

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



Dissertação

Avaliação de propriedades probióticas e tecnológicas *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de Queijos Coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS

Carlos Henrique Gomes de Sousa Lima

Pelotas, dezembro de 2019

Carlos Henrique Gomes de Sousa Lima

Avaliação de propriedades probióticas e tecnológicas *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de Queijos Coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção parcial do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Elizabete Helbig

Coorientadora: Nádia Carbonera

Pelotas, dezembro de 2019

Carlos Henrique Gomes de Sousa Lima

Avaliação de propriedades probióticas e tecnológicas *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de Queijos Coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS

Dissertação aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 12 de dezembro de 2019

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Elizabete Helbig (Orientador)

Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Nádia Carbonera (Coorientadora)

Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal do Rio Grande

Prof^a. Dr^a. Kelly Lameiro Rodrigues

Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra

Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Resumo

LIMA, Carlos Henrique Gomes de Sousa. **Avaliação de propriedades probióticas e tecnológicas *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de Queijos Coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS.** Orientadora: Elizabete Helbig. Coorientadora: Nádia Carbonera. 2019. 112 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) - Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

Bactérias ácido lácticas são definidas como um grupo de cocos e bastonetes gram-positivos, catalase negativa, não esporuladas, aeróbias, microaerófilas ou anaeróbios facultativas e produzem ácido láctico como o principal produto final durante a fermentação de carboidratos. Esse grupo de bactérias são geralmente reconhecidas como seguras e possuem um papel importante nos processos fermentativos e de preservação de alimentos, seja como microbiota nativa e culturas iniciadoras (*starter*) ou adjuntas adicionados sob condições adequadas, além de serem as principais representantes dos probióticos em alimentos, proporcionando diversos efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. Devido aos benefícios já reportados na literatura, a procura por novas linhagens com essas características tem sido relevante. No extremo sul do Brasil é comercializado um queijo produzido a partir de leite cru de elaborado modo artesanal, conhecido como queijo colonial artesanal, sendo uma fonte de bactérias ácido lácticas selvagem. Contudo o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial probiótico e tecnológico *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS. Foram isoladas 105 cepas, 73 foram caracterizados como gram positivos e catalase negativas e avaliadas quanto a aspectos fenotípicos de virulência. Todas as estirpes foram gelatinase e DNase negativas, quanto a atividade hemolítica, houve detecção de sete cepas como α e duas como β -hemolítica, resultado em 64 cepas de BAL para avaliação de susceptibilidade a antimicrobianos. Esses isolados apresentaram sensibilidade aos antibióticos cloranfenicol e tetraciclina. Para os outros antimicrobianos, apresentaram resistência a ciprofloxacina (93,5%, 58/64), oxacilina 98,4% (63/64), Penicilina G 51,6% (41/64) e vancomicina (85,9%, 54/64). A atividade antagonista de 63 cepas foi verificada pelo método “*spot on the lawn*” frente a *Staphylococcus aureus* 25923, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis*, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus brevis* ATCC 367, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 e *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338. Quatro isolados foram descartados por não apresentaram atividade frente aos patógenos, enquanto os outros 59 isolados apresentaram para ao menos duas cepas. Cerca de 22% dos isolados de BAL (13/59) apresentaram antagonismo frente ao menos uma BAL de referência, sendo *L. acidophilus* e *L. brevis* as que apresentaram maior inibição de 92,3% (12/13) e 77% (10/13). As 59 BAL foram verificadas pela produção de bacteriocinas através da técnica da difusão em poços. Quatro BAL (Q1BAL10, Q2BAL2, Q4BAL1 e Q4BAL5) foram capazes de produzir bacteriocinas frente a *L. monocytogenes*, proteinases extracelulares e destes Q2BAL2 e Q4BAL1 foram capazes de diminuir o pH do leite de 6,5 para 5,3 em até 6h. Contudo, as cepas Q2BAL2 e Q4BAL1 foram identificadas com potencial como culturas *starters* anti-*Listeria* para utilização na biopreservação de produtos lácteos.

Palavras-chave: microbiologia de queijos; biotecnologia de bactérias ácido lácticas; compostos bioativos; propriedades biotecnológicas.

Abstract

LIMA, Carlos Henrique Gomes de Sousa. **Evaluation of probiotic and technological properties *in vitro* of lactic acid bacteria isolated from artisanal colonial cheese of Pelotas, RS.** Advisor: Elizabete Helbig. Coordinator: Nádia Carbonera. 2019. 112 p. Thesis (Master in Nutrition and Food) - Faculty of Nutrition, Federal University of Pelotas, 2019.

Lactic acid bacteria are defined as a group of gram-positive, catalase-negative, unsporulated, aerobic, microaerophilic or facultative anaerobic rods and rods and produce lactic acid as the main end product during carbohydrate fermentation. This group of bacteria is generally recognized as safe and plays an important role in fermentation and food preservation processes, either as native microbiota and starter or adjunct cultures added under appropriate conditions, and is the major representative of probiotics in food, providing several beneficial effects to the health of the host. Due to the benefits already reported in the literature, the search for new strains with these characteristics has been relevant. In the far south of Brazil, a cheese made from artisanal raw milk, known as artisanal colonial cheese, is a source of wild lactic acid bacteria. However, the objective of this work was to evaluate the probiotic and technological potential *in vitro* of lactic acid bacteria isolated from artisanal colonial cheese marketed in Pelotas, RS. It were isolated 105 strains, 73 were characterized as gram positive and catalase negative and evaluated for phenotypic aspects of virulence. All strains were gelatinase and DNase negative. Regarding hemolytic activity, seven strains were detected as α and two as β -hemolytic, resulting in 64 LAB strains for antimicrobial susceptibility evaluation. These isolates were susceptible to chloramphenicol and tetracycline antibiotics. For the other antimicrobials, they were resistant to ciprofloxacin (93.5%, 58/64), oxacillin 98.4% (63/64), Penicillin G 51.6% (41/64) and vancomycin (85.9%, 54/64). Antagonist activity of 63 strains was verified by the spot on the lawn method against *Staphylococcus aureus* 25923, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis*, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus brevis* ATCC 367 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 and *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338. Four isolates were discarded for not showing activity against the pathogens, while the other 59 isolates presented for at least two strains. About 22% of the LAB isolates (13/59) presented antagonism in relation to at least one reference LAB, being *L. acidophilus* and *L. brevis* the ones with the highest inhibition of 92.3% (12/13) and 77% (10/13). The 59 LABs were verified by bacteriocin production through the well diffusion technique. Four LAB (Q1LAB10, Q2LAB2, Q4LAB1 and Q4LAB5) were able to produce bacteriocins against *L. monocytogenes*, extracellular proteinases and from these Q2LAB2 and Q4LAB1 were able to decrease the milk pH from 6.5 to 5.3 within 6h. However, strains

Q2LAB2 and Q4LAB1 have been potentially identified as starter anti-*Listeria* cultures for use in the biopreservation of dairy products.

Keywords: microbiology of cheese; biotechnology of lactic acid bacteria; bioactive compounds; biotechnological properties.

Sumário

1	9
INTRODUÇÃO.....	
.	
1.1	11
OBJETIVOS.....	
1.1.1 OBJETIVO	11
GERAL.....	
1.1.2 OBJETIVO	11
ESPECÍFICO.....	
2. REVISÃO	12
BIBLIOGRÁFICA.....	
2.1 ALIMENTOS	12
FUNCIONAIS.....	
2.1.1 CARACTERÍSTICAS E	13
LEGISLAÇÃO.....	
2.1.2	14
NUTRACÊUTICOS.....	
2.1.3 MERCADO PARA ALIMENTOS	15
FUNCIONAIS.....	
2.2	17
PROBIÓTICOS.....	
2.2.1 MECANISMOS DE	19
AÇÃO.....	
2.2.1.1 MAIOR VALOR NUTRICIONAL E MELHOR	19
DIGESTIBILIDADE.....	
2.2.1.2 TOLERÂNCIA À	19
LACTOSE.....	
2.2.1.3 AÇÃO	21
ANTIMICROBIANA.....	
2.2.1.4 AÇÃO	22
HIPOCOLESTEROLÊMICA.....	

2.2.1.5 AÇÃO ANTIOXIDANTE.....	23
2.2.1.6 REDUÇÃO DE PESO.....	24
2.2.1.7 ATIVIDADE ANTI-HIPERTENSIVA.....	25
2.3 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS.....	26
2.3.1 CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS.....	26
2.3.2 BAL POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS NA INDÚSTRIA LÁTICA.....	28
2.3.3 PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DE BAL.....	29
2.3.2.1 PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS.....	29
2.3.2.2 PRODUÇÃO DE COMPOSTOS AROMÁTICOS.....	29
2.3.2.3 PRODUÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEOS.....	30
2.3.2.4 ATIVIDADE LIPOLÍTICA E PROTEOLÍTICA.....	31
2.3.2.5 TOLERÂNCIA AO CLORETO DE SÓDIO.....	32
2.4 QUEIJOS COLONIAIS ARTESANAIS.....	32
3. PROJETO DE PESQUISA.....	36
4. RELATÓRIO DO TRABALHO DE CAMPO.....	54
5. ARTIGO 1: “ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE SEGURANÇA <i>IN VITRO</i> DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJOS COLONIAIS ARTESANAIS COMERCIALIZADOS EM	55

PELOTAS, RS”.....	
6. ARTIGO 2: “AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BACTERIOCINOGENICO <i>IN VITRO</i> DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJOS COLONIAIS ARTESANAIS COMERCIALIZADOS EM PELOTAS, RS”	73
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

1 Introdução

Bactérias ácido lácticas (BAL) podem ser definidas como um grupo de cocos e bastonetes gram-positivos, catalase negativa, não esporuladas, aeróbias, microaerófilas ou anaeróbios facultativas e produzem ácido láctico como o principal produto final durante a fermentação de carboidratos. As BAL estão compreendidas pelo Reino *Bacteria*, Filo *Firmicutes* e Classe *Bacilli* e Ordem *Lactobacillales*, sendo esta subdividida em seis Famílias: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* e *Streptococcaceae*. Dentre os principais gêneros do grupo das BAL estão *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Vagococcus* (LAHTINEN, 2011).

Como são geralmente reconhecidas como seguras (*GRAS status*) são material de estudo para avaliação de seu potencial probiótico, além de possuírem um papel importante nos processos fermentativos e de preservação de alimentos, seja como microbiota nativa e culturas iniciadoras (*starter*) ou adjuntas adicionados sob condições adequadas (PEREIRA et al., 2019). Probióticos são definidos pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization* (FAO/OMS), como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (JOINT, 2002), podendo ser utilizados como parte de alimentos com alegação de propriedades funcionais e, ou, de saúde, (BRASIL, 2002) ou de compostos nutracêuticos, comercializados na forma de produtos farmacêuticos (LIRA et al., 2009).

No entanto, a lista de espécies probióticas é bastante curta. Inclui cepas oferecidas pela indústria de laticínios e alguns grupos científicos. De modo geral, os probióticos mais atuais são as BAL pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, com menor número de *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* e *Streptococcus* e as *Bifidobacterium*, pertencentes ao grupo *Actinomycetaceae* de bactérias gram-positivas (FOLIGNÉ et al., 2013; HOLZAPFEL; WOOD, 2014). Assim, esse quadro tem levado ao desenvolvimento de pesquisas na obtenção de novas cepas com propriedades probióticas. Embora tenham sido relatados que um número substancial de espécies microbianas exiba propriedades probióticas

potenciais, estabelecidas após pesquisa *in vitro* e pré-clínica e/ou depois de ensaios clínicos em grande escala, apenas as cepas mais documentadas e robustas podem chegar ao mercado (FOLIGNÉ et al., 2013).

Os alimentos lácteos fermentados são fontes de BAL selvagens, entre eles estão os queijos artesanais, principalmente aqueles elaborados a partir de leite cru. Entende-se por queijo artesanal, o que possui algum grau de processamento realizado nas propriedades rurais, geralmente de produção familiar, através de um processo artesanal de produção, que geralmente são comercializados em feiras de produção agroecológica; e entre eles destaca-se o queijo colonial artesanal produzido na região sul do Brasil (DOTTO; GONÇALVES; IOP, 2015). Estes queijos são tradicionalmente feitos a partir de leite cru, utilizando uma cultura natural de soro de leite como coagulante podendo ser consumido fresco ou em diversos graus de maturação, e as questões que envolvem a sua segurança, qualidade e proveniência, a fim de proteger tanto os produtores como os consumidores, costuma ser um fator crítico, além de apresentarem problemas de padronização, como formato, tamanho, umidade e teor de cloreto de sódio (DAS DORES; FERREIRA, 2012; MENEZES, 2011)..

As BAL, comumente encontrados em queijos são as pertencentes aos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*. A microbiota característica dos diferentes queijos artesanais brasileiros, em geral, não é conhecida. Não existe metodologia que permita diferenciações de autenticidade e origens para queijos artesanais, que, conseqüentemente, não possuem uniformidade, e muitas vezes apresentam defeitos que poderiam ser evitados, se houvesse maior controle sobre as práticas de fabricação dos mesmos (FOX et al., 2017). Pesquisas envolvendo alimentos produzidos artesanalmente avaliam a caracterização da microbiota e a verificação das propriedades probióticas dos micro-organismos, principalmente bactérias ácido lácticas, e possibilita novas perspectivas para a melhoria da qualidade do queijo e da sua segurança alimentar, preservando a sua microbiota desejável (MOZZI et al., 2015).

Para identificação de novas cepas de BAL potencialmente probióticas para o consumo humano, alguns critérios são necessários na garantia da segurança, pois os micro-organismos probióticos não devem ser patogênicos, não possuir capacidade de transferir genes de resistência a antibióticos, além de serem capazes de manter a estabilidade genética. Para serem reconhecidos como componentes

funcionais dos alimentos, devem demonstrar as seguintes propriedades: estabilidade a ácidos e a bile, resistência a enzimas digestivas, adesão à superfície do intestino e atividade antagônica contra patógenos humanos (FAO, 2002). Como características tecnológicas necessárias para a indústria queijeira é crucial que as cepas promovam a acidez necessária para o desenvolvimento da coagulação do leite, e dessa forma serem capaz de apresentar uma característica desfavorável para a multiplicação de cepas patogênicas. Outra propriedade importante, das BAL na matriz láctea, é a capacidade de produzir proteases extracelulares, contribuindo no processo de maturação dos queijos (EL-GAISH et al., 2010; SETTANNI & MOSCHETTI, 2010).

Com isso, mostra-se evidente a importância de estudos que conduzam à avaliação de BAL potencialmente probióticas, com efeitos fisiológicos desejáveis e tecnológicos para formulação de produtos com alto valor agregado. A utilização de BAL é uma alternativa importante a ser considerada para a formulação de novos alimentos funcionais, de grande relevância e com menor utilização de compostos sintéticos para sua conservação, tornando-os mais atraentes para a população e indústria de alimentos. Perante esse contexto o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial probiótico e tecnológico *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos Coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS.

1.1 Objetivos

1.1 Objetivo geral

Isolar e identificar BAL a partir de queijos coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS, com potencial bacteriocinogênico e probiótico para utilização como culturas iniciadoras ou adjuntas funcionais em produtos lácteos.

1.2 Objetivos Específicos

- ✓ Isolar e identificar BAL de queijos coloniais artesanais;
- ✓ Verificar fatores fenotípicos de virulência dos isolados;
- ✓ Analisar a resistência a antimicrobianos;

- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana frente a micro-organismos indicadores;
- ✓ Avaliar o potencial tecnológico das cepas com potencial bacteriocinogênico;
- ✓ Identificar a nível molecular as bactérias por meio do sequenciamento do rDNA 16S;
- ✓ Verificar o potencial probiótico *in vitro* por meio da resistência a ácidos e sais biliares e tolerância ao trato gastrointestinal superior

2 Revisão da literatura

2.1 Alimentos funcionais

O termo alimentos funcionais surgiu primeiramente no Japão, em 1984, quando cientistas estudavam as relações entre nutrição, satisfação sensorial e modulação de sistemas fisiológicos, aonde chegaram à conclusão que se referiam aos alimentos utilizados como parte de uma dieta normal, que, além de demonstrarem seus efeitos nutricionais, são capazes de ocasionarem benefícios fisiológicos ou reduzirem o risco de doenças crônicas (SILVEIRA et al., 2009; COSTA; ROSA, 2016; POMERANZ, 2012). Tais alimentos, designados como Alimentos para Uso Específico de Saúde - *Foods For Specified Health Use* (FOSHU), trazem um selo de aprovação pelo Ministério da Saúde e Bem-Estar Japonês, e o conceito foi rapidamente adotado nos outros países (COSTA; ROSA, 2016).

Os Estados Unidos, por meio da *American Dietetic Association* (ADA) definem os alimentos integrais, fortificados, enriquecidos ou aprimorados como alimentos funcionais, pressupondo ao princípio de um efeito potencialmente benéfico sobre a saúde quando consumidos como parte de uma dieta equilibrada, em níveis efetivos (HASLER; BROWN, 2009). Apesar de ser uma enorme tendência, não há uma legalidade para o termo no país, cabendo mais para o marketing ao processo de regulamentação (SALLES, 2013). O *Codex Alimentarius* não disponibiliza uma definição oficial para alimentos funcionais, dispondo apenas de documentos para alegações específicas (NWAK; JUKES, 2001).

Na União Europeia, o *Functional Food Science in Europe* (FUFOSE), coordenada pela *International Life Sciences Institute* (ILSI), é uma tentativa única de

estabelecer um forte quadro científico para justificar o conceito de alimentos funcionais, para identificar e desenvolver novos alimentos funcionais que são principalmente orientados por funções e para fundamentar alegações cientificamente (ROBERFROID, 2002). Esse órgão define AF como aqueles que possuem efeitos satisfatoriamente demonstrados que afetem uma ou mais funções do organismo, além de suas características nutricionais básicas, sendo capaz de manter ou melhorar a saúde e o bem-estar e/ou reduzir o risco de patologias. Esses produtos não podem ser cápsulas ou pílulas e devem fazer parte da dieta usual (BECH-LARSEN e SCHOLDERER, 2007).

Em 2014, durante a 17ª Conferência Internacional do Centro de Alimentos Funcionais realizada em Dallas, TX, EUA, a *Academic Society for Functional Foods and Bioactive Compounds* (ASFFBC) adotou uma definição para alimentos funcionais, como: “Alimentos naturais ou processados que contêm compostos biologicamente ativos conhecidos ou desconhecidos; que, em quantidades eficazes e não tóxicas, proporcionam um benefício à saúde clinicamente comprovado e documentado para a prevenção, conduta ou tratamento de doenças crônicas”. O termo “em quantidades efetivas não tóxicas” foi acrescentado para evidenciar a importância da dosagem de compostos bioativos no consumo de alimentos funcionais (MARTIROSYAN; SINGH, 2015).

Para a Sociedade Brasileira de Alimentos Funcionais (SBAF), por exemplo, há o seguinte conceito: ‘Alimentos funcionais são alimentos ou ingredientes que, além das funções nutricionais básicas, quando consumidos como parte da dieta usual, produzem efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou benéficos à saúde, devendo ser seguros para o consumo sem supervisão médica, sendo que sua eficácia e segurança devem ser asseguradas por estudos científicos’ (SALGADO, 2016; COSTA; ROSA, 2016). Porém, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1999), não possui uma definição para alimento funcional, mas define uma alegação de propriedade de saúde e funcional para estabelecer diretrizes para sua utilização, bem como condições para registro de alimentos, não devendo mencionar referências a cura ou prevenção de doenças (BRASIL, 2002).

2.1.1 Características e legislação

Um aspecto crucial em alimentos funcionais é a regulamentação e declaração sobre seus efeitos saudáveis, o que varia de maneira significativa de um país para outro (LLANES, 2015). No âmbito nacional, a Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº 2/2002 (BRASIL, 2002) se aplica às diretrizes a serem adotadas para a avaliação de segurança, registro e comercialização de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e, ou de saúde, apresentadas como formas farmacêuticas (cápsulas, comprimidos, tabletes, pós, granulados, pastilhas, suspensões e soluções). Os produtos são classificados em: carotenóides, fitoesteróis, flavonóides, fosfolípidos, organossulfurados, polifenóis e probióticos (Tabela 1).

Tabela 1. Alegação de propriedade funcional e, ou de saúde em alimentos funcionais.

Produto	Composto	Alegação
Ácidos graxos	EPA e EDA	Manutenção de níveis saudáveis de triglicerídeos*
Carotenóides	Licopeno Luteína Zeaxantina	Ação antioxidante que protege as células contra os radicais livres*
Fibras alimentares	Fibras alimentares Dextrina resistente Lactulose Goma guar parcialmente hidrolisada Polidextrose Beta glucana Frutooligossacarídeo Inulina Psillium Quitosana Fitoesteróis	Auxiliam o funcionamento do intestino* Auxiliar na redução do colesterol* Equilíbrio da flora intestinal* Redução da absorção de gordura* Redução da absorção de gordura e colesterol* Redução da absorção de colesterol*
Polióis	Manitol / Xilitol / Sorbitol	Não produzem ácidos que danificam os dentes*
Probióticos	Probióticos	A alegação de propriedade funcional ou de saúde deve ser proposta pela empresa e será avaliada, caso a caso, com base nas definições e princípios estabelecidos na Resolução n. 18/1999*
Proteína de soja	Proteína de soja	Redução do colesterol*

*Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis.

FONTE: BRASIL, 2002.

2.1.2 Nutracêuticos

Diversos constituintes bioativos são comercializados na forma de produtos farmacêuticos, como cápsulas, soluções, géis, pós e granulados. Devido a essa

gama de produtos não serem classificados como alimentos, surgiu-se, então o termo nutracêuticos, criado nos Estados Unidos pela *Foundation for Innovation in Medicine* em meados de 1990, definindo como: “uma substância que pode ser um alimento ou parte de um alimento que proporciona benefícios medicinais, incluindo prevenção ou tratamento de doenças” (ANDLAUER; FÜRST, 2002; LIRA et al., 2009).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), não reconhece o termo nutracêutico. Porém, há uma definição oficial para substâncias bioativas pela Resolução RDC nº 2, de 2002, a mais compatível com nutracêuticos. Essa é definida como nutriente ou não nutriente com ação metabólica ou fisiológica específica no organismo, devendo estar presente em fontes alimentares, seja de origem natural ou sintética, sem finalidade medicamentosa ou terapêutica (BRASIL, 2002). Embora existam legislações e definições aplicáveis a nutracêuticos, não há reconhecimento oficial da categoria, bem como não há nenhuma lei específica para esses produtos que trate de sua eficácia, segurança e qualidade, devido a interface de enquadramento do produto entre alimento ou fármaco (MORAES; COLLA, 2006).

Nos Estados Unidos, nutracêuticos refere-se a um termo não oficial para suplementos dietéticos (ANDLAUER E FÜRST, 2002). Diferentemente, no Canadá, por meio da *Health Canada*, esse termo é oficialmente definido como “produto isolado ou purificado de alimentos, e geralmente vendido em formas medicinais não necessariamente associado com alimento e demonstrado ter um efeito fisiológico benéfico ou providenciar proteção contra doenças crônicas” (ROBERFROID, 2002).

Já na União Europeia, um produto alimentício não pode ser apresentado como agente modificador ou restaurador de funções fisiológicas do organismo e nem proporcionar o tratamento de patologias, assim, diversas substâncias acabam sendo classificadas como medicamento, ao invés de compostos alimentares (WILDMAN, 2016; LIRA et al., 2009).

2.1.3 Mercado para alimentos funcionais

As Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNT) constituem um grande problema global, sendo os quatro principais tipos: as doenças cardiovasculares, cânceres, doenças respiratórias crônicas e diabetes. Independente do ciclo da vida, todos são

vulneráveis aos fatores de risco que contribuir para o desenvolvimento das DCNT, seja de dietas pouco saudáveis, sedentarismo, exposição ao fumo, ou os efeitos do uso nocivo do álcool (BROWNELL; WALSH, 2017). Para diminuir o impacto das DCNT em indivíduos e sociedade, é necessária uma abordagem abrangente que exija a todos os setores, incluindo a saúde, finanças, relações exteriores, educação, agricultura, planejamento e outros, para trabalhar juntos para reduzir os riscos associados a essas patologias, bem como promover as intervenções para preveni-los e controlá-los (SASSI, 2010).

O inquérito lançado por meio da Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), demonstrou que os hábitos dos brasileiros impactam no crescimento da obesidade e aumento de diabetes e hipertensão no Brasil, ocorrendo um aumento na última década na incidência de DCNT. Os dados revelam que mais de metade da população está com excesso de peso acima do recomendado, sendo cerca de 19% obesos; 9% de diabéticos e 26% de hipertensos (BRASIL 2017).

Já com vista nesse cenário na última década, em 2011, o Ministério da Saúde lançou o Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis. E entre uma de suas principais ações, encontra-se a Alimentação Saudável, e um dos seus eixos é a “Regulação da Composição Nutricional de Alimentos Processados: Estabelecimento de acordo com o setor produtivo e parceria com a sociedade civil, com vistas à prevenção de DCNT e à promoção da saúde, para a redução do sal e do açúcar nos alimentos” (MALTA e SILVA, 2014).

Nos últimos anos, as preocupações sobre o impacto do consumo dos alimentos na saúde, bem como as consequências sociais e ambientais que isso acarreta, levaram a grandes mudanças em todas as etapas da cadeia alimentar (VALGUERA et al., 2012). Como consequência, o mercado para alimentos com propriedades promotoras de saúde, chamados de alimentos funcionais, mostram-se em potencial ascensão nas últimas décadas (SANDERS et al. 1999; CORBO et al. 2014).

A utilização de alguns aditivos alimentares sintéticos, como agentes antimicrobianos e antioxidantes, é considerada insegura. Seu uso deve-se ao fato de impedir a deterioração dos produtos alimentícios e garantir as qualidades organolépticas durante sua vida útil. A demanda para redução do uso de aditivos

confirma-se pela preferência do consumidor por alimentos frescos, seguros, saborosos, com teores reduzidos em açúcar, gordura e sal e que também possam garantir efeitos fisiológicos desejáveis a saúde (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2015).

A este respeito, os alimentos funcionais desempenham um papel de destaque, como demonstrado pela crescente demanda derivada do aumento do custo dos cuidados com a saúde. O uso de produtos artesanais, alimentos funcionais e nutracêuticos podem contribuir para esse quadro, entre eles estão os probióticos, presentes em alguns alimentos ou em suplementos, devido aos seus inúmeros efeitos benéficos relatados.

2.2 Probióticos

A primeira observação original do papel benéfico desempenhado por algumas bactérias selecionadas é atribuída ao russo Eli Metchnikoff, ganhador do Prêmio Nobel, que propôs que "A dependência dos micróbios intestinais na comida, permite adotar medidas para modificar a flora em nossos corpos e substituir os micróbios nocivos por micróbios úteis" (METCHNIKOFF, 1907).

Na mesma época, o pediatra francês Henry Tissier observou que as crianças com diarreia tinham nas fezes um número baixo de bactérias caracterizadas por uma peculiar morfologia em forma de Y. Estas bactérias "bífidas" foram, ao contrário, abundantes em crianças saudáveis (TISSIER, 1906). Ele sugeriu que essas bactérias poderiam ser administradas a pacientes com diarreia para ajudar a restaurar uma flora intestinal saudável.

