. 3º. A obtenção de registro e a autorização para comercialização de seus produtos ficam restritas à queijaria situada em propriedade rural certificado como livre de brucelose e tuberculose, de acordo com as normas do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT), ou controlado para brucelose e tuberculose pelo IMA, no prazo de até 3 (três) anos a partir da publicação da Lei nº 13.860, de 15 de julho de 2019, sem prejuízo das demais obrigações previstas em legislação específica (MINAS GERAIS, 2019).

O Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017, descreve que queijos maturados sejam aqueles em que ocorreram trocas bioquímicas e físicas necessárias e características de suas variedades (BRASIL, 2017). A maturação é um processo importante para melhoria das características dos queijos, sendo a última fase da fabricação, podendo variar de semanas a até mais de dois anos, dependendo do queijo produzido (COSTA et al., 2014). Atualmente, a Portaria IMA Nº 2051 07/2021, exige 14 dias para a microrregião de Araxá, Canastra e Serra do Salitre, mínimo de 17 dias para a microrregião do Serro e para as demais regiões do Estado, caracterizadas ou não como produtora de QMA, o período mínimo de maturação será de 22 dias ou pelo maior período especificado em estudos científicos (MINAS GERAIS, 2021).

A etapa de maturação age modificando as propriedades químicas e físicas da massa do queijo, o que influencia a textura e a consistência do produto final. Além disso, são formados os compostos responsáveis pelo desenvolvimento do sabor, que é característico de cada

variedade de queijo produzido. As principais alterações físico-químicas que controlam o crescimento de microrganismos em queijos, ocorrem em função do conteúdo de água, da concentração de sal e do pH do meio (CAMPOS et al., 2021). Durante o período de maturação, por meio de ações enzimáticas (proteolíticas e lipolíticas), ocorre uma série de reações biológicas, químicas e bioquímicas complexas. Dos eventos bioquímicos que ocorrem nessa etapa, a proteólise é o mais complexo e possui maior grau de importância, sendo responsável por conferir a textura flexível da massa, casca lisa, macia e sabor característico de um queijo maturado (BISCOLA et al., 2018; CAMPOS et al., 2021).

2.1.3 Microbiota do QMA

As bactérias lácticas são responsáveis pela fermentação e coagulação do leite na fase inicial da produção de queijo, e durante a maturação, fornecem características sensoriais de interesse. A predominância desses microrganismos em queijos artesanais é extremamente desejável, visto que, as BAL são responsáveis por conferir as características sensoriais típicas em queijos artesanais, além de contribuir para a segurança do alimento através da produção de compostos antimicrobianos (CAMARGO et al., 2021; NERO et al., 2021).

Embora as BAL compreenda uma grande diversidade de bactérias, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Weissella* e *Pediococcus*, representam os principais gêneros identificados em queijos artesanais (PERIN et al. 2017; CAMPAGNOLLO et al., 2018; CAMARGO et al., 2021; MARGALHO et al., 2021). Tal diversidade é influenciada por vários fatores, como região de produção, raça, tipo de dieta de rebanho, processo de fabricação (uso de técnicas rudimentares), microbiota autóctone do leite cru, ambiente de processamento e, principalmente, pelo uso do pingão (MARGALHO et al., 2020; NERO et al., 2021). Nos últimos anos, o interesse pela microbiota do queijo artesanal vem crescendo mundialmente. A qualidade do leite, os vários estágios do processo de fabricação, a água de lavagem e as instalações de processamento do queijo, abrigam comunidades bacterianas distintas e complexas (NERO et al. 2021).

A presença de microrganismos patogênicos e deteriorantes podem causar perdas econômicas, além de apresentar riscos à saúde dos consumidores, seja pela ingestão direta do patógeno, ou pela ingestão de enterotoxinas pré-produzidas, micotoxinas ou outros compostos indesejáveis. A presença de coliformes e de indicadores sanitários em QMA tem sido avaliada

em diversos estudos (CAMARGO et al., 2021; PENNA et al., 2021). Estes, revelaram a presença de estafilococos coagulase positiva e de coliformes termotolerantes em concentrações acima do permitido pela legislação. Tais contaminações podem estar relacionadas a precariedade dos procedimentos de higiene durante a produção do leite (ordenha, condições de saúde dos animais e trabalhadores, limpeza ineficaz dos equipamentos, manuseio e armazenamento inadequados), assim como a falta de Boas Práticas de Fabricação (BPF) durante a produção (PERIN et al., 2017; NERO et al., 2021; PENNA et al., 2021).

A detecção de *S. aureus* em níveis acima do permitido por lei têm sido frequentemente relatados em QMA. Tais achados estão associados a surtos de intoxicações alimentares relacionadas a enterotoxinas produzidas por diferentes *Staphylococcus* spp., e foram associados ao consumo de queijos artesanais tradicionais no Brasil. As principais vias de contaminação por *S. aureus* em QMA são, contaminações da pele dos animais ou de funcionários diretamente envolvidos no processo de ordenha, e/ou manipulação durante a fabricação do queijo (PENNA et al., 2021).

A presença de diferentes patógenos no queijo deve ser avaliada durante todo o processo produtivo, da matéria-prima até a fabricação, e, principalmente, durante o período de maturação. Estudos observaram a presença de *Listeria monocytogenes* em QMA mesmo após 28 dias de maturação. Dado preocupante, uma vez que, este microrganismo é capaz de tolerar altas concentrações de sais e ácidos, bem como sobreviver em temperaturas de refrigeração, o que representa um obstáculo quanto ao seu controle em produtos alimentícios fermentados (PENNA et al., 2021).

Em geral, é necessária a conscientização dos produtores de QMA quanto a importância de treinamentos em conhecimentos básicos de higiene e contaminação alimentar, a fim de reduzir os níveis de doenças veiculadas por alimentos associadas ao queijo, e assim, assegurar produtos de qualidade e seguros.

2.2 Bactérias lácticas

2.2.1 Caracterização

As bactérias lácticas (BAL) são cocos ou bastonetes Gram-positivos, catalase negativa, não patogênicos, geralmente não esporulados e podem ser caracterizadas de acordo com sua temperatura ótima de crescimento, em mesofílicas ou termofílicas. Este grupo de bactérias geralmente cresce sob condições microaerófilas ou estritamente anaeróbicas, sendo os principais microrganismos presentes no leite cru, representando de 20% a 30% das espécies (CAMARGO et al., 2021; MARGALHO et al., 2021). Os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* são membros importantes deste grupo (SHOKRYAZDAN et al., 2014).

As BAL são responsáveis pela produção do ácido láctico como o principal metabólito final da fermentação de açúcares, podendo ser divididas em dois grupos de acordo com o metabolismo de carboidratos e produtos finais: as homofermentativas (obrigatória) e as heterofermentativas, que é subdividido em facultativas e obrigatórias. Espécies de bactérias lácticas homofermentativas (*L. delbrueckii* subespécies *lactis* e *bulgaricus*, e *L. helveticus*) fermentam apenas hexoses em ácido láctico pela via Embden – Meyerhof – Parnas (EMP). Já as espécies obrigatoriamente heterofermentativas atuam na degradação das hexoses pela via do fosfogluconato, produzindo ácido láctico, etanol ou ácido acético e dióxido de carbono como produtos finais. As BAL facultativamente heterofermentativas (*L. casei*, *L. paracasei* e *L. plantarum*) degradam hexoses em ácido láctico através da via EMP, da mesma forma, podem metabolizar pentoses e frequentemente gluconato, por possuírem aldolase e fosfocetolase, produzindo então etanol, ácido acético e ácido fórmico sobre condições de limitação de glicose (GÄNZLE, 2015; BARROSO; BORELLI, 2020; CAMARGO et al., 2021).

Recentemente, o gênero *Lactobacillus* passou por reclassificação em função da diversidade das características fenotípicas, genotípicas e ecológicas que este gênero possui. Com base em uma abordagem polifásica, as 261 espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus* foram reclassificadas em 25 novos gêneros, incluindo os gêneros *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, 23 novos gêneros foram criados e apenas 38 espécies permaneceram classificadas como *Lactobacillus* (ZHENG et al., 2020). Na Tabela 1, a seguir, estão

apresentados alguns *Lactobacillus* relacionados ao uso na indústria de alimentos, com suas respectivas nomenclaturas atualizadas de acordo com o proposto por Zheng et al. (2020).

Tabela 1 - Nomenclaturas atualizadas de *Lactobacillus* de acordo com proposto por ZHENG et al., (2020).

Nomenclatura Antiga	Nomenclatura Atual
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Sem alteração
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Sem alteração
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Sem alteração
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>

Fonte: Da autora (2022).

2.2.2 Potencial probiótico e tecnológico

As BAL podem ser encontradas em diversas matrizes alimentares, como produtos lácteos, cárneos, além de produtos de origem vegetal como as bebidas fermentadas indígenas e o cacau (FONSECA et al., 2021). Dessa forma, tais fontes de alimentos são consideradas reservas potenciais de novas cepas probióticas. As BAL homofermentadoras (*Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* e alguns lactobacilos) são importantes culturas iniciais, ou *starters*, utilizadas na produção de queijos, pois atuam acidificando o leite e são responsáveis por iniciarem o processo de coagulação, dando origem ao queijo. Além disso, ao longo da maturação, liberam enzimas responsáveis pela lipólise, proteólise e conversão de aminoácidos, que atuam na formação de sabores característicos. As bactérias lácticas heterofermentadoras (*Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* e alguns lactobacilos) são responsáveis pelo metabolismo de compostos como dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, acetaldeído e diacetil (COLOMBO et al., 2018; CAMARGO et al., 2021; PENNA et al., 2021).

As bactérias lácticas iniciadoras são responsáveis por fermentar rapidamente a lactose, produzindo elevadas concentrações de ácido láctico e redução rápida do pH do leite. A exemplo desse grupo, pode-se citar as cepas mesofílicas *Lactococcus lactis* e *Leuconostoc* spp., e *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus helveticus*, entre as cepas termofílicas. As bactérias lácticas não iniciadoras (*Non-starter lactic acid bacteria - NSLAB*), principalmente *Lactobacillus* - NSLAB, desempenham papel fundamental na maturação de queijos, produzindo aroma característico de queijos maturados como resultado das reações de lipólise e proteólise. Além disso, também são responsáveis pela produção de exopolissacarídeos (EPS) como mecanismo de defesa em condições de estresse (diminuição da atividade de água e ataque por bacteriófagos) (SILVA et al., 2019; MARGALHO et al., 2020).

