

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**FACULDADE DE NUTRIÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS**



**Dissertação de Mestrado**

**POTENCIAL PROBIÓTICO, ASPECTOS DE SEGURANÇA E APLICAÇÃO  
DE *Pediococcus pentosaceus* P107 EM MATRIZ ALIMENTAR**

**Thayane Garcia Blumberg**

**Pelotas, 2021**

**Thayane Garcia Blumberg**

**POTENCIAL PROBIÓTICO, ASPECTOS DE SEGURANÇA E APLICAÇÃO  
DE *Pediococcus pentosaceus* P107 EM MATRIZ ALIMENTAR**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Pieniz  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ângela Maria Fiorentini

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

B658p Blumberg, Thayane Garcia

Potencial probiótico, aspectos de segurança e aplicação de *Pediococcus pentosaceus* P107 em matriz alimentar / Thayane Garcia Blumberg ; Simone Pieniz, orientadora ; Ângela Maria Fiorentini, coorientadora. — Pelotas, 2021.  
53 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Fermentação. 2. Bactéria ácido-láctica. 3. Iogurte. 4. Alimento funcional. I. Pieniz, Simone, orient. II. Fiorentini, Ângela Maria, coorient. III. Título.

CDD : 641.1

Elaborada por Maria Inez Figueiredo Figs Machado CRB: 10/1612

Thayane Garcia Blumberg

**Potencial probiótico, aspectos de segurança e aplicação de *Pediococcus pentosaceus* P107 em matriz alimentar**

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: 13/08/2021

Banca Examinadora:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Pieniz (Orientadora) – Presidente  
Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Angela Maria Fiorentini (Coorientadora) – Membro titular  
Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Pathise Souto Oliveira – Membro titular  
Doutora em Bioquímica e Bioprospecção pela Universidade Federal de Pelotas

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Graciele Daiana Funck – Membro titular  
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Prof.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> Robson Andreazza – Membro suplente  
Doutor em Ciência do Solo pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

*“Nada é tão nosso como os nossos sonhos”*

*(Friedrich Nietzsche)*

## **Agradecimentos**

Dedico esse trabalho e todas as minhas conquistas à minha avó Otalvina que não está mais nesse plano, mas que é a pessoa que me guia e me faz ter forças para seguir.

Agradeço à Deus pela minha vida, pela minha saúde e de todas as pessoas que eu amo. Por ter escutado minhas orações.

À minha família em especial minha mãe lara, que sempre acreditou em mim e fez tudo que era possível para que eu seguisse meus sonhos.

Ao meu namorado Eduardo por ser meu ponto de apoio.

A minha colega e amiga Taiciane que foi a pessoa que esteve comigo em todos os momentos, que foi meu braço esquerdo e direito, me ajudou, acalmou e ensinou.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Simone por acreditar e confiar em mim e neste estudo. Por acalmar nos momentos de desespero e sempre dizer que seria possível.

A minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Angela pelo incentivo e contribuições valiosas neste estudo.

Por fim a todos os meus amigos, familiares e as pessoas que sempre torceram pelo meu sucesso, a minha gratidão.

## RESUMO

BLUMBERG, Thayane Garcia. **Potencial probiótico, aspectos de segurança e aplicação de *Pediococcus pentosaceus* P107 em matriz alimentar.** 2021. 53f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

A crescente demanda por alimentos fermentados funcionais tem estimulado o desenvolvimento de novos produtos e a aplicação de bactérias ácido-lácticas (BAL) com potencial probiótico tem sido vastamente estudada por cientistas de alimentos. Dentre as BAL, *Pediococcus pentosaceus*, presente na microbiota natural de mamíferos, tem apresentado potencial probiótico, quando avaliado *in vitro* e *in vivo*. *P. pentosaceus* tem como principal função promover a fermentação dos produtos alimentícios, favorecer a acidificação do meio com consequente aumento da vida útil dos alimentos e, agregar valor como cultura adjunta com potencial probiótico. Assim, este estudo teve por objetivo avaliar as características probióticas e aspectos de segurança (*food safety*) do isolado *P. pentosaceus* P107, bem como a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) e viabilidade durante armazenamento em iogurte funcional. O potencial probiótico foi avaliado *in vitro* por meio da resistência a ácidos, sais biliares e tolerância ao TGI; como aspectos de segurança foram realizados os testes de gelatinase, DNase, hemolisina e susceptibilidade aos principais antimicrobianos de uso clínico. Posteriormente, foi elaborado um iogurte, suplementado com *P. pentosaceus* P107 (probiótico), para avaliação *in situ*. Na sequência, foi avaliada a viabilidade de *P. pentosaceus* P107, pH e acidez, durante o armazenamento do produto. De acordo com os resultados obtidos, o isolado apresentou tolerância em todas as faixas de pH (pH 2,0; 3,0 e 4,0) e em todas as concentrações de sais biliares (0,1 %, 0,3 %, 0,5 % e 1 % (m/v)) testadas. Foi observado ainda que, o isolado *P. pentosaceus* P107 manteve-se viável em todos os tempos, quando analisada a tolerância ao suco intestinal simulado (pancreatina e pancreatina + 0,5 % sais biliares). Em relação a tolerância ao suco gástrico simulado (pepsina e pepsina + leite integral), observou-se que, quando analisada a tolerância do isolado frente a adição de pepsina, o isolado apresentou viabilidade apenas nos tempos de 0 h e 2 h. Porém, quando testada a tolerância do isolado frente a adição de pepsina + leite, o isolado apresentou viabilidade semelhante em todos os tempos analisados (0 h, 2 h e 4 h), demonstrando que o alimento ofereceu proteção ao isolado, mesmo após 4 h de exposição. Ainda, o isolado apresentou ausência de virulência. Quando realizada a determinação da população estimada de BAL no iogurte foi observada uma redução na contagem de células de aproximadamente 1 log, após 32 dias de armazenamento. Porém, quando analisada a viabilidade da cultura probiótica observou-se um aumento na concentração, quando comparados o 1º e 32º dia de armazenamento (6 log.UFC/mL e 6,8 log.UFC/mL, respectivamente). Quanto as análises de pH e acidez, observou-se que o pH do iogurte 32 dias, apresentou uma variação de pH 4,2 a 4,0. Da mesma forma, quando analisada a acidez do iogurte observou-se constância entre as amostras quando comparados os dias 1 e 32. Por meio dos resultados obtidos pode-se inferir que, *P. pentosaceus* P107 apresenta potencial

probiótico e aspectos de segurança *in vitro*, conferindo viabilidade quando testado nas condições do TGI simulado e, o isolado se manteve viável e em concentrações adequadas durante o armazenamento do iogurte quando adicionado na matriz alimentar (iogurte). Portanto, *P. pentosaceus* P107 apresenta potencial probiótico para aplicação em alimentos e o iogurte funcional apresenta-se como um veículo satisfatório para a incorporação de bactérias probióticas.

**Palavras-chave:** Fermentação; bactéria ácido-láctica; iogurte; alimento funcional.

## ABSTRACT

BLUMBERG, Thayane Garcia. **Probiotic potential, safety aspects and application of *Pediococcus pentosaceus* P107 in food matrix.** 2021. 53f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

Given the growing demand for functional fermented foods, which has stimulated the development of new products, the application of lactic acid bacteria (LAB) with probiotic potential in foods has been widely studied. Among the BAL, *Pediococcus pentosaceus*, present in the natural microbiota of mammals, has shown probiotic potential when evaluated in vitro and in vivo. *P. pentosaceus* has the main function of promoting the fermentation of food products, favoring the acidification of the product, increasing the shelf life of the food, and as an adjunct with probiotic potential. Given the above, this study aimed to evaluate the probiotic characteristics and safety aspects (food safety) of the isolate *P. pentosaceus* P107, as well as its passage through the gastrointestinal tract (TGI) and its viability during storage in functional yoghurt. The probiotic potential was evaluated in vitro through resistance to acids, bile salts and tolerance to the GIT; as safety aspects, tests for gelatinase, DNase, hemolysin and susceptibility to the main antimicrobials in clinical use were performed. Subsequently, probiotic yoghurt, supplemented with *P. pentosaceus* P107, was prepared for in situ evaluation. Subsequently, the viability of P107, pH and acidity was evaluated during product storage. According to the results obtained, the isolate presented tolerance in all pH ranges (pH 2, 3 and 4) and in all bile salt concentrations (0.1%, 0.3%, 0.5% and 1 % (m/v)) tested. It was also observed that the isolate *P. pentosaceus* P107 remained viable at all times, when the tolerance to simulated intestinal juice (pancreatin and pancreatin + 0.5% bile salts) was analyzed. Regarding tolerance to simulated gastric juice (pepsin and pepsin + whole milk), it was observed that, when the tolerance of the isolate against the addition of pepsin was analyzed, the isolate showed viability only at times of 0 h and 2 h. However, when the tolerance of the isolate against the addition of pepsin + milk was tested, the isolate showed similar viability at all times analyzed (0h, 2h and 4h), demonstrating that the food offered protection to the isolate, even after 4h of exposure. Still, the isolate showed absence of virulence for the analyzed tests. When the determination of the estimated population of BAL in yogurt was performed, a cell count reduction of approximately 1 log was observed after 32 days of storage. However, when analyzing the viability of the probiotic culture, an increase in concentration was observed when comparing the 1<sup>st</sup> and 32<sup>th</sup> days of storage (6 log.UFC/mL and 6.8 log.UFC/mL, respectively). As for the pH and acidity analyses, it was observed that the pH of the 32-day yoghurt presented a pH variation from 4.2 to 4.0. Likewise, when the acidity of yogurt was analyzed, consistency was observed between the samples when comparing days 1 and 32. Through the results obtained, it can be inferred that *P. pentosaceus* P107 has probiotic potential and in vitro safety aspects, conferring viability when tested under the conditions of the simulated GIT, and when added to the food matrix (yoghurt), the isolate remained viable and at adequate concentrations during yogurt

storage. Therefore, *P. pentosaceus* has potential for application in probiotic foods and functional yoghurt presents itself as a satisfactory vehicle for the incorporation of probiotic bacteria.