Os trabalhos de Metchnikoff e Tissier foram pioneiros em fazerem sugestões científicas sobre o uso "probiótico" de bactérias. Porém, a palavra probiótico (do latim *pro* e do grego *bios*, significa "pró-vida") foi introduzida pelo cientista alemão Werner Kollath em 1953 para designar como substâncias ativas que são essenciais para o desenvolvimento saudável. Em 1965, o termo foi utilizado por Lilly e Stillwell com outro contexto, para nomear substâncias produzidas por micro-organismos que promovessem o crescimento de outros micro-organismos, prevenção ou tratamento de enfermidades (LILLY; STILLWELL, 1965, GASBARRINI et al., 2016).

Atualmente, a definição aceita para probióticos é da *Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization* (FAO/OMS), como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (JOINT, 2002). Os micro-organismos aprovados até o momento pela Anvisa constam na tabela 2.

Tabela 2. Micro-organismos com propriedades probióticas comprovada.

LACTOBACILLUS	BIFIDOBACTERIUM	ENTEROCOCCUS
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>E. faecium</i>
<i>L. casei shirota</i>	<i>B. animalis</i> (incluindo a subespécie <i>B. lactis</i>)	
<i>L. casei variedade rhamnosus</i>	<i>B. longum</i>	
<i>L. casei variedade defensis</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. lactis</i>		

FONTE: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2002).

Embora tenham sido relatados que um número substancial de espécies microbianas exiba propriedades probióticas potenciais, estabelecidas após pesquisa *in vitro* e pré-clínica e/ou depois de ensaios clínicos em grande escala, apenas as cepas mais documentadas e robustas podem chegar ao mercado (FOLIGNÉ et al, 2013). No entanto, a lista de cepas probióticas é bastante curta. Inclui cepas oferecidas pela indústria de laticínios e alguns grupos científicos. De modo geral, os probióticos mais atuais são as bactérias ácido lácticas (BAL) pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, e as *Bifidobacterium*, com menor número de leuconostocos, pediococos, lactococos, enterococos e estreptococos (FOLIGNÉ et al, 2013; HOLZAPFE; WOOD, 2014). É geralmente aceito que, com a exceção dos enterococos em alguns países, devido a questões de segurança em relação a capacidade de transferência de genes resistentes a antibióticos, as BAL raramente são patogênicas para humanos e animais (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002).

Apesar de algumas provas científicas afirmando a criação de benefícios para a saúde devido ao consumo de algumas cepas microbianas probióticas, nenhuma sugestão clara indica dose eficaz para estas estirpes. A dosagem de cepas probióticas para efeitos clínicos específicos ainda não é bem esclarecida. Entretanto, alguns autores concluíram que a sobrevivência das bactérias probióticas no produto alimentício deva alcançar 10^9 a 10^{10} UFC/100g/mL (Unidades Formadoras de Colônia) do produto, para que a quantidade intestinal atinja níveis significativos de

10^6 a 10^7 UFC/g/mL (JONES, 2010). De acordo com as recomendações da ANVISA (BRASIL, 2002) a quantidade viável para os probióticos deve estar na faixa de 10^8 a 10^9 UFC/100g/mL na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante.

2.2.1 Mecanismos de ação

2.2.1.1 Maior valor nutricional e melhor digestibilidade

A produção das vitaminas biotina, tiamina e ácido fólico não é uma característica comum das espécies probióticas, mas uma propriedade única de determinadas cepas. Porém, todas são capazes de sintetizar cobalamina (PRESTI et al., 2015). Probióticos podem sintetizar menaquinonas (MKs), também conhecidas como vitamina K-2, são sintetizadas principalmente por bactérias encontradas em quantidades menores no suprimento de alimentos, como: em carnes, laticínios e produtos alimentícios fermentados (WALTHER et al., 2013).

Alguns dos principais mecanismos que aumentam a biodisponibilidade de minerais incluem: em aumentar a solubilidade mineral devido à produção de ácidos graxos de cadeia curta, devido a diminuição do pH do lúmen intestinal e aumento da concentração de minerais ionizados; produção da enzima fitase por bactérias para superar o efeito dos minerais, como cálcio, zinco, ferro e fósforo, deprimidos pelo fitato e estímulo a difusão passiva e ativa; redução da inflamação intestinal seguida de aumento da densidade da massa óssea; hidrolisando alimento de ligação de glicosídeo nos intestinos por Lactobacilos e Bifidobactérias. Além disso, alguns probióticos produzem peptídeos, com funções biológicas no organismo, como induzir a uma melhor disponibilidade de minerais, prevenir a osteoporose, atividade antioxidante, anticancerígena, antimicrobiana e anti-hipertensiva (MACCABE; BRITTON, 2015; PARVANEH et al., 2014). Também é possível a produção da enzima β -galactosidase, por determinadas cepas, o que pode melhorar a absorção da lactose por indivíduos intolerantes (CORGNEAU et al., 2015).

2.2.1.2 Tolerância à lactose

A lactose, dissacarídeo composto de glicose e galactose, é o principal carboidrato encontrado no leite e em produtos industrializados e é amplamente utilizado em alimentos industrializados (FOX et al., 2017). Em recém-nascidos, a lactose ingerida é hidrolisada no intestino delgado pela enzima endógena lactase-florizina hidrolase (LPH), ou lactase, parte da família de enzimas β -galactosidase (β -gal), tornando os monossacarídeos absorvíveis no intestino. (MATAR e MAZO, 2010). Porém, após a fase de lactação, há um decréscimo na produção da enzima devido a uma condição geneticamente programada, que pode afetar cerca de 70% da população adulta, desencadeando a intolerância à lactose (FOX et al., 2017). A lactose não absorvida é metabolizada pelas bactérias do cólon, acarretando a produção de ácidos graxos de cadeia curta e gás, resultado em sintomas como desconforto, náusea, cólicas abdominais e diarreia (LOWER et al., 2007).

Pacientes intolerantes a lactose, em grande parte, são capazes de tolerar em torno de 6-12g de lactose por dia (MATTAR; MAZZO, 2010). A formulação de produtos lácteos adequados para a maioria dos pacientes intolerantes e suspeitos é uma medida adaptativa. O uso de preparações enzimáticas exógenas, bem como o consumo de produtos livres de lactose ou produtos fontes de probióticas são indicados como estratégias redutoras de sintomas (CORGNEAU et al., 2015).

Em estudos *in vitro*, como o de Monteagudo-Mera et al. (2011) ao analisarem 12 cepas de BAL perante a aplicabilidade como culturas iniciadoras ou probióticas, as identificaram como *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus casei* 393, *L. lactis* subsp. *lactis* 11454, *L. paracasei* subsp. *paracasei* 27092 e *Lactobacillus rhamnosus* 53103. Nesse trabalho demonstrou-se que todas as cepas de *Lactobacillus* spp. apresentaram alta atividade de β -galactosidase. Gheyntanichi et al. (2010) ao avaliarem a atividade da enzima em Lactobacilos isolados de queijo e leite, constataram que *Lactobacillus delbrueckii*. apresentou a maior atividade de produção enzimática. Já Tari et al., analisando a atividade da enzima em isolados de iogurtes turcos, constaram que *Streptococcus thermophilus* 95/2 e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *thermophilus* 77, apresentaram-se como boas produtoras da enzima.

Em uma revisão sistemática realizada por Oak e Jha (2018) analisaram o efeito de oito cepas probióticas no tratamento de intolerância a lactose (IL) em adultos a cima de 18 anos. As cepas analisadas foram *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Saccharomyces boulardii* e *Streptococcus thermophilus*. Entre essas, *B. animalis* foi caracterizada como a mais pesquisada e eficaz. Porém, em outro estudo de revisão sistemática por Shaukat et al. (2015), ao avaliar estratégias eficazes para controle da IL, não encontraram evidências suficientes para determinação da eficácia do iogurte ou ingestão de probióticos para melhorar os sintomas de intolerância à lactose.

2.2.1.3 Ação antimicrobiana

Todos os anos, a contaminação dos alimentos por micro-organismos deteriorantes e patogênicos, como *Listeria*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Salmonella* e *Bacillus* geram esforços para controle microbiológico dos alimentos através de métodos físicos, químicos e microbiológicos. A biopreservação é definida como a extensão do prazo de validade, visando uma maior segurança dos alimentos pelo uso de micro-organismos seguros e/ou compostos antimicrobianos (OZER; AKDEMIR-EVRENDILEK, 2014).

O uso de micro-organismos na conservação de alimentos tem ganhado importância nos últimos anos devido à demanda pelo uso reduzido de conservantes químicos pelos consumidores e pelo aumento crescente de espécies bacterianas resistentes a antibióticos e a conservantes. As BAL são capazes de produzir vários compostos antimicrobianos que são considerados importantes na biopreservação dos alimentos e rações, mas também são rentáveis e seguros (FOX et al., 2017; VARSHA; NAMPOOTHIRI, 2016).

Metabólitos antimicrobianos, como ácidos orgânicos (ácidos láctico, fórmico, acético, propiônico, benzóico e fenilacético), ácidos graxos de cadeia curta, peróxido de hidrogênio, reuterina, diacetil, bacteriocinas e substâncias inibidoras semelhantes à bacteriocina, são alguns dos produtos metabólicos dessas bactérias que sugerem ter potencial efeito antimicrobiano (OZER; AKDEMIR-EVRENDILEK, 2014). Os

possíveis mecanismo de ação dos principais metabólitos antimicrobianos estão elucidados na tabela 3.

Tabela 3. Mecanismos de ação antimicrobiana de metabólitos de probióticas.

Compostos antimicrobianos	Mecanismos de ação
Ácidos orgânicos [ácido láctico]	O ácido láctico, além de suas propriedades antimicrobianas devido à diminuição do pH, também funciona como um permeabilizante da membrana externa bacteriana Gram-negativa e pode atuar como um potencializador dos efeitos de outras substâncias antimicrobianas em produtos fermentados de pH obtidos por BAL iniciadoras. Ou seja, capaz de favorecer que numerosos metabólitos lipofílicos ou grandes possam penetrar eficazmente na intacta membrana externa Gram-negativa bacteriana, mas possivelmente na presença de ácido láctico (ALAKOMI et al., 2000).
Peróxido de hidrogênio	O efeito bactericida do peróxido de hidrogênio tem sido atribuído ao seu forte efeito oxidativo na célula bacteriana e à destruição de estruturas moleculares básicas de células proteína (LINDGREN e DOBROGOSZ, 1990)
Bacteriocinas [nisina]	A nisina inibe o crescimento bacteriano, gerando poros na membrana celular e interrompendo a biossíntese da parede celular por meio da interação lipídica específica II, molécula precursora na síntese da parede celular das bactérias (SANDHU et al., 2016)
Ácido graxos de cadeia curta	Um mecanismo que tem sido proposto para ácidos graxos de cadeia curta com atividade antifúngica é que a atividade é devida a propriedades do tipo detergente dos compostos, afetando a estrutura das membranas celulares dos organismos alvo. Isso acarreta na permeabilidade da membrana e a liberação de eletrólitos e proteínas intracelulares e, geralmente, leva à desintegração citoplasmática das células fúngicas (SJÖGREN et al., 2013; POHL et al; 2011)
Diacetil	Atividade antimicrobiana do diacetil pode ser exercida pela inativação da utilização de arginina por meio de sua reação com a proteína de ligação à arginina (JAY, 2005)
Reuterina	Sua atividade é atribuída principalmente à sua capacidade de reagir com grupos sulfidrila de aminoácidos, desencadeando uma resposta ao estresse oxidativo (SCHAEFER et al., 2010)

2.2.1.4 Ação hipocolesterolêmica

Alguns dos mecanismos através dos quais os probióticos supostamente exibem efeito hipocolesterolêmico podem ser: desconjugação dos sais biliares pela enzima *bile salt hidrolase (BSH)*, a qual hidrolisa a ligação amida e liberam a porção glicina/taurina do núcleo do esteroide; assimilação do colesterol pelas bactérias, ligação do colesterol às paredes celulares bacterianas ou ações fisiológicas finais da fermentação de ácidos graxos de cadeia curta nos produtos. Entre estes, a atividade da BSH é um fator essencial para a colonização e, portanto, considerado um critério

básico para a seleção de probióticos anti-colesterolêmicos (BEGLEY, 2006; THUSHARA, 2016).

Um trabalho de revisão sistemática por Wu et al. (2017) com base em ensaios clínicos randomizados, destacou que o consumo de *Lactobacillus* probiótico, especialmente *L. reuteri* e *L. plantarum*, poderia reduzir significativamente as taxas de triglicerídeo e de lipoproteínas de baixa densidade. Esses dados corroboram com a metanálise realizada por Shimizu et al. (2015), onde em subanálises, intervenções superiores a 4 semanas com probióticos, foram estatisticamente mais efetivas em diminuir o triglicerídeo e LDL-C que aquelas inferiores a 4 semanas. Já em outro estudo por Cho e Kim (2015), de metanálise de ensaios clínicos randomizados para averiguação o efeito dos probióticos na concentração lipídicas, constataram que não houve efeito significativo dos probióticos no colesterol HDL ou triglicerídeos. O efeito na diminuição do colesterol total e no colesterol LDL deve-se ao tempo de intervenção, o tipo de cepa utilizada e a diminuição foi mais acentuada em indivíduos com hipercolesterolemia.

2.2.1.5 Ação antioxidante

Estresse oxidativo (EO) refere-se a níveis intracelulares elevados de radicais de oxigênio, resultando em hidroxilação do DNA, desnaturação da proteína, peroxidação lipídica e apoptose (PISOSCHI; POP, 2015). Entre as espécies reativas de oxigênio (ROS) (*ROS: reactive oxygen species*), incluem-se os radicais ânion superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio. A maioria dos organismos vivos foram capazes de desenvolver durante o período evolutivo, sistemas de reparo para proteja-os contra o estresse oxidativo, como as defesas enzimáticas (superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase) e os antioxidantes não enzimáticos (glutathione, tioredoxina, vitamina C, vitamina E) (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Devido a limitada capacidade antioxidante do próprio sistema endógeno do organismo, suplementos acabam sendo necessários como uma forma importante no controle do EO e prevenção de doenças relacionadas, como por exemplo, na manipulação de novas estratégias de tratamento de doenças do sistema nervoso central por meio da manipulação da

microbiota intestinal, com o uso de probióticos altamente antioxidantes (BONFILI et al., 2017).

No intuito de avaliar BAL quanto à atividade antioxidante que poderia remover as reações oxidativas do trato gastrointestinal, Lee et al. (2005) isolaram de produtos lácteos 4 cepas de Lactobacilos (*L. rhamnosus* GG, *L. casei* KCTC 3260, *L. casei* 01 e *L. casei* KCTC 3109), e foi mensurada a atividade antioxidante total (AAT) e a resistência a ROS sob condições de peróxido de hidrogênio (1 mM), radicais hidroxilo (0,4 mM) e ânions superóxido (10 mM). *Lactobacillus casei* KCTC 3260 demonstrou a maior ATT e todas as cepas foram resistentes aos ânions superóxido. Para elucidar os mecanismos antioxidativos, foram realizadas as atividades de superóxido dismutase (SOD) e quelante para íons de ferro e cobre. Nenhuma cepa teve atividade para SOD e *L. casei* KCTC 3260 apresentou as melhores atividades para quelantes, concluindo a causa da ativação de sua atividade antioxidante.

Em uma pesquisa com *Lactobacillus plantarum* MA2 isolado a partir de grãos de Kefir tibetano tradicionalmente chineses, por Tang et al (2016), as atividades antioxidantes *in vitro* desta linhagem foram avaliadas. Os resultados mostraram que o micro-organismo tolerou o peróxido de hidrogênio, e seu fermentado (sobrenadante fermentado, células intactas e extrato livre de células) apresentou altas capacidades redutoras, inibição da peroxidação lipídica, capacidades de quelante de ferro, e outras capacidades de eliminação de radicais livres.

2.2.1.6 Redução de peso

Probióticos podem modular a microbiota intestinal, promovendo redução do peso corporal e da massa gorda. O mecanismo aceito deve-se a modulação da microbiota por esses micro-organismos. Eles podem auxiliar na recuperação da *tight junctions* entre as membranas laterais das células epiteliais, diminuindo assim a permeabilidade do intestino, impedindo a translocação de bactérias e diminuindo a inflamação derivada dos lipopolissacarídeos (LPS), um componente da parede das Gram-negativas, devido as associações entre os níveis circulantes de LPS, consumo de uma dieta hiperlipídica e a presença de obesidade e diabetes mellitus tipo 2 confirmadas em humanos. A inflamação reduzida aumenta a sensibilidade à insulina no hipotálamo, melhorando os quadros de saciedade. Além disso, o aumento das

concentrações do peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) e do hormônio peptídeo intestinal YY (PYY), secretado pelas células endócrinas L da porção distal do intestino delgado e intestino grosso, juntamente com a melhora da sensibilidade à insulina no hipotálamo, levam à redução da ingestão de alimentos devido ao aumento da saciedade. Redução da ingestão de alimentos, juntamente com o aumento da expressão do fator adipocitário induzido pelo jejum (FIAF: *fasting induced adipose*), promovem a redução de peso (SETIAN, 2004; DELZENNE et al., 2011; MADSBAD, 2014; CROVESY et al. 2017)

Segundo Crovesy et al. (2017) os efeitos de Lactobacilos na redução de peso e /ou de massa gorda, são cepa-dependentes, desatacando-se o uso de *Lactobacillus plantarum* e *L. rhamnosus* concomitantemente a uma dieta hipocalórica, *L. plantarum* com *L. curvatus*; *Lactobacillus gasseri*, *L. amylovorus*, *L. acidophilus* e *L. casei* com compostos fenólicos, e diversas espécies de *Lactobacillus*.

2.2.1.7 Atividade anti-hipertensiva

A Hipertensão Arterial Sistêmica é uma doença crônica caracterizada pelo aumento da pressão arterial (PA) sistólica (PAS) ≥ 140 mmHg ou PA diastólica (PAD) ≥ 90 mmHg, e tem sido fortemente associada com o risco de desenvolvimento de outras doenças como isquemia, cardiopatia, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral e doença renal (SBC, 2010). Como medidas preventivas para a hipertensão ou outras complicações, recomenda-se o controle através de uma dieta rica em frutas e vegetais, baixa em gorduras saturadas e em sódio e modificações no estilo de vida. Os probióticos, devido aos seus inúmeros efeitos fisiológicos, são amplamente estudados, devido a capacidade de algumas cepas em degradarem aminoácidos em peptídeos bioativos, capazes de inibirem a enzima conversora da angiotensina (ECA), atuando no controle da PA.

Em estudo de metanálise publicado por Khalesi et al. (2014), na averiguação dos efeitos do consumo de probióticos na redução da PA, encontraram uma relação positiva, com uma redução da PAS de 3,56 mmHg e PAD de 2,34 mmHg em relação ao grupo controle. Os resultados encontrados foram relacionados ao uso de cepas

conjuntas ao invés do uso separado do probiótico, foi mais significativa no grupo com PA elevada, doses diárias de consumo $\geq 10^{11}$ UFC/unidade do produto e tempo de intervenção ≥ 8 semanas. Os mecanismos sugeridos devem-se a capacidade dos probióticos em melhorarem os níveis de colesterol, regular o sistema renina-angiotensina através da produção de peptídeos inibidores da ECA, aumento da absorção de nutrientes e fitoestrogênios e na redução da glicose plasmática. Em um estudo de revisão são elucidados alguns mecanismos de redução da PA por probióticos, como indução do vasodilatador óxido nítrico quando presentes em quantidades adequadas no trato gastrointestinal, redução da amina bioativa poliamina nos tecidos; atividade antioxidante, devido a produção de superóxido dismutase e habilidades quelantes do metal e garantia de uma melhor absorção do cálcio (DALIRI et al., 2016). Vera et al. (2017) encontrou em seu estudo de revisão que a disbiose intestinal na hipertensão é caracterizada por um microbioma menos diversificado e menos rico com uma proporção aumentada dos filos bacterianos Firmicutes/Bacteroidetes, diminuição de bactérias produtoras de acetato e butirato e aumento de populações bacterianas produtoras de lactato, indicando a manipulação da microbiota como uma nova terapia anti-hipertensiva.

2.3 Bactérias ácido lácticas (BAL)

2.3.1 Classificação e características

BAL podem ser definidas como um grupo de cocos e bastonetes gram-positivos, catalase negativa, não esporuladas, aeróbias, microaerófilas ou anaeróbios facultativas e produzem ácido láctico como o principal produto final durante a fermentação de carboidratos.

A classificação das BAL, em diferentes grupos, baseia-se na sua morfologia, no modo de fermentação da glicose, do crescimento a diferentes temperaturas, na adaptação a ambientes ricos em nutrientes para produzirem ácido láctico, na habilidade de crescer em elevadas concentrações de sal (NaCl) e a capacidade de apresentarem tolerância a meios ácidos ou alcalinos (LAHTINEN et al., 2011). Para alguns dos novos gêneros, características como composição de ácidos graxos e motilidade são usados na classificação dos gêneros (PILAR et al., 2008).

As BAL estão compreendidas pelo Reino *Bacteria*, Filo *Firmicutes* e Classe *Bacilli* e Ordem *Lactobacillales*, sendo esta subdividida em 6 Famílias: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* e *Streptococcaceae*. Dentre os principais gêneros do grupo das bactérias lácticas estão *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Vagococcus* (LAHTINEN, 2011).

O gênero *Bifidobacterium* é historicamente considerado como pertencente ao grupo das BAL. Embora as espécies de *Bifidobacterium* se encaixem na descrição geral, elas são filogeneticamente mais relacionadas ao grupo *Actinomycetaceae* de bactérias gram-positivas. Além disso, eles têm um caminho especial para a fermentação do açúcar, exclusivo do gênero, que os separa claramente do grupo das BAL (HOLZAPFEL e WOOD, 2014).

O sistema de classificação a nível de gênero divide os micro-organismos, primeiramente, de acordo com a morfologia, em bastonetes (*Lactobacillus* e *Carnobacterium*) e cocos (todos os outros gêneros). A outra característica importante utilizada na diferenciação de gêneros de BAL é o modo de fermentação da glicose sob condições normais (fatores de crescimento como aminoácidos, vitaminas e precursores de ácidos nucleicos, e limitada capacidade de avaliação de oxigênio). Nestas condições, as BAL podem ser divididas em dois grupos: bactérias heterofermentativas (*Leuconostocs*, *Oenococcus*, *Wiesellas*, e um subgrupo de *Lactobacillus*) capazes de produzir não só ácido láctico, mas etanol/ácido acético e dióxido de carbono, e as homo fermentativas (os outros gêneros), capazes de converter quase que exclusivamente açúcar em ácido láctico (HOLZAPFEL e WOOD, 2014).

As BAL são mesófilas, porém possuem a capacidade de crescer em diferentes temperaturas entre 5-10°C a 45°C. O crescimento em certas temperaturas é usado principalmente para distinguir entre alguns cocos. Os enterococos podem crescer a 10°C e 45°C, lactococos e vagococos a 10°C, mas não a 45°C; os estreptococos geralmente não crescem a 10°C, enquanto o crescimento a 45°C é dependente da espécie. Quanto a tolerância ao sal (6,5% NaCl) também pode ser usado para distinguir entre enterococos, lactococos, vagococos e estreptococos, embora a reação variável possa ser encontrada entre os estreptococos. A maioria das espécies são inibidas em concentrações superiores a 6,5% de NaCl, mas já

concentrações extremas (18% NaCl) é característica ao gênero *Tetragenococcus*. Algumas linhagens apresentam capacidade de crescimento em pH 4,0 e 4,5 e outras em pH 3,8 e 9,8 (LAHTINEN et al. 2011; FELIS, SALVETTI e TORRIANI, 2015).

Por meio do desenvolvimento das ferramentas moleculares e da caracterização genética, o conhecimento atual sobre a relação filogenética das bactérias baseia-se principalmente na análise comparativa da sequência do RNA ribossomal 16S, ou 16S rRNA, o que permite um reordenamento da sua nomenclatura e identificação de novos grupos (HOLZAPFEL e WOOD, 2014).

Essas bactérias possuem como habitats cavidades humanas e animais (boca, genitais, intestinais e vias respiratórias), água, frutas, vegetais, alimentos fermentados (produtos lácteos, carne, peixe, vegetais, frutas e bebidas), bem como alimentos estragados, esgoto e materiais vegetais em decomposição (MONTET e RAY, 2016).

2.3.2 BAL potencialmente probióticas em produtos lácteos

BAL que possam sobreviver às condições do trato gastrointestinal são potentes candidatas para averiguação de sua capacidade como cultura iniciadora, *starter*, ou adjuntas nos processos fermentativos, como na fabricação de produtos lácteos (DOLCI; COCOLIN, 2017). A capacidade de BAL para produzir rapidamente ácido láctico é uma propriedade importante em produtos fermentados, incluindo queijos, pois uma queda rápida de pH é essencial para a coagulação, a firmeza e controle de contaminantes indesejáveis. A diminuição do pH como resultado da produção de ácido láctico pode ser suficiente para inibir algumas bactérias patógenos. Assim, controlar a acidificação nas etapas iniciais da fabricação de queijos é de suma importância para limitar o crescimento de *L. monocytogenes* (CENCI-GOGA, 2015).

Culturas funcionais iniciadoras apresentam, no mínimo, uma propriedade funcional inerente, contribuindo para a segurança alimentar e/ ou oferecer uma ou mais vantagens nos aspectos organolépticos, tecnológicos, nutricionais ou fisiológicos. A implementação de culturas iniciadoras ou adjuntas cuidadosamente selecionadas, sem apresentar riscos à saúde, no processo fermentativo pode contribuir no desenvolvimento de qualidades desejadas. Nesse âmbito estão as BAL que são capazes de produzir substâncias antimicrobianas, biopolímeros, compostos

aromáticos, enzimas e compostos nutracêuticos, como os peptídeos bioativos, com propriedades fisiológicas ou promotoras à saúde, como os probióticos (DOUILLARD; DE VOS, 2014).

2.3.3. Aspectos tecnológicos de BAL

2.3.2.1 Produção de bacteriocinas

Bacteriocinas são peptídeos sintetizados pelos ribossomos que possuem atividade antibacteriana (CLEVELAND et al., 2001). Apesar da maioria das bactérias Gram-positivas produzirem bacteriocinas, são as BAL as mais estudadas, devido ao fato de que a maioria dos BAL produtores de bacteriocinas são isoladas de produtos de origem alimentar e possuem status *GRAS*, o que contribui para a segurança destas (MOZZI et al., 2015). As bacteriocinas de BAL são inerentemente tolerantes ao estresse térmico elevado e são conhecidas por sua atividade em uma ampla faixa de pH. Estes peptídeos antimicrobianos também são incolores, inodoros e insípidos, o que aumenta ainda mais sua potencialidade (SYNDER et al., 2013).