A reação de proteólise é um dos principais eventos bioquímicos que ocorrem durante a maturação de queijos, pois dá origem a vários produtos, como peptídeos, cetonas e aminoácidos livres. Estes irão garantir o sabor, aroma e textura característicos, pela atuação de várias enzimas envolvidas no processo (MARGALHO et al., 2020). Além do aspecto sensorial, as BAL são essenciais para a segurança dos queijos, são responsáveis pela síntese de compostos antimicrobianos, incluindo ácidos orgânicos (principalmente ácido láctico), peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, que podem atuar inibindo a deterioração e o crescimento de microrganismos patogênicos (SANT'ANNA et al., 2017). Bacteriocinas são peptídeos com atividade antagonica contra grupos de microrganismos que podem contaminar queijos durante o processo de produção (CAMARGO et al., 2021). Principalmente as NSLAB, podem ser candidatas à elaboração de novas culturas lácticas para produção de produtos lácteos fermentados potencialmente funcionais, podendo auxiliar na segurança destes alimentos e na preservação da microbiota original de queijos artesanais (COSTA et al., 2013; MARGALHO et al., 2020).

Além das propriedades tecnológicas, algumas cepas de BAL podem apresentar propriedades probióticas. Os efeitos probióticos tendem a ser específicos da cepa: cada cepa pode trazer benefícios diferentes para o hospedeiro. Embora uma ampla variedade de gêneros e espécies de microrganismos sejam considerados potencialmente probióticos, o uso comercial em alimentos probióticos são predominantemente *Lactobacillus* spp. e gêneros relacionados (TRIPATHI; GIRI, 2014; FONSECA et al., 2021; MARGALHO, et al. 2021).

O gênero *Lactobacillus* foi isolado e identificado pela primeira vez pelo pediatra alemão Ernst Moro em 1900, a partir de fezes de lactentes amamentados com leite materno (GOMES; MALCATA, 1999). As bactérias do gênero *Lactobacillus* são frequentemente associadas como

sendo probióticas por serem classificadas como seguras ao consumo ou GRAS (*Generally Recognized As Safe*), por órgãos de pesquisa e de saúde pública, como a FAO (*Food and Agriculture Organization*) e FDA (*Food and Drug Administration*). Dessa forma, essas espécies de *Lactobacillus* não devem manifestar potencial patogênico, nem serem capazes de transmitir genes de resistência à antimicrobianos (OLIVEIRA et al., 2002). Os *Lactobacillus* se destacam também por seu isolamento recorrente de produtos fermentados e derivados do leite, bem como por seus extensos registros de uso seguro (MARGALHO, et al., 2021).

2.3 Probióticos

2.3.1 Definição

De acordo com a RDC N° 241/2018, probiótico é aquele microrganismo vivo que, quando administrado em quantidades adequadas, confere algum benefício à saúde do indivíduo e seu uso em alimentos requer a comprovação da sua segurança e benefícios à saúde (BRASIL, 2018). Esses microrganismos pertencem a diferentes gêneros e espécies, tanto de bactérias como leveduras, e têm sido associados a diversos efeitos benéficos.

Para que o microrganismo apresente potencial uso como probiótico, este deve atender a critérios específicos, como: (i) ser identificado à nível de gênero, espécie e linhagem, (ii) ser capaz de produzir substâncias antimicrobianas (bacteriocinas), (iii) ser seguro para uso em alimento e clínico, (iv) ser capaz de sobreviver a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI), (v) ser capaz de aderir a superfícies mucosas, (vi) ser capaz de colonizar o intestino humano, (vii) ser capaz de inibir bactérias patogênicas, (viii) possuir efeito benéfico à saúde clinicamente documentado e validado (ix) ser estável durante o processamento e armazenamento dos alimentos. Para que haja efeitos benéficos à saúde do consumidor, recomenda-se a ingestão de 10^8 – 10^9 UFC diária de 100 g do produto (COLOMBO et al., 2018; MARGALHO et al., 2021).

2.3.2 Probióticos e saúde humana

Os benefícios para a saúde humana associados ao uso de probióticos foram amplamente discutidos. De maneira geral, tais benefícios incluem a inibição de patógenos no TGI, alívio da

intolerância à lactose, redução do colesterol, melhora na resposta imunológica, prevenção de câncer, redução de fatores de risco de doença cardiovascular, prevenção de diarreia associada a antibióticos, produção de vitaminas, tratamento e prevenção de infecção urogenital, entre outros (BYAKIKA et al., 2019).

Os probióticos estão relacionados principalmente a sua ação no trato gastrointestinal. No intestino, sabe-se que os probióticos atuam na modificação da microbiota intestinal, na aderência competitiva à mucosa e epitélio, no fortalecimento da barreira epitelial intestinal e na modulação do sistema imunológico (COLOMBO et al., 2018; METHIWALA et al. 2021). Estudos demonstram a capacidade das bactérias lácticas de produzirem proteases que atuam na redução do potencial alergênico das proteínas do leite, dependendo da cepa e da regulação e otimização do processo de proteólise. Resultados indicam que os queijos artesanais podem ser explorados como fontes de BAL proteolíticas, com potencial para a fabricação de novos laticínios hipoalergênicos (BISCOLA et al., 2018).

Pesquisas recentes demonstram eficácia da suplementação de cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* na redução da gravidade ou no encurtamento da duração da infecção pelo novo Coronavírus em pacientes, havendo resultados positivos no auxílio do tratamento de infecções do trato respiratório de origem viral (JAYAWARDENA et al., 2020; WALTON et al., 2021). Os mecanismos que podem explicar os efeitos de modulação intestinal positivos são através da interação direta com as células imunes e epiteliais intestinais ou modulação indireta pelo microbioma intestinal. Desta forma, evidências clínicas indicam que a modulação da microbiota intestinal pode influenciar positivamente a progressão da doença COVID-19 (WALTON et al., 2021).

Recentemente, os probióticos ganharam força na pesquisa em saúde mental e doenças psíquicas, evidenciando efeitos da microbiota intestinal nos aspectos funcionais e neurológicos do cérebro. Estudos demonstram que o efeito do microbioma não se limita à neurotransmissão geral, mas também está envolvido em doenças psiquiátricas, do neurodesenvolvimento e neurodegenerativas (RUDZKI et al., 2019). O mecanismo de ação dos psicobióticos (probióticos utilizados auxiliando no tratamento de transtornos psicológicos), envolve a modulação de diferentes vias, incluindo sinalização neural, produção de metabólitos e resposta imune. Em geral, esses efeitos medeiam a sinalização neuroendócrina, relacionada a fisiopatologia de muitos distúrbios neurológicos e tem sido sugerida como um alvo eficaz para a ação dos probióticos (METHIWALA et al., 2021).

O uso de psicobióticos destacou um novo conceito de que, contrariamente ao uso de antidepressivos para fornecer as mudanças desejadas, é importante restaurar a comunicação entre a microbiota intestinal e o cérebro, para um estado saudável de equilíbrio e assim, auxiliar a restaurar o funcionamento cerebral saudável (METHIWALA et al., 2021). Portanto, é evidente que a modulação da microbiota intestinal por meio do uso de probióticos tem potencial para o tratamento das doenças e distúrbios mentais, doenças respiratórias virais, além dos distúrbios do TGI.

2.3.3 Legislação brasileira

A regulamentação dos probióticos no Brasil é compartilhada por duas instituições governamentais, o Ministério da Saúde, responsável por avaliar o potencial benéfico e probiótico das cepas que serão utilizadas na produção de alimentos, e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a qual assegura o registro de produtos e a autorização de empresas. Fica a par do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a responsabilidade de fiscalizar as indústrias e registrar os produtos que serão produzidos de acordo com as normas de fiscalização. Diante da complexidade do sistema regulatório brasileiro, o país possui um baixo número de pedidos de registro de alimentos com probióticos (COLOMBO et al., 2018).

A legislação brasileira refere-se aos probióticos nas seguintes resoluções: (i) Resolução RDC nº 241, de 26 de julho de 2018, que dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos; (ii) Resolução RDC nº 243, de 26 de julho de 2018, que dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares; (iii) Resolução nº 17, de 30 de abril de 1999, que aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para avaliação de risco e segurança dos alimentos; e (iv) Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999, que aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos.

Recentemente, a ANVISA publicou a segunda versão do Guia para Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para uso em Alimentos Guia nº 21/2021, contendo orientações para utilização de probióticos em alimentos e a condução da comprovação da

segurança e dos benefícios associados ao consumo desses microrganismos, considerando os requisitos estabelecidos na legislação (BRASIL, 2021).

Atualmente, o desenvolvimento de resistência a antimicrobianos entre bactérias lácticas é uma preocupação crescente no âmbito da saúde devido à possibilidade de transferência de sua resistência ou genes virulentos para outros microrganismos. Portanto, é necessária a avaliação de todas as linhagens microbianas candidatas a probióticos, quanto à susceptibilidade a um número relevante de antimicrobianos de importância tanto humana, quanto veterinária (COLOMBO et al., 2018).

2.3.4 Testes de triagem

Diversos testes podem ser empregues na caracterização de microrganismos como probióticos, entre os principais estão a resistência à acidez gástrica e aos ácidos biliares, aderência ao muco e/ou células epiteliais humanas, atividade antimicrobiana contra bactérias potencialmente patogênicas, capacidade de reduzir a adesão de patógenos às superfícies e atividade da hidrolase do sal biliar. O estudo de microrganismos potencialmente probióticos geralmente envolvem três componentes principais: a determinação da sobrevivência no TGI, segurança para uso humano ou animal e a definição da atividade/benefício do probiótico para o consumidor. Os benefícios à saúde são específicos para cada cepa e não abrangem necessariamente todos os organismos probióticos ou mesmo membros da mesma espécie (BYAKIKA et al., 2019; BINDA et al., 2020).

A avaliação de segurança é um critério importante para qualquer microrganismo de uso alimentar, mesmo para os lactobacilos, que não têm fatores de virulência associados e raramente foram relacionados a infecções em humanos saudáveis. A avaliação da segurança de um probiótico se inicia com a identificação correta da cepa em nível de espécie, uma vez que as propriedades probióticas são altamente específicas de cada cepa. Os métodos convencionais de identificação bacteriana baseiam-se principalmente em testes fenotípicos, que são inadequados ao nível da espécie, recomendando-se o uso de diferentes metodologias moleculares para estabelecer a identidade da cepa. As técnicas moleculares atuais usadas para identificação incluem técnicas baseadas em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), sequenciamento de

rRNA 16S e técnicas de impressão digital de DNA como ribotipagem e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (PRADHAN et al., 2020).