**Keywords:** Fermentation; lactic acid bacteria; yogurt; functional food.

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
2. Objetivo .....	15
3. Revisão de literatura.....	16
3.1. Bactérias ácido lácticas .....	17
3.2. <i>Pediococcus pentosaceus</i> .....	17
3.3. Probióticos.....	18
3.3.1 Sistema imune e probióticos .....	20
3.3.2 Resistência gastrintestinal e a colonização de patógenos.....	20
3.3.3 Probióticos e o alívio da constipação.....	20
3.3.4 Probióticos e a produção de vitamina e minerais.....	21
3.3.5 Probióticos e a relação com intolerância a lactose.....	21
3.4. Probióticos e aplicação em matriz alimentar.....	21
3.5. Produtos lácteos suplementados com probióticos.....	23
4. Materiais e Métodos.....	25
4.1 Bactérias.....	25
4.2 Caracterização do potencial probiótico <i>in vitro</i> .....	26
4.2.1 Tolerância a condições ácidas.....	26
4.2.2 Resistência aos sais biliares.....	26
4.2.3 Tolerância ao trato gastrintestinal de forma simulada.....	26
4.3 Fatores de virulência.....	27
4.3.1 Gelatinase.....	27
4.3.2 DNase.....	27
4.3.3 Atividade hemolítica.....	28
4.3.4 Avaliação da suscetibilidade e antimicrobianos.....	28
4.4 Caracterização da amostra.....	27
4.5 Produção de iogurte probiótico.....	28
4.5.1 Determinação da população estimada de bactérias ácido lácticas totais e viabilidade de culturas probióticas.....	30
4.5.1 Análise do pH e acidez do iogurte.....	31
4.5.2.1 pH.....	31
4.5.2.2 Acidez.....	31
5. Resultado e Discussão.....	32

5.1 Tolerância a condições ácidas.....	32
5.2 Resistência aos sais biliares.....	33
5.3 Tolerância ao trato gastrointestinal simulado.....	35
5.4 Fatores de virulência.....	36
5.4.1 Gelatinase.....	37
5.4.2 DNase.....	37
5.4.3 Atividade hemolítica.....	37
5.4.4 Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos.....	38
5.5 Iogurte probiótico.....	39
5.5.1 Determinação da população estimada de bactérias ácido lácticas e viabilidade da cultura probiótica.....	39
5.6 Análise pH e acidez do iogurte.....	42
6. Conclusão.....	44
7. Referências Bibliográficas.....	47

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a dieta da maioria da população, caracteriza-se por ser uma dieta ocidental, com baixo teor de fibras, alto consumo de gorduras e produtos ultra processados, características estas que elevam à proliferação de bactérias patogênicas na microbiota intestinal (JUMPERTZ et al., 2011). Em função disso, diversos produtos lácteos vêm sendo estudados para que possam atender às necessidades diárias de determinados micronutrientes, obtendo assim, uma alimentação mais saudável e natural. Entre os laticínios, incluem-se produtos como queijos, kefir, iogurtes e outros produtos fermentados (FERREIRA, 2003).

A maioria das bactérias probióticas pertence ao grupo de BAL. Estes micro-organismos são classificados como Gram-positivos, catalase negativa e, geralmente, seguros para o consumo (DORES; SILVA, 2017). Os probióticos são micro-organismos vivos que se administrados em quantidades suficientes, podem proporcionar benefícios ao hospedeiro (FAO, 2002). Após a ingestão, os probióticos necessitam sobreviver às condições adversas do trato gastrointestinal (TGI) como sais biliares, enzimas digestivas e suco gástrico, além de conservarem sua atividade metabólica e viabilidade até adesão ao trato intestinal, promovendo efeito benéfico ao hospedeiro (SAAD, 2006; ARAÚJO, 2007).

A crescente demanda por alimentos fermentados funcionais tem estimulado o desenvolvimento de novos produtos e a aplicação de bactérias ácido-láticas (BAL) com potencial probiótico tem sido vastamente estudada por cientistas de alimentos. Os produtos funcionais apresentam características como promoção de saúde e bem-estar, além da sua função de nutrir (MEIRA et al., 2012).

Entre as BAL com potencial probiótico, destaca-se *Pediococcus pentosaceus*, um micro-organismo presente na microbiota natural de mamíferos (FAO, 2002). Entretanto, este já foi isolado de vários produtos lácteos como leite iogurtes e queijos e, em produtos não lácteos, como por exemplo, produtos cárneos (principalmente embutidos), sorgo, pólen, fermentação de bambu, entre outros (VIDHYASAGAR; JEEVARATNAM, 2012; ELENA; MICHELA, 2013; BELHADJ et al., 2014).

*Pediococcus pentosaceus* tem como principal função promover a fermentação dos produtos alimentícios, favorecer a acidificação e consequente aumento da vida útil dos alimentos e agregar valor como cultura adjunta (probiótico). Desta forma, é empregado como cultura iniciadora no processo fermentativo de alguns produtos cárneos, como embutidos e produtos vegetais. A produção de outros metabólitos como peptídeos antimicrobianos que afetam a proliferação de micro-organismos deteriorantes e patogênicos, é uma das suas principais características, que fazem com que seja amplamente utilizado. Ainda, é aplicado como suplemento probiótico tanto para humanos como para animais (PAPAGIANNI e ANASTASIADOU, 2009; VIDHYASAGAR e JEEVARATNAM, 2012; PORTO et al., 2017; BORDINI, 2019).

Atualmente, o interesse no desenvolvimento de alimentos funcionais que contenham probióticos tem demonstrado grande potencial para promoção da saúde humana e estes, podem ser facilmente disponibilizados aos consumidores, incorporando-os em produtos lácteos, como o iogurte (AKIN; OZCAN, 2017; FULLER; GIBSON 1998). O iogurte é um alimento amplamente recomendando por conter propriedades nutricionais e sensoriais. É fonte de minerais como cálcio, fósforo, zinco e magnésio e rico em proteínas, contem baixo teor de gordura dependendo do tipo de leite com o qual é produzido (ROCHA et al., 2008).

A produção de iogurte ocorre através da fermentação do leite por meio do sinergismo entre as bactérias iniciadoras *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (SCHOINA et al., 2014), podendo ainda conter, culturas adjuntas com potencial probiótico (BRASIL, 2007).

Para serem consideradas como probióticos, os micro-organismos precisam responder a um extenso espectro de condições, tais como viabilidade e persistência no TGI, que começa com a sobrevivência à ação das enzimas salivares e do pH (MATTILA-SANDHOLM, 1998; MATTILA-SANDHOLM, 2002; SAAD, 2006), condições ácidas do estômago, aos sais biliares, as enzimas pancreáticas no intestino, as e, ainda, aderir ao hospedeiro e se multiplicarem (COOK et al., 2012; MARTÍN et al., 2015).

Segundo a FAO/WHO (FAO 2002; 2006), a recomendação de ingestão de probióticos para exercer um impacto benéfico à saúde é um mínimo de  $10^6$  –  $10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> por dia. De acordo com Agência Nacional de Vigilância Sanitária

(2017), a manutenção da viabilidade de bactérias probióticas deve se manter superior a  $10^8$  -  $10^9$  UFC até o consumo do alimento.

Em virtude do aumento da procura por alimentos mais saudáveis e atrativos, o consumidor tem exigido uma diversidade de produtos inovadores no mercado, para garantir que seus produtos sejam atrativos aos consumidores e garantir a comercialização, a indústria busca inovar com novos ingredientes, outros sabores e benéficos à saúde, principalmente quando se considera os alimentos funcionais (SOARES, 2017). A aplicação de novos isolados caracterizados com potencial probiótico, como *P. pentosaceus* P107, em matriz alimentar pode ser uma alternativa para o desenvolvimento de alimentos funcionais que atendam às necessidades do consumidor, de maneira viável e segura. Assim, uma série de informações como o comportamento destes micro-organismos em matrizes alimentícias, a influência destas na sobrevivência e no comportamento de micro-organismos em condições simuladas às condições gastrintestinais e seus efeitos potencialmente benéficos à saúde, ainda não foram completamente elucidados pela literatura.

Deste modo, ao utilizar uma matriz alimentar adequada (iogurte), possibilita-se o desenvolvimento e a viabilidade da bactéria probiótica em condições adversas do trato gastrintestinal e garante-se a proteção do micro-organismo para que alcance a mucosa intestinal e consiga colonizá-la. A ingestão constata deste micro-organismo irá promover efeitos benéficos à saúde do consumidor.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar as características probióticas e os aspectos de segurança do isolado *P. pentosaceus* P107, bem como passagem pelo TGI simulado e viabilidade durante armazenamento em iogurte funcional.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial probiótico de *P. pentosaceus* P107 *in vitro* por meio da resistência a ácidos, sais biliares e tolerância ao TGI;
- Avaliar os aspectos de segurança como gelatinase, DNase, hemolisina *in vitro*.
- Analisar a susceptibilidade aos principais antimicrobianos de uso clínico.
- Produzir iogurte suplementado com *P. pentosaceus* P107 (probiótico);
- Avaliar a viabilidade de *P. pentosaceus* P107 durante o armazenamento sob refrigeração do iogurte.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Bactérias ácido-lácticas

Bactérias ácido-lácticas pertencem a um grupo de 11 gêneros de bactérias Gram-positivas, sendo elas: *Propionibacterium*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella* (KAVITAKE et al., 2018), com características homofermentativa, oxidase-negativa e catalase negativa (KITAHARA, 1974; IVANOVA et al., 2013; SHUKLA e GOYAL, 2013; TEIXEIRA, 2018). Este grupo de bactérias ganham destaque em processos fermentativos por serem as culturas iniciadoras, capazes de produzirem ácidos orgânicos, sendo um dos seus principais produtos de fermentação do metabolismo de hidratos de carbono, o ácido láctico, como também por terem capacidade de formar aroma no produto (JAY, 2000). O ácido láctico tem como função prolongar a vida útil, aumentar os aspectos de segurança do produto final, além de promover melhoria às propriedades sensoriais do alimento (LEE et al., 2017; ROSOLEN, 2020).

A maioria das BAL são reconhecidas como micro-organismos seguros para o consumo humano e animal e, algumas, apresentam potencial probiótico, com inúmeras aplicações em alimentos, o que as torna muito atraentes para a produção de alimentos funcionais e para a indústria de alimentos (QUINTO et al., 2014).

Cepas probióticas provenientes de BAL são utilizadas para produção de laticínios, dentre os quais podemos citar iogurtes, leite fermentados, queijos e sobremesas com base láctea (RIVERA-ESPINOZA e GALLARDO-NAVARRO, 2010; SOCCOL et al., 2010; CASAROTTI e PENNA, 2015). Nestes alimentos se concentra a maior parte das aplicações de micro-organismos probióticos, pois há uma grande familiarização e aceitação do consumidor com laticínios os quais identificam como produtos que trazem benefícios à saúde por conterem micro-organismos vivos. Outro ponto a ser considerado é que o leite propicia um ambiente favorável para desenvolvimento e multiplicação destes micro-organismos, devido a elevada atividade de água e fonte nutricional, fazendo com que haja a fermentação do mesmo, promovendo melhorias na

digestibilidade e das características sensoriais dos derivados como textura, sabor e aroma (FELICIO et al., 2016; CHR-HANSEN, 2017).