A nisina, produzida por *Lactococcus Lactis*, é a única bacteriocina considerada segura para o consumo humano de acordo com a *Food and Drug Administration*, devido ao fato de ser degradada por enzimas proteolíticas no trato gastrointestinal e não formar compostos secundários, além de contribuírem para descontaminação ou controle do crescimento de *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* e *Staphylococcus aureus* (CHEN; HOOVER, 2003).

Perante a preservação de produtos lácteos, as bacteriocinas nisina, pediocina PA-1, lacticina 3147 e enterocinas isoladas ou combinadas com outros tratamentos podem representar um avanço promissor para a segurança microbiológica e manutenção de propriedades sensoriais nesses produtos (SOBRINO-LÓPEZ e MARTÍN-BELLOSO, 2008; SILVA et al., 2018). Um novo nicho é aplicabilidade de bacteriocinas em filmes e revestimentos bioativos, aplicados diretamente nas superfícies e nas embalagens dos alimentos, no intuito de garantir o controle de micro-organismos patogênicos nos produtos alimentícios (VALDÉS et al., 2017).

2.3.2.2 Produção de compostos aromáticos

A acidificação do meio e os processos enzimáticos que normalmente acompanham o crescimento dessas bactérias contribuem para as características de aroma, textura e preservação da qualidade microbiológica dos alimentos fermentados, como os produtos lácteos (KLAENHAMMER et al., 2005). Na indústria alimentícia algumas BAL heterofermentativas são mais importantes que as homofermentativas, como exemplo na produção de compostos que favoreçam a intensificação do *flavor* e aroma, como diacetil e acetaldeído por meio da fermentação de citratos (FOX et al., 2017). Além disso, podem produzir dióxido de carbono, capaz de formar os olhos de alguns queijos e o caráter espumoso de alguns leites fermentados.

Em estudo realizado por Londoño-Zapata et al. (2017), avaliando a caracterização e propriedade tecnológicas de BAL presentes em três queijos tradicionais colombianos, das cinco culturas encontradas apenas *Pediococcus acidilactici*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc citreum* apresentaram produção de diacetil por método qualitativo. Além disso, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, tem sido mencionado pela literatura pela sua capacidade de converter o citrato em diacetil, CO₂ e acetaldeído (VAN MASTRIGT et al., 2018).

2.3.3.3 Produção de Exopolissacarídeos

Os exopolissacarídeos (EPS) podem ser definidos como biopolímeros associados ao envelope celular ou liberados no meio extracelular, produzidos por vários micro-organismos, como bactérias, fungos e algas verde-azuladas, (BADEL, 2011). EPS são de elevado peso molecular, de cadeia longa, lineares ou ramificados consistindo em unidades de sacarídeo repetidas com frequência ou derivados de sacarídeo por ligações α e β -glicosídeo. Entre a grande variedade de micro-organismos produtores de EPS, encontram-se as BAL, principalmente os gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*. (RUAS-MADIEDO, 2006).

Os EPSs podem ser divididos em heteropolissacarídeos (HePSs) e homopolissacarídeos (HoPSs), dependendo sobre a composição da cadeia principal e seus mecanismos de síntese. Em geral, HePSs são constituídos por mais de um tipo de monossacarídeo e são sintetizados intracelularmente, considerando que os

HoPS, pertencentes principalmente aos gêneros de *Weissella*. consistem apenas num único tipo de monossacárido e são produzidos externamente à célula por uma enzima secretada pela bactéria (TORINO et al., 2015; BADEL et al. 2011).

BAL produtoras de EPSs são tradicionalmente conhecidas por desempenhar um papel nas características reológicas e sensoriais de produtos lácteos fermentados, como queijos (YUHARA et al., 2014; AYYASH et al., 2018; ZHANG et al., 2014) e iogurtes (ALE et al., 2016; GAWAI et al., 2017). O uso de culturas produtoras de EPS atraiu também o interesse da indústria de cereais e de panificação, onde sua natureza hidrocolóide está sendo avaliada como um substituto natural para as gomas comerciais e na adoção de produtos livres de glúten, pela sua capacidade de ligação à água e interação com componentes formadores de estrutura, como glúten e amido (WOLTER et al., 2014; LIU et al., 2018).

2.3.2.4 Atividade proteolítica e lipolítica

A atividade proteolítica e lipolítica tem forte influência na formação de compostos que favoreçam o sabor e aroma típicos de variados queijos maturados. O processo proteolítico envolve a ação de enzimas encontradas naturalmente no leite, como a plasmina, no coalho e nas enzimas microbianas intracelulares, proteinases e peptidases, produzidas por BAL adicionadas ao processo de fabricação de queijos. A proteólise envolve a desestabilização da micela de caseína através da liberação de peptídeos e aminoácidos que passam por um processo catabólico, formando assim outros compostos voláteis, como aminas, ácidos, tióis, ésteres, etc. (FOX et al., 2017; GALIOU et al., 2013) A proteólise é capaz de aumentar a capacidade do coágulo em ligar água devido à quebra da rede proteica, melhorando o desenvolvimento da textura dos queijos (McSWEENEY, 2004). Uma das maneiras mais eficazes de aumentar a quantidade de peptídeos bioativos é a utilização de cepas altamente proteolíticas no processo fermentativo (RAMCHANDRAN e SHAH, 2008). Já os agentes lipolíticos presentes no queijo são enzimas lipolíticas encontradas naturalmente no leite (lipase do leite), coalho (esterases pré-gástricas) e microflora, desencadeando a formação de ácidos graxos livres, contribuindo no desenvolvimento do *flavor* típico do produto (BLAYA et al., 2018; LAZZI et al., 2016; GALIOU et al., 2013).

Londoño-Zapata et al. (2017), avaliaram a atividade lipolítica e proteolítica extracelular das BAL *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc citreum*, *Pediococcus acidilactici*, *Weissella paramesenteroides* e *Weissella viridescens* isoladas de três queijos tradicionais colombianos, não foi evidenciada nenhuma atividade por meio de métodos qualitativos. Bezerra et al. (2015) verificaram os efeitos proteolíticos na adição de culturas probióticas isoladas e combinadas na fabricação de queijo coalho de cabra. O queijo preparado com diferentes culturas probióticas apresentaram vantagens no processo proteolítico em relação ao queijo preparado com a cultura starter (*L. lactis subsp. lactis* e *L. lactis subsp. cremoris*). O uso combinado de culturas probióticas promoveu aumento do teor de proteína solúvel e apresentou maior liberação de aminoácidos no primeiro dia após o processamento. A literatura tem reportado o gênero *Pediococcus spp.* como uma excelente BAL com propriedades proteolíticas (SIDDEGOWDA et al., 2017; CARAFA et al., 2014; LLORENTE-BOUSQUETS et al., 2008).

2.3.2.5 Tolerância ao cloreto de sódio

A maioria das BAL são insensíveis a variações de pressão osmótica, e são capazes de se adaptarem a variações fortes na concentração de solutos do meio, já que possuem uma parede celular rígida, porém uma concentração salina de 7% é a condição máxima de tolerância hipertônica (MANTILLA e PORTACIO, 2012).

Em produtos cárneos, como salsichas, onde a concentração de NaCl varia entre 2-15%, espera-se que a cultura iniciadora possa competir com a microbiota tradicional e desempenhar suas atividades metabólicas nas condições prevalentes (AMMOR e MAYO, 2007). Já Meng et al. (2018) analisaram as características tecnológicas de *Lactobacillus* de queijo chèvre de várias regiões do Mediterrâneo de 16 cepas de *Lactobacillus paracasei* e nove de *Lactobacillus rhamnosus*. Destas, 20 cepas, sendo 13 de *Lb. paracasei* e 7 de *Lb. rhamnosus*, puderam crescer a uma concentração de NaCl a 6%.

2.4 Queijos coloniais artesanais

Queijo é entendido como “o produto fresco ou maturado obtido por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído, ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácido orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar” (BRASIL, 1996) No Brasil as principais regiões queijeiras são: Região dos queijos especiais de Minas Gerais, Região do queijo do Reino, Região da Serra da Canastra, Região do Serro frio, Região da Serra do Salitre e Região de Araxá. Na região Sul, a qual engloba os estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, há um tipo de queijo típico, conhecido como Queijo colonial artesanal (MENEZES, 2011).

Entende-se por queijo artesanal, o que possui algum grau de processamento realizado nas propriedades rurais, geralmente de produção familiar, através de um processo artesanal de produção, que geralmente são comercializados em feiras de produção agroecológica; e entre eles destaca-se o queijo Colonial artesanal produzido na região sul do Brasil (DOTTO et al., 2015). Estes queijos são tradicionalmente feitos a partir de leite cru, utilizando uma cultura natural de soro de leite como coagulante, e as questões que envolvem a sua segurança, qualidade e proveniência, a fim de proteger tanto os produtores como os consumidores, são sempre motivo de preocupação (MENEZES, 2011; DORES; FERREIRA, 2012).

O estado de Santa Catarina aprovou a Lei nº 17.486, de 16 de janeiro de 2018 (DOESC, 2018), dispondo sobre a produção e comercialização de queijos artesanais de leite cru, definindo-os como “aquele elaborado com leite cru da própria fazenda, com métodos tradicionais, com vinculação ao território de origem...”. A Lei também define sobre a formulação desses produtos, constituída da matéria-prima (leite cru), condimentos e corantes naturais, coalhos, sal, fermentos e outras substâncias de origem natural. Quanto ao tempo de maturação/fermentação, quando aplicável e estabelecido em regulamento técnico específico para cada tipo de queijo, será definido por meio de comprovações laboratoriais de atendimento aos parâmetros microbiológicos presentes.

O Rio Grande do Sul não possui uma legislação específica para esses produtos, logo, podendo ser produzido de diversas formas, além do fato de não possuírem um padrão de identidade e de qualidade, bem como falta de rotulagem, informação nutricional e outras informações pertinentes ao consumidor, o que faz surgir a necessidade de implantação de núcleos de produção ou até mesmo cooperativas de produção (DOTTO et al., 2015). No âmbito federal, há a Instrução

Normativa nº 30 de 2013, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2013), para artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru. Essa IN determina que sejam maturados por um período inferior a 60 dias, quando estudos técnico-científicos comprovarem que a redução do período de maturação não compromete a qualidade e a inocuidade do produto.

Um dos queijos artesanais mais conhecidos do país, o queijo Minas tradicional é produzido com leite de vaca cru e, desde 2002, possui uma legislação específica que regula seu processo produtivo no estado de Minas Gerais. Posteriormente, em 2008, a produção de queijos artesanais em Minas Gerais foi reconhecida como patrimônio cultural imaterial pelo Instituto Nacional do Patrimônio Histórico e Cultural (IPHAN), em reconhecimento à importância dessa tradição como valor cultural (DORES; FERREIRA, 2012).

Em estudo com produtores de queijo coloniais artesanais demonstrou a dificuldade em realizar, sem o devido apoio, as análises do leite, da água e do queijo, a fim de poder garantir a qualidade e segurança adequada dos produtos com a aplicação das Boas Práticas, ou certificar a propriedade como livre de zoonoses. Também foi mencionado sobre a necessidade de uma legislação que atenda a produção artesanal da agricultura familiar do ponto de vista estrutural e tributário, assim como a falta de estudos suficientes voltados para certificar a qualidade e segurança dos produtos fabricados a partir de leite cru, como o período de maturação adequado para a comercialização (CARVALHO et al., 2015).

A pasteurização é o tratamento térmico que se aplica ao leite no intuito de eliminar as bactérias patogênicas, entre elas *Listeria monyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e coliformes. Esse processo também reduz de forma significativa a microbiota láctica natural do leite, responsável pelas características únicas de cada queijo produzido em diferentes regiões do Brasil. Como alternativa para compensar a destruição da flora bacteriana característica do leite, há a necessidade de utilização de fermentos lácteos industrializados, tendo seus atributos alterados e padronizadas (OZER e AKDEMIR-EVRENDILEK, 2014; MONTET e RAY, 2016).

As BAL, comumente encontrados em queijos são as pertencentes aos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*. A flora microbiana característica dos diferentes queijos artesanais brasileiros, em geral, não é conhecida. Não existe metodologia que permita diferenciações de autenticidade e

origens para queijos artesanais, que, conseqüentemente, não possuem uniformidade, e muitas vezes apresentam defeitos que poderiam ser evitados, se houvesse maior controle sobre as práticas de fabricação dos mesmos (FOX et al., 2017). Pesquisas envolvendo alimentos produzidos artesanalmente buscam a caracterização da microbiota e a verificação das propriedades probióticas dos microorganismos, principalmente bactérias ácido lácticas, possibilitando novas perspectivas para a melhoria da qualidade do queijo e da sua segurança alimentar, preservando a sua microbiota nativa (MOZZI et al., 2015).

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



Projeto de Pesquisa

Avaliação de propriedades probióticas e tecnológicas *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de Queijos Coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS

Carlos Henrique Gomes de Sousa Lima

Pelotas, agosto de 2018

Carlos Henrique Gomes de Sousa Lima

Avaliação de propriedades probióticas e tecnológicas *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de Queijos Coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS

Projeto de Pesquisa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas com requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Elizabete Helbig

Coorientadora: Nádia Carbonera

Pelotas, agosto de 2018

Resumo

LIMA, Carlos Henrique Gomes de Sousa. **Avaliação de propriedades probióticas e tecnológicas *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de Queijos Coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS.** 2018. 57 f. Projeto de Pesquisa (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

O aumento da prevalência de Doenças Crônicas não Transmissíveis e do cuidado dos consumidores com a alimentação tem elevado o consumo de produtos artesanais, alimentos funcionais e nutracêuticos, em busca de uma melhor qualidade de vida. Entre eles estão os probióticos, presentes em alguns alimentos. Por serem constituídos em grande parte por bactérias ácido lácticas, a busca por novas cepas com potencial probiótico pode contribuir com esse quadro. Pesquisas envolvendo queijos artesanais tem como principal objetivo a caracterização da microbiota e a verificação das propriedades probióticas dos micro-organismos. Os queijos Coloniais artesanais apresentam-se como uma promissora fonte de estudo. O objetivo desse projeto é avaliar o potencial probiótico e tecnológico *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos Coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS. A microbiota láctica será isolada em meio Ágar MRS através de diluições decimais até 10^{-9} e incubadas em anaerobiose nas temperaturas de 30 e 37°C. Os isolados serão avaliados quanto a coloração de Gram, morfologia, prova de catalase, atividade hemolítica e de gelatinase. As cepas Gram positivas, em forma cocóide ou bacilar, catalase negativa serão avaliadas quando aos aspectos de segurança: atividade hemolítica, produção de gelatinase e resistência a antibióticos. As bactérias selecionadas serão preservadas a -80°C em MRS com 50% de glicerol. A avaliação do potencial probiótico será mensurada pela averiguação da tolerância às funções do trato gastrointestinal com soluções gástricas e pancreáticas, tolerância à bile, adesão à mucosa e detecção da produção de bacteriocinas pela técnica de difusão em poços. As cepas com melhor desempenho serão identificadas bioquimicamente por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR). Como forma de avaliar características fisiológicas desejáveis das bactérias ácido lácticas potencialmente probióticas, será mensurada a capacidade antioxidante; produção da enzima β -galactosidase e capacidade de assimilação do colesterol. Quanto aos aspectos tecnológicos as cepas serão avaliadas quanto a capacidade de acidificação do leite e atividade proteolítica. Os dados serão analisados através do teste de Análise de Variância – ANOVA e do teste adicional de Tukey com nível de significância 0,05 ($p < 0,05$) com o auxílio do software Statistica 7.0 (StatSoft).

Palavras-chave: compostos bioativos, segurança alimentar, produtos lácteos, potencial biotecnológico.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as preocupações sobre o impacto dos alimentos na saúde, bem como as consequências sociais e ambientais que isso acarreta, levaram a grandes mudanças em todas as etapas das cadeias alimentares (VALGUERA et al. 2012). Principalmente, devido ao atual quadro de Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNT) constituírem um grande problema global, sendo os quatro principais tipos: as doenças cardiovasculares, cânceres, doenças respiratórias crônicas e diabetes. Independente do ciclo da vida, todos são vulneráveis aos fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento das DCNT, seja de dietas pouco saudáveis, sedentarismo, exposição ao fumo, ou os efeitos do uso nocivo do álcool (BROWNELL e WALSH, 2017). Na prevenção e tratamento dessas doenças, alternativas são necessárias para complementação das condutas da medicina convencional. Nesse âmbito, o uso de produtos naturais, alimentos funcionais e nutracêuticos, podem contribuir para esse quadro epidemiológico, entre eles estão os probióticos.

Probióticos são definidos pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization* (FAO/OMS), como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (JOINT, 2002), podendo ser utilizados como parte de alimentos com alegação de propriedades funcionais e, ou, de saúde, (BRASIL, 2002) ou de compostos nutracêuticos, comercializados na forma de produtos farmacêuticos (LIRA et al., 2009). Algumas das propriedades mencionadas nesse trabalho são atividades hipocolesterolêmica, antioxidante, imunomoduladora e anti-hipertensiva, produção de substâncias antimicrobianas e compostos aromáticos, possível contribuição redução de peso, tolerância à lactose, além de melhoraram o valor nutricional dos alimentos e garantir uma maior digestibilidade.

No entanto, a lista de espécies probióticas é bastante curta. Inclui cepas oferecidas pela indústria de laticínios e alguns grupos científicos. De modo geral, os probióticos mais atuais são as bactérias ácido lácticas (BAL) pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, e as *Bifidobacterium*, com menor número de leuconostocos, pediococos, lactococos, enterococos e estreptococos (FOLIGNÉ et al., 2013; HOLZAPFEL; WOOD, 2014). Assim, esse quadro tem levado ao desenvolvimento de

pesquisas na obtenção de novas cepas com propriedades probióticas. Embora tenham sido relatados que um número substancial de espécies microbianas exiba propriedades probióticas potenciais, estabelecidas após pesquisa *in vitro* e pré-clínica e/ou depois de ensaios clínicos em grande escala, apenas as cepas mais documentadas e robustas podem chegar ao mercado (FOLIGNÉ et al., 2013).

As BAL, comumente encontrados em queijos são as pertencentes aos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*. A microbiota característica dos diferentes queijos artesanais brasileiros, em geral, não é conhecida. Não existe metodologia que permita diferenciações de autenticidade e origens para queijos artesanais, que, conseqüentemente, não possuem uniformidade, e muitas vezes apresentam defeitos que poderiam ser evitados, se houvesse maior controle sobre as práticas de fabricação dos mesmos (FOX et al., 2017). Pesquisas envolvendo alimentos produzidos artesanalmente avaliam a caracterização da microbiota e a verificação das propriedades probióticas dos micro-organismos, principalmente bactérias ácido lácticas, e possibilita novas perspectivas para a melhoria da qualidade do queijo e da sua segurança alimentar, preservando a sua microbiota desejável (MOZZI et al., 2015).

Para identificação de novas cepas de BAL potencialmente probióticas para consumo humano, alguns critérios são necessários na garantia da segurança, pois os micro-organismos probióticos não devem ser patogênicos, não possuir capacidade de transferir genes de resistência a antibióticos, além de serem capazes de manter a estabilidade genética. Para serem reconhecidos como componentes funcionais dos alimentos, devem demonstrar as seguintes propriedades: estabilidade a ácidos a bile, resistência a enzimas digestivas, adesão à superfície do intestino e atividade antagônica contra patógenos humanos (FAO, 2002).

Com isso, mostra-se evidente a importância de estudos que conduzam à avaliação de BAL potencialmente probióticas, com efeitos fisiológicos desejáveis e tecnológicos para formulação de produtos com alto valor agregado. A utilização de BAL é uma alternativa importante a ser considerada para a formulação de novos alimentos funcionais, de grande relevância e com menor utilização de compostos sintéticos para sua conservação, tornando-os mais atraentes para a população e indústria de alimentos. Perante esse contexto o objetivo desse trabalho será avaliar

o potencial probiótico e tecnológico *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos Coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial probiótico e tecnológico *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de Queijos Coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Isolar e caracterizar bactérias ácido lácticas de queijos coloniais artesanais;
- ✓ Avaliar as bactérias isoladas quanto aos aspectos de segurança;
- ✓ Verificar a presença de atividade antimicrobiana da bacteriocina produzida pelos isolados;
- ✓ Determinar a resistência ao trato gastrointestinal;
- ✓ Identificar em nível de espécie os isolados através de métodos moleculares;
- ✓ Avaliar efeitos fisiológicos desejáveis das cepas probióticas;
- ✓ Avaliar o potencial tecnológico.

3 Hipótese

Queijos Coloniais artesanais comercializados em Pelotas, são fontes de bactérias ácido lácticas potencialmente probióticas e/ou com características de culturas iniciadoras.

4 Material e métodos

4.1 Amostragem

Para o desenvolvimento do presente estudo, serão adquiridas 12 amostras de Queijos Coloniais artesanais comercializados em seis feiras de produção agroecológica localizadas no município de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Serão coletadas duas amostras aleatórias em semanas alternadas em cada feira e utilizadas somente aqueles que forem produzidos com leite cru, sendo esta informação solicitada diretamente ao vendedor. Os produtos serão adquiridos entre os meses de agosto a outubro de 2018. Após a aquisição deverão ser acondicionados em caixas isotérmicas e encaminhados para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas/Pelotas-RS, Brasil, seguindo as normas do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (DOWNES; ITO, 2001). Os queijos serão mantidos a temperatura de refrigeração ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) e avaliados em até 12 horas após a aquisição.

4.2 Isolamento e caracterização morfológica

Das amostras serão transferidas asepticamente 25 gramas das porções centrais para bolsas plásticas estéreis, com 225 mL de meio composto por água peptonada 1% (Sigma, Aldrich), sendo esta diluição correspondendo a 10^{-1} . A bolsa será homogeneizada (*Stomacher 400 Circulator, Seward Laboratory Systems, Londres, Inglaterra*) por três minutos. Alíquotas de 1 mL de cada amostra serão transferidas para tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada estéril a 0,1% (p/v), correspondendo a diluição 10^{-2} , e serão realizadas diluições decimais até 10^{-9} .

As determinadas diluições serão semeadas pela técnica de profundidade no meio de crescimento de *Man Rogosa and Sharp* (MRS) Agar (CM0361/OXOID), e incubadas em placas de Petri a $37^{\circ}\text{C}/48$ h. As condições de incubação serão realizadas sob anaerobiose utilizando o kit Anerogen (Gas-Pack, Anaerogen; Oxoid Ltd., Hampshire, Inglaterra) (GALA, 2008; PERIN; NERO, 2014).

Após o crescimento, as colônias escolhidas, preferencialmente as maiores, lisas e com bordas definidas, serão avaliadas quanto à coloração pelo método de Gram e prova da catalase (H_2O_2 , 3% v/v), serão recultivadas em tubos com MRS Agar a 37°C/48h para manutenção dos isolados.

4.3 Testes de segurança

Os isolados gram-positivos, com forma cocóide ou bacilar e catalase negativos serão submetidos aos testes de segurança.

4.3.1 Avaliação da capacidade hemolítica

A atividade hemolítica será executada adaptando-se a metodologia descrita por Baumgartner et al. (1998). Para isso os isolados serão estriados em ágar MRS suplementado com 5,0% (v/v) de sangue de carneiro desfibrinado (New Prov). Os resultados serão avaliados após incubação a 37°C/48 h, em condição de anaerobiose. A reação hemolítica será verificada por meio da formação de zonas claras ao redor da colônia, como β -hemólise. Formação de pigmento verde ao redor da cepa indicará α -hemólise, enquanto que a ausência da reação será indicativa de γ -hemólise.

4.3.2 Avaliação da atividade de gelatinase

A atividade da enzima gelatinase será avaliada nas cepas selecionadas, conforme metodologia sugerida por Su et al. (1991), utilizando-se o ágar MRS suplementado com 3 % de gelatina (Sigma-Aldrich). O resultado será avaliado após incubação dos isolados à 37±1°C/48 h sob anaerobiose. A produção da enzima será verificada por meio da formação de um halo ao redor da estria após adição de aproximadamente 0,3 mL da solução de Frazier (cloreto de mercúrio, 15,0 g; ácido

clorídrico concentrado, 20 mL; e água destilada, 100 mL) por placa para confirmação da hidrólise da gelatina.

4.3.3 Resistência a antibióticos

Para a verificação da susceptibilidade antimicrobiana, seis antibióticos serão utilizados cloranfenicol (30 µg), oxacilina (1 µg), vancomicina (30 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg) e penicilina G (UI), segundo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Após o cultivo, os isolados passarão a inoculação em 4 mL de água destilada estéril para obter o padrão de McFarland 0,5 (Probac, Brasil) (10^8 UFC/mL). Em seguida, *swabs* estéreis serão utilizados para espalhar o inócuo por toda extensão de placas contendo MRS Agar para, em seguida, discos de antimicrobianos serem adicionados. A susceptibilidade antimicrobiana será avaliada por meio da mensuração dos halos de inibição de crescimento bacteriano, após incubação, durante 24-48 h/37°C (CHARTERIS et al., 1998).

Os isolados serão mantidos como culturas estoque congeladas a -80°C em caldo MRS contendo 40% (v/v) de glicerol, em tubos *eppendorf*.

4.4 Avaliação do potencial probiótico

Os isolados serão cultivados por duas vezes consecutivas em tubos contendo 10 mL de caldo MRS por 24h/37°C. O caldo com a cultura será centrifugado (6000 g, 20 min, 5°C), lavado duas vezes com solução PBS (pH 7,0) e suspenso em 1 mL da solução (CHATERIES et al., 1998).

4.4.1 Resistência aos sucos gástrico e pancreático simulados

A metodologia utilizada para determinação de tolerância intestinal foi preconizada por Charteris et al. (1998) com algumas modificações. As soluções de suco gástrico e pancreático serão preparadas no dia da análise por meio da suspensão em solução salina estéril (0,5% v/v) de pepsina (3g/L^{-1}) ou de pancreatina (1g/L^{-1}). O pH será ajustado em 2,0 e 3,0 para o suco gástrico e em 8,0 para o pancreático, por meio de HCl concentrado ou 0,1 m NaOH. Alíquotas de 1 mL da suspensão celular serão centrifugadas (12,000 g, 5 min, 5°C), resuspendidas nas devidas soluções, misturadas em agitador vortex (Prolab, São Paulo, Brasil) e incubadas a 37°C . Para avaliação a tolerância ao trânsito gástrico, alíquotas de 0,1 mL serão removidas após 1, 90 e 180 min para determinação do contagem de células viáveis. Para a tolerância do trânsito do intestino delgado, alíquotas serão retiradas após 1 e 240 min.

4.4.2 Tolerância à bile

Será utilizada 1 mL da última cultura para inocular tubos com 9 mL de caldo MRS adicionado de 0,3, 0,5 e 1,0% de sais biliares (Sigma-Aldrich). Os tubos serão incubados por 4 h a 37°C . A tolerância à bile pelas cepas avaliadas será verificada em placas com ágar MRS depois da incubação em estufa por 48 h a 37°C sob anaerobiose (PENNACCHIA et al., 2004).