A resistência aos antibióticos é a principal preocupação de segurança, portanto, os probióticos não devem atuar como fonte de genes de resistência a antibióticos. A presença de resistência em bactérias probióticas representa potencial de transferência dessa resistência para organismos patogênicos *in vivo*. Em geral, os lactobacilos são sensíveis à penicilina e β -lactamase, mas são mais resistentes às cefalosporinas, sendo que, cepas de lactobacilos são intrinsecamente resistentes à vancomicina. Por outro lado, os lactobacilos são geralmente suscetíveis a baixas concentrações de cloranfenicol, macrolídeos, lincosamidas e tetraciclina. A resistência a canamicina, gentamicina, e estreptomicina é frequentemente alta e considerada intrínseca. Os testes utilizados para avaliar a susceptibilidade dos microrganismos probióticos aos antibióticos incluem o teste de difusão em disco de ágar e o teste de Concentração Inibitória Mínima (MIC) (BYAKIKA et al., 2019; PRADHAN et al., 2020).

A avaliação da tolerância às condições ácidas e biliares severas do TGI é fundamental para a seleção de microrganismos probióticos. Existem vários métodos de avaliação da estabilidade de cepas microbianas a altas condições ácidas e biliares, entre eles, o método de tubo, métodos de difusão, biorreatores, estudos com animais e técnicas ômicas. O método *in vitro* em tubos é o mais comum, simples e mais barato e consiste no ajuste do pH de um respectivo caldo ou PBS (*Phosphate Buffered Saline*) para diferentes níveis (pH = 1,5–3,5) usando HCl concentrado. O caldo acidificado é inoculado com uma concentração conhecida da bactéria (10^6 – 10^9 UFC / mL) e incubado por um determinado período de tempo (2–4 horas). Este período de incubação se assemelha ao tempo que o alimento leva no estômago antes de seguir para o duodeno. As amostras são retiradas em intervalos para determinar as contagens de células viáveis ou crescimento celular (BYAKIKA et al., 2019).

A atividade antimicrobiana por parte dos microrganismos probióticos frente aos patogênicos, é realizada através da inibição dos patógenos por meio da produção de ácidos, peróxido de hidrogênio, álcoois e bacteriocinas. A ação antimicrobiana também pode ocorrer por competição com o patógeno por nutrientes ou locais de fixação no epitélio intestinal. O método de difusão em ágar é muito utilizado no estudo da atividade antimicrobiana de bactérias, onde, o microrganismo com potencial probiótico é cultivado em caldo por, aproximadamente 18 horas e centrifugado para obtenção do sobrenadante. Posteriormente é feita a inoculação do microrganismo patogênico em poços de diâmetro conhecido. Os poços são então cobertos com o sobrenadante e as placas incubadas em condições apropriadas. A formação de zonas claras

em torno dos poços é indicativa de inibição. Como alternativa, a cepa potencial probiótica é espalhada na superfície do ágar, incubada e, posteriormente, o patógeno, embebido em meio BHI (*Brain Heart Infusion Broth*) semissólido, é espalhado na superfície da placa. As placas são incubadas e as zonas de inibição medidas. Esses ensaios de difusão são simples e confiáveis; no entanto, são limitados pelo tipo e pela densidade do ágar (BYAKIKA et al., 2019).

2.3.5 QMA como potencial fonte de probióticos

A produção do QMA representa um importante papel histórico, social, econômico e cultural para as comunidades tradicionais, com sua produção datada de mais de 200 anos, é considerado uma fonte rica de microrganismos com potencial biotecnológico (ALMEIDA et al., 2012; CAMPAGNOLLO et al., 2018; MARGALHO et al., 2021; MARGALHO et al., 2020). As espécies *L. rhamnosus* (atualmente *Lacticaseibacillus rhamnosus*), *L. casei* e *L. plantarum* representam exemplos de microrganismos desejáveis para a produção de QMA devido as características sensoriais e por serem microrganismos com importante papel probiótico (RESENDE et al., 2011).

Apesar do leite cru ser considerado uma fonte de microrganismos benéficos, o controle sanitário do rebanho, a padronização do processo de fabricação, implementação as boas práticas de fabricação (BPF) e o cumprimento dos tempos de maturação, são obrigatórios para atender aos critérios de qualidade e segurança (CAMARGO et al., 2021). A redução do pH a partir da ação das BAL, a diminuição da umidade ao longo da maturação e a adição de sal na fabricação dos queijos, são condições que favorecem a segurança dos QMA (PENNA et al., 2021). Por meio da produção de compostos antimicrobianos pelas BAL, estas contribuem para a segurança dos produtos lácteos, sendo extremamente desejável em queijos artesanais. Além disso, o uso de BAL em alimentos como agentes biopreservativos, tornou-se uma tendência devido à sua maior eficácia em comparação aos conservantes artificiais, o que ajuda a prolongar a vida de prateleira e suprimir o crescimento de patógenos em produtos lácteos (MARGALHO et al., 2020; CAMARGO et al., 2021).

As indústrias de alimentos estão frequentemente em busca de novas cepas probióticas, com foco no desenvolvimento de novos produtos lácteos afim de suprir a demanda dos consumidores por alternativas para manter a saúde e bem-estar (COLOMBO et al., 2018).

Atualmente, produtos lácteos são o principal veículo para a administração de probióticos em concentrações ideais para os consumidores, principalmente os leites fermentados. Estudos demonstram o potencial dos queijos como portadores de culturas probióticas, podendo ser um veículo interessante para o probiótico, já que consiste em uma matriz alimentar altamente nutritiva. Além disso, a caracterização das BAL nesses produtos pode fornecer marcadores úteis de autenticidade e identidade dos mesmos (NERO et al., 2021).

O desenvolvimento de queijos probióticos exige o conhecimento tanto das etapas de processamento, bem como a influência destas na sobrevivência dos microrganismos durante toda a vida útil do produto, de maneira que as células estejam viáveis no momento do consumo. Para isso, as bactérias probióticas incorporadas no queijo devem ser capazes de se multiplicarem no intestino humano (MARGALHO et al, 2021). Paralelamente, a seleção de microrganismos probióticos a partir desses queijos é de interesse científico e industrial, devido ao potencial biotecnológico e funcional a ser explorado. Em função da presença de uma microbiota endógena específica de cada região de produção, o QMA é considerado um produto alimentício fonte de microrganismos para formação de banco de culturas lácticas desejáveis, conferindo segurança na produção e sabor aos queijos, além de preservar o patrimônio cultural (ANDRADE et al., 2014; MARGALHO et al., 2020).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A. C.; DINIZ, T. T.; DE SOUZA, M. R.; et al. Characterization of production of artisanal cheese in the region of Montes Claros-MG, Brazil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 4, p. 312–320, 2012. Disponível em: <<https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/2924>>. Acesso em: 29/9/2020.
- ANDRADE, C. R. G.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M.; et al. Propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra - MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 5, p. 1592–1600, 2014. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/abmvz/a/WSpkP65kdQ89NMKCHrNDg7y/?lang=pt>>. Acesso em: 21/12/2021.
- ARENA, M. P.; SILVAIN, A.; NORMANNO, G.; et al. Use of *Lactobacillus plantarum* Strains as a Bio-Control Strategy against Food-Borne Pathogenic Microorganisms. **Frontiers in microbiology**, v. 7, n. APR, 2016. Front Microbiol. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27148172/>>. Acesso em: 3/1/2022.
- BARROSO DE ANTONIO, M.; MARTINS BORELLI, B. A importância das bactérias lácticas na segurança e qualidade dos queijos Minas artesanais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 75, n. 3, p. 204–221, 2020. Lepidus Tecnologia. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/799>>. Acesso em: 23/12/2021.
- BINDA, S.; HILL, C.; JOHANSEN, E.; et al. Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1662, 2020. Frontiers Media S.A.
- BISCOLA, V.; CHOISSET, Y.; RABESONA, H.; et al. Brazilian artisanal ripened cheeses as sources of proteolytic lactic acid bacteria capable of reducing cow milk allergy. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 2, p. 564–574, 2018. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<https://onlinelibrary-wiley.ez26.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1111/jam.13779>>. Acesso em: 21/12/2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 241, de 26 de julho 2018. Requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos - Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 de jul. 2018. p. 97.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia Para Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para Uso em Alimentos. Guia nº 21/2021 – versão 2.
- BYAKIKA, S.; MUKISA, I. M.; BYARUHANGA, Y. B.; MUYANJA, C. A Review of Criteria and Methods for Evaluating the Probiotic Potential of Microorganisms. **https://doi.org/10.1080/87559129.2019.1584815**, v. 35, n. 5, p. 427–466, 2019. Taylor & Francis. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/87559129.2019.1584815>>. Acesso em: 5/1/2022.
- CAMARGO, A. C.; DE ARAÚJO, J. P. A.; FUSIEGER, A.; DE CARVALHO, A. F.; NERO, L. A. Microbiological quality and safety of Brazilian artisanal cheeses. **Brazilian Journal of Microbiology** 2021 **52:1**, v. 52, n. 1, p. 393–409, 2021. Springer. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez26.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s42770-020-00416->

9>. Acesso em: 21/12/2021.

CAMPAGNOLLO, F. B.; MARGALHO, L. P.; KAMIMURA, B. A.; et al. Selection of indigenous lactic acid bacteria presenting anti-listerial activity, and their role in reducing the maturation period and assuring the safety of traditional Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 73, p. 288–297, 2018. Academic Press.

CAMPOS, G. Z.; LACORTE, G. A.; JURKIEWICZ, C.; et al. Microbiological characteristics of canastra cheese during manufacturing and ripening. **Food Control**, v. 121, p. 107598, 2021. Elsevier.

CARLOS GONÇALVES COSTA JÚNIOR, L.; JOSÉ MORENO, V.; ANTONIO RESPLANDE MAGALHÃES, F.; et al. MATURAÇÃO DO QUEIJO MINAS ARTESANAL DA MICRORREGIÃO CAMPO DAS VERTENTES E OS EFEITOS DOS PERÍODOS SECO E CHUVOSO. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 2, p. 111, 2014. Lepidus Tecnologia. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/326>>. Acesso em: 29/9/2020.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic Lactobacillus Species. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 12, p. 1636–1643, 1998. Allen Press. Disponível em: <http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/61/12/1636/1663654/0362-028x-61_12_1636.pdf>. Acesso em: 21/12/2021.

COLAUTTI, A.; ARNOLDI, M.; COMI, G.; IACUMIN, L. Antibiotic resistance and virulence factors in lactobacilli: something to carefully consider. **Food Microbiology**, v. 103, p. 103934, 2022. Academic Press.

COLOMBO, M.; TODOROV, S. D.; ELLER, M.; NERO, L. A. The potential use of probiotic and beneficial bacteria in the Brazilian dairy industry. **Journal of Dairy Research**, v. 85, n. 4, p. 487–496, 2018. Cambridge University Press. Disponível em: <<https://www-cambridge.ez26.periodicos.capes.gov.br/core/journals/journal-of-dairy-research/article/potential-use-of-probiotic-and-beneficial-bacteria-in-the-brazilian-dairy-industry/90AE9D7B70989C871C498D9F7A409214>>. Acesso em: 22/12/2021.