Dentre o grupo das BAL, encontra-se *P. pentosaceus*, presente na microbiota de mamíferos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF THE UNITED NATIONS AND WHO WORKING GROUP, 2002; PORTO et al., 2017), entretanto, este já foi isolado em diversos produtos fermentados (queijos), não fermentados (leites) e principalmente em produtos cárneos, os quais apresentam diversas características bioquímicas e fisiológicas, conforme descrito a seguir.

### **3.2 *Pediococcus pentosaceus***

*Pediococcus pentosaceus* é um micro-organismo utilizado em diversos processos industriais associados a fermentação. Na sua utilização como probiótico, *P. pentosaceus* desempenha diversos benefícios como modulação da resposta imune do hospedeiro (JEEVARATNAM, 2012), redução dos níveis séricos de colesterol (PORTO et al., 2017), normalização da composição da microbiota intestinal e alta atividade antimicrobiana contra patógenos (PAPAGIANNI; ANASTASIADOU, 2009), isto porque, *P. pentosaceus* produz bacteriocinas, como a pediocina, a qual apresenta significativa atividade sobre as espécies patogênicas de *Listeria* sp. (BORDINI, 2019.)

*Pediococcus pentosaceus* é empregado como cultura iniciadora no processo fermentativo de alguns produtos cárneos, salames e produtos vegetais. A produção de outros metabólitos como peptídeos antimicrobianos que afetam a proliferação de micro-organismos deteriorantes e patogênicos, é uma das suas principais características, que fazem com que seja amplamente utilizado. Ainda, é aplicado como suplemento probiótico tanto para humanos como para animais (PAPAGIANNI e ANASTASIADOU, 2009; VIDHYASAGAR e JEEVARATNAM, 2012; PORTO et al., 2017; BORDINI 2019).

Existem diversos estudos que comprovam a competência do *P. pentosaceus* como probiótico e, este fato, deve-se a capacidade de se ligar às células epiteliais do intestino, como também em resistir a passagem gástrica e intestinal, demonstrando resultados benéficos por meio da avaliação de segurança quando aplicados em alimentos (VIDHYASAGAR e JEEVARATNAM, 2012; PORTO et al., 2017; WEBER, 2019).

De forma a disponibilizar aos consumidores alimentos contendo *P. pentosaceus* como probiótico, estudos científicos vêm sendo realizados com o intuito de observar sua viabilidade e segurança.

Um estudo realizado por Teixeira (2018) com *P. pentosaceus* demonstrou que o isolado manteve sua viabilidade sob armazenamento em refrigeração por até 30 dias, utilizando grãos de arroz como o suporte para imobilização, demonstrando característica vantajosa para aplicação em alimentos. Fernandes (2017) avaliou *in vitro* o potencial de segurança, probiótico e tecnológico de *P. pentosaceus* isolado de leite de ovelha, onde o isolado se manteve seguro quanto a sua utilização. Bordini (2019), utilizou a microencapsulação de *P. pentosaceus* P107 utilizando como material de parede soro de queijo, pectina e xantana e observou que a aplicação deste micro-organismo microencapsulado pode ser uma alternativa positiva para uso como probiótico.

### **3.3 Probióticos**

O termo probiótico foi utilizado primeiramente em 1965 por Lilly e Stillwell, os quais definiram como substâncias obtidas por meio da produção de micro-organismos que incitavam o crescimento de outras bactérias. Por meio deste, inúmeros estudos foram desenvolvidos com o objetivo de averiguar a ação probiótica de diferentes gêneros, bem como espécies. Fuller (1989), determinou que os probióticos são micro-organismos vivos que promovem benefícios como o equilíbrio da microbiota intestinal e saúde do hospedeiro. Anos mais tarde, Habenaar et al. (1992), completou a definição de Fuller (1989), definindo probióticos como uma ou várias culturas de bactérias que quando aplicadas em seres humanos ou em animais, auxiliam beneficemente o hospedeiro, promovendo melhora na microbiota endógena (KURITIZA, 2014).

Há muitas características desejáveis ao se escolher uma linhagem probiótica como a segurança (fatores de virulência, origem, patogenicidade, etc), critérios tecnológicos (viabilidade durante o armazenamento e o processamento, boa aceitabilidade sensorial, eficácia antagonista contra patógenos, etc), critérios funcionais (tolerância a presença e variações de acidez e a sais biliares, competência de adesão ao epitélio intestinal do hospedeiro, etc), e ainda, demonstrar resistência frente às condições do

sistema gastrointestinal (baixo pH do estômago, amilase da cavidade oral, secreções biliares e suco pancreático excretados na região duodenal) colonizando, desta forma, temporariamente o intestino (HERNANDEZ-HERNANDEZ et al., 2012; RITA, 2014).

A ação dos probióticos atualmente tem sido associada a diversos benefícios para a saúde, tais como redução da colonização de bactérias patogênicas, redução da inflamação intestinal, redução dos níveis de colesterol sanguíneos (CHOTIKO e SATHIVEL, 2016), efeito antagônico e imunológico, resultando em um aumento da resistência contra patógenos. Sendo assim, a utilização de culturas probióticas estimula o aumento de micro-organismos benéficos, diminuindo a proliferação de micro-organismos potencialmente prejudiciais à saúde, substanciando mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002). A maior parte da aplicação de probióticos em matriz alimentar é em produtos lácteos fermentados e em alguns produtos não lácteos, como por exemplo, suco de frutas e sorvetes (RIVERA ESPINOZA e GALLARDO NAVARO, 2010; PANGHAL et al., 2018).

Na literatura encontramos diversos benefícios oriundos da ingestão de probióticos relacionados à saúde humana. Alguns destes, estão descritos a seguir.

### **3.3.1 Sistema Imune e probióticos**

Atualmente sabe-se que existem algumas espécies de bactérias intestinais, como o *Bifidobacterium* e o *Lactobacillus* que estão ligados a melhora do sistema imunológico, devido à proliferação de células T, produção de interferon, ativação dos macrófagos e aumento da produção de anticorpos (LODDI et al., 2002). Segundo Jin et al. (1997) o gênero *Lactobacillus* pode ser significativo no progresso da imunocompetência, desempenhando assim proteção nas reações inflamatórias do intestino que são ocasionadas por patógenos.

### **3.3.2 Resistência gastrintestinal e a colonização de patógenos**

A presença de micro-organismos com propriedades probióticas no intestino tem significativa importância, pois apresentam efeito competitivo por meio da produção de compostos inibitórios, fazendo com que não ocorra a

proliferação de patógenos demonstrando um efeito protetor contra infecções gastrintestinais (GRANATO et al., 2012; UECKER, 2018). Os sítios de ligação da mucosa intestinal são ocupados por bactérias com efeito probiótico, conferindo assim, uma barreira física para defender a colonização de patógenos (FURLAN et al., 2004; UECKER, 2018). Loddi et al. (2002), relatam que esse bloqueio de ligação nos sítios da mucosa entérica, que ocorre pelas bactérias do intestino, diminui a área onde ocorre a interação no ceco pelos patógenos, sendo necessário aproximadamente 40 bactérias para que uma célula intestinal seja recoberta. Sendo assim, os patógenos seriam descartados por competição (LODDI et al., 2002).

### **3.3.3 Probióticos e o alívio da constipação**

Gotteland et al. (2010) realizaram um estudo clínico com homens e mulheres adultos, na faixa de 25 anos, os quais foram tratados com bebida láctea simbiótica como tratamento para a constipação, este estudo demonstrou resultados satisfatórios para o controle da constipação. Matsumoto et al. (2006) relata estudo semelhante, no qual observou redução da constipação em indivíduos adultos que consumiram diariamente leite fermentado suplementado com *Lactobacillus casei* durante um mês, por meio de análise dos movimentos intestinais, consistência fecal, frequência de defecação e histórico de constipação dos indivíduos. Entre as causas descobertas para a evolução da constipação dos indivíduos em ambos estudos foram aumento no número de bifidobactérias e de lactobacilos presentes no bolo fecal e aumento na frequência dos movimentos intestinais, aumentando a formação do bolo fecal, ocasionando, desta forma, um trânsito intestinal mais rápido.

### **3.3.4 Probióticos e a produção de vitaminas e minerais**

Uma microbiota intestinal em desequilíbrio provoca inúmeras perdas, como por exemplo, competição pelas vitaminas ingeridas via alimentação e diminuição da produção de vitaminas ocasionando a inativação de enzimas. Estas, então, não desempenham suas funções por completo, ocasionando uma produção de toxinas que destroem a mucosa do intestino, provocando uma redução na absorção dos minerais (ALMEIDA et al., 2009). A nutrição das bactérias probióticas ocorre parcialmente por meio da degradação pelas

enzimas adicionadas a dieta intencionalmente sendo o exemplo, os prebióticos, como também pela degradação das enzimas normais do sistema digestório (LODDI et al., 2002).

### **3.3.5. Probióticos e a relação com diminuição a alergias a proteínas alimentares e intolerância a lactose**

Os micro-organismos probióticos estão ligados à diminuição das alergias a proteínas alimentares, isso ocorre devido a indução da ruptura no TGI de proteínas com potencial alergênico (MORAIS e JACOB, 2006). Em indivíduos com intolerância a lactose os sintomas indesejados podem ser reduzidos com a introdução de probióticos, visto que estes digerem a lactose na luz intestinal, pelo fato de possuírem a enzima  $\beta$ -D-galactosidase, responsável pela degradação da lactose. Em indivíduos com intolerância a lactose, essa enzima está ausente ou em níveis muito baixo (UECKER, 2018). Desta forma, alguns dos efeitos da intolerância a lactose como, o desconforto abdominal e a diarreia osmótica pelo excesso de lactose, podem ser minimizados (SAAD, 2006). No estudo realizado por Fan et al. (2006), pacientes com sintomas da síndrome do intestino irritado, ingeriram pelo período de um ano, micro-organismos probióticos dos gêneros *Enterococcus*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e estes verificaram uma redução de 73% dos sintomas nos pacientes estudados.

### **3.4 Probióticos e aplicação em matriz alimentar**

Os alimentos probióticos estão sendo cada vez mais utilizados pela população, sendo conhecidos por suas propriedades funcionais, ou seja, alimentos que trazem benefícios ao consumidor além de suas funções básicas de nutrição. Os probióticos estão disponíveis em várias formas como produtos farmacêuticos, formulação para animais, produtos para confeitaria, produtos lácteos, cárneos e fermentados (FERREIRA, 2003).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) instituiu em 2021 o “Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos”. Este guia preconiza que a matriz alimentar utilizada, assim como a dose avaliada em estudos, deve ser compatível com a dose e os alimentos nos quais os probióticos serão adicionados.