4.4.3 Adesão à mucosa

4.4.3.1 Capacidade de autoagregação e coagregação

O ensaio para averiguação da autogregação será conduzido como descrito por Collado et al. (2007) com algumas pequenas modificações. As células colhidas

serão lavadas duas vezes com PBS (pH 7,2), ressuspensas na solução, submetidas à agitação e incubadas a 37°C durante 5 h. Alíquotas (1 mL) serão retiradas de cada amostra a 0 e 5 h, e a absorbância medida a D.O. 660 nm. A agregação automática (%) será calculada usando a equação:

$$[(A_0 - A_5) / A_0] \times 100.$$

Onde, A_0 é a absorbância inicial e A_5 a após 5 horas de incubação.

A avaliação de coagregação será feita utilizando suspensões de BAL, bem como bactérias patogênicas individuais, serão preparadas com base no método que foi descrito no ensaio acima (COLLADO et al., 2007). Um mililitro da suspensão celular para cada isolado e uma estirpe patogêna serão misturadas e incubadas a 37°C. A absorbância será medida a D.O. 600 nm a 0 e 5 h de incubação. Para averiguação dos resultados (%), utilizará a fórmula:

$$[(A_0 - A_5) / A_0] \times 100.$$

Onde, A_0 é a absorbância da suspensão bacteriana mista em 0 h de incubação, e A_5 é a absorbância da suspensão bacteriana mista após 5 h.

4.4.3.2 Hidrofobicidade

O teste será feito conforme descrito por Doyle e Rosenberg (1995) com algumas pequenas modificações por Khalil et al. (2018). As células bacterianas serão colhidas e lavadas duas vezes com PBS, ressuspensas em 5 mL de PBS, e determinada a densidade óptica (D.O. 580 nm). Uma amostra de 2 mL de suspensão celular será adicionada à 2 mL de fase orgânica de n-hexadecano (Pro-Análise) e submetida a agitação por 2 min. As fases ficarão em repouso durante 30 min à temperatura ambiente. Um mililitro da fase aquosa deverá ser descartado, e determinada a D.O. a 580 nm. A hidrofobicidade (%) será calculada usando a equação:

$$[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Onde, A_0 é a D.O. inicial e A_1 a final D.O.

4.4.4 Detecção da produção de bacteriocinas

A bacteriocina produzida pelas cepas de BAL encontradas serão detectadas pela aplicação da técnica difusão em poços, conforme descrito por Herreros et al. (2005). *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* serão utilizadas como bactérias indicadoras. Os patógenos serão cultivados em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Fisher Scientific, ON, Canad) a 37°C/24 h.

Um milímetro de cada micro-organismo indicador (5 a 6 log UFC.mL⁻¹) será inoculado em 15 ml de ágar semissólido BHI (caldo BHI mais ágar bacteriológico a 0,7%) mantido a 50° C e depois vertido numa placa de Petri. Após a solidificação, serão realizados três poços (5 mm de diâmetro) e 35 µl do sobrenadante livre de células (SLC) de cada BAL isolada e apropriadamente ajustado será adicionado a cada poço. Os sobrenadantes serão preparados como se segue: um mL do isolado BAL congelado será cultivado duas vezes por 24 h em 20 mL de caldo MRS. As células serão removidas por centrifugação a 14000 g por 5 min (Sorvall RC6 PLUS, Thermo-electron Corporation, Asheville, NC, EUA). O sobrenadante será filtrado através de uma membrana com porosidade correspondente a 0,22 µm (GVWP Durapore, Millipore) e 35 µl da alíquota não ajustada do sobrenadante será adicionada ao primeiro poço. O SLC restante terá o pH ajustado para 6,0 com NaOH 1 mol.l⁻¹, a fim de excluir possíveis efeitos de inibição devido aos ácidos orgânicos, depois será adicionado aos outros poços. A ausência de crescimento da cepa indicadora ao redor da cultura potencialmente probiótica indicará sua inibição frente à presença da bacteriocina produzida por este micro-organismo testado.

As placas de BHI serão incubadas a 37° C/24 h em aerobiose. As zonas de inibição serão medidas usando um paquímetro eletrônico com display digital

(MastercraftMD, Miami, FL, USA). As triagens para BAL produtoras de bacteriocina serão realizadas em duplicata para cada isolado.

4.5 Identificação molecular

A identificação molecular será realizada por meio da obtenção do sequenciamento do rDNA 16S. As cepas que apresentarem melhor desempenho probiótico no decorrer do trabalho, passarão por sequenciamento genético. O DNA total será extraído pelo método fenol/clorofórmio e as Reações em Cadeia da Polimerase serão realizadas empregando os primers 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1525r (5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), conforme Lisboa et al. (2006). As reações de PCR serão conduzidas em volume de 25 µL nas seguintes condições: desnaturação inicial de 3 min a 95°C, seguida por 25 ciclos de 30s a 94 °C (desnaturação), 30s a 52 °C (anelamento) e 1 min 40 s a 72°C (extensão), com extensão final de 7 min a 72 °C. Os produtos da PCR (1465 pb) serão purificados com o kit Ciclo Pure EZNA (Life Technologies, EUA) e encaminhados para ATCGene (Porto Alegre, Brasil), onde passarão por sequenciamento. O algoritmo BLAST será utilizado para busca por sequências homólogas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e, para alinhamento destas sequências, terá como base o software CLUSTAL W versão 1.8.

4.6 Características fisiológicas

4.6.1 Atividade antioxidante por eliminação de radicais DPPH

A capacidade de eliminação de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) das cepas de bactérias ácido lácticas será determinada seguindo a metodologia prescrita por Kao e Chen (2006) com algumas modificações por Kachouri et al. (2015). Será adicionada 1,0 mL da suspensão das células bacterianas, 10^7 a 10^9 UFC/mL, a uma

solução etanólica de DPPH de 2,0 mL (0,05 mM). A mistura será homogeneizada vigorosamente e incubada à temperatura ambiente no escuro durante 30 min. Os controles incluirão água deionizada e solução de DPPH. Os espaços em branco constituirão apenas etanol e as células. A absorbância da solução resultante será medida a 517 nm após centrifugação a 8000 g durante 10 min. A habilidade de eliminação será definida através da seguinte fórmula como:

$$\text{Capacidade de eliminação (\%)} = [1 - (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}} / A_{\text{Controle}})] \times 100$$

4.6.2 Avaliação da produção de β -galactosidase

A avaliação da produção da enzima β -galactosidase será avaliada conforme metodologia preconizada por Miller (1998). As culturas serão cultivadas nas condições já mencionadas. Durante o crescimento, alíquotas de 80 μ L do agente permeabilizante (100 mM Na_2HPO_4 ; 20 mM KCl; 2 mM MgSO_4 ; 0.8 mg/mL brometo de eciltrimetilamônio; 0.4 mg/mL desoxicolato de sódio; 5.4 μ L/mL β -mercaptoetanol) serão adicionadas a tubos *ependorf* (2 mL). Será mensurada a absorbância na D.O. a 600 nm das bactérias em crescimento, e 20 μ L serão adicionadas aos tubos, o que tornará as membranas estáveis. Serão adicionadas 600 μ L da solução preparada do substrato (3 mL 0.2 M Na_2HPO_4 ; 2 mL 0.2 M NaH_2PO_4 ; 10 mg o-nitrophenyl- β -D-Galactoside; 2.7 μ L/mL β -mercaptoetanol em 10 mL de água destilada estéril) anotando o tempo em que será adicionado. Após o aparecimento da coloração amarelada, serão adicionadas 700 μ L de Na_2CO_3 1 M para término da reação e o tempo deverá ser anotado. Depois que as reações terminarem nas amostras, elas deverão ser transferidas para microcentrífuga por 5-10 min em velocidade máxima. O sobrenadante deverá ser retirado para registrado na absorbância de 420 nm. As unidades de β -gal serão calculadas em “unidades de Miller”, conforme a equação:

$$(\text{Abs}_{420}) / [\text{Abs}_{600} * (\text{volume } 0,02 \text{ mL}) * \text{tempo de reação}] * 1000$$

4.7 Propriedades tecnológicas

4.7.1 Capacidade de acidificação

Para avaliação da capacidade acidificante e alteração do pH, será utilizada a metodologia descrita por Franciosi et al. (2009) e modificada, pela alteração nos tempos de avaliação do pH e teor de ácido láctico (0, 3, 12, 24 e 48h). As bactérias serão reativadas como já mencionado e, a seguir, serão crescidas por 18 horas em caldo MRS, centrifugadas a 10.192 g por 10 min, lavadas com água peptonada estéril e inoculadas 1% (v/v) em 9 mL de leite integral UHT, incubadas a 37°C. A taxa de acidificação será medida em pHmêtro (PH140, Simpla) por imersão do eletrodo previamente calibrado e calculada de acordo com Ayad et al. (2004).

Para uma cultura láctica ser considerada rápida produtora de ácido, ela deve reduzir o pH do leite de 6,5 para 5,3 em até 6 h de incubação à temperatura adequada (COGAN et al. 1997). Enquanto que o valor de acidez será determinado por titulação com NaOH 0,1 N, seguindo o método da A.O.A.C 920.124 (2005), sendo expresso em porcentagem de ácido láctico. Com os dados da velocidade de acidificação, as cepas serão classificadas em rápida, média ou lenta acidificação, dependendo do tempo em que ocorrer a diferença de pH em 0,4 U em relação ao valor inicial, sendo possível selecionar as BAL iniciadoras e as candidatas como culturas secundárias ou adjuntas.

4.7.2 Atividade proteolítica

Para a determinação da atividade proteolítica extracelular qualitativa, as bactérias serão semeadas em meio sólido composto por 1% (v/v) de leite desnatado e 1,5% de ágar em 37°C, como descrito por Jones et al. (2007), sendo observada em intervalos de 24 h durante três dias. A atividade proteolítica será indicada como uma zona clara ao redor das colônias.

5. Análises estatísticas

Os experimentos serão replicados no mínimo três vezes e os resultados serão apresentados com média \pm desvio padrão. A análise estatística dos dados ocorrerá através do teste de Análise de Variância – ANOVA. Quando for observado um valor significativo, um teste adicional de Tukey (post hoc test) será realizado com nível de significância 0,05. Todas as análises serão feitas no software Statistica 7.0 (StatSoft).

6. Cronograma

Tabela 4. Cronograma do desenvolvimento, implantação, execução e conclusão do Projeto de Pesquisa.

ATIVIDADES	PERÍODO																									
	2017						2018						2019													
	JULHO	AGOSTO	SETEMBRO	OUTUBRO	NOVEMBRO	DEZEMBRO	JANEIRO	FEVEREIRO	MARÇO	ABRIL	MAIO	JUNHO	JULHO	AGOSTO	SETEMBRO	OUTUBRO	NOVEMBRO	DEZEMBRO	JANEIRO	FEVEREIRO	MARÇO	ABRIL	MAIO	JUNHO	JULHO	AGOSTO
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Qualificação													X													
Isolamento e caracterização													X	X	X											
Avaliação do potencial probiótico															X	X	X									
Identificação molecular																	X	X	X							
Propriedades funcionais																					X	X	X			
Propriedades tecnológicas																					X	X	X			
Escrita dos artigos científicos																								X	X	
Defesa da dissertação																										X

8. Orçamento

Tabela 5. Orçamento médio do Projeto de Pesquisa.

Material	Quantidade	Preço médio (R\$)
Saco Stomacher	1 pacote c/ 250 unidades	275,00
Água peptonada	500 gramas	315,00
MRS Ágar	1 kg	700,00
MRS caldo	1 kg	900,00
Sangue de carneiro desfibrinado	2 frascos 100 mL/ cada	370,00
Gelatina (<i>Nutrient gelatina</i>)	200 gramas	65,00
Glicerol p.a.	500 mL	40,00
Sais biliares	1 kg	600,00
Pepsina	100 gramas	142,00
Pancreatina	100 gramas	140,0
Discos de cloranfenicol (30 µg), oxacilina (1 µg), vancomicina (30 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg) e penicilina G (UI)	50 unidades/ cada	80,00
Kit Ciclo Pure EZNA	1 unidade (até 50 preparações)	300,00
Hidroxitolueno butilado	200 gramas	220,00
β-ONPG	250 gramas	142,00
β-mercaptoethanol	10 mL	160,00
Solução ácida de colesterol (<i>Cholesterol-Water Soluble</i>)	30 g	538,00
Total		4.987,00

4. Relatório do trabalho de campo

No projeto de pesquisa estava previsto inicialmente as análises de virulência gelatinase e atividade hemolítica, mas devido a fatores de segurança, o teste de DNase foi incluído. Também foi necessário incluir análises microbiológicas de atividade antagonista pelo método “*spot on the lawn*” frente à BAL indicadoras, no intuito de garantir uma melhor eficácia na aplicabilidade de culturas em sistemas lácteos. No 2º artigo, será acrescentado como parte o resultado da PCR, visando a identificação das cepas com potencial bacteriocinogênico. Como parte final das análises, essas cepas serão avaliadas quanto ao potencial probiótico e acrescentadas em um terceiro artigo para entrega final da dissertação. Como perspectiva futura do estudo está em pesquisar qual a bacteriocina produzida pelos isolados, purificar e testar sua aplicação in situ em queijos a nível piloto, testando sua eficácia no controle de *Listeria monocytgenes*.

5. ARTIGO 1

INTERNACIONAL DAIRY JOURNAL

Isolamento e avaliação de parâmetros de segurança *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS

Carlos Henrique Gomes de Sousa Lima^{a*}, Nádia Carbonera^b, Elizabete Helbig^a

^aFaculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, R. Gomes Carneiro n. 1, Centro, Pelotas, Brasil

^bCentro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, Brasil

**Autor correspondente: +55 (53) 9841-49442*

Endereço eletrônico: carloshgsl@hotmail.com

RESUMO

Esse estudo teve como objetivo selecionar e avaliar BAL isoladas de queijos coloniais artesanais comercializados em feiras livres de Pelotas, RS, Brasil, quanto aos aspectos de segurança in vitro. Foram isoladas 105 cepas, 73 foram caracterizados como gram positivos e catalase negativas e avaliadas quanto a aspectos fenotípicos de virulência. Todas as estirpes foram gelatinase e DNase negativas, quanto a atividade hemolítica, houve detecção de sete cepas como α e duas como β -hemolítica, resultado em 64 cepas de BAL para avaliação de susceptibilidade a antimicrobianos. Esses isolados apresentaram sensibilidade aos antibióticos cloranfenicol e tetraciclina. Para os outros antimicrobianos, apresentaram resistência a ciprofloxacina (93,5%, 58/64), oxacilina 98,4% (63/64), Penicilina G 51,6% (41/64) e vancomicina (85,9%, 54/64). Deste modo, os queijos coloniais são fontes prósperas de BAL potencialmente seguras, as quais serão utilizadas para avaliação da atividade antimicrobiana e potencial probiótico, visando contribuir na aplicabilidade de novas cepas funcionais em produtos lácteos.

1. Introdução

Bactérias ácido lácticas (BAL) podem ser definidas como um grupo de cocos e bastonetes gram-positivos, catalase negativa, não esporuladas, aeróbias, microaerófilas ou anaeróbios facultativas e produzem ácido láctico como o principal produto final durante a fermentação de carboidratos. As BAL estão compreendidas pelo Reino *Bacteria*, Filo *Firmicutes* e Classe *Bacilli* e Ordem *Lactobacillales*, sendo esta subdividida em seis Famílias: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* e *Streptococcaceae*. Dentre os principais gêneros do grupo das BAL estão *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Vagococcus* (Lahtinen, 2011).

Essas bactérias possuem como habitats cavidades humanas e animais (boca, genitais, intestinais e vias respiratórias), água, frutas, vegetais, alimentos fermentados (produtos lácteos, carne, peixe, vegetais, frutas e bebidas), bem como alimentos estragados, esgoto e materiais vegetais em decomposição (Montet & Ray, 2016). Entre os alimentos lácteos fermentados estão os queijos artesanais, principalmente aqueles elaborados a partir de leite cru. Entende-se por queijo artesanal, o que possui algum grau de processamento realizado nas propriedades rurais, geralmente de produção familiar, através de um processo artesanal de produção, que geralmente são comercializados em feiras de produção agroecológica; e entre eles destaca-se o queijo colonial artesanal produzido na região sul do Brasil (Dotto, Gonçalves & Iop, 2015). Estes queijos são tradicionalmente feitos a partir de leite cru, utilizando uma cultura natural de soro de leite como coagulante podendo ser consumido fresco ou em diversos graus de maturação, e as questões que envolvem a sua segurança, qualidade e proveniência, a fim de proteger tanto os produtores como os consumidores, costuma ser um fator crítico, além de apresentarem problemas de padronização, como formato, tamanho, umidade e teor de cloreto de sódio (Das Dores & Ferreira, 2012; Menezes, 2011).

O uso de micro-organismos na conservação de alimentos tem ganhado importância nos últimos anos devido à demanda pelo uso reduzido de conservantes químicos pelos consumidores e pelo aumento crescente de espécies bacterianas resistentes a antibióticos e a conservantes. As BAL são capazes de produzirem vários compostos antimicrobianos que são considerados importantes na biopreservação dos alimentos, mas também são rentáveis e

seguros (Fox et al., 2017; Varsha & Nampoothiri, 2016). Metabólitos antimicrobianos, como ácidos orgânicos (ácidos láctico, fórmico, acético, propiônico, benzóico e fenilacético), ácidos graxos de cadeia curta, peróxido de hidrogênio, reuterina, diacetil, bacteriocinas e substâncias inibidoras semelhantes à bacteriocina, são alguns dos produtos metabólicos dessas bactérias que sugerem ter potencial efeito antimicrobiano (Ozer & Akdemir-Evrendilek, 2014).

Apesar de muitas BAL serem reconhecidas como seguras (GRAS) para a produção de alimentos, há algumas que podem apresentar caráter de patogenicidade, responsáveis por causar doenças infecciosas em seres humanos, como bacteremia e endocardites, e por espalhar genes de resistência a antibióticos (Chen, Yu & Shi, 2019; Grogga-Bada, 2018; Vahabnezhad et al., 2013). Dessa forma, testes de segurança são importantes para que novas cepas possam vir a ser utilizadas para consumo humano, especificações como origem, falta de atividades prejudiciais e ausência de resistência aos antibióticos adquiridos, são necessárias no processo de seleção, sendo os testes *in vitro* a primeira etapa na triagem (FAO, 2002).

O desenvolvimento de pesquisas envolvendo queijos produzidos artesanalmente buscam ampliar o conhecimento acerca da caracterização da microbiota e a verificação das propriedades microbiológicas e probióticas dos micro-organismos, possibilitando novas perspectivas para a melhoria da qualidade do queijo e da sua segurança alimentar, preservando a sua microbiota nativa (Mozzi, Raya & Vignolo, 2015). O objetivo do estudo foi selecionar e avaliar BAL isoladas de queijos coloniais artesanais comercializados em feiras livres de Pelotas, RS, Brasil, quanto aos aspectos de segurança *in vitro*, visando encontrar cepas viáveis para serem avaliadas posteriormente quanto aos aspectos microbiológicos e probióticos e contribuir para novos avanços na obtenção desses micro-organismos.

2. Material e métodos

2.1 Amostragem

Para o desenvolvimento do presente estudo, a matéria-prima utilizada foram queijos coloniais artesanais comercializados em cinco feiras de produção agroecológica localizadas no município de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil (Latitude: 31° 46' 34" Sul, Longitude: 52°

21' 34" Oeste). Foram coletadas duas amostras aleatórias, não padronizadas, em meses alternados em cada feira e utilizadas somente aquelas que eram produzidas com leite cru, sendo esta informação solicitada diretamente ao comerciante. Os produtos foram adquiridos a temperatura ambiente entre os meses de agosto a dezembro de 2018. Após a aquisição as amostras foram acondicionadas em embalagens de polietileno e transportadas em caixas isotérmicas para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas/Pelotas-RS, Brasil, seguindo as normas do *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (Downes & Ito, 2001). Os queijos foram mantidos a temperatura de refrigeração ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) e avaliados em até 12 horas após a aquisição.

2.2 Isolamento e caracterização morfológica

Das amostras foram transferidas assepticamente 25 gramas das porções centrais para bolsas plásticas estéreis, com 225 mL de meio composto por água peptonada tamponada 1% (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), sendo esta diluição correspondendo a 10⁻¹. A bolsa foi homogeneizada (Stomacher 400 Circulator, Seward Laboratory Systems, Inglaterra) por três minutos. Aliquotas de 1 mL de cada amostra foram transferidas para tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (p/v), correspondendo a diluição 10⁻², e foram realizadas diluições decimais seriadas até 10⁻⁹. As diluições foram semeadas pela técnica de inoculação em profundidade no meio de crescimento de Man Rogosa and Sharp (MRS) Agar (CM0361/OXOID), e incubadas em placas de Petri a 37°C/48 h. As condições de incubação foram realizadas sob anaerobiose utilizando jarras específicas (JA0401, Permution, Brasil) (Perin & Nero, 2014; Gala et al., 2008).

Após o crescimento, as colônias foram selecionadas, preferencialmente as maiores, lisas e com bordas definidas, em seguida foram recultivadas em placas de Petri com MRS ágar a 37°C/48 h e avaliadas quanto à Coloração Diferencial de Gram e prova da catalase (H₂O₂, 3% v/v). Os isolados gram-positivos, com forma cocóide ou bacilar e catalase negativos foram submetidos aos testes de segurança.

2.3 Avaliação da capacidade hemolítica

A atividade hemolítica foi executada adaptando-se a metodologia descrita por Baumgartner et al. (1998). Para isso os isolados foram estriados em MRS ágar suplementado com 5,0% (v/v) de sangue de carneiro desfibrinado (New Prov, Brasil). Os resultados foram avaliados após incubação a 37°C/48 h, em condição de anaerobiose. A reação hemolítica foi verificada por meio da formação de zonas claras ao redor da colônia, como β -hemólise. Formação de pigmento verde ao redor da cepa indicará α -hemólise, enquanto que a ausência da reação será indicativa de γ -hemólise.

2.4 Avaliação da atividade de gelatinase

A atividade da enzima gelatinase foi avaliada nas cepas selecionadas conforme metodologia sugerida por Su et al. (1991), utilizando-se o MRS ágar suplementado com 3 % de gelatina (Sigma-Aldrich). O resultado foi avaliado após incubação dos isolados a 37°C/48 h sob anaerobiose. A produção da enzima foi verificada por meio da formação de um halo ao redor da estria após adição de aproximadamente 0,3 mL da solução de Frazier (cloreto de mercúrio, 15,0 g; ácido clorídrico concentrado, 20 mL; e água destilada, 100 mL) por placa para confirmação da hidrólise da gelatina. Como controle positivo utilizou-se *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

2.5 Atividade da enzima DNase

A produção da enzima DNase foi determinada a partir da inoculação de 1 μ L dos isolados, previamente ativados em caldo MRS (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) a 37°C/24 h para o ágar teste DNase (Acumedia, EUA) com azul de toluidina a 0,1%. As placas foram incubadas a 37°C/24 h e para leitura dos resultados utilizou-se solução de ácido clorídrico na concentração de 1 N. (Labysynth, Diadema, Brasil) O aparecimento de halos rosados ao entorno dos isolados denotou resultado positivo para produção da enzima (Perin et al., 2014).

2.6 Resistência a antibióticos

Para a verificação da susceptibilidade antimicrobiana, seis antibióticos foram utilizados cloranfenicol (30 µg), oxacilina (1 µg), vancomicina (30 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg) e penicilina G (UI), segundo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Após o cultivo, os isolados foram inoculados em 4 mL de água destilada estéril para obter o padrão de McFarland 0,5 (Probac, Brasil) (10^8 UFC/mL). Em seguida, *swabs* estéreis foram utilizados para espalhar o inócuo por toda extensão de placas contendo MRS ágar (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) para, em seguida, discos de antimicrobianos serem adicionados. A susceptibilidade antimicrobiana foi realizada em duplicata e avaliada por meio da mensuração dos halos de inibição de crescimento bacteriano, após incubação, durante 37°C/ 24-48 h, conforme critérios propostos por Charteris et al., (1998).

3. Resultados e discussão

3.1 Isolamento e caracterização morfológica

No presente estudo, de 105 isolados a partir de placas com MRS ágar, 73 (69,5%) foram considerados bactérias ácido lácticas (BAL) a partir do resultado positivo para o teste de Gram, ausência de catalase e prova morfológica (Tabela 1). Destes, 49,3% (36/73) foram classificados morfológicamente como cocos e, os outros 50,3% (37/73) como bacilos. O sistema de classificação a nível de gênero divide as BAL, de acordo com a morfologia, em bastonetes (*Lactobacillus* e *Carnobacterium*) e cocos (todos os outros gêneros) (Lahtinen et al., 2011). Hermanns et al. (2013) isolaram 112 colônias características de BAL a partir de queijo Colonial artesanal produzido em Pelotas/RS, e identificaram que 54,46% eram positivas para coloração de Gram e negativas para catalase; destes, 25,89% apresentaram morfologia de bastonetes e 29,46% de cocos.

Queijos artesanais possuem características sensoriais típicas devido a diversidade das BAL. Esses aspectos que são desenvolvidos durante o processo fermentativo do leite cru, devem-se ao tipo de raça, nutrição das fêmeas, clima, temperatura, ao processo de fabricação tradicional e a microbiota nativa, a qual é responsável pela fermentação e maturação típicas da

região produtora. Os queijos Coloniais artesanais são produzidos geralmente com leite cru, com adição de cultura natural de soro de leite como coagulante, e sob condições ineficientes de higiene, o que pode tornar o produto como fonte de micro-organismos deteriorantes e patogênicos. Seu modo de fabricação tem sido transferido verbalmente ao longo das gerações, o que torna um produto com características distintas pelas diversas regiões produtoras do queijo no sul do Brasil (Carvalho et al., 2019; Carvalho, Lindner & Fariña, 2015; Das Dores & Ferreira, 2012; Menezes, 2011;).

Estudos de caracterização da microbiota láctica específica de queijos Coloniais artesanais há carências de informações na literatura. Kamimura et al. (2019) realizaram um mapeamento em larga escala da diversidade microbiana de 11 diferentes tipos de queijos artesanais produzidos em cinco regiões geográficas do Brasil, incluindo o queijo Colonial produzido de modo artesanal no sul do país. Foram destacadas diferenças nos padrões de BAL: *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Lactobacillus*, as quais variaram de acordo com o tipo de produto e a região de produção. Os queijos Coloniais apresentaram maior população para *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*.

Tabela 1.

Caracterização morfológica e bioquímica de cepas isoladas de queijos coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS (n=105).

Queijo	Cepas	Gram		Morfologia		Catalase	
		Positiva	Negativa	Cocos	Bastonetes	Positiva	Negativa
Q1	8	7	1	6	2	-	7
Q2	12	12	-	2	10	1	11
Q3	10	8	2	8	2	4	4
Q4	10	7	3	3	7	-	7
Q5	8	4	4	1	7	-	4
Q6	10	8	2	10	-	-	8
Q7	10	7	3	9	1	-	7
Q8	15	9	6	15	-	-	9
Q9	9	5	4	5	4	-	5
Q10	13	11	2	7	6	-	11
Total	105	78	27	66	39	5	73

n= número de cepas avaliadas

3.2 Perfil de expressão fenotípica de virulência

Na tabela 2, é possível visualizar o perfil de expressão fenotípica de virulência dos isolados de BAL. Os dados revelam que nenhuma das 73 cepas de BAL apresentaram atividade positiva para gelatinase pelo método de placas com ágar e DNase. Quanta a

atividade hemolítica, 9,6% (7/73) apresentaram-se como α -hemolítica, ou seja, produziram parcialmente a hemólise, enquanto 2,8% (2/73) como β -hemolítica em placas com ágar e sangue de carneiro. Estas cepas foram posteriormente descartadas, resultando em 64 estirpes aptas para avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos.