COSTA, H. H. S.; SOUZA, M. R.; ACÚRCIO, L. B.; et al. Potencial probiótico in vitro de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1858–1866, 2013. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/abmvz/a/CkbwNBcmt5S8Mb8kDf5KqGz/?lang=pt>>. Acesso em: 21/12/2021.

EPAMIG. Queijo minas artesanal: principais problemas de fabricação: manual técnico de orientação ao produtor. Belo Horizonte: EPAMIG, 2019.

FINGER, J. A. F. F.; BARONI, W. S. G. V.; MAFFEI, D. F.; BASTOS, D. H. M.; PINTO, U. M. Overview of Foodborne Disease Outbreaks in Brazil from 2000 to 2018. **Foods** **2019**, Vol. **8**, Page **434**, v. 8, n. 10, p. 434, 2019. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2304-8158/8/10/434/htm>>. Acesso em: 12/1/2022.

FIOCCO, D.; LONGO, A.; ARENA, M. P.; et al. How probiotics face food stress: They get by with a little help. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 9, p. 1552–1580, 2020. Taylor and Francis Inc. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/331856820_How_probiotics_face_food_stress_Th>

ey_get_by_with_a_little_help>. Acesso em: 18/1/2022.

FONSECA, H. C.; DE SOUSA MELO, D.; RAMOS, C. L.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Probiotic Properties of Lactobacilli and Their Ability to Inhibit the Adhesion of Enteropathogenic Bacteria to Caco-2 and HT-29 Cells. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 13, n. 1, p. 102–112, 2021. Springer. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez26.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s12602-020-09659-2>>. Acesso em: 21/12/2021.

GÄNZLE, M. G. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 106–117, 2015. Elsevier.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 4–5, p. 139–157, 1999. Elsevier.

HALDER, D.; MANDAL, M.; CHATTERJEE, S. S.; PAL, N. K.; MANDAL, S. Indigenous Probiotic Lactobacillus Isolates Presenting Antibiotic like Activity against Human Pathogenic Bacteria. **Biomedicines**, v. 5, n. 2, 2017. Biomedicines. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28621711/>>. Acesso em: 12/1/2022.

HANDA, S.; SHARMA, N. In vitro study of probiotic properties of Lactobacillus plantarum F22 isolated from chhang – A traditional fermented beverage of Himachal Pradesh, India. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 91–97, 2016. No longer published by Elsevier.

HANDWERGER, S.; PUCCI, M. J.; VOLK, K. J.; LIU, J.; LEE, M. S. Vancomycin-resistant Leuconostoc mesenteroides and Lactobacillus casei synthesize cytoplasmic peptidoglycan precursors that terminate in lactate. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 1, p. 260, 1994. American Society for Microbiology (ASM). Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/125040/>>. Acesso em: 13/1/2022.

JAYAWARDENA, R.; SOORIYAARACHCHI, P.; CHOURDAKIS, M.; JEEWANDARA, C.; RANASINGHE, P. Enhancing immunity in viral infections, with special emphasis on COVID-19: A review. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 14, n. 4, p. 367–382, 2020. Elsevier.

JUNNARKAR, M. V.; THAKARE, P. M.; YEWALE, P. P.; et al. Evaluation of Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Different Sources in Western India. <https://doi.org/10.1080/08905436.2018.1443825>, v. 32, n. 2, p. 112–129, 2018. Taylor & Francis. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08905436.2018.1443825>>. Acesso em: 18/1/2022.

KAMIMURA, BRUNA AKIE; DE FILIPPIS, F.; SANT’ANA, A. S.; ERCOLINI, D. Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 80, p. 40–49, 2019. Academic Press.

KAMIMURA, BRUNA A.; MAGNANI, M.; LUCIANO, W. A.; et al. Brazilian Artisanal Cheeses: An Overview of their Characteristics, Main Types and Regulatory Aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 5, p. 1636–1657, 2019. Blackwell Publishing Inc. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1541-4337.12486>>. Acesso em: 29/9/2020.

KHAGWAL, N.; SHARMA, P. K.; CHAND SHARMA, D. African Journal of Microbiology Research Screening and evaluation of *Lactobacillus* spp. for the development of potential probiotics. , v. 8, n. 15, p. 1573–1579, 2014. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/AJMR>>. Acesso em: 18/1/2022.

LIU, J.; WANG, Y.; LI, A.; et al. Probiotic potential and safety assessment of *Lactobacillus* isolated from yaks. **Microbial Pathogenesis**, v. 145, p. 104213, 2020. Academic Press.

MANTZOURANI, I.; CHONDROU, P.; BONTSIDIS, C.; et al. Assessment of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from kefir grains: evaluation of adhesion and antiproliferative properties in in vitro experimental systems. . Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13213-019-01467-6>>. Acesso em: 18/1/2022.

MARGALHO, L. P.; FELICIANO, M. D. E.; SILVA, C. E.; et al. Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of nonstarter lactic acid bacteria regarding technological, biopreservative, and safety properties—Insights through multivariate analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 9, p. 7908–7926, 2020. Elsevier.

MARGALHO, L. P.; JORGE, G. P.; NOLETO, D. A. P.; et al. Biopreservation and probiotic potential of a large set of lactic acid bacteria isolated from Brazilian artisanal cheeses: From screening to in product approach. **Microbiological Research**, v. 242, p. 126622, 2021. Urban & Fischer.

MARGALHO, L. P.; KAMIMURA, B. A.; BREXÓ, R. P.; et al. High throughput screening of technological and biopreservation traits of a large set of wild lactic acid bacteria from Brazilian artisanal cheeses. **Food Microbiology**, v. 100, p. 103872, 2021. Academic Press.

MENESES, J. N. C. Queijo Artesanal de Minas: patrimônio cultural do Brasil. , v. 1, p. 156, 2006.

METHIWALA, H. N.; VAIDYA, B.; ADDANKI, V. K.; et al. Gut microbiota in mental health and depression: role of pre/pro/synbiotics in their modulation. **Food & Function**, v. 12, n. 10, p. 4284–4314, 2021. The Royal Society of Chemistry. Disponível em: <<https://pubs-rsc-org.ez26.periodicos.capes.gov.br/en/content/articlehtml/2021/fo/d0fo02855j>>. Acesso em: 22/12/2021.

MINAS GERAIS. Lei nº 20549, de 18 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos Artesanais de Minas Gerais. Diário do Executivo. 19 de dez. 2012.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA. Portaria nº 1.937, de 14 de agosto de 2019. Dispõe sobre a habilitação sanitária dos queijos artesanais e da concessão do selo Arte às queijarias com habilitação sanitária no IMA. Instituto Mineiro de Agropecuária, Belo Horizonte, 14 ago. 2019.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA. Portaria nº 2.051, de 07 de abril de 2021. Define o período de Maturação do Queijo Minas Artesanal produzido nas microrregiões de Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro.

MONTEIRO, R. P., & Da Matta, V. M. (2018). Queijo Minas artesanal: valorizando a agroindústria familiar. Embrapa Agroindústria de Alimentos-Livro técnico (INFOTECA-E).

NATH, S.; SIKIDAR, J.; ROY, M.; DEB, B. In vitro screening of probiotic properties of

- Lactobacillus plantarum isolated from fermented milk product. **Food Quality and Safety**, v. 4, n. 4, p. 213–223, 2020. Oxford Academic. Disponível em: <<https://academic-oup-com.ez26.periodicos.capes.gov.br/fqs/article/4/4/213/5918439>>. Acesso em: 21/12/2021.
- NERO, L. A.; ANDRETTA, M.; ALMEIDA, T. T.; et al. Lactic microbiota of the minas artisanal cheese produced in the serro region, Minas Gerais, Brazil. **LWT**, v. 148, p. 111698, 2021. Academic Press.
- NOGUEIRA DE OLIVEIRA, M.; SIVIERI, K.; HENRIQUE, J.; et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 1, 2002.
- OH, A.; DALIRI, E. B. M.; OH, D. H. Screening for potential probiotic bacteria from Korean fermented soybean paste: In vitro and Caenorhabditis elegans model testing. **LWT - Food Science and Technology**, v. 88, p. 132–138, 2018. Academic Press. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/320342827_Screening_for_potential_probiotic_bacteria_from_Korean_fermented_soybean_paste_In_vitro_and_Caenorhabditis_elegans_model_testing>. Acesso em: 18/1/2022.
- OŁDAK, A.; ZIELIŃSKA, D.; ŁEPECKA, A.; DŁUGOSZ, E.; KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, D. Lactobacillus plantarum Strains Isolated from Polish Regional Cheeses Exhibit Anti-Staphylococcal Activity and Selected Probiotic Properties. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 3, p. 1025–1038, 2020. Springer. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez26.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s12602-019-09587-w>>. Acesso em: 21/12/2021.
- PENNA, A. L. B.; GIGANTE, M. L.; TODOROV, S. D. Artisanal Brazilian Cheeses—History, Marketing, Technological and Microbiological Aspects. **Foods 2021, Vol. 10, Page 1562**, v. 10, n. 7, p. 1562, 2021. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2304-8158/10/7/1562/htm>>. Acesso em: 22/12/2021.
- PERIN, L. M.; SAVO SARDARO, M. L.; NERO, L. A.; NEVIANI, E.; GATTI, M. Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. **Food Microbiology**, v. 65, p. 160–169, 2017. Academic Press.
- PIENIZ, S.; ANDREAZZA, R.; ANGHINONI, T.; CAMARGO, F.; BRANDELLI, A. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of Enterococcus durans strain LAB18s. **Food Control**, v. 37, n. 1, p. 251–256, 2014. Elsevier.
- PRADHAN, D.; MALLAPPA, R. H.; GROVER, S. Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria. **Food Control**, v. 108, p. 106872, 2020. Elsevier.
- 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 acidoláticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1567–1573, 2011. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/abmvz/a/QvV468RTqd6HNcdxN3LjvSK/?lang=pt>>. Acesso em: 21/12/2021.
- RUDZKI, L.; OSTROWSKA, L.; PAWLAK, D.; et al. Probiotic Lactobacillus Plantarum 299v decreases kynurenine concentration and improves cognitive functions in patients with major depression: A double-blind, randomized, placebo controlled study. **Psychoneuroendocrinology**, v. 100, p. 213–222, 2019. Psychoneuroendocrinology. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30388595/>>. Acesso em: 23/12/2021.

SAINI, K.; TOMAR, S. K. In vitro evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus* cultures of human origin capable of selenium bioaccumulation. **LWT**, v. 84, p. 497–504, 2017. Academic Press.