Os micro-organismos probióticos conferem uma melhora no equilíbrio da microbiota intestinal dos indivíduos que fazem uso regularmente, pois devido a capacidade de se manterem viáveis no produto e sobreviverem à passagem pelo TGI, aderem-se assim no intestino e promovem seus efeitos benéficos (BEHRENS et al., 2001). A ingestão recomendável de alimentos probióticos no dia a dia é variável. Vinderola e Reinheimer (2000) descrevem que para que se obtenha um efeito benéfico desejado é necessária a ingestão entre  $10^8$  e  $10^{11}$  UFC.mL<sup>-1</sup> ou UFC.g<sup>-1</sup> variando entre a linhagem utilizada. Segundo Oliveira et al. (2002) para que os micro-organismos se mantenham viáveis, em quantidades apropriadas e desempenhem efeitos benéficos ao seu hospedeiro, a amostra mínima deve ser de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> ou UFC.g<sup>-1</sup> em uma área de ação específica, como intestino grosso ou intestino delgado. Já a Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO) recomenda um mínimo de  $10^6$  padronizar de alimento, diariamente (FAO, 2002).

Matrizes alimentares são representadas como sendo um fator definitivo para a atividade e a viabilidade de um micro-organismo. Toda cepa dispõe de alguma característica, tornando-se de suma importância o conhecimento de sua vida útil no produto, a começar pelo processo de produção até a finalização em seu período de armazenamento (PADILHA, 2013).

Existem fatores que podem afetar a sobrevivência dos probióticos em matrizes alimentares como a estirpe, matriz de entrega, etapas de fabricação, condições de armazenagem, etc (GOMAND et al., 2019); a sua alta sensibilidade à fatores ambientais como pH, acidez, concentrações, proteínas, temperatura, presença de oxigênio dissolvido, condições de estocagem, prática de inoculação, interações entre as espécies e a presença de substâncias inibidoras no meio (OLIVEIRA e DAMIN, 2003; RITA, 2014).

Assim, na aplicação da indústria de alimentos os atributos funcionais das proteínas têm suma importância, pois são intermoleculares, interfásicas e hidrofílicas fazendo com que haja interferência significativa na viabilidade dos micro-organismos, atuando como um agente microencapsulante e auxiliando na interação do micro-organismos com a matriz alimentar (VIEIRA, 2007).

### **3.5 Produtos lácteos suplementados com probióticos**

Muitas vantagens estão sendo atribuídas aos produtos alimentícios suplementados com probióticos e, algumas destas, são a recolonização da microbiota intestinal, quando houver o uso de antimicrobianos clínicos, possibilitando maior resistência gastrointestinal à ação de micro-organismos patógenos, devido à excreção de metabólitos antimicrobianos como o ácido acético, o ácido láctico e as bacteriocinas, contribuindo para a melhora do sistema imune, diminuição da intolerância a lactose e, ainda, promovendo redução nos níveis de colesterol sérico e pressão sanguínea arterial (FULLER, 1989; LEVRI et al., 2005; SULLIVAN; NORD, 2005; RITA, 2014).

A seleção de cepas que tenham como base a resistência a ácidos auxilia na aplicação probiótica e apresenta elevada sobrevivência, em produtos alimentares e em condições ambientais em que o hospedeiro se encontra. Produtos de origem alimentar como os laticínios auxiliam na sobrevivência dos probióticos ao suco gástrico, principalmente por ter efeito protetor e tamponante (ROSS, DESMOND, STANTON, 2005).

Entre as espécies e gêneros incluídos com potencial probiótico, ressalta-se as BAL e, dentre estas, o gênero *Lactobacillus*, representado pelas espécies *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei defensis* e *Lactococcus lactis* (BRASIL, 2018), tem sido vastamente utilizado na indústria alimentícia. Além dos *Lactobacillus*, outros micro-organismos estão sendo empregados na indústria alimentícia, especialmente na produção de queijos e na fermentação de leite ou outras matérias primas, como o caso de *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *Bifidobacterium lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium* (BRASIL, 2018).

Um estudo feito por Rocha (2020) avaliou o efeito conservador de um substância (tipo bacteriocina) produzido por *Pediococcus acidilactici* em suco de laranja, utilizando como micro-organismos indicadores a *Listeria monocytogenes* e a *Enterococcus faecium* e conclui que a substância tipo bacteriocina produzida pelo *Pediococcus acidilactici* tem potencial para ser aplicada na indústria alimentícia, principalmente em alimentos refrigerados, congelados e com pH ácido, uma vez que esta apresentou estabilidade às essas várias condições de armazenamento.

Machado (2007) descreve que as BAL, além de possuírem benefícios nos seus atributos sensoriais (sabor e textura), também são importantes devido ao aumento do seu valor nutritivo, sendo utilizadas como bioconservadores devido à produção de bacteriocinas. As BAL têm suma importância no ramo alimentício, devido a sua função como conservador biológico e por não formarem compostos indesejáveis durante sua degradação, desempenhando assim, uma função dupla, atuando como agentes fermentadores de alimentos, e promovendo efeitos benéficos à saúde do consumidor.

Alguns produtos fermentados com probióticos são bem conhecidos para a população, entre estes, o iogurte, um produto feito com culturas iniciadoras de BAL. Esse processo ocorre em um tempo mínimo de 4 a 5 h de incubação com temperaturas entre 40 a 44 °C, alterando a consistência do leite, devido a coagulação das proteínas. Quando o pH pretendido é alcançado, o leite coagulado passa para o resfriamento rápido, para que ocorra a interrupção da fermentação e mantido em refrigeração durante a vida útil do produto (VAN DE WATER, 2003).

É de suma importância que haja novos estudos de bactérias com o potencial probiótico para que assim possa se desenvolver novas alternativas para a melhora da saúde e da qualidade de vida da população, bem como para o fortalecimento do sistema imunológico, principalmente em tempos como estes que estamos passando.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Bactérias**

No experimento, foi utilizado o isolado *P. pentosaceus* P107, proveniente de presunto cozido fatiado (MARQUES, 2014), pertencente a coleção de bactérias probióticas e culturas iniciadoras do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) e as culturas iniciadoras comerciais: *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Chr. Hansen®).

## **4.2 Caracterização do potencial probiótico *in vitro***

### **4.2.1 Tolerância a condições ácidas**

A resistência de *P. pentosaceus* P107 sob diversas condições ácidas foi realizada de acordo com Erkkila & Petaja (2000), com algumas modificações. Este foi inoculado em caldo *De Man Rogosa and Sharpe* (MRS) a 37 °C por 24 h e, posteriormente inoculado em caldo MRS (pH 7) ajustado com ácido clorídrico (HCL) concentrado a pH 2, 3 e 4, sendo que o pH 7 foi utilizado como controle. Um mililitro (1 mL) da cultura foi adicionado aos tubos contendo 10 mL de caldo MRS acidificado. Após a exposição às condições ácidas por 0 h, 2 h e 4 h, diluições seriadas de cada tempo foram inoculadas em placas contendo ágar MRS e incubado à 37 °C por 24 h. Após este período, foi realizada a contagem da sobrevivência das células, a qual foi expressa como valores de log de Unidades Formadoras de Colônias por mL (log.UFC/mL). A porcentagem de sobrevivência foi calculada com a seguinte equação: % de sobrevivência: contagem final (log.UFC/mL) / controle (log.UFC/mL) x 100. O experimento foi realizado em triplicata.

### **4.2.2 Resistência aos sais biliares**

Após a incubação em caldo MRS à 37 °C por 24 h, células de *Pediococcus pentosaceus* P107 foram coletadas por centrifugação (10000 x g por 15 min à 4 °C) e a avaliação da resistência bacteriana aos sais biliares foi realizada utilizando 10 mL de caldo MRS, suplementado com uma mistura de colato de sódio e desoxicolato de sódio (Sigma) na proporção de 1:1, obtendo uma concentração final de 0,1 %, 0,3 %, 0,5 % e 1 % (m/v). A contagem de células viáveis foi determinada, quando expostas aos sais biliares por 0 h, 2 h, e 4 h de incubação, em placas contendo ágar MRS. Em cada período foram realizadas diluições seriadas das amostras e incubadas à 37 °C por 24 h. Os dados foram expressos como valores de log.UFC/mL (PERELMUTER et al., 2008). O experimento foi realizado em triplicata.

### **4.2.3 Tolerância ao trato gastrintestinal de forma simulada**

A avaliação de tolerância ao TGI foi avaliada de forma simulada conforme Huang & Adams (2004). Após 24 h de incubação a 37 °C, as células de *P. pentosaceus* P107 foram separadas por centrifugação (1200 x g por 5

min), lavadas duas vezes com tampão fosfato salina (0,85%) (PBS, Laborclin®) e ressuspendidas em solução salina a 0,5 %. Uma alíquota de 200 µl da suspensão celular foi ministrada a 0,3 mL de solução salina e 1 mL de suco gástrico ou intestinal simulado e incubados a 37 °C. A contagem de células viáveis foi realizada no tempo 0 h, 2 h e 4 h para a tolerância gástrica e para a determinação da tolerância ao trânsito no intestino delgado. O suco gástrico simulado consistiu em pepsina (3 mg.mL<sup>-1</sup>) e pH 2 com ou sem a adição de leite integral; enquanto o suco intestinal simulado foi composto por pancreatina (1mg.mL<sup>-1</sup>), pH 8 com ou sem adição de 0,5 % de sais biliares. O efeito da presença de um alimento na sobrevivência durante o trânsito gástrico em pH 2 foi avaliado da mesma forma, porém, substituindo a solução salina (0,85 %) por 0,3 mL de leite integral reconstituído a 10b % (m/v). A contagem do número de células viáveis durante a simulação pelo trato gástrico e pelo trato intestinal foi realizada nos tempos 0 h, 2 h e 4 h em placas de Petri contendo ágar MRS. Os dados serão expressos como valores de log.UFC/mL. O experimento foi realizado em triplicata.

### **4.3 Fatores de virulência**

#### *4.3.1 Gelatinase*

A detecção da produção de gelatinase foi realizada de acordo com Marra et al. (2007). *P. pentosaceus* P107 foi inoculado em tubos contendo 4 mL de caldo MRS com 12 % de gelatina por 48 h a 37 °C. Após a incubação, os tubos foram alocados em banho de gelo por 30 min, sem agitação. Foi utilizado como controle positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. O resultado foi interpretado como negativo: meio sólido ou, positivo: meio líquido. O experimento foi realizado em duplicata em dois experimentos independentes.