Tabela 2.

Testes de segurança e fatores fenotípicos de virulência de BAL isoladas de queijos coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS (n=73).

Queijo	Cepas	Gelatinase		DNase		Hemólise		
		Positiva	Negativa	Positiva	Negativa	β	α	Υ
Q1	7	-	7	-	7	-	-	7
Q2	11	-	11	-	11	-	2	9
Q3	4	-	4	-	4	-	-	4
Q4	7	-	7	-	7	-	1	6
Q5	4	-	4	-	5	-	1	3
Q6	8	-	8	-	8	-	1	7
Q7	7	-	7	-	7	-	2	5
Q8	9	-	9	-	9	-	-	9
Q9	5	-	5	-	5	1	-	4
Q10	11	-	11	-	11	1	-	10
Total	73	-	73	-	73	2	7	64

n= número de cepas avaliadas; β : hemólise total; α : hemólise parcial; Υ : ausência de hemólise;

As desoxirribonucleases bacterianas (DNases), são enzimas capazes de hidrolizar os ácidos nucleicos para produzir oligonucleotídeos, como fatores de virulência, elas podem estar envolvidas no crescimento bacteriano, permitindo a degradação do DNA extracelular em uma fonte acessível de carbono, nitrogênio e fosfato (Mulcahy, Charron-Mazenod & Lewenza, 2010), na formação e dispersão do biofilme (Mann et al., 2009), bem como na resistência das bactérias contra a atividade antimicrobiana mediada por neutrófilos (Berends et al., 2010). Em estudo feito por Ferrari et al. (2016), todas as 60 cepas isoladas de derivados de leite de cabra não apresentaram atividade enzimática para DNase. Pino et al. (2019) caracterizaram a população de *Lactobacillus* do queijo Piacentinu Ennese de Denominação de Origem Protegida (DOP) para avaliação do potencial probiótico. Cento e treze isolados foram caracterizados quanto ao perfil de segurança, e nenhuma das cepas apresentou resultado positivo para DNase, gelatinase e hemólise.

As metaloproteinases da matriz (MMPs), uma família de proteinases, a qual inclui as gelatinases, afetam a quebra e a rotatividade da matriz extracelular, implicado na destruição tecidual em várias condições fisiopatológicas (Thrallkill, Bunn & Fowlkes, 2008), esta proteinase de acordo com Thurlow et al. (2010) está envolvida em infecções enterocócicas.

Os resultados encontrados neste trabalho não foram semelhantes aos obtidos por Domingos-Lopes et al. (2017) que detectaram a presença fenotípica para produção de gelatinase em 47% de 114 cepas de BAL isoladas de queijo Pico artesanal, destas, cerca de 64% das cepas de *Enterococcus* apresentaram maior atividade. Também foi detectada a atividade em uma cepa de *Lactococcus* e outra de *Lactobacillus*, enquanto nenhuma de *Leuconostoc* apresentou resultado positivo. Na detecção do gene *gelE*, foi detectada sua presença em 77% dos isolados de *Enterococcus*. Em trabalho realizado por Jurkovic et al. (2006) de 308 cepas de *Enterococcus* spp. isoladas de queijo bryndza, apenas 13 apresentaram resultado fenotípico positivo para gelatinase por teste *in vitro*, porém 20 isolados continham o gene determinante de virulência *gelE*. Outros autores também afirmam que a presença do gene no gênero *Enterococcus* não está relacionada com a sua expressão (Ribeiro et al., 2014; Rivas et al., 2012; Serio et al., 2007). A literatura reporta que a regulação da atividade da gelatinase também pode ser modulada pós-transcricionalmente, pois a atividade enzimática não pode ser detectada, mesmo quando ocorre a transcrição total do operon, sugerindo diferentes mecanismo de modulação da gelatinase entre espécies de *Enterococcus* (Lopes et al., 2006).

A citolisina (*Cyl*) é uma substância hemolítica que possui atividade como bacteriocina, sendo letal para diversas bactérias gram-positivas e células eucarióticas, como na liberação do grupo heme presente na hemoglobina e mioglobina dos eritrócitos, e também um fator de virulência que reside em plasmídeos conjugativos em *Enterococcus*, sendo possível sua transferência entre as linhagens (Huseby et al., 2007; Cox, Coburn & Gilmore et al., 2005). A presença de β -hemólise é um indicador da produção de citolisina (Eaton & Gasson, 2001). A atividade hemolítica é capaz de romper a camada epitelial, facilitando a atuação da gelatinase, a qual é capaz de danificar o revestimento mucóide, interferindo no funcionamento normal desses tecidos e favorecendo o surgimento de processos infecciosos (EFSA, 2008).

3.3 Resistência a antibióticos

O resultado do perfil de susceptibilidade a antibióticos das 64 cepas de BAL isoladas de queijos Coloniais artesanais encontra-se na tabela 3. Os resultados do presente estudo, baseados na abordagem fenotípica, indicaram que todos os isolados foram sensíveis aos antibióticos cloranfenicol e tetraciclina. Para os outros antimicrobianos, apresentaram resistência a ciprofloxacina (93,5%, 58/64), oxacilina 98,4% (63/64), Penicilina G 51,6% (41/64) e vancomicina (85,9%, 54/64).

Apesar do histórico das BAL como GRAS, a resistência a antibióticos ainda é controversa e, portanto, deve ser abordada para cada estirpe (Álvarez- Cisneiros & Ponce-Alquicir, 2018). O uso de antibióticos na alimentação animal foi aprovado em 1951 pela *Food and Drug Administration* (FDA), onde na época não era necessária prescrição veterinária (Jones & Ricke, 2003). O uso de antibióticos promotores de crescimento (APC) como aditivo alimentar, visando o desempenho em animais produtores de alimentos, desencadeou uma rígida legislação por organismos reguladores internacionais, devido a constatação da promoção do aparecimento de bactérias patogênicas multirresistentes a esses antibióticos e também, a surgimento de resíduos na carne e demais subprodutos animais (Álvarez-Cisneiros & Ponce-Alquicir, 2018; Thumu & Halami, 2012).

Atualmente, não há uso indiscriminado de antibióticos na alimentação dos animais e também são proibidos o uso de antibióticos de uso humano para os mesmos. No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), aprova o uso de antibióticos com características APCs para uso restrito, com efeito sobre bactérias Gram-positivas e baixa absorção intestinal, diminuindo as chances que uma transferência horizontal de genes possa alcançar os alimentos (Álvarez- Cisneiros & Ponce-Alquicir, 2018; Gonzales, De Carvalho Mello & Café, 2012). O MAPA proíbe, desde 2003, o uso de cloranfenicol para animais de produção em virtude do potencial de toxicidade dos resíduos presentes nos produtos destinados ao consumo humano (Brasil, 2003).

Tabela 3.

Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das BAL isoladas de Queijos Coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS (n=64).

ATB		Queijo										T
		Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9	Q10	
CLO	S	7	9	4	6	3	7	5	9	4	10	64
	MS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OXA	S	-	-	-	-	-	2	-	-	1	1	4
	MS	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	2
	R	7	9	4	6	3	4	5	8	3	9	58
VAN	S	-	-	-	-	-	6	-	-	1	3	10
	MS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	7	9	4	6	3	1	5	9	3	7	54
TET	S	7	9	4	6	3	7	5	9	4	10	64
	MS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PEN	S	3	3		1		4	4	2	1	5	23
	MS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	4	6	4	5	3	3	1	7	3	5	41

	S	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
CIP	MS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	R	7	9	4	6	3	7	5	9	3	1	63

ATB = antibiótico, CLO (cloranfenicol - 30 µg), OXA (oxacilina - 1 µg), VAN (vancomicina - 30 µg), TET (tetraciclina - 30 µg), PEN (penicilina G – UI) e CIP (ciprofloxacina - 5 µg). R = resistente; MS = moderadamente sensível; S = sensível.

Em estudo por Pino et al. (2019) com a população de *Lactobacillus* do queijo Piacentinu Ennese, todos os isolados foram sensíveis aos antibióticos cloranfenicol e tetraciclina, o que para os autores pode ser um indicativo da ausência desses APC's na área geográfica onde o queijo é produzido. A sensibilidade a esses antimicrobianos também foi encontrada por outros autores (Ruiz-Moyano, et al. 2019, Sharma et al., 2016). Em estudo realizado por Domingos-Lopes et al. (2017) ao analisarem a resistência de 114 cepas de BAL isoladas de queijo Serpa artesanal frente a esses antibióticos, destacaram que as cepas que apresentaram resistência a cloranfenicol e a tetraciclina pertenciam ao gênero *Enterococci*. A resistência natural e adquirida desse gênero pode estar relacionada a presença de genes *tet* (M), abrigados por transposons conjugativos (CTns) pertencentes à família Tn916–Tn1545, responsáveis por codificar uma proteína de proteção ribossômica (RPP) capaz de conferir resistência às tetraciclina (Ciric et al., 2013; Mathur & Singh et al., 2005), ou a nível de plasmídeos como no caso a cloranfenicol (Bischoff et al., 2005; Pepper et al., 1986). A literatura reporta que *Lactobacillus* spp. são capazes de carregar genes de resistência a cloranfenicol *cat* e a tetraciclina *tet* (S), (W), (K), (L) e (O), o que pode representar um potencial risco de transferência para outras bactérias no trato gastrointestinal, visto seu amplo uso na indústria de alimentos funcionais (Campedelli et al., 2019; Gueimonde et al., 2013; Thumu & Halami, 2012)

A resistência à ciprofloxacina está associada a mutações nas regiões determinantes da resistência à quinolona (QRDR) dos genes *gyrA* ou *parC*, que levam a substituições de aminoácidos e resultam no fenótipo de resistência à quinolona (Fukao et al., 2009; Oyamada et al., 2006). A literatura reporta que *Lactobacillus* demonstram uma alta resistência natural a muitos antimicrobianos, como fluoroquinolonas, entre elas a ciprofloxacina, devido a uma capacidade de atuar como reservatórios de genes de resistência a antibióticos, como muitas bactérias patogênicas (Ammor, Flórez & Mayo et al., 2007; Mathur & Singh et al., 2005). Para Petronio (2013) a resistência a fluoroquinolonas em *Lactobacilos* pode estar associada com a presença de bombas de efluxo tipo NorA.

O antimicrobiano oxacilina, não está relacionado a conjugação plasmídica, a literatura reporta as BAL como capazes de codificar resistência intrínseca à oxacilina (Alonso et al., 2009). Para Teuber et al. (1999), geralmente as taxas de resistência à oxacilina são maiores do que para penicilina. Essa resistência aos β -lactâmicos pode ser explicada pela possível impermeabilidade da parede celular das bactérias ou pela produção e ação de β -lactamase (penicilinase), capaz de hidrolisar o agente antibiótico (Charteris et al., 1998).

Os gêneros *Lactobacilli*, *Pediococci* e *Leuconostoc* spp. são relatados por apresentarem uma propriedade única de resistência natural à vancomicina, diferentemente de outras bactérias Gram-positivas (Gad, Abdel-Hamid & Farag, 2014; Ammor, Flórez & Mayo, 2007; Swenson, Facklam & Thornsberry, 1990). Essa capacidade pode ser explicada pela composição de d-alanil-d-lactato no peptidoglicano das BAL, em vez do dipeptídeo d-alanil-d-alanina (d-Ala-d-Ala), que é o alvo da vancomicina, resultando em resistência ao antibiótico (Zhang et al., 2018).

A ausência de atividade hemolítica e de gelatinase e o não carregamento de genes de resistência a antibióticos, são critérios de seleção para potenciais candidatas de estirpes potencialmente probióticas, contribuindo na aplicabilidade de novas cepas funcionais em produtos lácteos. Outros testes de abordagem genotípica, verificação de segurança em modelos animais e em humanos, ainda são necessários para que novas cepas possam chegar à mesa do consumidor (Maragkoudakis et al., 2006; FAO/WHO, 2002).

4. Conclusão

O presente estudo destacou que os queijos coloniais são fontes prósperas de BAL potencialmente seguras. De 105 isolados, 73 foram caracterizados como gram positivos e catalase negativos e avaliados quanto a aspectos fenotípicos de virulência. Todas as estirpes foram gelatinase e DNase negativas, quanto a atividade hemolítica, houve detecção de sete cepas como α e duas como β -hemolítica, resultado em 64 cepas de BAL para avaliação de susceptibilidade a antimicrobianos. Esses isolados apresentaram sensibilidade aos antibióticos cloranfenicol e tetraciclina. Para os outros antimicrobianos, apresentaram resistência a ciprofloxacina (93,5%, 58/64), oxacilina 98,4% (63/64), Penicilina G 51,6% (41/64) e vancomicina (85,9%, 54/64). Baseado nesses resultados as cepas serão verificadas quanto a

atividade antimicrobiana e probiótica, visando na contribuição de novas cepas com características funcionais na indústria de produtos lácteos.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Referências

- Álvarez-Cisneros, Y. M., & Ponce-Alquicira, E. (2018). Antibiotic Resistance in Lactic Acid Bacteria. In *Antimicrobial Resistance-A Global Threat*. IntechOpen.
- Ammor, M. S., Flórez, A. B., & Mayo, B. (2007). Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food microbiology*, 24(6), 559-570.
- Baumgartner, A., Kueffer, M., Simmen, A., & Grand, M. (1998). Relatedness of *Lactobacillus rhamnosus* Strains Isolated from Clinical Specimens and Such from Food-stuffs, Humans and Technology. *LWT-Food Science and Technology*, 31(5), 489-494.
- Berends, E. T., Horswill, A. R., Haste, N. M., Monestier, M., Nizet, V., & von Köckritz-Blickwede, M. (2010). Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *Journal of innate immunity*, 2(6), 576-586.
- Bischoff, K. M., White, D. G., Hume, M. E., Poole, T. L., & Nisbet, D. J. (2005). The chloramphenicol resistance gene *cmlA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, 243(1), 285-291.
- Brasil. (2003). Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. *Publicado no Diário Oficial da União de 24/12/2003*.
- Campedelli, I., Mathur, H., Salvetti, E., Clarke, S., Rea, M. C., Torriani, S., ...& O'Toole, P. W. (2019). Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 85(1), e01738-18.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., & Collins, J. K. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of applied microbiology*, 84(5), 759-768.
- Chen W., Yu L., Shi Y. (2019). Safety Evaluation of Lactic Acid Bacteria. In: Chen W. (eds) *Lactic Acid Bacteria*. Springer, Singapore.
- Ciric, L., Jasni, A., de Vries, E. L., Agero, Y., Mullany, P., & Roberts, A. P. (2013). The Tn916/Tn1545 Family of Conjugative Transposon. *Landes Bioscience*.
- CLSI. (2012). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty two informational supplement*. Clinical and Laboratory Standards Institute. *CLSI document M100-S22*. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

- Cox, C. R., Coburn, P. S., & Gilmore, M. S. (2005). Enterococcal cytolysin: a novel two component peptide system that serves as a bacterial defense against eukaryotic and prokaryotic cells. *Current Protein and Peptide Science*, 6(1), 77-84.
- das Dores, M. T., & Ferreira, C. L. D. L. F. (2012). Queijo minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, 2(2).
- de Medeiros Carvalho, M., de Fariña, L. O., Strongin, D., Ferreira, C. L. L., & Lindner, J. D. D. (2019). Traditional Colonial-type cheese from the south of Brazil: A case to support the new Brazilian laws for artisanal cheese production from raw milk. *Journal of dairy science*.
- de Medeiros Carvalho, M., Lindner, J. D. D., & Fariña, L. O. (2015). A produção de queijos colonial artesanal no município de Seara, Estado de Santa Catarina, frente à legislação brasileira. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 70(5), 253-261.
- Domingos-Lopes, M. F. P., Stanton, C., Ross, P. R., Dapkevicius, M. L. E., & Silva, C. C. G. (2017). Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food microbiology*, 63, 178-190.
- Dotto, D. M. R., Gonçalves, T. P., & Iop, S. C. F. (2015). Queijo: percepções atuais de um hábito alimentar milenar. *Agroalimentaria*, 21(40), 175-186.
- Downes, F. P., & Ito, K. (2001). Compendium of methods for the microbiological. *Examinations of foods*, 4.
- Eaton, T. J., & Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(4), 1628-1635.
- EFSA. (2008). Technical guidance-Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. European Food Safety Authority. *EFSA Journal*, 6(7), 732.
- FAO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food-Joint food and agricultural organization of the United Nations and World health organization working group meeting report. London, Ontario, Canada.
- Ferrari, S. I., Ramos, C. L., Schwan, R. F., & Dias, F. S. (2016). Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of Salmonella typhi in artisanal cheese. *Food microbiology*, 60, 29-38.
- Flórez, A. B., Delgado, S., & Mayo, B. (2005). Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Canadian journal of microbiology*, 51(1), 51-58.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. (2017). *Fundamentals of cheese science* (pp. 185-229). Boston, MA, USA: Springer.
- Fukao, M., Tomita, H., Yakabe, T., Nomura, T., Ike, Y., & Yajima, N. (2009). Assessment of antibiotic resistance in probiotic strain Lactobacillus brevis KB290. *Journal of food protection*, 72(9), 1923-1929.
- Gad, G. F. M., Abdel-Hamid, A. M., & Farag, Z. S. H. (2014). Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 25-33.
- Gala, E., Landi, S., Solieri, L., Nocetti, M., Pulvirenti, A., & Giudici, P. (2008). Diversity of lactic acid bacteria population in ripened Parmigiano Reggiano cheese. *International journal of food microbiology*, 125(3), 347-351.
- Gonzales, E., de Carvalho Mello, H. H., & Café, M. B. (2012). Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação e produção animal. *Revista UFG*, 13(13).

- Groga-Bada, P., Mueller, I. I., Foschi, F., Gawaz, M., & Eick, C. (2018). Mitral valve endocarditis due to *Lactobacillus*. *Case reports in medicine*, 2018.
- Gueimonde, M., Sánchez, B., de los Reyes-Gavilán, C. G., & Margolles, A. (2013). Antibiotic resistance in probiotic bacteria. *Frontiers in microbiology*, 4, 202.
- Haakensen, M., Vickers, D. M., & Ziola, B. (2009). Susceptibility of *Pediococcus* isolates to antimicrobial compounds in relation to hop-resistance and beer-spoilage. *BMC microbiology*, 9(1), 190.
- Hermanns, G., Funck, G. D., Schmidt, J. D., Richards, N. S. P. S. (2013). Isolamento e identificação de bactérias lácticas supostamente bacteriocinogênicas em leite e queijo. *Revista Acadêmica Ciência Animal*, 11(2), 191-196, abr. 2013.
- Huseby, M., Shi, K., Brown, C. K., Digre, J., Mengistu, F., Seo, K. S., ... & Earhart, C. A. (2007). Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 189(23), 8719-8726.
- Jones, F. T., & Ricke, S. C. (2003). Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. *Poultry science*, 82(4), 613-617.
- Jurkovič, D., Križková, L., Dušinský, R., Belicová, A., Sojka, M., Krajčovič, J., & Ebringer, L. (2006). Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese. *Letters in applied microbiology*, 42(6), 553-559.
- Kamimura, B. A., De Filippis, F., Sant'Ana, A. S., & Ercolini, D. (2019). Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. *Food microbiology*, 80, 40-49.
- Kateete, D. P., Kimani, C. N., Katabazi, F. A., Okeng, A., Okee, M. S., Nanteza, A., ... & Najjuka, F. C. (2010). Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 9(1), 23.
- Klein, G., Hallmann, C., Casas, I. A., Abad, J., Louwers, J., & Reuter, G. (2000). Exclusion of vanA, vanB and vanC type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. *Journal of Applied Microbiology*, 89(5), 815-824.
- Lahtinen, S.; Ouwehand, A. C.; Salminen, S., & Von Wright, A. (2004). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (4 ed.). Boca Raton, USA: CRC Press.
- Lopes, M. D. F. S., Simões, A. P., Tenreiro, R., Marques, J. J. F., & Crespo, M. T. B. (2006). Activity and expression of a virulence factor, gelatinase, in dairy enterococci. *International journal of food microbiology*, 112(3), 208-214.
- Mann, E. E., Rice, K. C., Boles, B. R., Endres, J. L., Ranjit, D., Chandramohan, L., ... & Bayles, K. W. (2009). Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PloS one*, 4(6), e5822.
- MAPA. (2003). Instrução Normativa 9/2003 de 30 de junho de 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- Maragkoudakis, P. A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal*, 16(3), 189-199.
- Marroki, A., & Bousmaha-Marroki, L. (2014). *Lactobacilli* isolated from Algerian goat's milk as adjunct culture in dairy products. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(3), 410-420.

- Mathur, S., & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International journal of food microbiology*, 105(3), 281-295.
- Menezes, S. D. S. M. (2011). Queijo artesanal: identidade, prática cultural e estratégia de reprodução social em países da América Latina. *Revista Geográfica de América Central*, 2, 1-16.
- Montet, D., & Ray, R. C. (Eds.). (2016). *Fermented Foods, Part I: Biochemistry and Biotechnology*. Boca Raton, USA: CRC Press.
- Mozzi, F., Raya, R. R., Vignolo, G. M., & Love, J. C. (2016). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria—Novel Applications (2e)*. Hoboken, USA: Wiley-Blackwell
- Mozzi, F., Raya, R. R., Vignolo, G. M., & Love, J. C. (2016). *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria—Novel Applications 2e*.
- Mulcahy, H., Charron-Mazenod, L., & Lewenza, S. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* produces an extracellular deoxyribonuclease that is required for utilization of DNA as a nutrient source. *Environmental microbiology*, 12(6), 1621-1629.
- Oyamada, Y., Ito, H., Inoue, M., & Yamagishi, J. I. (2006). Topoisomerase mutations and efflux are associated with fluoroquinolone resistance in *Enterococcus faecalis*. *Journal of medical microbiology*, 55(10), 1395-1401.
- Ozer, B., & Akdemir-Evrendilek, G. (Eds.). (2014). *Dairy microbiology and biochemistry: recent developments*. Boca Raton, USA: CRC Press.
- Pepper, K., Le Bouguéneq, C., de Cespédès, G., & Horaud, T. (1986). Dispersal of a plasmid-borne chloramphenicol resistance gene in streptococcal and enterococcal plasmids. *Plasmid*, 16(3), 195-203.
- Perin, L. M., Miranda, R. O., Todorov, S. D., de Melo Franco, B. D. G., & Nero, L. A. (2014). Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk. *International journal of food microbiology*, 185, 121-126.
- Petronio Petronio G. (2013). Study of fluoroquinolone resistance in *Lactobacillus spp.* Ph.D. thesis, University of Catania. Catania, Italy. Retrieved insert the date from <http://archivia.unict.it/bitstream/10761/1332/1/PTRGLI83L28C351F-Tesi%20dottorato%20Giulio%20Petronio%20%20Petronio.pdf>
- Pino, A., Russo, N., Van Hoorde, K., De Angelis, M., Sferrazzo, G., Randazzo, C. L., & Caggia, C. (2019). Piacentinu Ennese PDO Cheese as Reservoir of Promising Probiotic Bacteria. *Microorganisms*, 7(8), 254.
- Ribeiro, S. C., Coelho, M. C., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. M., Dapkevicius, M. L. E., & Silva, C. C. G. (2014). Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from P ico cheese an artisanal cow's milk cheese. *Journal of applied microbiology*, 116(3), 573-585.
- Rivas, F. P., Castro, M. P., Vallejo, M., Marguet, E., & Campos, C. A. (2012). Antibacterial potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from ewes' milk and cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 46(2), 428-436.
- Rodriguez-Alonso, P., Fernandez-Otero, C., Centeno, J. A., & Garabal, J. I. (2009). Antibiotic resistance in lactic acid bacteria and Micrococcaceae/Staphylococcaceae isolates from artisanal raw milk cheeses, and potential implications on cheese making. *Journal of food science*, 74(6), M284-M293.
- Ruiz-Moyano, S., dos Santos, M. T. P. G., Galván, A. I., Merchán, A. V., González, E., de Guía Córdoba, M., & Benito, M. J. (2019). Screening of autochthonous lactic acid bacteria strains from artisanal soft cheese: probiotic characteristics and prebiotic metabolism. *LWT*, 114, 108388.

- Serio, A., Paparella, A., Chaves-Lopez, C., Corsetti, A., & Suzzi, G. (2007). Enterococcus populations in Pecorino Abruzzese cheese: biodiversity and safety aspects. *Journal of food protection*, 70(7), 1561-1568.
- Sharma, P., Tomar, S. K., Sangwan, V., Goswami, P., & Singh, R. (2016). Antibiotic resistance of *Lactobacillus* sp. isolated from commercial probiotic preparations. *Journal of Food Safety*, 36(1), 38-51.
- Singh, K. V., Coque, T. M., Weinstock, G. M., & Murray, B. E. (1998). In vivo testing of an *Enterococcus faecalis* efaA mutant and use of efaA homologs for species identification. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 21(4), 323-331.
- Su, Y. A., Sulavik, M. C., He, P. I. N. G., Makinen, K. K., Makinen, P. L., Fiedler, S., ... & Clewell, D. B. (1991). Nucleotide sequence of the gelatinase gene (gelE) from *Enterococcus faecalis* subsp. liquefaciens. *Infection and immunity*, 59(1), 415-420.
- Swenson, J. M., Facklam, R. R., & Thornsberry, C. (1990). Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 34(4), 543-549.
- Teuber, M., Meile, L., & Schwarz, F. (1999). Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. In *Lactic acid bacteria: Genetics, metabolism and applications* (pp. 115-137). Springer, Dordrecht.
- Thraillkill, K. M.; Bunn, R. C; Fowlkes, J. L (2009). Matrix metalloproteinases: their potential role in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Endocrine*, 35(1), 1-10.
- Thumu, S. C. R., & Halami, P. M. (2012). Presence of erythromycin and tetracycline resistance genes in lactic acid bacteria from fermented foods of Indian origin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 102(4), 541-551.
- Thurlow, L. R., Thomas, V. C., Narayanan, S., Olson, S., Fleming, S. D., & Hancock, L. E. (2010). Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. *Infection and immunity*, 78(11), 4936-4943.
- Vahabnezhad, E., Mochon, A. B., Wozniak, L. J., & Ziring, D. A. (2013). *Lactobacillus* bacteremia associated with probiotic use in a pediatric patient with ulcerative colitis. *Journal of clinical gastroenterology*, 47(5), 437-439.
- Varsha, K. K., & Nampoothiri, K. M (2016). Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures. *Food Control*, 69, 61-64.
- Zhang, S., Oh, J. H., Alexander, L. M., Özçam, M., & Van Pijkeren, J. P. (2018). d-Alanyl-d-alanine ligase as a broad-host-range counterselection marker in vancomycin-resistant lactic acid bacteria. *Journal of bacteriology*, 200(13), e00607-17.