DE SANT'ANNA, F. M.; ACURCIO, L. B.; ALVIM, L. B.; et al. Assessment of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Minas artisanal cheese produced in the Campo das Vertentes region, Brazil. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, n. 4, p. 592–601, 2017. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<https://onlinelibrary-wiley.ez26.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1111/1471-0307.12422>>. Acesso em: 21/12/2021.

SCHNEIDER, K. UNIVERSIDADE DO OESTE DE SANTA CATARINA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E BIOTECNOLOGIA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGROINDÚSTRIA E SAÚDE. , 2016.

SCHWEIGER, M.; EICHMANN, T. O.; TASCHLER, U.; et al. Measurement of Lipolysis. **Methods in Enzymology**, v. 538, p. 171–193, 2014. Academic Press.

SHARMA, P.; TOMAR, S. K.; SANGWAN, V.; GOSWAMI, P.; SINGH, R. Antibiotic Resistance of *Lactobacillus* sp. Isolated from Commercial Probiotic Preparations. **Journal of Food Safety**, v. 36, n. 1, p. 38–51, 2016. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em: <<https://onlinelibrary-wiley.ez26.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1111/jfs.12211>>. Acesso em: 21/12/2021.

SHOKRYAZDAN, P.; SIEO, C. C.; KALAVATHY, R.; et al. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014. Hindawi Publishing Corporation.

SILVA, L. A.; LOPES NETO, J. H. P.; CARDARELLI, H. R. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*: technological properties, biological activity, and potential application in the food industry. **Annals of Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 321–328, 2019. Springer Verlag. Disponível em: <<https://annalsmicrobiology-biomedcentral-com.ez26.periodicos.capes.gov.br/articles/10.1007/s13213-019-01456-9>>. Acesso em: 21/12/2021.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, n. 1, p. 225–241, 2014. Elsevier.

WALTON, G. E.; GIBSON, G. R.; HUNTER, K. A. Mechanisms linking the human gut microbiome to prophylactic and treatment strategies for COVID-19. **British Journal of Nutrition**, v. 126, n. 2, p. 219–227, 2021. Cambridge University Press. Disponível em: <<https://www-cambridge.ez26.periodicos.capes.gov.br/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/mechanisms-linking-the-human-gut-microbiome-to-prophylactic-and-treatment-strategies-for-covid19/A3E1ADF2053768F34BCA72BF620AC86F>>. Acesso em: 22/12/2021.

ZHENG, J.; WITTOUCK, S.; SALVETTI, E.; et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 2020. Microbiology Society. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004107>>. Acesso em: 22/12/2021.

ZIELIŃSKA, D.; RZEPKOWSKA, A.; RADAWSKA, A.; ZIELIŃSKI, K. In vitro screening of selected probiotic properties of Lactobacillus strains isolated from traditional fermented cabbage and cucumber. **Current microbiology**, v. 70, n. 2, p. 183–194, 2015. Curr Microbiol. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25270682/>>. Acesso em: 18/1/2022.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de condução do experimento

O estudo foi conduzido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

3.2 Amostragem

A coleta dos queijos artesanais foi realizada em maio de 2021. Foram adquiridos 7 queijos artesanais no primeiro dia de fabricação, diretamente de um produtor situado no município de Bambuí, na região da Serra da Canastra, Minas Gerais. Após a coleta, os queijos foram mantidos sob refrigeração (4 °C a 10 °C) e encaminhados para o laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciências dos Alimentos da UFLA para maturação e realização das análises microbiológicas. Os queijos foram maturados ao longo de 30 dias em câmara de maturação com temperatura média de 23-25 °C e umidade de 62 %. Amostras das unidades experimentais foram retiradas nos tempos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias de maturação para avaliação da população de BAL.

3.3 Análises microbiológicas

3.3.1 Isolamento de bactérias lácticas

O processamento das amostras e posterior diluição, foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Silva *et. al.* (2010), onde, 25 g de cada amostra de QMA foram homogeneizadas em 225 mL de solução de citrato de sódio (2% m/v) esterilizada. Em seguida foram realizadas diluições seriadas em água peptonada (0,1% m/v) e semeados alíquotas de 100 µL na superfície do ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Difco, Detroit, Michigan, Estados

Unidos). As placas foram incubadas a 37 °C, por 48 horas, em anaerobiose. Essa gerada por geradores de anaerobiose (Anaerobac, Probac do Brasil®).

3.3.2 Caracterização morfológica

Foi realizada a contagem padrão das placas que continham entre 30-300 UFC e todos os morfotipos foram caracterizados macroscopicamente e agrupadas de acordo com a coloração de Gram. As colônias de bactérias com morfotipos diferentes, crescidas em ágar MRS foram retiradas, depositadas em tubos contendo caldo MRS (Difco, Detroit, Michigan, Estados Unidos) e incubadas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, uma alíquota de 200 µL de cada tubo foi transferida para tubos Eppendorf e adicionados 200 µL de meio de congelamento (15% de glicerol, 0,5% de peptona bacteriológica, 0,3% de extrato de levedura e 0,5% de NaCl), e em seguida, congelada a -18 °C para futuras análises (SILVA et al., 2010).

3.3.3 Identificação de bactérias lácticas

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

As bactérias lácticas isoladas (45) foram submetidas a identificação pela análise proteômica, seguindo o protocolo de extração padrão adaptado de Carvalho et al. (2017). Aproximadamente uma alçada de cultura bacteriana foi ressuspensa em 1,2 mL de solução de etanol 75%. A amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi removido. Ao pellet formado, foram adicionados 50 µL de acetronitrila, ácido fórmico e água (50:35:15 v/v) e seguido da agitação em vortex durante 1 min. Foi realizada uma segunda centrifugação e logo após, 0,3µl dos precipitados obtidos contendo as células lisadas, foram depositados em placa de 96 poços e secada em temperatura ambiente para análise no espectrômetro Maldi-tof Microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e análise dos dados no software FlexControl (Versão 3.0).

3.3.3.2 Identificação das bactérias lácticas por Maldi-tof MS

Cada isolado foi analisado em triplicata e a metodologia de calibração do equipamento e método de análise de dados foram realizados conforme descrito por Carvalho et al. (2017). A identificação dos resultados foi expressa por BioTyper log (scores), indicando a similaridade da cepa desconhecida com o perfil disponível em bancos de dados do Maldi-tof MS.

3.4 Potencial Probiótico

3.4.1 Teste de sobrevivência aos sucos gástricos e intestinais

A sobrevivência das BAL na presença dos sucos gástricos e intestinais simulados foi avaliada conforme descrito por Saini et al. (2017), com modificações. As culturas foram cultivadas por 16 horas a 37 °C em caldo MRS estéril, então 1 mL de cada cultura foi misturado em 9 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% p / v) com pH ajustado para 2,0 utilizando ácido clorídrico 1 M (HCl), contendo 0,5 % de pepsina (Fisher Scientific, RU) (p/v). Após a mistura, as contagens iniciais de BAL foram determinadas por plaqueamento em superfície. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 90 min a 37 °C e a viabilidade celular determinada por plaqueamento novamente. Em seguida, o suco intestinal simulado foi preparado pela adição de soluções de oxgall (Himedia, Mumbai, Índia) e pancreatina (Dinâmica, Brasil) para obter as concentrações finais de 0,3% e 0,1% (p/v), respectivamente. O pH foi então ajustado a 7,0 adicionando hidróxido de sódio 1 M (NaOH). Após a mistura, as amostras foram incubadas a 37 °C por 150 min, em seguida, as contagens de células viáveis foram determinadas. Todas as contagens de amostra foram determinadas por plaqueamento em ágar MRS (Man Rogosa and Shape, Kasvi, Itália). Os experimentos foram repetidos três vezes e realizados em triplicata. Os resultados foram expressos como unidades formadoras de colônias logarítmicas médias por mL (Log UFC / mL). A taxa de sobrevivência foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Sobrevivência (\%)} = [\text{final (Log UFC/mL)} / \text{inicial (Log UFC/mL)}] \times 100$$

3.4.2 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das culturas de BAL foi avaliada a partir da formação de halos de inibição em ágar de acordo com Arena et al. (2016) com modificações. Alíquotas de 15 µL de cada isolado de BAL previamente cultivado em caldo MRS foi aplicada separadamente em placas contendo ágar MRS e incubados a 37 °C por 48 horas para permitir a expressão e secreção de compostos antimicrobianos produzidos. Os microrganismos indicadores foram: *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) CDC 055, *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) ATCC 35401, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Staphylococcus aureus* ATCC 13565. Culturas crescidas com aproximadamente 18h de cultivo, ou *overnight*, dos microrganismos indicadores foram misturados (1:100) com ágar acrescido de BHI (0,7 % p / v) e sobrepostos em colônias desenvolvidas (8 mm diâmetro) dos isolados de BAL. Após incubação a 37 °C por 24 horas, as placas foram verificadas quanto a formação de zonas de inibição em torno das colônias de BAL. O ensaio foi repetido três vezes.

3.4.3 Suscetibilidade a antibióticos

A susceptibilidade aos antibióticos foi determinada pelo ensaio de difusão em disco. Culturas crescidas *overnight* de isolados de BAL (100 µL) foram espalhados em meio ágar MRS e discos de antibióticos contendo: ampicilina (10 µg), vancomicina (30 µg), estreptomicina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), azitromicina (15 µg), oxacilina (1 µg), cefuroxina (30 µg), norfloxacin (10 µg) e lincomicina (2 µg), foram colocados na superfície das placas inoculadas usando uma pinça estéril. Os diâmetros da zona de inibição foram medidos após incubação a 37 °C por 24 horas. A susceptibilidade dos isolados foi categorizada como resistente (R), moderadamente suscetível (MS) ou suscetível (S) de acordo com Charteris et al. (1998). O experimento foi repetido três vezes e realizados em triplicata.

3.5 Potencial Tecnológico

3.5.1 Atividade proteolítica e lipolítica

Para a determinação da atividade proteolítica, 2 μL ($\sim 10^8$ UFC / mL) de culturas crescidas *overnight* em caldo MRS foram adicionadas na superfície do meio ágar leite desnatado reconstituído, contendo 10% de leite (m/v) e 2% de ágar (m/v). As cepas proteolíticas positivas foram identificadas pela formação de zonas claras ao redor das células. Para a determinação da atividade lipolítica, 2 μL das culturas cultivadas durante a noite em caldo MRS foram colocadas em placas contendo meio lipolítico (peptona de carne: 2,5 g / L; peptona de caseína: 2,5 g / L; extrato de levedura: 3 g / L; Agar-agar: 12g /L), adicionado com 1% de tributirina e 0,0025% (p/v) de fenol vermelho, utilizado como indicador para a produção de ácido butírico. O aparecimento de halos amarelos ao redor das células é indicativo de atividade positiva. Os resultados foram expressos em alta (+++), média (++) e baixa (+) atividade, de acordo com o tamanho ou intensidade do halo.