#### *4.3.2 DNase*

A atividade de DNase foi testada como descrito por Bannerman (2003), com adaptações, utilizando o ágar DNase (Oxoid, São Paulo, Brasil). *Pediococcus pentosaceus* P107 foi estriado diretamente na placa com o ágar DNase e incubados por 24 h à 37 °C. Após o tempo de incubação a placa foi coberta com ácido clorídrico 1 N por 3 min. A formação de halo claro em torno das colônias foi considerada indicativo de resultado positivo. Como controle

positivo foi utilizado *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. O experimento foi realizado em duplicata em dois experimentos independentes.

#### 4.3.3 Atividade hemolítica

*Pediococcus pentosaceus* P107 foi testado quanto a atividade hemolítica segundo Foulquié-Moreno et al. (2003), utilizando ágar Sangue (suplementado com 7 % v/v de sangue de cavalo) e incubado a 37 °C por 48 h. A interpretação do resultado foi feita da seguinte forma:  $\alpha$ -hemólise - linhagens que produziram zonas verdes em torno das colônias;  $\gamma$ -hemólise - não produziram qualquer efeito sobre as placas de ágar Sangue (sendo consideradas não hemolíticas). A presença de zona de lise ao redor das colônias foi classificada como hemolítica ( $\beta$ -hemólise). O experimento foi realizado em duplicata em dois experimentos independentes.

#### 4.3.4 Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos

A suscetibilidade a antimicrobianos foi avaliada pelo teste de difusão em ágar Müller-Hinton (MH, Oxoid®), realizado de acordo com as normas do documento M100-S22 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020). Após o cultivo em caldo MRS a 37 °C por 24 h, *P. pentosaceus* P107 foi adicionado em solução salina estéril (0,85 %) e mensurado espectrofotometricamente a  $0,150 \pm 0,02$  (Densidade Óptica – DO<sub>600nm</sub>). Em seguida, com o auxílio de *swab*, a cultura foi semeada em ágar MH e adicionado discos impregnados com diferentes tipos de antimicrobianos. Foram utilizados seis agentes antimicrobianos de uso clínico: clindamicina-2 µg (CLI), cloranfenicol-30 µg (CLO), Meropen-10 µg (MER), Eritromicina-15 µg (ERI), vancomicina-30 µg (VAN) e penicilina-10 µg (PEN) (Laborclin®). Após, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e os diâmetros das zonas de inibição foram mensurados utilizando-se paquímetro Digimes® e expressos em milímetros. O experimento foi realizado em quadruplicata.

#### 4.4 Caracterização da amostra

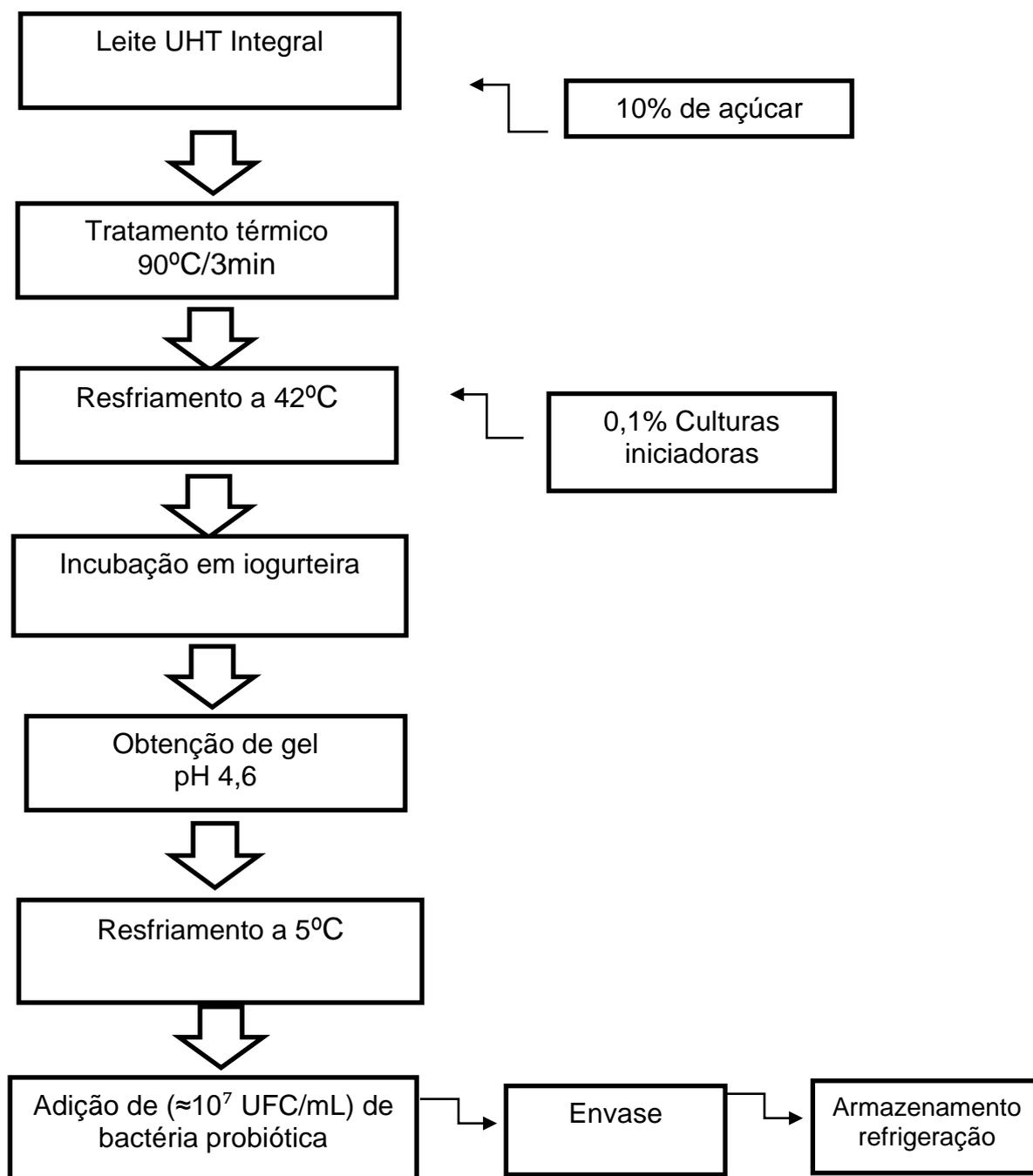
O presente estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia em Alimentos, Laboratório de Nutrigenômica e Laboratório de Técnica Dietética da Faculdade de Nutrição, da UFPEL, Campus Porto, Rio Grande do Sul. A

matéria-prima utilizada para a produção do iogurte foi o leite UHT integral (Elegê®) e açúcar (União®). Ambos foram adquiridos de um comércio local da cidade de Pelotas-RS, Brasil. Foram realizadas análises físico-químicas (acidez (°Dornic) e pH) e microbiológicas (viabilidade da cultura probiótica) que, por meio de testes preliminares, todo o processo do iogurte foi definido, assim como a quantidade dos componentes adicionados no mesmo. O iogurte foi analisado nos dias 0, 1, 7, 14, 28 e 32 dias de estocagem em refrigeração (período no qual foi estabelecido o tempo de armazenagem). As análises foram realizadas em triplicata.

#### **4.5 Produção de iogurte probiótico**

A elaboração do iogurte foi realizada em iogurteira com capacidade de 1 L. A base láctea utilizada para o experimento foi o leite UHT integral (Elege®) com adição de 10 % de açúcar (União®) e 0,1 % de mix de fermentos lácteos (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus*). A esta mistura foi aplicada tratamento térmico de 90 °C durante três minutos e, em seguida, promoveu-se seu resfriamento para 42 °C, temperatura ideal para adição das culturas iniciadoras do iogurte. Após a inoculação das culturas lácticas, procedeu-se a homogeneização do leite, seguido de repouso.

Durante o período de incubação foram realizadas coletas de amostra para o monitoramento do pH do iogurte, em intervalos de 30 minutos a partir da terceira hora de fermentação, até quando o mesmo atingiu o valor de 4,6 (pH final), sendo então a fermentação interrompida. Em seguida, o iogurte foi resfriado e, ao atingir a temperatura de 5 °C, realizou-se a quebra do coágulo, seguido da adição de bactéria probiótica P107 ( $\approx 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) e posterior armazenamento em temperatura de 2 a 6 °C (Figura 1).



**Figura 1.** Fluxograma da produção de iogurte.

#### 4.5.1 Análises microbiológicas do iogurte

##### 4.5.1.1 Determinação da população estimada de bactérias ácido-lácticas totais e viabilidade da cultura probiótica

A determinação da população estimada de *BAL* totais e de culturas probióticas foi realizada de acordo com a *International Dairy Federation* (1997) no tempo inicial (0) 1º, 7º, 14º, 28º e 32º dias de armazenamento do produto.

Um mililitro da amostra foi diluído em tubos contendo 9 mL de água peptonada 0,1 % (p/v), seguido de homogeneização em aparelho vortex. Em seguida, diluições seriadas foram feitas utilizando-se o mesmo diluente, até a obtenção da diluição desejada para inoculação nos meios seletivos.

Ágar MRS e ágar MRS suplementado com 0,02 % de Bile Bovina (BILE-MRS) (Sigma-Aldrich) foram preparados de acordo com a metodologia descrita por Zacarchenco (2004). Para a determinação da população total de BAL foi utilizada a técnica de semeadura em superfície (“*spread plate*”), inoculando-se 1 mL de amostra, referente às diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$ , diretamente sobre a superfície de placas contendo ágar MRS. Para a contagem da cultura probiótica, *P. pentosaceus* P107, foi utilizada a técnica de semeadura em superfície (“*spread plate*”), inoculando-se 1 mL de amostra, referente às diluições  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$ , diretamente sobre a superfície de placas contendo ágar BILE-MRS (0,02%). Em seguida, as amostras foram espalhadas com o auxílio da alça de drigalski até sua total absorção pelo meio. As placas contendo ágar MRS foram incubadas a 37 °C durante 48 h sob condições aeróbicas; já as placas contendo ágar BILE-MRS foram incubadas a 37 °C por 72 h em jarras de anaerobise. Os resultados obtidos foram expressos em log.UFC/mL.

## **4.5.2 Análises de pH e acidez do iogurte**

### **4.5.2.1 pH**

A determinação do valor do pH foi realizada em pHmetro digital AKI151-AKSO. As análises foram realizadas em triplicata nos tempos 1, 7, 14, 21, 28 e 32 dias de armazenamento do iogurte.