6. ARTIGO 2

INTERNACIONAL DAIRY JOURNAL

Avaliação do potencial bacteriocinogênico *in vitro* de bactérias ácido lácticas isoladas de Queijos Coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS

Carlos Henrique Gomes de Sousa Lima^{a*}, Nádia Carbonera^b, Elizabete Helbig^a

^aFaculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, R. Gomes Carneiro n. 1, Centro, Pelotas, Brasil

^bCentro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, Brasil

**Autor correspondente: +55 (53) 9841-49442*

Endereço eletrônico: carloshgsl@hotmail.com

RESUMO

O presente estudo objetivou selecionar bactérias ácido lácticas com potencial bacteriocinogênico a partir da microbiota nativa de queijos coloniais artesanais comercializados em feiras livres de Pelotas, RS, no intuito de contribuir para o processo de maturação destes. Assim, a atividade antagonista de 63 cepas foi verificada pelo método “*spot on the lawn*” frente a *Staphylococcus aureus* 25923, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis*, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus brevis* ATCC 367, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 e *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338. A produção de bacteriocina de 59 isolados foi verificada pela técnica da difusão em poços. Quatro BAL (Q1BAL10, Q2BAL2, Q4BAL1 e Q4BAL5) foram capazes de produzir bacteriocinas frente a *L. monocytogenes*, proteinases extracelulares e destas Q2BAL2 e Q4BAL1 foram capazes de diminuir o pH do leite de 6,5 para 5,3 em até 6h. Contudo as cepas Q2BAL2 e Q4BAL1 foram identificadas com potencial de culturas *starters* anti-*Listeria* para utilização na biopreservação de produtos lácteos.

1. Introdução

Bactérias ácido lácteas (BAL) são geralmente reconhecidas como seguras (*GRAS status*) e possuem um papel importante nos processos fermentativos e de preservação de alimentos, seja como microbiota nativa e culturas iniciadoras (*starter*) ou adjuntas adicionados sob condições adequadas. BAL podem ser definidas como um grupo de cocos e bastonetes gram-positivos, catalase negativa, não esporuladas, aeróbias, microaerófilas ou anaeróbios facultativas e produzem ácido láctico como o principal produto final durante a fermentação de carboidratos. Entre os principais estão *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weisella*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Vagococcus* (Lahtinen, 2011).

O uso de micro-organismos na conservação de alimentos tem ganhado importância nos últimos anos devido à demanda pelo uso reduzido de conservantes químicos pelos consumidores e pelo aumento crescente de espécies bacterianas resistentes a antibióticos e a conservantes. As BAL são capazes de produzir vários compostos antimicrobianos que são considerados importantes na biopreservação dos alimentos, sendo também rentáveis e seguros (Fox et al., 2017; Varsha & Nampoothiri, 2016). Metabólitos antimicrobianos, como ácidos orgânicos (ácidos láctico, fórmico, acético, propiônico, benzóico e fenilacético), ácidos graxos de cadeia curta, peróxido de hidrogênio, reuterina, diacetil, bacteriocinas e substâncias inibidoras semelhantes à bacteriocina, são alguns dos produtos metabólicos dessas bactérias que sugerem ter potencial efeito antimicrobiano, sendo destaque estudos relacionados a bacteriocinas pela sua aplicabilidade na bioconservação de alimentos (Ozer & Akdemir-Evrendilek, 2014).

Bacteriocinas são peptídeos sintetizados pelos ribossomos que possuem atividade antibacteriana (Cleveland et al., 2001). Apesar da maioria das bactérias Gram-positivas produzirem bacteriocinas, são as BAL as mais estudadas, devido ao fato de que a maioria das BAL produtoras de bacteriocinas são isoladas de produtos de origem alimentar e possuem status *GRAS*, o que contribui para a segurança destas (Mozzi et al., 2015). As bacteriocinas de BAL são inerentemente tolerantes ao estresse térmico elevado e são conhecidas por sua atividade em uma ampla faixa de pH. Estes peptídeos antimicrobianos também são incolores, inodoros e insípidos, o que aumenta ainda mais sua potencialidade, além de atuarem como conservantes naturais, conferindo proteção natural contra a contaminação por micro-organismos patogênicos (Synder & Worobo et al., 2013).

Os alimentos lácteos fermentados são fontes de BAL, entre eles estão os queijos artesanais, principalmente aqueles elaborados a partir de leite cru. No extremo sul do Brasil destaca-se o queijo colonial artesanal, o qual é produzido em propriedades rurais, geralmente de produção familiar, através de um processo artesanal de produção, e comercializados em feiras de produção agroecológica (Dotto et al., 2015). Estes queijos são tradicionalmente elaborados a partir de leite cru, utilizando uma cultura natural de soro de leite como coagulante podendo ser consumido fresco ou em diversos graus de maturação. As questões que envolvem a sua segurança, qualidade e procedência, a fim de proteger tanto os produtores como os consumidores, costuma ser um fator crítico, além de apresentarem problemas de padronização, como formato, tamanho, umidade e teor de sal (das Dores & Ferreira, 2012; Menezes, 2011).

Em estudos com produtores de queijos coloniais artesanais, foi demonstrada a dificuldade na realização de pesquisas suficientes voltadas para certificar a qualidade e segurança em todas as etapas da cadeia produtiva dos queijos fabricados a partir de leite cru e também do período de maturação adequado para a comercialização, visando sua preservação (Carvalho et al., 2019; Carvalho et al.; 2015). Fator esse, desencadeado pela falta de pasteurização, tratamento térmico que se aplica ao leite no intuito de eliminar as bactérias patogênicas. Esse processo também reduz de forma significativa a microbiota láctica natural do leite, responsável pelas características pertinentes a cada queijo típico.

Como alternativa para compensar a destruição da flora bacteriana característica do leite, há a necessidade de utilização de fermentos lácteos industrializados, tendo seus atributos alterados e padronizadas, ou estudos técnicos que comprovem a segurança microbiológica a partir do grau de maturação (Montet & Ray, 2016; Ozer & Akdemir-Evrendilek, 2014). Para a seleção de novas cepas de BAL para a indústria queijeira é crucial que elas promovam a acidez necessária para o desenvolvimento da coagulação do leite, e dessa forma serem capaz de apresentar uma característica desfavorável para a multiplicação de cepas patogênicas. Outra propriedade importante, das BAL na matriz láctea, é a capacidade de produzir proteases extracelulares, contribuindo no processo de maturação (EL-GAISH et al., 2010; SETTANNI & MOSCHETTI, 2010). Portanto, o objetivo do estudo foi selecionar BAL com potencial bacteriocinogênico a partir da microbiota nativa de queijos coloniais artesanais comercializados em feiras livres de Pelotas, RS, no intuito de contribuir com novas cepas iniciadoras ou *starters* ou adjuntas.

2. Material e métodos

2.1. Amostragem

As 63 BAL foram isoladas inicialmente a partir de queijos coloniais artesanais comercializados em feiras livres de Pelotas, RS, e mantidas como culturas estoques no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil. As culturas foram avaliadas por meio de testes fenotípicos quanto a aspectos de segurança conforme Lima, Helbig & Carbonera (2019). As BAL de referências (*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus brevis* ATCC 367, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 e *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338) foram adquiridas e doadas pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia, UFPel. As cepas indicadoras (*Staphylococcus aureus* 25923, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis*) são culturas estoque do Laboratório de Ciência dos Alimentos e Biologia Molecular, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, UFPel. Os isolados estavam estocados em ultrafreezer (Coldlab, Piracicaba, Brasil) a -80°C em MRS (Man Rogosa Shape) caldo (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) para as BAL e BHI (Brain Heart Infusion) caldo (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) para as patogênicas, suplementado com glicerol (50/50) e para a realização das análises foram realizados dois recultivos em caldo MRS ou BHI a 37°C/24h.

2.2 Teste de antagonismo pelo método “spot on the lawn”

Para a detecção da atividade antagonista, foi utilizado o procedimento descrito por Lewus, Kaiser & Montville (1991). Placas contendo MRS ágar foram semeadas com 2 µL de caldo MRS contendo a reativação das cepas de BAL reativadas. As placas foram incubadas em aerobiose (AnaeroGen 2,5 L) a 30°C por 24 h. Após o recultivo dos micro-organismos indicadores, 100 µL de cada cultura foram adicionados a um erlenmeyer contendo 50 mL de ágar BHI fundido (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), suplementado com 0,8% de ágar bacteriológico (Labysynth, Diadema, Brasil) e a um segundo erlenmeyer contendo Agar MRS (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) a fim de obter uma concentração de 5 a 6 Log₁₀ UFC.mL⁻¹ de cada cultivo. Após as placas inoculadas com as cepas patogênicas foram incubadas em aerobiose a 37°C durante 18-24 h. As placas inoculadas com as BAL foram incubadas em

aerobiose a 37°C durante o mesmo período. A inibição foi realizada em duplicata e verificada pela formação de um halo característico translúcido ao redor das colônias relacionadas com cada micro-organismo indicador testado.

2.3 Detecção da produção de bacteriocinas pela técnica da difusão em poços

A bacteriocina produzida pelas BAL foi detectada pela aplicação da técnica difusão em poços. As cepas foram cultivadas em 100 mL de caldo MRS a 37°C/24h. O caldo foi centrifugado a 10.844 x g por 15 min a 4°C (Quimis, Diadema, Brasil) e o sobrenadante foi esterilizado por filtração em membrana com porosidade correspondente a 0,22 µm (GVWP Durapore, Millipore, [Massachusetts, EUA](#)). O pH do sobrenadante foi ajustado em 6,5 utilizando solução de NaOH 1N (Labsynth, Diadema, Brasil) para eliminar a possibilidade de inibição causada pela presença do ácido lático. Após o recultivo de *L. monocytogenes* e *S. aureus*, 100 µL foram adicionados a um erlenmeyer contendo BHI fundido (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra), adicionado de 0,8% de ágar bacteriológico (Labsynth, Diadema, Brasil), a fim de obter uma concentração de 5 a 6 Log₁₀ UFC.mL⁻¹ destes micro-organismos. Após incubação, 20 mL de cada cultivo, correspondente a cada micro-organismo patogênico, foram transferidos para placas de Petri e, então, no meio solidificado, foram realizados poços com 5 mm de diâmetro. Nestes poços foram adicionados 40 µL dos sobrenadantes neutralizados correspondentes aos cultivos de *L. monocytogenes* e *S. aureus*. As placas foram mantidas a 20°C por 4 h para permitir a difusão do inóculo no ágar. As placas inoculadas foram incubadas em aerobiose a 37°C durante 18-24h. O antagonismo foi detectado pela formação da zona de inibição caracterizada por um halo característico. A ausência de crescimento da cepa indicadora ao redor da cultura de BAL indicou sua inibição frente à presença da bacteriocina produzida por este micro-organismo testado (Lewus, Kaiser & Montville, 1991).

2.4 Propriedades tecnológicas

2.4.1 Capacidade de acidificação

Para avaliação da capacidade acidificante e alteração do pH, foi utilizado o método descrito por Franciosi et al. (2009) e modificado, pela alteração nos tempos de avaliação do

pH e teor de ácido láctico (6 e 12h). As bactérias foram cultivadas por 18h em caldo MRS, centrifugadas a 10.192 g por 10 min, lavadas com água peptonada estéril e inoculadas 1% (v/v) em 9 mL de leite desnatado UHT, incubadas a 37°C. A taxa de acidificação foi medida em pHmêtro (PH140, Simpla) por imersão do eletrodo previamente calibrado e calculada de acordo com Ayad et al. (2004). A produção de acidez foi determinada por titulação com NaOH 0,1 N, seguindo o método 920.124 (Horwitz, 2005), sendo o resultado expresso em porcentagem de ácido láctico.

Para uma cultura láctica ser considerada rápida produtora de ácido, ela deve reduzir o pH do leite de 6,5 para 5,3 em até 6h de incubação à temperatura adequada (Cogan et al. 1997). De acordo com a velocidade de acidificação, as estirpes capazes de reduzir o pH do leite em 1,2U foram classificadas como de rápida acidificação e selecionadas como BAL iniciadoras ou *starters*, enquanto que a de lenta acidificação, foram selecionadas como culturas secundárias ou adjuntas (Settanni & Moschetti, 2010).

2.4.2 Atividade proteolítica

Para a determinação da atividade proteolítica extracelular qualitativa, as bactérias foram semeadas em meio sólido composto por 1% (v/v) de leite desnatado em pó e 1,5% de ágar bacteriológico a 37°C, como descrito por Jones et al. (2007), sendo observada em intervalos de 24h durante três dias. A atividade proteolítica foi indicada como uma zona clara ao redor das colônias.

3. Resultados e discussão

3.1 Antagonismo pelo método “spot on the lawn”

O resultado da atividade antagonista das 63 BAL pelo método *spot on the lawn* encontra-se na Tabela 1. Foram descartadas quatro BAL (Q2BAL5, Q3BAL8, Q8BAL76, Q9BAL3) por não apresentarem antagonismo frente as bactérias patogênicas. As outras 59 cepas apresentaram atividade inibidora em relação a pelo menos duas das cepas patogênicas *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. typhimurium* e *S. enteritidis*. Foram utilizadas quatro cepas de BAL como referência *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Lactobacillus brevis* ATCC 367 e *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338. Cerca de 22%

dos isolados de BAL (13/59) apresentaram antagonismo frente ao menos uma BAL de referência, sendo *L. acidophilus* e *L. brevis* as que apresentaram maior inibição de 92,3% (12/13) e 77% (10/13).

As BAL tornaram-se muito importantes na indústria de alimentos e na saúde pública devido ao seu *status* como GRAS (Geralmente reconhecidas como seguras), o que possibilita sua utilização para o consumo humano, e seu potencial antagônico contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes, configurando seu uso como biopreservação de alimentos (Hammami, Ismail & Corsetti, 2019). Além da produção de ácidos orgânicos (lático, acético, fórmico e propiônico), que causam uma queda no pH suficiente para inibir certas cepas, também funcionam como permeabilizantes da membrana externa bacteriana Gram-negativa e podem atuar como um potencializador dos efeitos de outras substâncias antimicrobianas em produtos fermentados por BAL iniciadoras. Ou seja, capazes de favorecer que numerosos metabólitos lipofílicos ou grandes possam penetrar eficazmente na intacta membrana externa Gram-negativa bacteriana, mas possivelmente na presença de ácido lático, resultando em um efeito bacteriostático ou bactericida (Alakomi et al., 2000). Também, sua atividade é fortalecida pelos efeitos inibitórios de seus outros metabólitos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, ácidos graxos, compostos antifúngicos, bacteriocinas e substâncias inibidoras semelhantes à bacteriocina (BLIS) (Favaro, Penna & Todorov, 2015). A pesquisa por BAL com atividade antagonista é essencial para aplicação destas como culturas *starters*, para produção de alimentos com qualidade e características que identifiquem a região onde foi produzido (De Pasquale et al. 2019).

Tabela 1.

Atividade antagonista* pelo método “*spot on the lawn*” das BAL isoladas de queijos coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS, frente aos micro-organismos indicadores (n=63).

Cepas	Micro-organismos indicadores								
	SA	L. M	E.C.	S. T	S. E.	L. A.	L. P.	L. B.	L. F.
Q1BAL2	21,5	25,0	21,0	39,5	18,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q1BAL3	26,0	41,0	32,5	37,5	30,5	13,5	16,0	10,0	17,0
Q1BAL4	33,5	41,0	39,5	39,5	31,0	16,0	12,5	15,0	10,0
Q1BAL5	28,0	30,5	27,5	30,5	26,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q1BAL9	28,5	34,5	24,5	32,0	22,5	17,5	17,0	18,5	14,5
Q1BAL10	25,5	27,0	26,0	37,0	24,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q1BAL11	20,0	24,5	18,5	36,0	17,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q2BAL2	33,0	40,0	31,5	35,5	26,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Q2BAL3	30,0	38,5	27,0	31,0	25,5	0,0	0,0	19,0	0,0
Q2BAL5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	-	-
Q2BAL6	26,0	14,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Q2BAL7	31,0	33,0	27,5	33,0	25,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Q2BAL9	23,0	27,5	11,5	22,5	11,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q2BAL10	15,0	26,0	0,0	26,0	13,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Q2BAL11	33,0	37,5	32,5	37,5	29,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Q2BAL12	23,5	25,5	17,0	25,5	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q3BAL2	33,5	40,0	35,0	28,5	38,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q3BAL3	27,0	45,0	27,0	13,0	22,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q3BAL8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	-	-
Q3BAL9	27,5	39,0	32,0	37,0	39,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q4BAL1	27,5	55,0	28,0	35,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q4BAL2	21,0	50,0	42,5	50,0	26,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q4BAL3	31,0	50,0	30,0	40,0	20,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Q4BAL5	25,0	42,0	26,5	23,5	26,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Q4BAL6	27,5	26,5	31,5	50,0	32,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Q5BAL35	23,5	41,0	18,5	28,5	22,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Q5BAL36	20,0	55,0	30,0	11,0	15,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q5BAL38	23,5	43,5	30,5	26,0	31,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q6BAL47	21,0	24,5	25,0	23,5	28,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Q6BAL50	24,0	21,5	25,5	21,0	22,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q6BAL51	23,0	23,5	21,5	23,0	22,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q6BAL52	20,0	15,5	29,0	30,0	26,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q6BAL56	18,5	51,0	17,5	31,0	18,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Q6BAL57	26,0	28,5	24,5	37,5	35,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q6BAL58	26,0	39,0	24,0	33,0	25,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q7BAL61	23,0	29,0	28,0	18,0	23,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Q7BAL63	24,0	30,0	23,5	32,5	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q7BAL67	27,5	25,0	20,0	27,5	24,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Q7BAL69	12,5	19,0	19,0	27,5	17,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q7BAL70	34,5	32,0	28,5	35,0	22,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q8BAL75	39,5	33,5	33,5	38,0	29,5	19,0	19,0	22,5	18,0
Q8BAL76	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	-	-
Q8BAL77	21,0	28,5	20,0	27,5	26,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q8BAL79	32,5	38,0	27,0	37,5	31,0	22,0	22,0	16,5	20,0
Q8BAL82	26,0	11,0	22,5	25,0	24,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Q8BAL84	20,5	42,0	19,0	30,0	19,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q8BAL85	20,5	20,0	27,5	14,5	22,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Q8BAL86	17,0	28,0	14,5	22,0	16,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q8BAL87	19,5	13,0	22,5	22,0	27,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Q9BAL1	46,5	15,0	32,5	36,0	30,0	19,0	20,0	0,0	0,0
Q9BAL2	40,0	24,0	27,5	25,0	22,0	13,5	14,5	23,0	16,5
Q9BAL3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	-	-
Q9BAL9	30,5	22,5	0,0	36,0	33,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q10BAL1	23,5	19,0	23,5	27,5	28,5	19,0	14,5	13,5	18,0
Q10BAL3	26,0	37,5	18,5	41,0	25,0	14,0	0,0	0,0	0,0
Q10BAL5	27,0	22,5	30,0	39,5	35,0	15,5	10,0	20,0	17,5
Q10BAL7	12,0	10,0	13,5	30,5	18,5	14,5	0,0	19,0	12,5
Q10BAL8	28,5	22,5	24,0	32,0	31,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q10BAL9	25,5	19,0	20,0	26,5	27,5	0,0	0,0	0,0	0,0
Q10BAL13	24,5	23,0	17,0	41,0	18,5	11,5	0,0	0,0	0,0
Q10BAL14	31,5	10,0	11,5	16,0	13,5	0,0	0,0	0,0	0,0

Q10BAL15	27,0	27,0	13,5	26,0	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Q10BAL18	16,0	32,5	16,0	27,5	16,5	0,0	0,0	0,0	0,0

*(médias dos diâmetros de halos de inibição em milímetros obtidos em duplicata); S.A., *Staphylococcus aureus* 25923; L.M., *Listeria monocytogenes*; E.C., *Escherichia coli*; S.T., *Salmonella typhimurium*; S.E., *Salmonella enteritidis*; L.A., *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356; L.P., *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014; L.B., *Lactobacillus brevis* ATCC 367; L.F., *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338.

Wang e colaboradores (2014) analisaram o mecanismo de ação do ácido láctico frente aos patógenos *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* por meio das técnicas de mensuração do tamanho, SDS-PAGE e Microscopia eletrônica de transmissão. De acordo com os resultados, o teor de 0,5% de ácido láctico foi determinante para inibir o crescimento das cepas. As células bacterianas tratadas com o ácido perderam a integridade da estrutura da camada da membrana celular, por meio da formação de poros locais, com isso favorecendo o vazamento de proteínas intracelulares e assim, perdendo totalmente sua viabilidade. Após o tratamento com o ácido, todas as cepas tiveram o tamanho da membrana reduzido, especialmente para *Salmonella*.

Para a seleção de BAL, isoladas com a finalidade de compor culturas que poderiam melhorar a qualidade sanitária do queijo colonial artesanal, o ideal seria que elas não interferissem na atividade de outras BAL desejáveis. Embora tenha ocorrido antagonismo entre algumas BAL testadas, e, portanto, interferência na sua atividade, poderiam ser utilizadas com a finalidade de melhorar a qualidade sanitária do produto, conforme (Gaspar & Crespo, 2016) De acordo com dados da literatura, culturas selvagens isoladas de ecossistemas complexos de alimentos tradicionalmente fermentados exibem uma diversidade de atividades metabólicas que divergem fortemente de cepas comparáveis usadas como *starters* industriais. Isso inclui diferenças na taxa de crescimento e comportamento estratégico competitivo de crescimento em culturas mistas, adaptação a um substrato ou matéria-prima em particular, propriedades antimicrobianas e atributos de sabor, aroma e qualidade. As cepas selvagens precisam suportar a competição de outros microrganismos para sobreviver em seu ambiente natural hostil, de modo que frequentemente produzam antimicrobianos (Leroy & De Vuyst, 2004).

3.2 Detecção da produção de bacteriocinas pela técnica da difusão em poços

A avaliação da produção de bacteriocinas pela técnica da difusão em poços encontra-se na Tabela 2. Das 59 cepas de BAL, quatro (Q1BAL10, Q2BAL2, Q4BAL1 e Q4BAL5) foram capazes de produzir atividade contra *L. monocytogenes* com halos variando entre 13,0 e 17,5 mm, nenhuma apresentou antagonismo frente a *S. aureus*.

Tabela 2.

Atividade antagonista* pela técnica da difusão em poços das BAL isoladas de queijos coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS, frente aos micro-organismo indicadores (n=4).

Micro-organismos indicadores	Cepas			
	Q1BAL10	Q2BAL2	Q4BAL1	Q4BAL5
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	16,5(±0,71)	17,5(±0,71)	13,5(±0,71)	13,0(±1,41)

*(médias dos diâmetros de halos de inibição em milímetros obtidos em duplicata e seguidos de desvio padrão).

As bacteriocinas produzidas pelas BAL possuem espectro antibacteriano naturalmente limitado a bactérias taxonomicamente próximas à linhagem produtora, o que inclui organismos deteriorantes e patógenos de origem alimentar, como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, mas também outras BAL (Hécharde & Sahl, 2002). Foram descritas amplas faixas de modo de ação para bacteriocinas, como modulação da atividade enzimática, inibição do crescimento de esporos e inibição da síntese de peptidoglicano, o qual é capaz de favorecer a formação de poros na membrana citoplasmática, após interação com lipídeo II, o precursor essencial da parede celular, e consequente efluxo de metabólitos intracelulares, resultando na despolarização da membrana e, consequente morte celular (Perez, Zendo & Sonomoto, 2018; Mokoena, 2017). A adição de agentes quelantes, como ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), tem sido eficaz para alterar a estabilidade e causar danos à membrana externa das células das bactérias Gram-negativas, tornando-as suscetíveis às bacteriocinas. A utilização complementar de óleos essenciais, hipoclorito de sódio e outros tratamentos de conservação e processamento de alimentos também tem sido efetivos como potencializadores da atividade do peptídeo antimicrobiano (Prudêncio, Santos & Vanetti, 2015). Além disso, sua resistência a altas temperaturas e pH baixo e sua sensibilidade às enzimas proteolíticas humanas são características úteis na aplicação desses compostos na preservação de alimentos (Masuda et al., 2011).

Em estudo realizado por Macaluso et al. (2016) de 223 cepas de BAL isoladas de queijos tradicionais sicilianos com atividade anti-*Listeria* pelo método “spot on the lawn”, 37 BAL foram

positivas contra a cepa patogênica pela técnica de difusão em disco pertencentes às espécies: *Enterococcus faecium* (18), *Leuconostoc mesenteroides* (4), *Streptococcus thermophilus* (4), *Enterococcus faecalis* (3), *Leuconostoc pseudomesenteroides* (3), *Lactococcus lactis* (3), *Lactobacillus casei* (1) e *Lactobacillus deulbrueckii* (1). Ho et al. (2018) caracterizou 847 BAL de fontes não lácteas, como frutas, ervas e vegetais quanto à atividade anti-*Listeria* por meio de teste com placas com ágar MRS. Destes, catorze apresentaram atividade inibitória contra o patógeno e foram identificados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA como *Lactococcus lactis* e todos continham o agrupamento de genes da nisina. Apenas quatro apresentaram atividade anti-*Listeria* em meio com leite e aceitáveis características tecnológicas, elucidando as cepas como promissoras culturas adjuntas biopreservativas no controle de *L. monocytogenes* em queijos.

A nisina, produzida por *Lactococcus Lactis*, é a única bacteriocina considerada segura para o consumo humano de acordo com a *Food and Drug Administration*, devido ao fato de ser degradada por enzimas proteolíticas no trato gastrointestinal e não formar compostos secundários, além de contribuir para descontaminação ou controle do crescimento de *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* e *Staphylococcus aureus* (Chen & Hoover, 2003). Perante a preservação de produtos lácteos, as bacteriocinas nisina, pediocina PA-1, lacticina 3147 e enterocinas isoladas ou combinadas com outros tratamentos podem representar um avanço promissor para a segurança microbiológica e manutenção de propriedades sensoriais nesses produtos (Silva, Silva & Ribeiro, 2018; Sobrino-López & Martín-Belloso, 2008). Um avanço promissor é a aplicabilidade de *Lactococcus lactis* com potencial tecnológico e produtor de nisina no controle de *L. monocytogenes* em queijos. Mulkyte et al. (2017) estudaram a utilização das cepas produtoras de nisina, as quais não apresentaram controle efetivo na eliminação de *L. monocytogenes* de 5 unidades log, mas a utilização complementar de tecnologia Hurdle pode ser eficaz. De acordo com Samelis & Kakouri (2018) a utilização de *L. lactis* como *costarter* não pode ser acompanhada de cepas *starters* termofílicas, particularmente *Streptococcus thermophilus*, pelo rápido crescimento dominante e a capacidade acelerada de acidificação do leite, sendo um obstáculo para o patógeno, mas também para a *costarter*.