3.6 Análise estatística

Os dados foram analisados por análise de variância, seguida de teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Toda a análise estatística foi realizada no software R versão 3.5.1 (R Foundation, Áustria).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e caracterização das bactérias lácticas

As colônias de BAL foram isoladas ao longo do tempo de maturação em intervalos de cinco dias, totalizando 65 morfotipos e 127 isolados. Na Tabela 2 são apresentadas as quantidades de morfotipos, colônias e contagens totais de BAL isoladas em cada tempo de maturação.

Tabela 2 – Número de morfotipos e colônias isoladas em cada tempo de maturação do QMA, juntamente com a contagem total de BAL.

Tempo	Morfotipos	Colônias isoladas	Contagem Total Log UFC/g
0	8	26	7,47
5	9	21	9,13
10	10	22	8,97
15	13	13	7,95
20	12	18	9,14
25	8	14	8,90
30	5	13	9,10

Fonte: Da Autora (2022).

4.2 Identificação das bactérias lácticas isoladas

Do total de isolados, apenas 18 foram identificados com escore maior ou igual a 2,0. De acordo com fabricante, escore entre 1,7 e 1,9 é indicativo de identificação de gênero e escore igual ou superior a 2,0 é o limiar definitivo para identificação da espécie. As cepas caracterizadas, utilizando a análise Maldi-tof, resultou na identificação da espécie *Lactobacillus plantarum* em 40% dos isolados. Entre os demais isolados, 15 foram identificados apenas em nível de gênero, *Lactobacillus* spp. (33%) e o restante (27%), não resultou em identificação confiável pelo programa. Na Tabela 3, são apresentados os valores de escore de identificação dos isolados de acordo com o software FlexControl (Versão 3.0).

De acordo com Penna et al. (2021), a microbiota do queijo minas artesanal é composta principalmente por *Lactococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus* spp., *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus casei*. Kamimura, et al., (2019), realizaram mapeamento em larga escala da diversidade microbiana de diferentes tipos de

queijos artesanais brasileiros, onde os resultados revelaram que aspectos, tanto tecnológicos quanto geográficos, influenciam na microbiota do queijo. Perin et al. (2017) relataram que *Lactobacillus* spp. foi o gênero mais prevalente nos QMA das regiões da Canastra, Serra do Salitre, Serro, Araxá e Campo das Vertentes. Em outro estudo, Resende et al. (2011) registraram a presença de *L. rhamnosus*, *L. casei* e *L. plantarum* como principal espécie isolada do leite e do queijo Canastra. Portanto, a predominância do gênero *Lactobacillus* e da espécie *L. plantarum* nas amostras analisadas no presente estudo, corroboram com achados anteriores. A maior incidência de *L. plantarum* pode ser explicada pela sua presença no ambiente (ar, utensílios), produtos lácteos e não lácteos, vegetais fermentados e intestinos humanos (MARGALHO et al., 2021).

Tabela 3 - Espécies de bactérias lácticas isoladas de queijos artesanais identificadas por MALDI-TOF.

Isolado	Espécie	Valor (escore)^a
LP54	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.286
LP48	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.234
LP24	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.222
LP22	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.184
LP99	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.178
LP33	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.159
LP101	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.144
LP77	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.137
LP100	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.124
LP44	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.124
LP94	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.123
LP25	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.119
LP71	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.094
LP76	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.087
LP61	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.085
LP116	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.056
LP72	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.023
LP42	<i>Lactobacillus plantarum</i>	2.011

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

4.3 Potencial probiótico

4.3.1 Atividade antimicrobiana

Quanto a atividade antimicrobiana, as cepas *L. plantarum* LP116, *L. plantarum* LP77, *L. plantarum* LP24 e *L. plantarum* LP48, demonstraram atividade inibitória contra todos os patógenos avaliados (TABELA 4). Por outro lado, as espécies isoladas de *L. plantarum* LP101 e LP94, não apresentaram atividade inibitória frente a nenhum dos microrganismos patogênicos avaliados. Entre os isolados identificados por gênero, *Lactobacillus* spp. L88 e L41 apresentaram atividade inibitória frente aos patógenos testados, enquanto que os isolados *Lactobacillus* spp. L105, L119 e L91 não inibiram o crescimento dos mesmos. A atividade antimicrobiana dos *L. plantarum* LP116, LP77, LP24 e LP48, e dos *Lactobacillus* spp. L81, L88 e L41, pode ser explicada pela produção do ácido lático, bacteriocinas e H₂O₂, já que, estes microrganismos são relacionados a produção dessas substâncias.

Tabela 4 - Atividade inibitória de cepas BAL selecionadas contra cepas indicadoras.

Isolado	Cepas indicadoras			
	SA	LM	EPEC	ETEC
<i>Lactobacillus</i> spp. L105	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> LP101	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> LP116	+++	+++	+++	+++
<i>L. plantarum</i> LP77	+++	+++	+++	+++
<i>L. plantarum</i> LP94	-	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> spp. L119	-	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> spp. L81	+++	-	+++	+++
<i>L. plantarum</i> LP24	+++	+++	+++	+++
<i>Lactobacillus</i> spp. L88	+++	+++	++	++
<i>Lactobacillus</i> spp. L41	+++	+++	+++	+++
<i>Lactobacillus</i> spp. L91	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> LP48	++	++	++	++

-: sem inibição, +: zona de inibição 9-11 mm, ++: zona de inibição 12-14 mm, +++: zona de inibição ≥ 15 mm.

SA: *S. aureus* ATCC 13565; LM: *L. monocytogenes* ATCC 19117; EPEC: *E. coli* enteropatogênica CDC 055; ETEC: *E. coli* enterotoxigênica ATCC 35401.

Fonte: Da Autora (2022).

Diversos estudos avaliaram o potencial de diferentes BAL na inibição contra patógenos presentes nos QMA, de acordo com os resultados obtidos, bactérias do gênero *Lactobacillus* demonstraram os melhores resultados (ANDRADE et al., 2014; BARROSO; BORELLI, 2020). Microrganismos do gênero *Lactobacillus* spp. foram identificados com diferentes atividades antibacterianas contra uma variedade de patógenos humanos. *L. plantarum* isolados de diferentes fontes alimentares (frutas e vegetais fermentados, cereais, iogurtes e queijos) apresentaram propriedade antibacteriana frente aos patógenos *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, além de *Vibrio cholerae*, *S. typhi*, *Salmonella* e espécies de *Shigella*. Entretanto, a relação de antagonismo entre os lactobacilos e bactérias patogênicas é específico entre cepa/isolado, bem como patógeno específico (HALDER et al., 2017; FONSECA et al., 2021). O que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo, onde, 66% dos *L. plantarum* e 50% *Lactobacillus* spp. isolados inibiram os patógenos testados.

A detecção de estafilococos coagulase positiva em níveis acima dos permitidos por lei tem sido frequentemente relatada para diversos tipos de QMA, e o seu controle é considerado um marcador para avaliar a segurança dos produtos lácteos (PENNA et al., 2021). Devido a tolerância a altas concentrações de sal e ácido e a capacidade de sobrevivência em temperaturas de refrigeração, *L. monocytogenes* representa uma série de obstáculos para seu controle em produtos alimentícios fermentados, sendo relatada a sua presença em amostras de queijo artesanal da Serra da Canastra (CAMPOS et al., 2021; PENNA et al., 2021). Diferentes estudos avaliaram a presença de *E. coli* em QMA, os resultados indicaram possível contaminação fecal, representando fator de risco, já que algumas cepas podem ser patogênicas (FINGER et al., 2019; CAMPOS et al., 2021).

A atividade antimicrobiana ou antagonismo, pode ocorrer pela competição por nutrientes ou sítio de adesão, e pela produção de substâncias antimicrobianas (bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, ácidos orgânicos, acetaldeído e diacetil) (BARROSO; BORELLI, 2020). Portanto, a inibição de microrganismos patogênicos e deteriorantes é importante, pois contribui para sobrevivência das bactérias ácido lácticas em queijos, auxiliando na manutenção da qualidade e segurança do produto.

4.3.2 Sobrevivência aos sucos gástricos e intestinais

A sobrevivência de microrganismos potencialmente probióticos pela passagem ao trato gastrointestinal (TGI), é um dos critérios de seleção mais importantes, para isso, devem apresentar tolerância as condições adversas do processo de digestão (MARGALHO et al., 2021). Os isolados que apresentaram as melhores atividades antagônicas frente aos patógenos testados, foram selecionados para avaliação da sobrevivência ao TGI simulados. Apenas um isolado (*Lactobacillus plantarum* LP24), apresentou taxa de sobrevivência acima de 50% após exposição aos sucos gástricos e intestinais simulados. O restante dos microrganismos isolados apresentou taxas de sobrevivência abaixo de 50%. Os isolados *Lactobacillus* spp. L88 e *Lactobacillus* spp. L81 não foram capazes de tolerar condições de estresse impostas pelo TGI simulado (TABELA 5).

Tabela 5 - Sobrevivência de cepas BAL selecionadas sob condições simuladas de sucos gástricos e intestinais a 37 °C.

Isolado	Sobrevivência aos sucos gástricos e intestinais			Taxa de Sobrevivência (%) **
	Contagem inicial*	Sobrevivência após 90 min*	Sobrevivência após 240 min*	
<i>L. plantarum</i> LP77	1,14	0,32	0,90	28,18
<i>L. plantarum</i> LP48	1,56	0,06	2,57	4,99
<i>L. plantarum</i> LP116	2,13	0,10	3,67	4,74
<i>Lactobacillus</i> spp. L88	2,34	0,00	2,41	0,00
<i>L. plantarum</i> LP24	3,68	2,17	3,61	59,26
<i>Lactobacillus</i> spp. L41	1,82	0,10	1,35	5,60
<i>Lactobacillus</i> spp. L81	0,21	0,00	0,56	0,00

*Os valores são relatados como Log UFC/mL (média de 3 experimentos, cada um foi realizado em triplicata).

**Com diferença significativa ($p > 0,05$), segundo teste de Tukey.

Fonte: Da Autora (2022).

Inicialmente, os isolados de BAL foram submetidos a pH baixo (2,0), sendo este o primeiro desafio durante a passagem pelo TGI durante a digestão, considerado o principal

obstáculo para o estabelecimento de bactérias probióticas no intestino do hospedeiro (FIOCCO et al., 2020). Além disso, o processo de digestão também envolve a ação de enzimas digestivas presentes no estômago e a sobrevivência de diferentes bactérias lácticas ao estresse do processo digestivo varia entre as espécies (PIENIZ et al., 2014; HANDA; SHARMA, 2016). Dado este que explica a variação dos resultados obtidos no presente teste. Margalho et. al, (2021) avaliaram a sobrevivência de BAL potencialmente probióticas isoladas de diferentes queijos artesanais brasileiros, onde, 46,7 % dos *Lactobacillus plantarum* isolados apresentaram taxas de sobrevivência moderada (entre 50 e 75 %). Os sais biliares agem rompendo a camada lipídica e de ácidos graxos da membrana celular, o que diminui a taxa de sobrevivência das bactérias em teste (KHAGWAL et al., 2014).