### **4.5.2.2 Acidez**

A partir de uma solução alcalina de concentração conhecida, foi realizada uma titulometria para determinar a acidez do produto, utilizando-se NaOH 0,1 N e fenolftaleína como indicador de viragem. Os resultados foram expressos em percentual de ácido láctico presente na amostra. As análises foram realizadas em triplicata a partir dos tempos 1, 7, 14, 21, 28 e 32 dias.

## 5. Resultados e Discussão

Os resultados das análises de tolerância ácida, sais biliares e tolerância ao TGI simulado do isolado *P. pentosaceus* P107 são descritos a seguir.

### 5.1 Tolerância a condições ácidas

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 1), observa-se que o isolado *P. pentosaceus* P107 apresentou viabilidade em todos os tratamentos e tempos testados, sendo que no tempo de 4 h além de se manter viável, demonstrou aumento de  $\pm 2$  log.UFC/mL. Este resultado demonstra que o isolado apresenta capacidade de sobrevivência em pH ácido, mesmo após 4 h de incubação em todos os pH testados, apresentando resistência a condição ácida estomacal simulada.

**Tabela 1.** Simulação das condições ácidas *in vitro* do isolado *Pediococcus pentosaceus* P107\*.

	Tolerância a ácidos		
	0 horas	2 horas	4 horas
	---- log.UFC/mL $\pm$ desvio padrão ----		
Controle	7,48 $\pm$ 0,12	7,48 $\pm$ 0,16	10,67 $\pm$ 0,09
pH2	7,30 $\pm$ 0,00	7,47 $\pm$ 0,09	10,41 $\pm$ 0,03
pH3	7,30 $\pm$ 0,00	7,48 $\pm$ 0,09	9,95 $\pm$ 0,25
pH4	7,30 $\pm$ 0,12	7,32 $\pm$ 0,05	10,67 $\pm$ 0,02

\*Resultados expressos em log.UFC/mL  $\pm$  desvio padrão.

A capacidade de sobreviver no ambiente no qual irá agir é essencial para a escolha de um micro-organismo probiótico (MARAGKOUKIS et al., 2006). Os micro-organismos precisam tolerar ao baixo pH do estômago, o qual apresenta uma variação de 2,5 a 3,5, mas que pode ser inferior a 1,5 durante o período de jejum ou 4,5 no período pós-prandial, para que estes consigam sobreviver e colonizar o intestino. Ressalta-se que, a natureza do alimento afeta o tempo de trânsito, sendo que os alimentos sólidos geralmente permanecem no estômago entre 2 h e 4 h (HUANG & ADAMS, 2004).

Diferente do encontrado no presente estudo, Fernandes (2017) evidenciou uma redução expressiva da concentração de culturas de *P. pentosaceus* em pH 3,0 e pH 5,0. Já no estudo realizado por Meira (2011) foi

avaliada a capacidade de sobrevivência de BAL isoladas de leite e queijos de ovelha, quando expostas às diferentes condições ácidas após 4 h de incubação. Foi observado que quando expostas as condições de pH 3,0 e pH 4,0 com até 4 h de incubação, as linhagens de *Lactobacillus* apresentaram resistência. Hwanhlem et al. (2010), encontrou resultados semelhantes, onde linhagens de *Lactobacillus* quando expostos a condições ácidas com pH entre 2,5 e 4,0 apresentaram viabilidade. Para Argyri e colaboradores (2013), os quais utilizaram cinco culturas de *Lactobacillus plantarum*, estes micro-organismos apresentaram resistência ao pH 2,5 após 3 h de incubação. Estes corroboram com os resultados encontrados no presente estudo.

Esses resultados demonstram que somente bactérias com potencial probiótico sobrevivem em pH baixo, fazendo com que seja uma característica de suma importância, pois o ácido do estômago humano apresenta valores de pH entre 0,9 e 3,0 na presença de alimentos, sendo um dos obstáculos que as bactérias encontram no TGI (ERKKILA & PETAJA, 2000). Devido a este fato, um micro-organismo probiótico deve sobreviver no mínimo 90 minutos quando exposto ao um pH 3,0 (BERNARDEAU; VERNOUX; GUEGUEN, 2001).

## 5.2 Resistência aos sais biliares

De acordo com os resultados apresentados (Tabela 2), observa-se que no tempo 0 h houve pequena variação logarítmica entre as concentrações testadas. Já nos tempos de 2 e 4 h pode-se observar que com o aumento do tempo, houve aumento da concentração do isolado, com exceção na concentração de 1% de sais biliares, provavelmente, demonstrando adaptação do isolado ao meio e, conseqüentemente, característica probiótica.

**Tabela 2.** Simulação da presença de sais biliares *in vitro* do isolado *Pediococcus pentosaceus* P107\*.

	Tolerância aos sais biliares		
	0 horas	2 horas	4 horas
	---- log.UFC/mL ± desvio padrão ----		
0,1%	7,90 ± 0,09	9,70 ± 0,24	10,69 ± 0,01
0,3%	7,48 ± 0,09	10,11 ± 0,10	10,25 ± 0,15
0,5%	7,48 ± 0,12	9,95 ± 0,09	10,20 ± 0,04
1,0%	7,30 ± 0,00	9,70 ± 0,24	9,70 ± 0,29
Controle	7,48 ± 0,12	7,48 ± 0,16	10,67 ± 0,09

\*Resultados expressos em log.UFC/mL  $\pm$  desvio padrão

A eliminação de bactérias patogênicas presentes no TGI, ocorre também pela presença dos sais biliares. Estes são capazes de solubilizar a membrana plasmática dos patogênicos, devido a sua ação de degradar substâncias lipídicas. Porém, este mecanismo não atinge somente as bactérias patogênicas, assim, os micro-organismos probióticos precisam, todavia, serem tolerantes a esses sais biliares, para que possam desempenhar no hospedeiro efeitos benéficos (BALLUS et al., 2010).

A enzima hidrolase de sais biliares (BSH) é sintetizada por alguns micro-organismos, esta possui capacidade de hidrolisar os sais biliares e diminuir o seu efeito como detergente (ERKKILA & PETAJA, 2000). As bactérias que sintetizam a enzima BSH são capazes de promover uma ação benéfica na diminuição dos níveis de colesterol circulante, pois com a desconjugação dos sais biliares no intestino, ocorre a redução da presença deste no intestino, provocando a produção de bile a partir do colesterol (REDONDO, 2008).

Segundo Begley et al. (2006), a bile é composta principalmente por sais biliares, estes possuem capacidade de desorganizar a estrutura das membranas celulares, fazendo com que sejam tóxicos às células vivas. Por meio deste, solubilizam os lipídeos, demonstrando ação antimicrobiana, dissolvendo a membrana bacteriana, sendo fundamentais no processo de digestão de gorduras.

No presente estudo houve, provavelmente uma adaptação de *P. pentosaceus* P107 às concentrações de sais biliares, já no estudo de Fernandes (2017) cepas de *P. pentosaceus* quando analisadas nas concentrações de 0,1 %; 0,3 %; 0,6 % e 1 % não ocorreu sua multiplicação nas 12 horas de experimento.

Um estudo realizado por Tavakoli et al. (2017), analisou isolados a partir de um queijo tradicional iraniano “*Koozeh Paneer*”, os quais apresentaram tolerância aos sais biliares, sendo que oito isolados se mantiveram viáveis nas concentrações de 0,3 e 0,5 %; seis isolados na concentração de 1,0 % e três isolados apresentaram resistência quando testados na concentração de 2,0 % de sais biliares.

Segundo Huang & Adams (2004), quando há resistência dos micro-organismos avaliados a concentração de sais biliares entre 0,1 e 0,3 % em a avaliação *in vitro* da passagem pelo intestino delgado, estes são considerados como potencialmente probióticos. Portanto, obteve-se ótimos resultados e comprovou-se que os outros micro-organismos avaliados, que também sobreviveram a menor concentração de sais biliares (0,1 %), dispõem da mesma forma, potencial para serem utilizados como probióticos.

### 5.3 Tolerância ao trato gastrointestinal simulado

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 3), pode-se observar que, o isolado *P. pentosaceus* P107, manteve-se viável em todos os tempos, quando analisada a tolerância ao suco intestinal simulado (pancreatina e pancreatina + 0,5 % sais biliares). Em relação a tolerância ao suco gástrico simulado (pepsina e pepsina + leite integral), observa-se que, quando analisada a tolerância do isolado frente a adição de pepsina, o isolado apresentou viabilidade apenas nos tempos de 0 h e 2 h. Porém, quando testada a tolerância do isolado frente a adição de pepsina + leite, o isolado apresentou viabilidade semelhante em todos os tempos analisados, demonstrando que o alimento ofereceu proteção ao isolado, mesmo após 4 h de exposição.

Huang et al. (2004), demonstraram que a adição de alimento, aumenta o pH, fazendo com que este, seja possivelmente um dos fatores que contribuem para o aumento da viabilidade de linhagens testadas. Quando tamponados por alimentos ou encapsuladas, as linhagens podem chegar ao intestino em alta concentração, demonstrando assim efeitos benéficos ao hospedeiro.

**Tabela 3.** Simulação das condições do trato gastrointestinal *in vitro* do isolado *Pediococcus pentosaceus* P107\*.

	Tolerância ao trato gastrointestinal simulado		
	0 horas	2 horas	4 horas
	---- log.UFC/mL ± desvio padrão ----		
Pancreatina pH 8 + sais biliares	8,20 ± 0,12	8,18 ± 0,14	8,46 ± 0,13
Pancreatina pH 8	8,18 ± 0,06	8,04 ± 0,52	8,18 ± 0,16
Pepsina pH 2	6,88 ± 0,03	5,60 ± 0,09	0,00 ± 0,00
Pepsina pH 2 + leite	7,53 ± 0,17	7,64 ± 0,14	7,59 ± 0,18

\*Resultados foram expressos em log.UFC/mL  $\pm$  desvio padrão.

No estudo de Silva (2016) foi avaliada a capacidade de resistência ao TGI de cepas de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei*, estas foram resistentes ao pH 2,0 e a ação de pepsina apenas no início da exposição, porém, ao final de 4 h não haviam células viáveis e, conseqüentemente, não foram resistentes a pancreatina.