Um novo nicho é a aplicabilidade de bacteriocinas em filmes e revestimentos bioativos, aplicados diretamente nas superfícies e nas embalagens dos alimentos, ou a utilização da BAL produtora de bacteriocinas, no intuito de garantir o controle de micro-organismos patogênicos em diversos produtos alimentícios, como leites, queijos e iogurtes (Silva, Silva & Ribeiro, 2018; Valdés et al., 2017). Guitián et al. (2019) verificaram o efeito anti *L. monocytogenes* de enterocinas sintetizadas por *Enterococcus avium* DSMZ17511 por meio de filmes comestíveis

em ágar aplicados como revestimentos antimicrobianos em diferentes matrizes de queijo artificialmente contaminados com *L. monocytogenes* 01/155. Os queijos apresentaram diminuição de 1 log na viabilidade do patógeno, as matrizes com maior umidade tiveram uma melhor distribuição do antimicrobiano, diferente dos queijos mais duros que aconteceram gradualmente.

3.3 Propriedades tecnológicas

3.3.1 Capacidade acidificante

Propriedades tecnológicas, como capacidades proteolítica e acidificante, são fatores importantes na seleção de novas cepas de BAL para aplicação como culturas iniciadoras ou adjuntas na produção queijeira. Para a avaliação da capacidade acidificante, as BAL foram cultivadas em leite desnatado UHT e avaliadas nos tempos 6h e 12h. Conforme os resultados expressos na Tabela 3, as cepas variam o pH de 5,62 (5,20-6,19) em 6h para 5,44 (4,96-6,09) em 12h. Os isolados Q2BAL2 e Q4BAL1 foram capazes de reduzir o pH do leite de 6,5 para 5,3 a 37°C em até 6h, caracterizando-as como culturas de acidificação rápida com potencial tecnológico para aplicabilidade como *starter* ou iniciadoras em produtos lácteos. A capacidade de acidificação das BAL foi determinada através do método titulométrico, em cultivo em leite desnatado UHT, cujos resultados foram expressos em ácido láctico (%). Os valores variaram de 0,91% (0,65-1,06) em 6h para 1,02% (0,68-1,3) para 12h.

Tabela 3.

Valores médios seguidos de desvio padrão de pH e acidez em ácido láctico (%) das BAL produtoras de bacteriocina isoladas de queijos coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS, após 6h e 12h de incubação (n=4).

Cepas	pH	pH	Acidez	pH	Acidez
	0h	6 h		12h	
Q1BAL10	6,50	5,80(±0,11)	0,94(±0,03)	5,57(±0,03)	0,99(±0,03)
Q2BAL2	6,50	5,20(±0,01)	1,0(0,05)	4,96(±0,2)	1,13(±0,05)

Q4BAL1	6,50	5,30(±0,12)	1,06(±0,03)	5,01(±0,01)	1,30(±0,02)
Q4BAL5	6,50	6,19 (±0,01)	0,65(±0,01)	6,09(±0,01)	0,68(±0,03)
Média		5,62(±0,47)	0,91(±0,18)	5,44(±0,55)	1,02(±0,26)

A rápida capacidade acidificante das BAL e a intensidade de produção de ácidos são fatores importantes na produção de produtos lácteos. A lactose é geralmente metabolizada pela via glicolítica nos estágios iniciais da maturação do queijo, resultando em uma diminuição no pH (Martinovic, et al., 2018). Segundo a literatura, a atividade acidificante de cada cepa está relacionada com sua capacidade específica para quebrar as substâncias no meio e torná-las assimiláveis para seu metabolismo (Savijoki, Ingmer & Varmanen, 2006). Portanto, BAL denominadas rápidas acidificantes tem potencial tecnológico como culturas *starters*. Quando a produção de ácido láctico é suficiente, a caseína coagula no seu ponto isoelétrico (pH 4,6) que é essencial na produção de queijos, caracterizando firmeza da coalhada e controle de contaminantes indesejáveis, visto sua maior tolerância em faixas de pH próxima a neutralidade ou em condições ligeiramente alcalinas para seu crescimento (De Pasquale et al., 2019). Assim, controlar a acidificação nas etapas iniciais da fabricação de queijos também é um fator limitante para impedir o crescimento de *L. monocytogenes* (Østergaard, Eklöv & Dalgaard, 2014). Todavia as BAL com atividade lenta podem ser utilizadas como culturas secundárias para equilibrar o teor de umidade em produtos lácteos (Pereira et al., 2019).

3.3.2 Atividade proteolítica

A avaliação da atividade proteolítica extracelular dos isolados de BAL produtoras de bacteriocinas estão expressos na Tabela 4. O teste resultou positivo para os quatro isolados (QIBAL10, Q2BAL2, Q4BAL1 e Q4BAL5), que foram capazes de produzir a enzima por meio da formação de um halo translúcido na placa com meio sólido composto por 1% (v/v) de leite desnatado e 1,5% de ágar bacteriológico. Os halos formados pela hidrólise da caseína variaram entre 11,5 a 52 mm. A cepa Q4BAL1 foi a que melhor apresentou desempenho de atividade proteolítica extracelular.

Tabela 4.

Atividade proteolítica extracelular* das BAL produtoras de bacteriocina isoladas de queijos coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS (n=4).

	Cepas			
	Q1BAL10	Q2BQL2	Q4BAL1	Q4BAL5
Atividade proteolítica	32,5(±0,71)	11,5(±0,71)	52,0(±1,41)	37,5(±0,71)

*(médias dos diâmetros de halos de hidrólise em milímetros obtidos em duplicata e seguidos de desvio padrão).

A capacidade de produção de enzimas extracelulares é uma característica importante das BAL, (Settanni & Moschetti, 2010). As proteases extracelulares são cruciais na hidrólise da caseína em oligopeptídeos, fornecendo os aminoácidos essenciais para o seu crescimento, além de permitir a liberação aminoácidos livres e peptídeos mais curtos, muitos considerados bioativos com funções imunomoduladoras, anticarcinogênica, anti-hipertensiva, antioxidante, antimicrobiana entre outras, contudo capazes de favorecer uma rápida acidificação do meio durante o processo fermentativo (Venegas-Ortega et al., 2019; El-Gaish et al., 2010). As peptidases e proteinases intracelulares liberadas das paredes celulares bacterianas após a lise celular também são cruciais na hidrólise da caseína (Lim et al., 2019). A degradação da proteína do leite também proporciona um papel vital no desenvolvimento de produtos fermentados porque estão associadas à liberação dessas moléculas diretamente responsáveis pelo aroma desejável, pois estas moléculas são precursoras dos compostos voláteis como ácidos, álcoois, aldeídos, amônia, compostos sulfurados ésteres, entre outros. Além de atuarem na modificação de textura e redução de atividade da água de alguns produtos, como queijos maturados (García-Cano et al., 2019).

Além da capacidade de produzir enzimas proteolíticas, as BAL também são capazes de produzir grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas que, juntamente com as enzimas proteolíticas, transformam os nutrientes fundamentais do leite e do queijo em compostos com propriedades sensoriais desejáveis (Tekin & Güler, 2019). Certas BAL *starters* possuem atividade proteolítica essencial na maturação de queijos, pois são responsáveis pela transformação de lactose em ácido láctico e suas enzimas contribuem na maturação, estando envolvidas na proteólise e na conversão de aminoácidos em substâncias voláteis responsáveis pelas propriedades organolépticas do produto (Altieri et al., 2017). Essas BAL podem ser adicionadas no início da produção ou não. Neste último caso, utilizam-se somente as bactérias selvagens presentes naturalmente no leite sendo este processo normalmente utilizado na fabricação de queijos artesanais a partir de leite não pasteurizado

(Altieri et al., 2017). Uma proteólise muito intensa é um fator desfavorável, pois é capaz de provocar alterações no aroma, sabor e características físico-químicas do leite e derivados tais como acidez excessiva e sabor amargo do queijo (Tekin & Güler, 2019)

4. Conclusão

O estudo detectou o queijo colonial artesanal como fonte próspera de BAL produtoras de substâncias antimicrobianas de natureza proteica, supostamente caracterizadas como bacteriocinas e com potenciais cultivos iniciadores antimicrobianos, supostamente bacteriocinogênicos. Foram avaliadas a atividade antagonista de 63 cepas pelo método “*spot on the lawn*” frente a *Staphylococcus aureus* 25923, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis*, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus brevis* ATCC 367, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 e *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338. Quatro isolados foram descartados por não apresentaram atividade frente aos patógenos, enquanto os outros 59 isolados apresentaram para para ao menos duas cepas. Cerca de 22% dos isolados de BAL (13/59) apresentaram antagonismo frente ao menos uma BAL de referência, sendo *L. acidophilus* e *L. brevis* as que apresentaram maior inibição de 92,3% (12/13) e 77% (10/13). As 59 BAL foram verificadas pela produção de bacteriocinas através da técnica da difusão em poços. Quatro BAL (Q1BAL10, Q2BAL2, Q4BAL1 e Q4BAL5) foram capazes de produzir bacteriocinas frente a *L. monocytogenes*, proteinases extracelulares e destes Q2BAL2 e Q4BAL1 foram capazes de diminuir o pH do leite de 6,5 para 5,3 em até 6h. Contudo, as cepas Q2BAL2 e Q4BAL1 foram identificadas com potencial como culturas *starters* anti-*Listeria* para utilização na biopreservação de produtos lácteos.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Referências

- Alakomi, H. L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., & Helander, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(5), 2001-2005.
- Altieri, C., Ciuffreda, E., Di Maggio, B., & Sinigaglia, M. (2017). Lactic acid bacteria as starter cultures. *Starter cultures in food production*, 1-15.
- Horwitz, W. (2005). International Official Methods 920.124. *Official Methods of Analysis of AOAC International* (18 ed.). AOAC International, Gaithersburg, MD, U.S.A.
- Lahtinen, S.; Ouwehand, A. C.; Salminen, S., & Von Wright, A. (2004). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (4 ed.). Boca Raton, USA: CRC Press.
- Chen, H. & Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(3), 82-100.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International journal of food microbiology*, 71(1), 1-20.
- Cogan, T. M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P. S., FERNANDES, I., ... & MEDINA, M. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 64(3), 409-421.
- das Dores, M. T., & Ferreira, C. L. D. L. F. (2012). Queijo minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, 2(2).
- de Medeiros Carvalho, M., de Fariña, L. O., Strongin, D., Ferreira, C. L. L., & Lindner, J. D. D. (2019). Traditional Colonial-type cheese from the south of Brazil: A case to support the new Brazilian laws for artisanal cheese production from raw milk. *Journal of dairy science*, 102(11), 9711-9720.
- de Medeiros Carvalho, M., Lindner, J. D. D., & Fariña, L. O. (2015). A produção de queijo colonial artesanal no município de Seara, estado de Santa Catarina frente à legislação. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 70(5), 253-261.
- De Pasquale, I., Di Cagno, R., Buchin, S., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2019). Use of autochthonous mesophilic lactic acid bacteria as starter cultures for making Pecorino Crotonese cheese: Effect on compositional, microbiological and biochemical attributes. *Food research international*, 116, 1344-1356.
- Dotto, D. M. R., Gonçalves, T. P., & Iop, S. C. F. (2015). Queijo: percepções atuais de um hábito alimentar milenar. *Agroalimentaria*, 21(40), 175-186.
- El-Ghaish, S., Dalgalarrodo, M., Choiset, Y., Sitohy, M., Ivanova, I., Haertlé, T., & Chobert, J. M. (2010). Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity. *European Food Research and Technology*, 230(4), 635-643.
- Favaro, L., Penna, A. L. B., & Todorov, S. D. (2015). Bacteriocinogenic LAB from cheeses—application in biopreservation?. *Trends in Food Science & Technology*, 41(1), 37-48.
- Field, D., Ross, R. P., & Hill, C. (2018). Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives. *Current Opinion in Food Science*, 20, 1-6.
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. (2017). *Fundamentals of cheese science* (p. 185-229). Springer, Boston, MA, U.S.A.
- Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A., & Poznanski, E. (2009). Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International dairy journal*, 19(1), 3-11.

- García-Cano, I., Rocha-Mendoza, D., Ortega-Anaya, J., Wang, K., Kosmerl, E., & Jiménez-Flores, R. (2019). Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Applied microbiology and biotechnology*, 1-15.
- Gaspar, F. B., & Crespo, M. T. B. (2016). Lactic acid bacteria as functional starter in food fermentations. *Fermented Foods. Part, 1*, 166-184.
- Gutián, V. M., Ibarguren, C., Soria, C. M., Hovanyecz, P., Banchio, C., & Audisio, C. M. (2019). Anti-Listeria monocytogenes effect of bacteriocin-incorporated agar edible coatings applied on cheese. *International Dairy Journal*.
- Hammami, R., Ismail, F., & Corsetti, A. (2019). " Application of protective cultures and bacteriocins for food biopreservation". *Frontiers in microbiology*, 10, 1561.
- Héchar, Y., & Sahl, H. G. (2002). Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*, 84(5-6), 545-557.
- Jones, B. V., Sun, F., & Marchesi, J. R. (2007). Using skimmed milk agar to functionally screen a gut metagenomic library for proteases may lead to false positives. *Letters in applied microbiology*, 45(4), 418-420.
- Kondrotiene, K., Kasnauskite, N., Serniene, L., Gözl, G., Alter, T., Kaskoniene, V., ... & Malakauskas, M. (2018). Characterization and application of newly isolated nisin producing Lactococcus lactis strains for control of Listeria monocytogenes growth in fresh cheese. *LWT*, 87, 507-514.
- Lahtinen, S.; Ouwehand, A. C.; Salminen, S., & Von Wright, A. (2004). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (4 ed.). Boca Raton, USA: CRC Press.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78.
- Lewus, C. B., Kaiser, A. L. A. N., & Montville, T. J. (1991). Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(6), 1683-1688.
- Lim, Y. H., Foo, H. L., Loh, T. C., Mohamad, R., & Abdullah, N. (2019). Comparative studies of versatile extracellular proteolytic activities of lactic acid bacteria and their potential for extracellular amino acid productions as feed supplements. *Journal of animal science and biotechnology*, 10(1), 15.
- Lisboa, M. P., Bonatto, D., Bizani, D., Henriques, J. A., & Brandelli, A. (2006). Characterization of a bacteriocin-like substance produced by Bacillus amyloliquefaciens isolated from the Brazilian Atlantic forest. *International microbiology*, 9(2), 111-118.
- Lo, R., Bansal, N., & Turner, M. S. (2018). Characterisation of Lactococcus lactis isolates from herbs, fruits and vegetables for use as biopreservatives against Listeria monocytogenes in cheese. *Food Control*, 85, 472-483.
- Macaluso, G., Fiorenza, G., Gaglio, R., Mancuso, I., & Scatassa, M. L. (2016). In vitro evaluation of bacteriocin-like inhibitory substances produced by lactic acid bacteria isolated during traditional Sicilian cheese making. *Italian journal of food safety*, 5(1).
- Martinovic, A., Narvhus, J., Abrahamsen, R. K., Østlie, H. M., & Skeie, S. B. (2018). Application of indigenous strains of lactic acid bacteria for semi-industrial production of autochthonous Montenegrin Njeguši cheese. *International journal of dairy technology*, 71(3), 683-692.
- Masuda, Y., Ono, H., Kitagawa, H., Ito, H., Mu, F., Sawa, N., ... & Sonomoto, K. (2011). Identification and characterization of leucocyclicin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by Leuconostoc mesenteroides TK41401. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(22), 8164-8170.
- Menezes, S. D. S. M. (2011). Queijo artesanal: identidade, prática cultural e estratégia de reprodução social em países da América Latina. *Revista Geográfica de América Central*, 2, 1-16.
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules*, 22(8), 1255.

- Montet, D., & Ray, R. C. (2016). *Fermented Foods, Part I: Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press, Boca Raton, U.S.A., 413 p.
- Felis, G. E., Salvetti, E., & Torriani, S. (2015). Systematics of lactic acid bacteria: current status. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, 25-32.
- Ozer, B., & Akdemir-Evrendilek, G. (Eds.). (2014). *Dairy microbiology and biochemistry: recent developments*. CRC Press.
- Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2018). Circular and leaderless bacteriocins: biosynthesis, mode of action, applications and prospects. *Frontiers in microbiology*, 9, 2085.
- Prudêncio, C. V., Dos Santos, M. T., & Vanetti, M. C. D. (2015). Strategies for the use of bacteriocins in Gram-negative bacteria: relevance in food microbiology. *Journal of food science and technology*, 52(9), 5408-5417.
- Samelis, J., & Kakouri, A. (2018). Hurdle factors minimizing growth of *Listeria monocytogenes* while counteracting in situ antilisterial effects of a novel nisin A-producing *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* costarter in thermized cheese milks. *AIMS Microbiology*, 4, 19-41.
- Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 71(4), 394-406.
- Settanni, L., & Moschetti, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, 27(6), 691-697.
- Silva, C. C., Silva, S. P., & Ribeiro, S. C. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in microbiology*, 9, 594.
- Sobrino-López, A., & Martín-Belloso, O. (2008). Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, 18(4), 329-343.
- Snyder, A. B., & Worobo, R. W. (2014). Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(1), 28-44.
- Tekin, A., & Güler, Z. (2019). Glycolysis, lipolysis and proteolysis in raw sheep milk Tulum cheese during production and ripening: Effect of ripening materials. *Food chemistry*, 286, 160-169.
- Valdés, A., Ramos, M., Beltrán, A., Jiménez, A., & Garrigós, M. C. (2017). State of the art of antimicrobial edible coatings for food packaging applications. *Coatings*, 7(4), 56.
- Varsha, K. K., & Nampoothiri, K. M. (2016). Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures. *Food Control*, 69, 61-64.
- Venegas-Ortega, M. G., Flores-Gallegos, A. C., Martínez-Hernández, J. L., Aguilar, C. N., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2019). Production of Bioactive Peptides from Lactic Acid Bacteria: A Sustainable Approach for Healthier Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(4), 1039-1051.
- Vinicius De Melo Pereira, G., De Carvalho Neto, D. P., Junqueira, A. C. D. O., Karp, S. G., Letti, L. A., Magalhães Júnior, A. I., & Soccol, C. R. (2019). A Review of Selection Criteria for Starter Culture Development in the Food Fermentation Industry. *Food Reviews International*, 1-33.
- Wang, C., Chang, T., Yang, H., & Cui, M. (2015). Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 47, 231-236.

7. Considerações finais

O queijo colonial artesanal comercializado em Pelotas, RS, é fonte de BAL produtoras de substâncias antimicrobianas de natureza proteica, supostamente caracterizadas como bacteriocinas e com potenciais cultivos iniciadores antimicrobianos, supostamente bacteriocinogênicos.

Dentre as 105 cepas isoladas da matriz láctea, 73 foram caracterizadas como gram positivas e catalase negativas e avaliadas quanto a aspectos fenotípicos de virulência. Todas as estirpes foram gelatinase e DNase negativas, quanto a atividade hemolítica, houve detecção de sete cepas como α e duas como β -hemolítica, resultado em 64 cepas de BAL para avaliação de susceptibilidade a antimicrobianos. Esses isolados apresentaram sensibilidade aos antibióticos cloranfenicol e tetraciclina. Para os outros antimicrobianos, apresentaram resistência a ciprofloxacina (93,5%, 58/64), oxacilina 98,4% (63/64), Penicilina G 51,6% (41/64) e vancomicina (85,9%, 54/64).

A atividade antagonista de 63 cepas foi verificada pelo método “*spot on the lawn*” frente a *Staphylococcus aureus* 25923, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis*, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, *Lactobacillus brevis* ATCC 367, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 e *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338. Quatro isolados foram descartados por não apresentaram atividade frente aos patógenos, enquanto os outros 59 isolados apresentaram para ao menos duas cepas. Cerca de 22% dos isolados de BAL (13/59) apresentaram antagonismo frente ao menos uma BAL de referência, sendo *L. acidophilus* e *L. brevis* as que apresentaram maior inibição de 92,3% (12/13) e 77% (10/13). As 59 BAL foram verificadas pela produção de bacteriocinas através da técnica da difusão em poços. Quatro BAL (Q1BAL10, Q2BAL2, Q4BAL1 e Q4BAL5) foram capazes de produzir bacteriocinas frente a *L. monocytogenes*, proteinases extracelulares e destes Q2BAL2 e Q4BAL1 foram capazes de diminuir o pH do leite de 6,5 para 5,3 em até 6h.

Como resultado final, as cepas Q2BAL2 e Q4BAL1 foram identificadas com potencial como culturas *starters* anti-*Listeria* para utilização na biopreservação de produtos lácteos.

8. Referências

ALAKOMI, H. L.; SKYTTÄ, E.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; LATVA-KALA, K.; HELANDER, I. M. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2001-2005, 2000.

ALE, E. C.; PEREZLINDO, M. J.; PAVÓN, Y.; PERALTA, G. H.; COSTA, S.; SABBAG, N.; BINETTI, A. G. Technological, rheological and sensory characterizations of a yogurt containing an exopolysaccharide extract from *Lactobacillus fermentum* Lf2, a new food additive. **Food Research International**, v. 90, p. 259-267, 2016.

AMMOR, M. S.; MAYO, B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat science*, v. 76, n. 1, p. 138-146, 2007.

ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. **Food Research International**, v. 35, n. 2-3, p. 171-176, 2002.

AOAC. American Organization of Analytical Chemists International. (2005). **Official methods of analysis** (18th ed.). Gaithersburg, MD: Author

AYAD, E. H. E.; NASHAT, S.; EL-SADEK, N.; METWALY, H.; ELSODA, M. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. **Food Microbiology**, v. 21, n.6, p.715-725, 2004.

AYYASH, M.; ABU-JDAYIL, B.; HAMED, F.; SHAKER, R. (2018). Rheological, textural, microstructural and sensory impact of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus plantarum* isolated from camel milk on low-fat akawi cheese. **LWT-Food Science and Technology**, v. 87, p. 423-431., 2018.

BAUMGARTNER, A.; KUEFFER, M.; SIMMEN, A.; GRAND, M. Relatedness of *L. rhamnosus* strains isolated from clinical specimens and such from food-stuffs, humans and technology. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.31, p.489-494, 1998.

BECH-LARSEN, T; SCHOLDERER, J. Functional foods in Europe: consumer research, market experiences and regulatory aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 4, p. 231-234, 2007.

BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C. G. M. Bile salt hydrolase activity in probiotics. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1729-1738, 2016.

BEZERRA, T. K. A.; DE ARAUJO, A. R. R.; DO NASCIMENTO, E. S.; DE MATOS PAZ, J. E.; GADELHA, C. A.; GADELHA, T. S.; MADRUGA, M. S. Proteolysis in goat “coalho” cheese supplemented with probiotic lactic acid bacteria. **Food Chemistry**, v. 196, p. 359-366, 2016.

BLAYA, J.; BARZIDEH, Z.; LAPOINTE, G. Interaction of starter cultures and nonstarter lactic acid bacteria in the cheese environment. **Journal of Dairy Science**, 2017.

BONFILI, L.; CECARINI, V.; CUCCIOLONI, M.; ANGELETTI, M.; BERARDI, S.; SCARPONA, S.; ELEUTERI, A. M. SLAB51 Probiotic Formulation Activates SIRT1 Pathway Promoting Antioxidant and Neuroprotective Effects in an AD Mouse Model. **Molecular Neurobiology**, p. 1-14, 2018.

BRASIL. Instrução Normativa nº 30, de 7 de agosto de 2013 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União. Brasília, 08 de agosto de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Vigitel 2016: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2016. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. Portaria do Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária (MAARA) nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova padrões microbiológicos, físicos e químicos para leite e derivados. Diário Oficial. Brasília, 11, 3977-3986.

BRASIL. Resolução ANVS/MS n.º 18, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Republicada no Diário Oficial da União, Brasília, 03 de dezembro de 1999.

BROOWNELL, Kelly D.; WALSH, B. Timothy (Ed.). **Eating disorders and obesity: A comprehensive handbook**. Guilford Publications, 2017.

CARAFÀ, I.; NARDIN, T.; LARCHER, R.; VIOLA, R.; TUOHY, K.; FRANCIOSI, E. Identification and characterization of wild lactobacilli and pediococci from spontaneously fermented Mountain Cheese. **Food Microbiology**, v. 48, p. 123-132, 2015.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C.F. R. Natural food additives: Quo vadis?. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 284-295, 2015.

CARVALHO, M. M.; LINDNER, J. D. D.; FARIÑA, L. O. A produção de queijo colonial artesanal no município de Seara, estado de Santa Catarina, frente à legislação brasileira. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n.5, p. 253-261, 2015.

CENCI-GOGA, B. T. et al. Growth inhibition of selected microorganisms by an association of dairy starter cultures and probiotics. **Italian Journal of Animal Science**, v. 14, n. 2, p. 3745, 2015.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 5, p. 759-768, 1998.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 5, p. 759-768, 1998.

CHEN, H.; HOOVER, D. G. Bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. 3, p. 82-100, 2003.

CHO, Y. A.; KIM, J. Effect of probiotics on blood lipid concentrations: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Medicine**, v. 94, n. 43, 2015.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 1, p 1–20, 2001.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty two informational supplement**. CLSI document M100-S22. Wayne: CLSI, v. 25, p.24-24, 2012.

COGAN, T. M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E.; BIANCHI-SALVADORI, B.; COCCONCELLI, P. S.; FERNANDES, I. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*. Cambridge, v.64, n.3, p.409-421, 1997.

CORBO, M, R, et al. Functional beverages: the emerging side of functional foods: commercial trends, research, and health implications. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 13, n. 6, p. 1192-1206, 2014.

CORGNEAU, M.; SCHER, J.; RITIE-PERTUSA, L.; LE, D. T.; PETIT, J.; NIKOLOVA, Y.; GAIANI, C. Recent advances on lactose intolerance: Tolerance thresholds and currently available answers. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n.15, p. 3344-3356, 2017.

COSTA, Neuza Maria Brunoro; ROSA, Carla de Oliveira Barbosa. **Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológico**. Editora Rubio, 2016.

CROVESY, L.; OSTROWSKI, M.; FERREIRA, D. M. T. P.; ROSADO, E. L.; SOARES-MOTA, M. Effect of *Lactobacillus* on body weight and body fat in overweight subjects: a systematic review of randomized controlled clinical trials. **International Journal of Obesity**, v. 41, n. 11, p. 1607, 2017.

DALIRI, E. B. M.; LEE, B. H.; OH, D. H. Current perspectives on antihypertensive probiotics. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 9, n. 2, p. 91-101, 2017.

DAS DORES, M. T.; FERREIRA, C. L. L. F. Queijo minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 2, n. 2, 2012.

DE VUYST L.; FOULQUIE M. R.; REVETS H. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, p. 299-318, 2003.

DOLCI, Paola; COCOLIN, L. S.. Starter 10 strains and adjunct non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) in dairy products. **Microbiology in Dairy Processing: Challenges and Opportunities**, p. 177, 2017.

DOUILLARD, F. P.; DE VOS, W. M. Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. In: **Microbial cell factories**. BioMed Central, 2014. p. S8.

DOESC. Diário Oficial do Estado de Santa Catarina Lei nº 17.486, de 16 de janeiro de 2018. Dispõe sobre a produção e comercialização de queijos artesanais de leite cru e adota outras providências. Florianópolis, 17 de janeiro de 2018.