Em estudo conduzido por Zielińska et al. (2015), foi relatado taxa de sobrevivência entre 30 - 100 % de cepas probióticas de *Lactobacillus*, quando inoculadas em suco gástrico em pH 3. A variação nas taxas de sobrevivência pelos microrganismos testados também foi observada no presente estudo, variando de 0 a 59 %. Nath et al. (2020), relataram taxa de sobrevivência elevada (<90%) de cepas *L. plantarum* isoladas de produtos lácteos fermentados, demonstrando sua eficácia e uso adicional como uma potencial cepa probiótica. Entretanto, o presente estudo não observou valores semelhantes, onde apenas um isolado apresentou taxa de sobrevivência moderada (59,26%), e os demais resultaram em baixa sobrevivência (0- 20 %).

Nos últimos anos, diferentes estudos foram realizados para demonstrar a interação de bactérias lácticas com enzimas pancreáticas, e sua sobrevivência em triagem *in vitro* torna-se um critério importante para a seleção de microrganismos probióticos (JUNNARKAR et al., 2018; OH et al., 2018; MANTZOURANI et al., 2019).

4.3.3 Suscetibilidade a antibióticos

As cepas avaliadas foram sensíveis a pelo menos um antibiótico das classes inibidor de síntese proteica e inibidor de síntese de parede celular. Todas as cepas foram sensíveis à eritromicina e ampicilina, e resistentes à vancomicina, norfloxacin e cloranfenicol (TABELA 6). Apenas a cepa de *L. plantarum* LP24 apresentou resistência a azitromicina e a cepa *Lactobacillus* spp. L105 foi a única susceptível a estreptomicina.

Tabela 6 - Suscetibilidade a antibióticos^a de cepas de BAL selecionadas avaliadas pelo método de difusão em disco.

Cepa	Diâmetro da zona de inibição em mm do antibiótico testado ^b									
	OXA1	NOR10	AZI15	E15	CXM30	VAN30	AMP10	S10	L2	CL30
L105	20 (S)	0 (R)	29 (S)	32 (S)	17 (MS)	8 (R)	37 (S)	16 (S)	39 (S)	0 (R)
L119	14 (S)	0 (R)	27 (S)	39 (S)	21 (S)	0 (R)	48 (S)	0 (R)	38 (S)	0 (R)
LP101	10 (MS)	0 (R)	24 (S)	31 (S)	27 (S)	0 (R)	44 (S)	0 (R)	39 (S)	2 (R)
L81	7 (R)	0 (R)	41 (S)	39 (S)	19 (S)	0 (R)	41 (S)	0 (R)	0 (R)	0 (R)
LP48	12 (MS)	0 (R)	33 (S)	32 (S)	31 (S)	0 (R)	58 (S)	0 (R)	47 (S)	12 (R)
LP24	5 (R)	0 (R)	10 (R)	28 (S)	23 (S)	7 (R)	34 (S)	0 (R)	0 (R)	0 (R)
L88	0 (R)	0 (R)	22 (S)	31 (S)	14 (R)	0 (R)	40 (S)	0 (R)	0 (R)	0 (R)
LP116	12 (MS)	0 (R)	23 (S)	30 (S)	19 (S)	0 (R)	47 (S)	0 (R)	0 (R)	0 (R)
LP94	19 (S)	0 (R)	29 (S)	33 (S)	33 (S)	0 (R)	37 (S)	3 (R)	44 (S)	10 (R)
L41	3 (R)	0 (R)	19 (S)	26 (S)	31 (S)	0 (R)	46 (S)	5 (R)	36 (S)	0 (R)
LP77	20 (S)	0 (R)	27 (S)	37 (S)	32 (S)	0 (R)	47 (S)	0 (R)	28 (S)	2 (R)
L91	0 (R)	0 (R)	22 (S)	24 (S)	0 (R)	0 (R)	37 (S)	0 (R)	0 (R)	0 (R)

^aA suscetibilidade dos isolados foi classificada como resistente (R), moderadamente suscetível (MS) e suscetível (S) de acordo com os valores de corte propostos por Charteris et al. (1998).

^bAntibióticos: OXA = oxacilina (1 µg); NOR = norfloxacina (10 µg); AZI = azitromicina (15 µg); E = eritromicina (15 µg); CXM = cefuroxina (30 µg); VAN = vancomicina (30 µg); AMP = ampicilina (10 µg); S = estreptomicina (10 µg); L = lincomicina (2 µg); CLO = cloranfenicol (30 µg).

Fonte: Da Autora (2022).

Vários *Lactobacillus* spp. foram relatados como resistentes à vancomicina, o que também foi observado no presente estudo (ANDRADE et al., 2014; HALDER et al., 2017; LIU et al., 2020; FONSECA et al., 2021). Nath et al. (2020) observaram susceptibilidade moderada de cepas de *L. plantarum* frente ao antibiótico norfloxacina, porém, as cepas aqui avaliadas apresentaram resistência ao antibiótico da classe das fluoroquinolonas de segunda geração, estando de acordo com achados por Sharma et al. (2016). *Lactobacillus* spp. são relatados como resistentes ao cloranfenicol, o que confirma a resistência de todas as cepas frente ao antibiótico em teste (SCHNEIDER, 2016).

De maneira geral, os lactobacilos são suscetíveis a antibióticos que inibem a síntese de proteínas como eritromicina e azitromicina, antibióticos da classe dos macrolídeos, porém, a crescente pressão seletiva tornou possível a adaptação e aquisição de genes de resistência por esses microrganismos (NATH et al., 2020). Entretanto, os resultados obtidos indicaram suscetibilidade da maioria das cepas testadas aos antibióticos em questão. Segundo Colautti et al. (2022), os lactobacilos geralmente são considerados suscetíveis aos antibióticos β-lactâmicos, como ampicilina, confirmando os resultados do presente estudo.

A resistência aos antibióticos é um mecanismo bacteriano natural. Diferentes estudos apontaram que genes resistentes podem ser transferidos horizontalmente para acelerar sua disseminação entre bactérias, portanto, cepas potencialmente probióticas devem ser sensíveis aos antibióticos mais comumente usados (LIU et al., 2020; COLAUTTI et al., 2022). Contudo, autores sugerem que as cepas resistentes aos antibióticos, não associadas à transferência gênica, são candidatas para uso em terapia concomitante ou após o uso de antibióticos, pois atuam diminuindo os efeitos adversos desses medicamentos (HANDWERGER et al., 1994; COLAUTTI et al., 2022). Este parâmetro não foi avaliado no presente estudo, e deve ser considerado para posterior caracterização dos candidatos selecionados.

4.4 Potencial Tecnológico

4.4.1 Atividade proteolítica e lipolítica

O aroma característico de diversos queijos maturados resulta principalmente das reações de lipólise e proteólise (MARGALHO et al., 2020). Portanto a avaliação destes parâmetros é fundamental para a seleção de cepas de BAL com potencial uso na indústria de alimentos. Entre os isolados testados, todos apresentaram alguma atividade proteolítica, as cepas de *L. plantarum* LP94 e LP24, e *Lactobacillus* spp. L105 e L88 apresentaram alta capacidade de degradar a caseína do leite (+++) (TABELA 7).

Na lipólise ocorre a clivagem hidrolítica de ligações éster em triglicerídeos, resultando na geração de ácidos graxos e glicerol (SCHWEIGER et al., 2014). Do total de isolados testados, *Lactobacillus* spp. L105, L91 e *L. plantarum* LP77, não apresentaram atividade lipolítica. As cepas *L. plantarum* LP48 e LP94 e *Lactobacillus* spp. L41 obtiveram atividade moderada (++) . O perfil enzimático das BAL utilizadas na produção de queijos é um dos fatores responsáveis pelo sabor do queijo, sendo que, a atividade lipolítica e proteolítica de *Lactobacillus* está relacionada à espécie, o que já havia sido relatado anteriormente e também observado no presente estudo (OŁDAK et al., 2020). O gênero *Lactobacillus* é um dos mais avaliados quanto às características tecnológicas em queijos artesanais brasileiros e amplamente

utilizado como starter para a fabricação de uma gama de produtos fermentados, como queijos, iogurtes, vegetais, etc. (MARGALHO et al., 2021).

Tabela 7 - Atividade proteolítica e lipolítica de cepas de BAL isoladas de QMA.

Isolado	Proteolítica*	Lipolítica*
<i>L. plantarum</i> LP116	+	+
<i>Lactobacillus</i> spp. L119	++	+
<i>Lactobacillus</i> spp. L41	+	++
<i>Lactobacillus</i> spp. L105	+++	-
<i>L. plantarum</i> LP48	+	++
<i>Lactobacillus</i> spp. L81	++	+
<i>Lactobacillus</i> spp. L88	+++	+
<i>L. plantarum</i> LP94	+++	++
<i>Lactobacillus</i> spp. L91	+	-
<i>L. plantarum</i> LP101	+	+
<i>L. plantarum</i> LP24	+++	+
<i>L. plantarum</i> LP77	+	-

*Capacidade de produzir enzimas proteolíticas e lipolíticas, em quantidades altas (+++), moderadas (++) e baixas (+)

Fonte: Da Autora (2022).