Estudo realizado por Sehn (2015), avaliou a capacidade de sobrevivência ao suco gástrico simulado do isolado *Lactobacillus curvatus* (LC254), e observou que a linhagem não obteve capacidade de sobreviver ao suco gástrico simulado, quando em condições de pH 2,5 + 3 mg.mL<sup>-1</sup> de pepsina. Porém, quando exposto ao suco gástrico simulado inoculado juntamente com leite integral, o isolado se manteve viável entre 1 e 2 h, demonstrando assim o efeito protetor do alimento, permitindo a sobrevivência durante a passagem pelo estômago o que corrobora com o presente estudo.

É de suma importância que o alimento probiótico apresente um número de micro-organismos viáveis, sendo o mínimo de 10<sup>6</sup> a 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> ou g<sup>-1</sup> até o momento do consumo (FAO/WHO, 2002). Esses micro-organismos depois de ingeridos devem ter a capacidade de sobreviver às condições adversas do TGI, além de se manterem viáveis para exercerem assim efeitos benéficos como atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, melhoria no metabolismo da lactose, propriedades anticarcinogênicas, propriedades antidiarreicas, estimulação do sistema imune, melhoria da síndrome do intestino irritável e supressão de infecções causadas por *Helicobacter pylori* (TUOHY et al. 2003; SAAD, 2006; ARAÚJO, 2007).

#### **5.4 Fatores de virulência**

A virulência de micro-organismos deve ser investigada para que se possa preservar a segurança do consumo destes, via alimento, mesmo para o grupo de micro-organismo geralmente considerados seguros para o consumo (*status* GRAS), como no caso de BAL (FAO / WHO, 2002). Os resultados das análises de virulência para o isolado *P. pentosaceus* P107 estão descritos a seguir.

#### 5.4.1 Gelatinase

Observou-se que o isolado *P. pentosaceus* P107 apresentou atividade da gelatinase negativa. A gelatinase está associada à hidrólise de uma série de peptídeos biológicos, como por exemplo: gelatina, colágeno, hemoglobina e caseína (WANG et al., 2011).

Estudo de Fernandes (2017) utilizando *P. pentosaceus* evidenciou, assim como no presente estudo, atividade da gelatinase negativa. Estudo realizado por Moraes (2011) avaliou a atividade da gelatinase de BAL isoladas de amostras de queijo e de leite cru, constatando que dos 43 *Enterococcus spp.* avaliados, somente 11 demonstraram atividade de gelatinase. Mahasneh et al. (2015) estudaram 17 isolados de *Lactobacillus spp.* oriundos de produtos fermentados e com potencial probiótico e constataram que estes apresentaram atividade de gelatinase negativa. Resultados estes que corroboram com os dados encontrados no presente estudo.

#### 5.4.2 DNase

O isolado *P. pentosaceus* P107 apresentou atividade DNase negativa, resultado este de suma importância, levando em consideração que este fator de virulência é utilizado como um dos critérios para a seleção de micro-organismos utilizados em alimentos.

A DNase é capaz de degradar o ácido nucleico (DNA), por isso essa enzima permite que ocorra a infecção do hospedeiro (UECKER, 2018). Frequentemente, não se é observado esse fator de virulência em amostras derivadas de alimentos quando comparadas com amostras clínicas (BARBOSA et al., 2010). Pieniz et al. (2015) constataram DNase negativa para o isolado *Enterococcus faecium* LAB18s proveniente de queijo minas frescal. Em outro estudo Moraes (2011), analisou isolados de BAL de queijo e leite cru, observando resultado negativo para atividade de DNase. Estes resultados são semelhantes aos obtidos no presente estudo.

#### 5.4.3 Atividade hemolítica

Na análise de atividade hemolítica, o isolado foi considerado  $\gamma$ -hemólise, não produzindo qualquer efeito sobre as placas de ágar Sangue suplementado com sangue de cavalo (7%) (não hemolítico).

Fernandes (2017) em seu estudo utilizando *P. pentosaceus* isolados de leite de ovelha, evidenciou atividade hemolítica negativa para todos os isolados. Além disso, estudos utilizando outros gêneros de BALs apresentaram atividade negativa, como no estudo de Pieniz et al. (2015) os quais verificaram que o isolado *Enterococcus faecium* LAB18s proveniente de queijo minas frescal, não apresentou qualquer atividade hemolítica ( $\gamma$ -hemólise,  $\alpha$ -hemólise e / ou  $\beta$ -hemólise) após 48 h de incubação em placas de ágar Sangue suplementado com sangue de cavalo (7%). Já no estudo de Uecker (2018), foi encontrada atividade  $\alpha$ -hemólise, a qual é caracterizada por uma hemólise incompleta, sendo assim considerada não hemolítica. Contudo, esta falta de atividade hemolítica não demonstra que o isolado não possua potencial de virulência (BARBOSA et al., 2010).

#### 5.4.4 Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos

O isolado *P. pentosaceus* P107 apresentou sensibilidade frente a todos os antimicrobianos testados, de acordo com os padrões CLSI, conforme demonstrado na Tabela (4).

Ao testar *P. pentosaceus* isolados de leite de ovelha, Fernandes (2017) avaliou a suscetibilidade a antimicrobianos e observou resistência a oxaciclina, sulatrimetoprim e vancomicina e sensibilidade a cloranfenicol e tetraciclina. Pieniz et al. (2015) avaliaram o isolado *Enterococcus faecium* LAB18s proveniente de queijo minas frescal, onde o mesmo demonstrou sensibilidade para todos os antibióticos testados, comprovando assim, segurança quanto ao seu uso em alimentos.

**Tabela 4.** Suscetibilidade a antimicrobianos do isolado *Pediococcus pentosaceus* P107, de acordo com a classificação CLSI (2018). Os resultados foram expressos em mm  $\pm$  desvio padrão.

Antimicrobianos	Zona de inibição (mm)	Classificação CLSI (S*)
Eritromicina	19,32 $\pm$ 0,99	14-22
Penicilina	20,91 $\pm$ 1,26	$\geq$ 2
Cloranfenicol	25,00 $\pm$ 0,91	$\geq$ 16
Meropenen	29,16 $\pm$ 0,55	$\geq$ 16
Vancomicina	19,58 $\pm$ 0,35	$\geq$ 17
Clindamicina	24,66 $\pm$ 0,32	$\geq$ 8

\*Sensível

Em um estudo realizado por Schittler (2012) avaliou 16 isolados de *Enterococcus faecium* oriundo de leite *in natura* e constatou que 94% destes isolados demonstraram sensibilidade à ampicilina, 100% à vancomicina e 81% a tetracilina, antibióticos com grande destaque clínico. No estudo de Uecker (2018), no qual foram avaliadas BAL isoladas de produtos lácteos, os isolados apresentaram sensibilidade a penicilina, vancomicina e cloranfenicol como no presente estudo, porém alguns apresentaram resistência a meropenem. Segundo a FAO/WHOO (2006), a susceptibilidade antimicrobiana demonstrada por micro-organismos quando utilizados em alimentos é considerada um fator de grande importância, visto que está ligada diretamente à segurança dos alimentos e deve ser realizada a investigação quando se tem a intenção de utilizar novas linhagens como culturas probióticas e/ou iniciadoras. Novas linhagens de BAL podem demonstrar resistência frente aos diferentes tipos de antimicrobianos, carregando genes de resistência que podem ser transmitidos a outras bactérias e assim, elevando o potencial de virulência. Se presentes no alimento ou no intestino humano, essas bactérias podem disseminar estes genes de resistência ocasionando um risco para a saúde humana (GIRAFFA, 2002).

Embora no presente estudo *P. pentosaceus* P107 não tenha apresentado resistência a nenhum antimicrobiano, é importante ressaltar que em alguns casos, BAL probióticas podem apresentar resistência intrínseca a espécie como em *Lactobacillus* que apresentam resistência à vancomicina, sendo esta cromossômica, ou seja, não transferível a outras espécies (MORROW et al., 2012; ARGYRI et al., 2013).

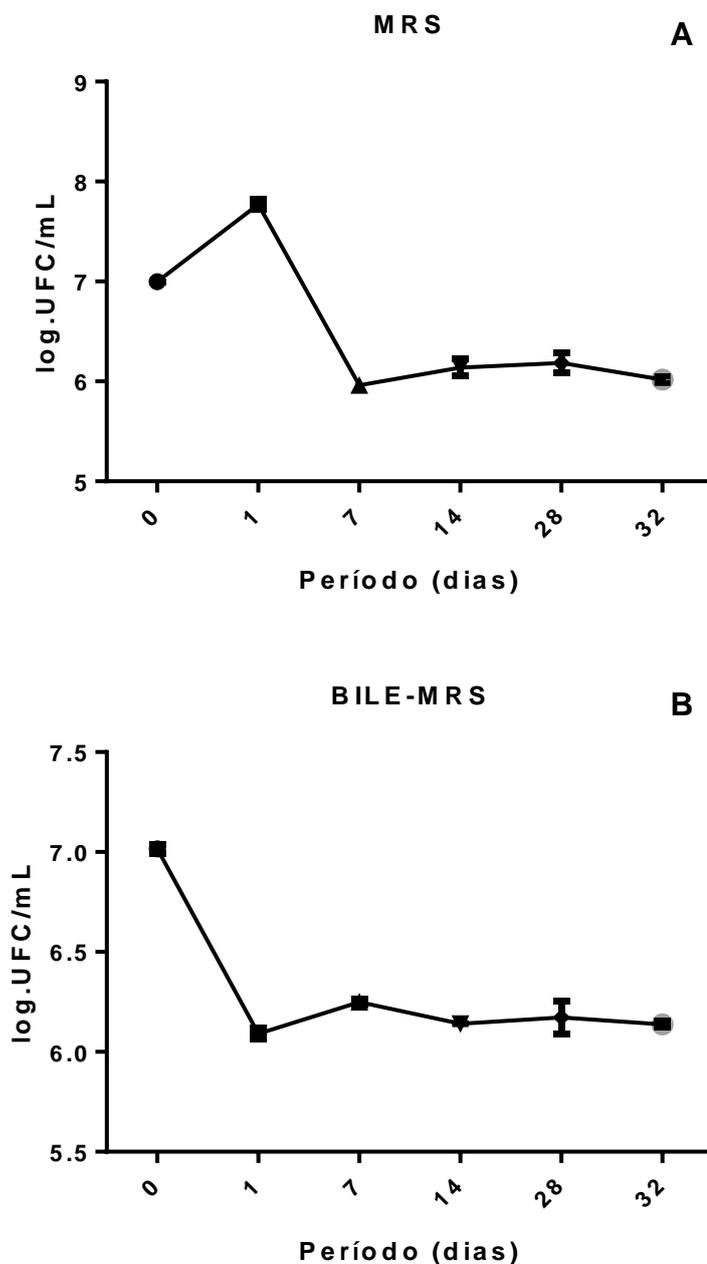
## **5.5 logurte probiótico**

### **5.5.1 Determinação da população estimada de bactérias ácido-lácticas e viabilidade da cultura probiótica**

A população de BAL viável total foi determinada em ágar MRS, após 48 h, sob condições aeróbicas (Figura 2). A contagem total de BAL em ágar MRS (controle) no tempo inicial (dia 0) foi de  $10^7$  log.UFC/mL e esta apresentou redução de aproximadamente 1 log após 32 dias de armazenamento do produto ( $6,5 \times 10$  log.UFC/mL) (Figura 2A). Da mesma

forma, quando analisada a viabilidade da cultura probiótica em ágar BILE-MRS, observou-se redução de aproximadamente 1 log após 32 dias de armazenamento do produto ( $6,1 \times 10^8$  log.UFC/mL) (Figura 2B).