DOTTO, D. M. R.; GONÇALVES, T. P.; IOP, S. C. F. Queijo: percepções atuais de um hábito alimentar milenar. *Agroalimentaria*, v. 21, n. 40, p. 175-186, 2015.

DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological examination of Foods**, American Public Health Association Inc. 4 ed. Washington: Board, 2001. 676 p.

DUPONT, H.; MONTRAVERS, P.; MOHLER, J.; CARBON, C. Disparate findings on the role of virulence factors of *Enterococcus faecalis* in mouse and rat models of peritonitis. **Infection Immunity**, v. 66, p. 2570–2575, 1948.

EL GALIOU, O.; ZANTAR, S.; BAKKALI, M.; LAGLAOUI, A. Lipolysis and proteolysis during the ripening of fresh Moroccan goats' milk cheese. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 8, n. 2, p. 201-206, 2013.

FALGUERA, Víctor; ALIGUER, Nuria; FALGUERA, Merce. An integrated approach to current trends in food consumption: Moving toward functional and organic products?. **Food Control**, v. 26, n. 2, p. 274-281, 2012.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. FOX. Biochemistry of cheese ripening. In: **Fundamentals of Cheese Science**. Boston: Springer, 2017. p. 391-442.

FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 1, p. 3-11, 2009.

GALA, E.; LANDI, S.; SOLIERI, L.; NOCETTI, M.; PULVIRENTI, A.; GIUDICI, P. Diversity of lactic acid bacteria population in ripened Parmigiano Reggiano cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, n. 3, p. 347-351, 2008.

GASBARRINI, Giovanni; BONVICINI, Fiorenza; GRAMENZI, Annagiulia. Probiotics history. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 50, p. S116-S119, 2016.

GAWAI, K. M.; MUDGAL, S. P.; PRAJAPATI, J. B. Stabilizers, Colorants, and Exopolysaccharides in Yogurt. **Yogurt in Health and Disease Prevention**, p. 49-68, 2017.

GHEYTANCHI, E., HESHMATI, F., SHARGH, B. K., NOWROOZI, J., & MOVAHEDZADEH, F. Study on b-galactosidase enzyme produced by isolated lactobacilli from milk and cheese. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 6, 454-458, 2010.

GILLILAND, S. E.; NELSON, C. R.; MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 377-381, 1985.

HASLER, C. M.; BROWN, A. C. Position of the American Dietetic Association: functional foods. **Journal of the American Dietetic Association**, v.109, n. 4, p. 735-746, 2009.

HOLZAPFEL, Wilhelm H.; WOOD, Brian J. B. **Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2014. 632 p.

HUSAIN, S. Effect of ferric iron on siderophore production and pyrene degradation by *Pseudomonas fluorescens* 29L. **Current Microbiology**, v. 57, p. 331–334, 2008.

JAY, James M. trad. TONDO, Eduardo Cesar. **Microbiologia de Alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712 p.

JOINT, F. A. O. **WHO: Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London, Canada, v. 30, 2002.

JONES, B. V.; SUN, F.; MARCHESI, J. R. Using skimmed milk agar to functionally screen a gut metagenomic library for proteases may lead to false positives. **Applied Microbiology**, v. 45, n. 4, p.4 18–420, 2007.

JONES, K. Probiotics: Preventing Antibiotic-Associated Diarrhea. **Journal for Specialists in Pediatric Nursing**, v. 15, n. 2, p. 160-162, 2010.

KACHOURI, F.; KSONTINI, H.; KRAIEM, M.; SETTI, K.; MECHMECHE, M.; HAMDY, M. Involvement of antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum* on functional properties of olive phenolic compounds. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 7924-7933, 2015.

KAO, T.; CHEN, B. Functional components in soybean cake and their effects on antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7544–7555, 2006.

KHALESI, S.; SUN, J.; BUYS, N.; JAYASINGHE, R. Effect of Probiotics on Blood Pressure Novelty and Significance: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized, Controlled Trials. **Hypertension**, v. 64, n. 4, p. 897-903, 2014.

KULLISAAR, T.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M.; VIHALEMM, T.; ANNUK, H.; KAIRANE, C.; KILK, A. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. **International journal of food microbiology**, v. 72, n. 3, p. 215–224, 2002.

KWAK, N. S.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. **Food Control**, v. 12, n. 2, p. 99-107, 2001.

LAHTINEN, Sampo; OUWEHAND, Arthur C., SALMINEN, Seppo; VON WRIGHT, Atte. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 4 ed. Boca Raton: CRC Press, 2011. 798 p.

LAZZI, C.; POVOLO, M.; LOCCI, F.; BERNINI, V.; NEVIANI, E.; GATTI, M. Can the development and autolysis of lactic acid bacteria influence the cheese volatile fraction. **International Journal of Food Microbiology**, v. 233, p. 20-28, 2016.

LEE, J.; HWANG, K. T.; CHUNG, M. Y.; CHO, D. H.; PARK, C. S. Resistance of *Lactobacillus casei* KCTC 3260 to reactive oxygen species (ROS): role for a metal ion chelating effect. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 8, 2005.

LINDGREN, S. E. AND DOBROGOSZ, W. J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 7, n. 1-2, p. 149-163, 1990.

LIRA, C. R. G.; ZUCCO, F.; NEGRÃO, A. N.; SILVA, M. A. S.; MURAKAMI, F. S. Nutracêuticos: aspectos sobre segurança, controle de qualidade e legislação. **Rev. Bras. Farm.**, v. 90, n. 1, p. 45-49, 2009.

LLORENTE-BOUSQUETS, A.; PÉREZ-MUNGUÍA, S.; FARRÉS, A. Novel extracellular proteolytic activity in *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 694-699, 2008.

LONDOÑO-ZAPATA, A. F.; DURANGO-ZULETA, M. M.; SEPÚLVEDA-VALENCIA, J. U.; HERRERA, C. X. M. Characterization of lactic acid bacterial communities associated with a traditional Colombian cheese: Double cream cheese. **LWT-Food Science and Technology**, v. 82, p. 39-48, 2017.

MADSBAD, S. The role of glucagon-like peptide-1 impairment in obesity and potential therapeutic implications. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 16, n. 1, p. 9-21, 2014.

MALTA, D. C.; SILVA JR., J. B. D. Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis no Brasil após três anos de implantação, 2011-2013. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, p. 389-395, 2014.

MARTIROSYAN, D. M.; SINGH, J. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? **Functional Foods in Health and Disease**, v. 5, n. 6, p. 209-223, 2015.

MATTAR, R.; MAZO, D. F. D. C. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 2, 230-236, 2010.

COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 1065-1073, 2007.

DOYLE, R. J.; ROSENBERG, M. Measurement of microbial adhesion to hydrophobic substrata. In: **Methods in enzymology**. Academic Press: v. 253, p. 542-550, 1995.

KHALIL, E. S.; MANAP, M. Y.; MUSTAFA, S.; AMID, M.; ALHELLI, A. M.; ALJOURI, A. Probiotic characteristics of exopolysaccharides-producing *Lactobacillus* isolated from some traditional Malaysian fermented foods. **CyTA-Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 287-298, 2018.

MCCABE, L; BRITTON, R. A.; PARAMESWARAN, N. Prebiotic and probiotic regulation of bone health: role of the intestine and its microbiome. **Current Osteoporosis Reports**, v. 13, n. 6, p. 363-371, 2015.

McSWEENEY, Paul L. H. Biochemistry of cheese ripening: introduction and overview. In: FOX, Patrick . F.; McSWEENEY, Paul L. H.; COGAN, Timothy M.; GUINEE, Timothy P. **Cheese – chemistry, physics, and microbiology**. 3^a ed. London: General Aspects, 2004.

MENEZES, Sônia de Souza Mendonça. Queijo artesanal: identidade, prática cultural e estratégia de reprodução social em países da América Latina. **Revista Geográfica de América Central**, v. 2, p. 1-16, 2011.

MENG, Z., ZHANG, L., XIN, L., LIN, K., YI, H., & HAN, X. Technological characterization of Lactobacillus in semihard artisanal goat cheeses from different Mediterranean areas for potential use as nonstarter lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 2887-2896, 2018.

MILLER, Jeffrey H. Assay of -galactosidase. In: MILLER Jeffrey H (Org.). **Experiments in Molecular Genetics**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1998. p. 352-355.

MONTEAGUDO-MERA, A.; CARO, I.; RODRÍGUEZ-APARICIO, L. B.; RÚA, J.; FERRERO, M. A.; GARCÍA-ARMESTO, M. R. Characterization of certain bacterial strains for potential use as starter or probiotic cultures in dairy products. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 8, p.1379-1386, 2011.

MONTET, Didier; RAY, Ramesh C. **Fermented Foods, Part I: Biochemistry and Biotechnology**. Boca Raton: CRC Press, 2016. 413 p.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MOZZI, Fernanda; RAYA, Raúl R.; VIGNOLO, Grraciele M. Systematic of lactic acid bacteria: current status. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**. 2 ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2015. 392 p.

NIVOLIEZ, A.; VEISSEIRE, P.; ALATERRE, E.; DAUSSET, C.; BAPTISTE, F.; CAMARÈS, O.; BORNES, S. Influence of manufacturing processes on cell surface properties of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35®. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 1, p. 399-411, 2015.

OAK, S. J.; JHA, R. The effects of probiotics in lactose intolerance: A systematic review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-9, 2018.

OZER, B.; AKDEMIR-EVRENDILEK, G. **Dairy Microbiology and Biochemistry: recent developments**. Boca Raton: CRC Press, 2014. 464 p.

PARVANEH, K.; JAMALUDDIN, R.; KARIMI, G.; ERFANI, R. Effect of probiotics supplementation on bone mineral content and bone mass density. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

PENNACCHIA, C., ERCOLINI, D., BLAIOTTA, G., PEPE, O., MAURIELLO, G., VILLANI, F. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. **Meat science**, v. 67, n. 2, p. 309-317, 2004.

PERIN, L. M.; NERO, L. A. Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. **BMC microbiology**, v. 14, n.1, p. 36, 2014.

PILAR, C-M.; SAMUEL, A.; KAROLA, B.; TRINIDAD, M.; ANANIAS, P.; JORGE, B-V. 2008. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. **Food and Bioprocess Technology**, v. 1, n. 1, p. 43-63, 2008.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.

POHL, C. H.; KOCK, J. L.; THIBANE, V. S. Antifungal free fatty acids: a review. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, v. 3, p. 61-71, 2011.

POMERANZ, Yeshajahu. **Functional Properties of Food Components**. Academic Press, 2012.

PORTO, A. L. F., CAMPOS-TAKAKI, G. M.; FILHO, J. L. L. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soy bean flour medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.60, n.2, p.115-122, 1996.

PRESTI, I.; D'ORAZIO, G.; LABRA, M.; LA FERLA, B.; MEZZASALMA, V.; BIZZARO, G.; DI GENNARO, P. Evaluation of the probiotic properties of new *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains and their in vitro effect. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 13, p. 5613-5626, 2015.

PRINCE, A.; Sandhu, P.; Ror, P.; Dash, E.; Sharma, S.; Arakha, M.; Saleem, M. Lipid-II independent antimicrobial mechanism of nisin depends on its crowding and degree of oligomerization. **Scientific Reports**, v. 6, p. 37908, 2016.

RAMCHANDRAN, L.; SHAH, N. P. Proteolytic Profiles and Angiotensin-I Converting Enzyme and α -Glucosidase Inhibitory Activities of Selected Lactic Acid Bacteria. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 2, 2008.

ROBERFROID, M. B. Global view on functional foods: European perspectives. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. S2, p. S133-S138, 2002.

RUAS-MADIEDO, Patricia et al. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 8, p. 2011-2015, 2006.

RUDEL, L. L.; MORRIS, M. D. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. **Journal of Lipid Research**, v. 14, n. 3, p. 364-366.

SALGADO, Jocelem. **Alimentos Funcionais**. Oficina de Textos, 2016.

SALLES, Leonardo Gaspar. **Os alimentos funcionais no Brasil: uma análise dos produtos registrados com alegações de propriedade funcional e/ou de saúde entre 1999 e 2013**. 2013. 102 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Sociais) - Centro de Filosofia e Ciências Humanas. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

SANDERS, M. E. et al. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. In: **Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications**. Springer, Dordrecht, 1999. p. 293-315.

SANTARMAKI, V.; KOURKOUTAS, Y.; ZOUMPOPOULOU, G.; MAVROGONATOU, E.; KIOURTZIDIS, M.; CHORIANOPOULOS, N.; YPSILANTIS, P. Survival, Intestinal Mucosa Adhesion, and Immunomodulatory Potential of *Lactobacillus plantarum* Strains. **Current Microbiology**, v. 74, n. 9, p. 1061-1067, 2017.

SASSI, Franco. **Obesity and the Economics of Prevention**. Cheltenham: Edward Elgar Publishing, 2010.

SBC. Sociedade Brasileira de Cardiologia. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 95, n. 1, p. 1-51, 2010.

SCHAEFER, L.; AUCTIONG, T. A.; HERMANS, K. E.; WHITEHEAD, D.; BORHAN, B.; BRITTON, R. A. The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. **Microbiology**, v. 156, n. 6, p. 1589–1599, 2010.

SETIAN, N. Efeitos anoréticos do PYY na obesidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 50, n. 3, p. 236-236, 2004.

SETTANNI, L., MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*, v. 27, p. 691-697, 2010.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. **Journal of functional foods**, v. 18, p. 820-897, 2015.

SHAUKAT, A.; LEVITT, M. D.; TAYLOR, B. C.; MACDONALD, R.; SHAMLIYAN, T. A.; KANE, R. L.; WILT, T. J. Systematic review: effective management strategies for lactose intolerance. **Annals of Internal Medicine**, v. 152, n. 12, p. 797-803, 2010.

SHIMIZU, M.; HASHIGUCHI, M.; SHIGA, T.; TAMURA, H. O.; MOCHIZUKI, M. Meta-analysis: effects of probiotic supplementation on lipid profiles in normal to mildly hypercholesterolemic individuals. **PLoS One**, v. 10, n. 10, e0139795, 2015.

SIDDEGOWDA, G. S.; BHASKAR, N.; GOPAL, S. Fermentative properties of proteolytic pediococcus strains isolated from salt fermented fish hydrolysate prepared using freshwater Fish Rohu (*Labeo Rohita*). **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 26, n. 3, p. 341-355, 2017.

SILVA, C. C.; SILVA, S. P.; RIBEIRO, S. C. Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 594, 2018.

SILVEIRA, T. F. V. D.; VIANNA, C. M. D. M.; MOSEGUI, G. B. G. Brazilian legislation for functional foods and the interface with the legislation for other food and medicine classes: contradictions and omissions. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 19, n. 4, p. 1189-1202., 2009.

SJÖGREN, J.; MAGNUSSON, J.; BROBERG, A.; SCHNÜRER, J.; KENNE, L. (2003). Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 7554-7557, 2003.

SYNDER, A. B.; WOROBO, R. W. Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 1, p. 28–44, 2013.

SOBRINO-LÓPEZ, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 4, p. 329-343, 2008.

SU, Y.A., SULAVIK, M.C., HE, P., MAKINEN, K.K., MAKINEN, P., FIEDLER, S., WIRTH, R., CLEWELL, D.B., 1991. Nucleotide sequence of the gelatinase gene from *Enterococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 415–420.

TANG, W.; XING, Z.; LI, C.; WANG, J.; WANG, Y. Molecular mechanisms and in vitro antioxidant effects of *Lactobacillus plantarum* MA2. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1642-1649, 2017.

TARI, C.; USTOK, F. I.; HARSA, S. Production of food grade β -galactosidase from artisanal yogurt strains. **Food Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 78-94, 2010.

THUSHARA, R. M.; GANGADARAN, S.; SOLATI, Z.; MOGHADASIAN, M. H. Cardiovascular benefits of probiotics: a review of experimental and clinical studies. **Food & function**, v. 7, n. 2, p. 632-642, 2016.

HERREROS, M. A. et al. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). **Food microbiology**, v. 22, n. 5, p. 455-459, 2005.

TORINO, M. I.; FONT DE VALDEZ, G.; MOZZI, F. Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 834, 2015.

VALDÉS A., RAMOS M., BELTRÁN A., JIMÉNEZ A., GARRIGÓS M. C. State of the art of antimicrobial edible coatings for food packaging applications. **Coatings**, v. 7, n. 4, p. 56, 2017.

VAN HOORDE, K.; VERSTRAETE, T.; VANDAMME, P.; HUYS, G. Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. *Food microbiology*, v. 25, n. 7, p. 929-935, 2008.

VAN MASTRIGT, Oscar et al. Citrate, low pH and amino acid limitation induce citrate utilization in *Lactococcus lactis* biovar diacetylactis. **Microbial biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 369-380, 2018.

VARSHA, K. K.; NAMPOOTHIRI, K. M. Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures. **Food Control**, v. 69, p. 61-64, 2016.

WALTHER, B.; KARL, J. P.; BOOTH, S. L.; BOYAVAL, P. MENAQUINONES, Bacteria, and the Food Supply: The Relevance of Dairy and Fermented Food Products to Vitamin K Requirements—. **Advances in Nutrition**, v. 4, n. 4, p. 463-473, 2013.

WILDMAN, R. E. C. **Handbook of nutraceuticals and functional foods**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press, 2016. 560 p.

WU, Y.; ZHANG, Q.; REN, Y.; RUAN, Z. Effect of probiotic *Lactobacillus* on lipid profile: A systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. **PLoS One**, v. 12, n. 6, e0178868, 2017.

YUHARA, T. T., MATSUBARA, S. T., DOS SANTOS, J. S., & GARCIA, S. (2014). Produção de queijo tipo Quark funcional contendo exopolissacarídeos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 6, p. 387-394, 2014.

ZHANG, L.; LI, X.; REN, H.; LIU, L.; MA, L.; LI, M.; BI, W. Impact of Using Exopolysaccharides (EPS)-Producing Strain on Qualities of Half-Fat Cheddar Cheese. **International Journal of Food Properties**, v. 18, n. 7, p. 1546-1559, 2015.

ANEXOS

Tabela 1. Caracterização e avaliação de fatores fenotípicos de virulência de BAL isoladas de Queijos Coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS (n=105).

Cepas	Caracterização			Testes de segurança		
	Gram	Morfologia	Catalase	Gelatinase	Dnase	Hemólise
Q1BAL2	+	C	-	-	-	Y
Q1BAL3	+	C	-	-	-	Y
Q1BAL4	+	B	-	-	-	Y
Q1BAL5	+	C	-	-	-	Y
Q1BAL7	-	C				
Q1BAL9	+	B	-	-	-	Y
Q1BAL10	+	C	-	-	-	Y
Q1BAL11	+	C	-	-	-	Y
Q2BAL1	+	C	+			
Q2BAL2	+	C	-	-	-	Y
Q2BAL3	+	B	-	-	-	Y

Q2BAL4	+	B	-	-	-	α
Q2BAL5	+	B	-	-	-	\bar{Y}
Q2BAL6	+	B	-	-	-	\bar{Y}
Q2BAL7	+	B	-	-	-	\bar{Y}
Q2BAL8	+	B	-	-	-	α
Q2BAL9	+	B	-	-	-	\bar{Y}
Q2BAL10	+	B	-	-	-	\bar{Y}
Q2BAL11	+	B	-	-	-	\bar{Y}
Q2BAL12	+	B	-	-	-	\bar{Y}
Q3BAL1	+	C	+			
Q3BAL2	+	B	-	-	-	\bar{Y}
Q3BAL3	+	C	-	-	-	\bar{Y}
Q3BAL4	-	C				
Q3BAL5	-	C				
Q3BAL8	+	C	-	-	-	\bar{Y}
Q3BAL9	+	B	-	-	-	\bar{Y}
Q3BAL10	+	C	+			
Q3BAL11	+	C	+			
Q3BAL12	+	C	+			
Q4BAL1	+	B	-	-	-	\bar{Y}
Q4BAL2	+	B	-	-	-	\bar{Y}
Q4BAL3	+	B	-	-	-	\bar{Y}
Q4BAL4	+	B	-	-	-	α
Q4BAL5	+	B	-	-	-	\bar{Y}
Q4BAL6	+	B	-	-	-	\bar{Y}
Q4BAL7	+	B	-	-	-	\bar{Y}
Q4BAL8	-	C				
Q4BAL9	-	C				
Q4BAL10	-	C				
Q5BAL31	-	B				
Q5BAL35	+	B	-	-	-	\bar{Y}
Q5BAL36	+	B	-	-	-	\bar{Y}
Q5BAL37	-	B				
Q5BAL38	+	B	-	-	-	\bar{Y}
Q5BAL39	-	B				
Q5BAL41	+	B	-	-	-	α
Q5BAL42	-	C				
Q6BAL45	+	C	-	-	-	α
Q6BAL46	-	C				
Q6BAL47	+	C	-	-	-	\bar{Y}
Q6BAL50	+	C	-	-	-	\bar{Y}
Q6BAL51	+	C	-	-	-	\bar{Y}
Q6BAL52	+	C	-	-	-	\bar{Y}
Q6BAL55	-	C				
Q6BAL56	+	C	-	-	-	\bar{Y}
Q6BAL57	+	C	-	-	-	\bar{Y}
Q6BAL58	+	C	-	-	-	\bar{Y}
Q7BAL59	+	C	-	-	-	α
Q7BAL60	-	C				
Q7BAL61	+	C	-	-	-	\bar{Y}
Q7BAL62	+	C	-	-	-	α
Q7BAL63	+	C	-	-	-	\bar{Y}
Q7BAL66	-	B				

Q7BAL67	+	C	-	-	-	Y
Q7BAL68	-	C				
Q7BAL69	+	C	-	-	-	Y
Q7BAL70	+	C	-	-	-	Y
Q8BAL73	-	C				
Q8BAL75	+	C	-	-	-	Y
Q8BAL76	+	C	-	-	-	Y
Q8BAL77	+	C	-	-	-	Y
Q8BAL78	-	C				
Q8BAL79	+	C	-	-	-	Y
Q8BAL80	-	C				
Q8BAL81	-	C				
Q8BAL82	+	C	-	-	-	Y
Q8BAL83	-	C				
Q8BAL84	+	C	-	-	-	Y
Q8BAL85	+	C	-	-	-	Y
Q8BAL86	+	C	-	-	-	Y
Q8BAL87	+	C	-	-	-	Y
Q8BAL88	-	C				
Q9BAL1	+	B	-	-	-	Y
Q9BAL2	+	B	-	-	-	Y
Q9BAL3	+	C	-	-	-	Y
Q9BAL5	-	C				
Q9BAL6	-	C				
Q9BAL9	+	B	-	-	-	Y
Q9BAL10	-	C				
Q9BAL12	-	C				
Q9BAL14	+	B	-	-	-	β
Q10BAL1	+	B	-	-	-	Y
Q10BAL2	-	B				
Q10BAL3	+	C	-	-	-	Y
Q10BAL4	-	C				
Q10BAL5	+	B	-	-	-	Y
Q10BAL6	+	B	-	-	-	β
Q10BAL7	+	B	-	-	-	Y
Q10BAL8	+	B	-	-	-	Y
Q10BAL9	+	C	-	-	-	Y
Q10BAL13	+	C	-	-	-	Y
Q10BAL14	+	C	-	-	-	Y
Q10BAL15	+	C	-	-	-	Y
Q10BAL18	+	C	-	-	-	Y

Legenda: (+): positivo; (-) negativo; C: cocos; B: bastonetes; β: hemólise total; α: hemólise parcial; Y: ausência de hemólise; (■): fator eliminatório.

Tabela 2. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das BAL isoladas de Queijos Coloniais artesanais comercializados em Pelotas, RS (n=64)

Cepas	Antibiograma					
	CLO	OXA	VAN	TET	PEN	CIP
Q1BAL2	S	R	R	S	S	R

Q1BAL3	S	R	R	S	R	R
Q1BAL4	S	R	R	S	S	R
Q1BAL5	S	R	R	S	S	R
Q1BAL9	S	R	R	S	R	R
Q1BAL10	S	R	R	S	R	R
Q1BAL11	S	R	R	S	R	R
Q2BAL2	S	R	R	S	R	R
Q2BAL3	S	R	R	S	R	R
Q2BAL5	S	R	R	S	S	R
Q2BAL6	S	R	R	S	S	R
Q2BAL7	S	R	R	S	S	R
Q2BAL9	S	R	R	S	S	R
Q2BAL10	S	R	R	S	S	R
Q2BAL11	S	R	R	S	S	R
Q2BAL12	S	R	R	S	R	R
Q3BAL2	S	R	R	S	R	R
Q3BAL3	S	R	R	S	R	R
Q3BAL8	S	R	R	S	R	R
Q3BAL9	S	R	R	S	R	R
Q4BAL1	S	R	R	S	R	R
Q4BAL2	S	R	R	S	R	R
Q4BAL3	S	R	R	S	R	R
Q4BAL5	S	R	R	S	R	R
Q4BAL6	S	R	R	S	S	R
Q4BAL7	S	R	R	S	R	R
Q5BAL35	S	R	R	S	R	R
Q5BAL36	S	R	R	S	R	R
Q5BAL38	S	R	R	S	R	R
Q6BAL47	S	R	S	S	R	R
Q6BAL50	S	R	S	S	S	R
Q6BAL51	S	MS	S	S	R	R
Q6BAL52	S	S	S	S	S	R
Q6BAL56	S	S	S	S	S	R
Q6BAL57	S	R	R	S	S	R
Q6BAL58	S	R	R	S	R	R
Q7BAL61	S	R	R	S	S	R
Q7BAL63	S	R	R	S	S	R
Q7BAL67	S	R	R	S	S	R
Q7BAL69	S	R	R	S	R	R
Q7BAL70	S	R	R	S	S	R
Q8BAL75	S	R	R	S	R	R
Q8BAL76	S	R	R	S	R	R
Q8BAL77	S	R	R	S	S	R
Q8BAL79	S	R	R	S	S	R
Q8BAL82	S	MS	R	S	S	R
Q8BAL84	S	R	R	S	S	R
Q8BAL85	S	R	R	S	S	R
Q8BAL86	S	R	R	S	S	R
Q8BAL87	S	R	R	S	S	R
Q9BAL1	S	R	R	S	R	R
Q9BAL2	S	R	R	S	R	R
Q9BAL3	S	S	S	S	S	S
Q9BAL9	S	R	R	S	R	R

Q10BAL1	S	R	R	S	R	R
Q10BAL3	S	R	R	S	R	R
Q10BAL5	S	R	R	S	S	R
Q10BAL7	S	R	R	S	R	R
Q10BAL8	S	R	R	S	R	R
Q10BAL9	S	R	R	S	S	R
Q10BAL13	S	R	S	S	S	R
Q10BAL14	S	R	R	S	S	R
Q10BAL15	S	S	S	S	S	R
Q10BAL18	S	R	S	S	R	R

Legenda: CLO (cloranfenicol - 30 µg), OXA (oxacilina - 1 µg), VAN (vancomicina - 30 µg), TET (tetraciclina - 30 µg), PEN (penicilina G - UI e CIP (ciprofloxacina - 5 µg). R = resistente; MS = moderadamente sensível; S = sensível.