Das sete cepas avaliadas quanto a sobrevivência em sucos gástricos e intestinais simulados, apenas *L. plantarum* LP24 resultou em taxa de sobrevivência moderada. Essa cepa foi capaz de inibir o crescimento dos microrganismos patogênicos *S. aureus*, *L. monocytogenes*, EPEC e ETEC. No entanto, a mesma apresentou susceptibilidade aos eritromicinas, cefuroxina e ampicilina, e resistência aos demais antibióticos testados. Ao avaliar seu potencial tecnológico, a mesma apresentou atividade proteolítica elevada e baixa atividade lipolítica. Esta, em relação as demais cepas isoladas do QMA, exibiu interessantes propriedades probióticas, tornando-se a candidata mais promissora do presente estudo.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que as cepas de *Lactobacillus* isoladas de QMA da Canastra - MG, atenderam aos critérios de seleção *in vitro* de microrganismos com potencial probióticos e tecnológicos avaliados. Entretanto mais estudos são necessários para confirmação de tais achados preliminares.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI, C.; ECKERT, C.; VINCENZI, A.; et al. Characterization of technological and probiotic properties of indigenous *Lactobacillus* spp. from south Brazil. **3 Biotech** **2018** **8:11**, v. 8, n. 11, p. 1–12, 2018. Springer. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez26.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s13205-018-1469-7>>. Acesso em: 21/12/2021.
- ANDRADE, C. R. G.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M.; et al. Propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra - MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 5, p. 1592–1600, 2014. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/abmvz/a/WSpkP65kdQ89NMKCHrNDg7y/?lang=pt>>. Acesso em: 21/12/2021.
- ARAÚJO, T. F. Caracterização e identificação de *Enterococcus* spp. isolados do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Minas artesanal da região da Canastra, Minas Gerais. , 2008. Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: <<https://locus.ufv.br/handle/123456789/2855>>. Acesso em: 10/1/2022.
- ARENA, M. P.; SILVAIN, A.; NORMANNO, G.; et al. Use of *Lactobacillus plantarum* Strains as a Bio-Control Strategy against Food-Borne Pathogenic Microorganisms. **Frontiers in microbiology**, v. 7, n. APR, 2016. Front Microbiol. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27148172/>>. Acesso em: 3/1/2022.
- BARROSO DE ANTONIO, M.; MARTINS BORELLI, B. A importância das bactérias lácticas na segurança e qualidade dos queijos Minas artesanais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 75, n. 3, p. 204–221, 2020. Lepidus Tecnologia. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/799>>. Acesso em: 23/12/2021.
- CAMPOS, G. Z.; LACORTE, G. A.; JURKIEWICZ, C.; et al. Microbiological characteristics of canastra cheese during manufacturing and ripening. **Food Control**, v. 121, p. 107598, 2021. Elsevier.
- CARVALHO, B. F., ÁVILA, C. L. S., BERNARDES, T. F., PEREIRA, M. N., SANTOS, C., & SCHWAN, R. F. 25 (2017). Fermentation profile and identification of lactic acid bacteria and yeasts of rehydrated 26 corn kernel silage. **Journal of applied microbiology**, 122(3), 589-600. 27 <https://doi.org/10.1111/jam.13371>
- CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Species. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 12, p. 1636–1643, 1998. Allen Press. Disponível em: <http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/61/12/1636/1663654/0362-028x-61_12_1636.pdf>. Acesso em: 21/12/2021.
- COLAUTTI, A.; ARNOLDI, M.; COMI, G.; IACUMIN, L. Antibiotic resistance and virulence factors in lactobacilli: something to carefully consider. **Food Microbiology**, v. 103, p. 103934, 2022. Academic Press.
- FINGER, J. A. F. F.; BARONI, W. S. G. V.; MAFFEI, D. F.; BASTOS, D. H. M.; PINTO, U. M. Overview of Foodborne Disease Outbreaks in Brazil from 2000 to 2018. **Foods** **2019**, **Vol. 8**, **Page 434**, v. 8, n. 10, p. 434, 2019. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2304-8158/8/10/434/htm>>. Acesso em: 12/1/2022.

FIOCCO, D.; LONGO, A.; ARENA, M. P.; et al. How probiotics face food stress: They get by with a little help. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 9, p. 1552–1580, 2020. Taylor and Francis Inc. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/331856820_How_probiotics_face_food_stress_They_get_by_with_a_little_help>. Acesso em: 18/1/2022.

FONSECA, H. C.; DE SOUSA MELO, D.; RAMOS, C. L.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Probiotic Properties of Lactobacilli and Their Ability to Inhibit the Adhesion of Enteropathogenic Bacteria to Caco-2 and HT-29 Cells. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 13, n. 1, p. 102–112, 2021. Springer. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez26.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s12602-020-09659-2>>. Acesso em: 21/12/2021.

HALDER, D.; MANDAL, M.; CHATTERJEE, S. S.; PAL, N. K.; MANDAL, S. Indigenous Probiotic Lactobacillus Isolates Presenting Antibiotic like Activity against Human Pathogenic Bacteria. **Biomedicines**, v. 5, n. 2, 2017. Biomedicines. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28621711/>>. Acesso em: 12/1/2022.

HANDA, S.; SHARMA, N. In vitro study of probiotic properties of Lactobacillus plantarum F22 isolated from chhang – A traditional fermented beverage of Himachal Pradesh, India. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 91–97, 2016. No longer published by Elsevier.

HANDWERGER, S.; PUCCI, M. J.; VOLK, K. J.; LIU, J.; LEE, M. S. Vancomycin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei* synthesize cytoplasmic peptidoglycan precursors that terminate in lactate. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 1, p. 260, 1994. American Society for Microbiology (ASM). Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12500000/>>. Acesso em: 13/1/2022

JUNNARKAR, M. V.; THAKARE, P. M.; YEWALE, P. P.; et al. Evaluation of Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Different Sources in Western India. **https://doi.org/10.1080/08905436.2018.1443825**, v. 32, n. 2, p. 112–129, 2018. Taylor & Francis. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08905436.2018.1443825>>. Acesso em: 18/1/2022.

KAMIMURA, BRUNA AKIE; DE FILIPPIS, F.; SANT'ANA, A. S.; ERCOLINI, D. Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 80, p. 40–49, 2019. Academic Press.

KHAGWAL, N.; SHARMA, P. K.; CHAND SHARMA, D. African Journal of Microbiology Research Screening and evaluation of Lactobacillus spp. for the development of potential probiotics. , v. 8, n. 15, p. 1573–1579, 2014. Disponível em: <<http://www.academicjournals.org/AJMR>>. Acesso em: 18/1/2022.

KOSTINEK M, SPECHT I, EDWARD VA, SCHILLINGER U, HERTEL C, HOLZAPFEL WH, FRANZ CM. Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. **Syst Appl Microbiol**. 2005 Aug;28(6):527-40. doi: 10.1016/j.syapm.2005.03.001. PMID: 16104351.

LIU, J.; WANG, Y.; LI, A.; et al. Probiotic potential and safety assessment of Lactobacillus isolated from yaks. **Microbial Pathogenesis**, v. 145, p. 104213, 2020. Academic Press.

- MANTZOURANI, I.; CHONDROU, P.; BONTSIDIS, C.; et al. Assessment of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from kefir grains: evaluation of adhesion and antiproliferative properties in in vitro experimental systems. . Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13213-019-01467-6>>. Acesso em: 18/1/2022.
- MARGALHO, L. P.; FELICIANO, M. D. E.; SILVA, C. E.; et al. Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of nonstarter lactic acid bacteria regarding technological, biopreservative, and safety properties—Insights through multivariate analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 9, p. 7908–7926, 2020. Elsevier.
- MARGALHO, L. P.; JORGE, G. P.; NOLETO, D. A. P.; et al. Biopreservation and probiotic potential of a large set of lactic acid bacteria isolated from Brazilian artisanal cheeses: From screening to in product approach. **Microbiological Research**, v. 242, p. 126622, 2021. Urban & Fischer.
- NATH, S.; SIKIDAR, J.; ROY, M.; DEB, B. In vitro screening of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented milk product. **Food Quality and Safety**, v. 4, n. 4, p. 213–223, 2020. Oxford Academic. Disponível em: <<https://academic-oup-com.ez26.periodicos.capes.gov.br/fqs/article/4/4/213/5918439>>. Acesso em: 21/12/2021.
- OH, A.; DALIRI, E. B. M.; OH, D. H. Screening for potential probiotic bacteria from Korean fermented soybean paste: In vitro and *Caenorhabditis elegans* model testing. **LWT - Food Science and Technology**, v. 88, p. 132–138, 2018. Academic Press. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/320342827_Screening_for_potential_probiotic_bacteria_from_Korean_fermented_soybean_paste_In_vitro_and_Caenorhabditis_elegans_model_testing>. Acesso em: 18/1/2022.
- OŁDAK, A.; ZIELIŃSKA, D.; ŁEPECKA, A.; DŁUGOSZ, E.; KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, D. *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Polish Regional Cheeses Exhibit Anti-Staphylococcal Activity and Selected Probiotic Properties. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 3, p. 1025–1038, 2020. Springer. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez26.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s12602-019-09587-w>>. Acesso em: 21/12/2021.
- PENNA, A. L. B.; GIGANTE, M. L.; TODOROV, S. D. Artisanal Brazilian Cheeses—History, Marketing, Technological and Microbiological Aspects. **Foods 2021, Vol. 10, Page 1562**, v. 10, n. 7, p. 1562, 2021. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2304-8158/10/7/1562/htm>>. Acesso em: 22/12/2021.
- PERIN, L. M.; SAVO SARDARO, M. L.; NERO, L. A.; NEVIANI, E.; GATTI, M. Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and -independent methods. **Food Microbiology**, v. 65, p. 160–169, 2017. Academic Press.
- PIENIZ, S.; ANDREAZZA, R.; ANGHINONI, T.; CAMARGO, F.; BRANDELLI, A. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. **Food Control**, v. 37, n. 1, p. 251–256, 2014. Elsevier.
- 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 acidoláticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1567–1573, 2011. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Disponível em: <<http://www.scielo.br/j/abmvz/a/QvV468RTqd6HNcdxN3LjvSK/?lang=pt>>. Acesso em: 21/12/2021.

SAINI K, TOMAR SK (2017). In vitro evaluation of probiotic potential of Lactobacillus cultures of human origin capable of selenium bioaccumulation. **LWT - Food Sci Technol** 84:497–504 . doi: 10.1016/j.lwt.2017.05.034

SCHNEIDER, K. UNIVERSIDADE DO OESTE DE SANTA CATARINA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E BIOTECNOLOGIA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGROINDÚSTRIA E SAÚDE. , 2016.

SCHWEIGER, M.; EICHMANN, T. O.; TASCHLER, U.; et al. Measurement of Lipolysis. **Methods in Enzymology**, v. 538, p. 171–193, 2014. Academic Press.

SHARMA, P.; TOMAR, S. K.; SANGWAN, V.; GOSWAMI, P.; SINGH, R. Antibiotic Resistance of Lactobacillus sp. Isolated from Commercial Probiotic Preparations. **Journal of Food Safety**, v. 36, n. 1, p. 38–51, 2016. John Wiley & Sons, Ltd. Disponível em:

<<https://onlinelibrary-wiley.ez26.periodicos.capes.gov.br/doi/full/10.1111/jfs.12211>>. Acesso em: 21/12/2021.

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

ZIELIŃSKA, D.; RZEPKOWSKA, A.; RADAWSKA, A.; ZIELIŃSKI, K. In vitro screening of selected probiotic properties of Lactobacillus strains isolated from traditional fermented cabbage and cucumber. **Current microbiology**, v. 70, n. 2, p. 183–194, 2015. Curr Microbiol. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25270682/>>. Acesso em: 18/1/2022.