A viabilidade de micro-organismos probióticos encontrados em iogurtes depende de diversos fatores tais como, as culturas iniciadoras utilizadas, as bactérias probióticas incorporadas, interação entre as espécies presentes, tempo de fermentação, condições da cultura e de armazenamento, concentração de açúcar (pressão osmótica), pH do iogurte (pós-acidificação durante o armazenamento), disponibilidade de nutrientes, teor de sólidos do leite, entre outros (KAILASAPATHY et al., 2008). Um estudo feito por Lankaputhra et al. (1996) demonstrou que iogurtes com o pH abaixo de 4,3 influenciam na viabilidade de bactérias probióticas, como por exemplo, as bifidobactérias que são sensíveis ao pH de sucos de frutas (onde os pH estão entre 3,0 e 4,0). Contudo, os alimentos que possuem na sua natureza ácidos orgânicos presentes, fazem com que haja desenvolvimento negativo dos probióticos. Kailasapathy et al. (2008), analisaram a adição de manga (5 g em 100 g) em iogurtes probióticos, no entanto, não constataram uma redução da viabilidade destes micro-organismos, isso pode ter ocorrido pela menor concentração da adição da fruta no iogurte.



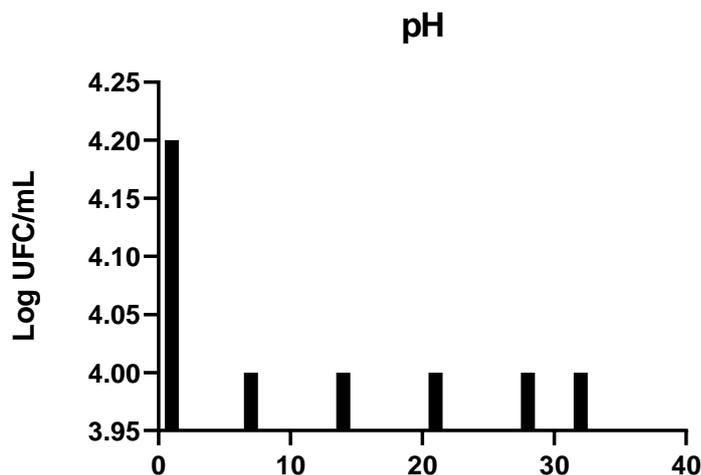
**Figura 2.** Contagem total de bactérias ácido-lácticas (A) em ágar MRS e da cultura probiótica (B) em ágar BILE-MRS presentes na amostra de iogurte suplementado com *Pediococcus pentosaceus* P107. Os dados foram expressos em log.UFC/mL.

Gallina et al. (2011), observaram contagens de bifidobactérias de 6 log.UFC/mL em iogurte probiótico adicionado de frutooligossacarídeo (FOS) ao longo de 28 dias de armazenamento refrigerado. Outro estudo feito por Gallina

et al. (2012) verificaram que a viabilidade da cultura probiótica de uma bebida elaborada com uma mistura (50/50%) de polpa de goiaba e de leite fermentado (com cultura de iogurte e biofidobactérias), com e sem a adição de FOS, manteve-se com valores entre  $10^6$  e  $10^7$  log.UFC/mL, no decorrer de 30 dias de armazenamento refrigerado, apesar de não apresentar acidez satisfatória (pH 4,4). Diversos autores sugerem uma dose mínima diária da cultura probiótica considerada terapêutica, de  $10^8$  a  $10^9$  UFC, o que equivale ao consumo de 100 g de produto contendo  $10^6$  a  $10^7$  UFC/g (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001; KAILASAPATHY et al. 2008; DIAS et al., 2013; KAUR et al., 2014). Nesse estudo, após aplicação em matriz alimentar, foi obtida a concentração mínima considerada terapêutica de micro-organismos probióticos.

### 5.6 Análises pH e acidez do iogurte

O pH do iogurte foi analisado nos dias 1, 7, 14, 21, 28 e 32 (Figura 3). Por meio dos resultados obtidos observou-se que o pH teve alteração ao longo dos 32 dias, apresentando uma variação de pH 4,0 a 4,2, mesmo assim, estando dentro da faixa (3,5 a 4,6) aceitável pela legislação brasileira vigente (BRASIL, 2007).



**Figura 3.** Valores de pH de amostras de iogurte suplementado com *Pediococcus pentosaceus* P107 durante 32 dias. Os dados foram expressos em log.UFC/mL.

Os iogurtes estão sujeitos ao decréscimo de pH e aumento da acidez durante a estocagem refrigerada, isso ocorre devido à alta atividade das bactérias durante a estocagem do produto. Gallina et al. (2011) encontrou valores de pH similares em leites fermentados, com e sem adição de probióticos e prebióticos, sendo estes 4,31 a 4,33 (pH inicial) e 4,05 a 4,12 (pH final). O pH é um fator fortemente ligado à viabilidade dos micro-organismos e da acidez. O seu valor acarreta na atividade metabólica das bactérias, sendo capaz de favorecer um determinado grupo em desfavor de outro. Em fermentações como no iogurte, bactérias do gênero *Lactobacillus* toleram e crescem em valores de pH menores do que as que pertencem ao gênero *Streptococcus* (RODAS et al., 2001). Akalin et al. (2004) encontraram valores de pH inicial entre 4,51 e 4,48 para iogurtes distintos. Kailasapathy et al. (2008) verificaram valores médios de pH entre 4,62 e 4,68 em iogurtes naturais e em iogurte com frutas.

Com a finalidade de acompanhar a acidez do produto e seus efeitos sobre os atributos de qualidade do iogurte, procedeu-se a titulação de amostras de iogurte, uma vez que a acidez é um dos fatores que limita uma maior aceitação do produto. Quanto a análise de acidez do iogurte observou-se pequena variabilidade na porcentagem de ácido láctico entre as amostras quando comparados os dias 1 e 32 (Tabela 5). Em termos gerais, os resultados obtidos pela análise de acidez foi em torno de 0,70 %, resultado este satisfatório, visto que o desejável é o iogurte apresentar uma acidez em torno de 0,70 - 0,72 % de ácido láctico (TAMIME & ROBINSON, 1991). Segundo a Norma FIL 150 (1991), os iogurtes deverão cumprir os requisitos físico-químicos para acidez (g de ácido láctico/100 g) entre 0,6 a 1,5.

**Tabela 5.** Valores de acidez de iogurte suplementado com *Pediococcus pentosaceus* P107 durante 32 dias. Os dados foram expressos em % de ácido láctico  $\pm$  desvio padrão.

<b>Acidez</b>	
<b>Dia</b>	---- % de ácido láctico ----
1	0,76 $\pm$ 0,00
7	0,80 $\pm$ 0,01
14	0,65 $\pm$ 0,19
21	0,70 $\pm$ 0,14
28	0,71 $\pm$ 0,12

Giese et al. (2010), destacam que mesmo que a acidez em certo grau seja apetecível no iogurte, a super acidificação do produto não o é, visto que conduz à deterioração da sua consistência e viscosidade e também a separação do soro. Segundo Figueredo & Porto (2002), uma alta acidez é resultante da acidificação do leite que ocorre pelo desdobramento da lactose, oriunda da ação microbiológica. Esta tende a elevar significativamente se o iogurte não for devidamente refrigerado e manipulado. Salinas (1986) comprova isto, quando ao verificar a qualidade de iogurtes, demonstrou que o aumento da acidez titulável é diretamente proporcional ao tempo de armazenamento.

O decréscimo do pH durante a estocagem refrigerada devido à atividade metabólica persistente da BAL faz com que ocorra uma pós-acidificação no produto final. Essa pós-acidificação é mais acentuada na primeira semana de produção do iogurte devido a produção de ácido láctico, a alta atividade metabólica da bactéria no período (BEAL et al., 1999).

Giese et al. (2010) observaram diferença significativa em iogurtes com relação a acidez (entre 0,835 e 1,069 g de ácido láctico/100g), porém essas matrizes analisadas não tiveram diferença com relação ao pH (entre 3,83 e 4,01). Contudo, Moreira et al. (1999), ao avaliar três lotes de quatro marcas comerciais de iogurtes, constatou que os resultados para acidez encontrados (entre 0,57 e 1,20 g de ácido láctico/100g) não foram contínuos nas diversas amostras, devido aos lotes de fabricação, no entanto, estes estavam dentro dos valores preconizados.

## 6. Conclusão

O isolado *P. pentosaceus* P107 apresentou potencial probiótico e aspectos de segurança quando analisado *in vitro* e, quando adicionado à matriz alimentar, o isolado se manteve viável e em concentrações adequadas durante o armazenamento do iogurte.

Desta forma, os resultados apresentados nos permitem concluir que o iogurte se apresenta como um veículo satisfatório para a incorporação de bactéria probiótica garantindo a viabilidade de *P. pentosaceus* P107, durante o

armazenamento sob refrigeração, em concentrações estabelecidas pela legislação. Assim, este estudo poderá contribuir com o desenvolvimento de novos produtos funcionais, pois o iogurte suplementado com *P. pentosaceus* P107, apresenta potencial para uso na indústria alimentícia.

## REFERÊNCIAS

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Gerência-Geral de Alimentos. Probióticos: Construção da Lista de Linhagens Probióticas, abril de 2017.
- AMES, Camila Waschburger. **Lactobacillus casei CSL3: imobilização celular em aveia e aplicação como cultura probiótica na produção de iogurte**. 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.
- AKALIN, Ayşe Sibel; FENDERYA, Serap; AKBULUT, Necati. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. **International journal of food science & technology**, v. 39, n. 6, p. 613-621, 2004.
- AKIN, Zeynep; OZCAN, Tulay. Functional properties of fermented milk produced with plant proteins. **LWT**, v. 86, p. 25-30, 2017.
- ARAÚJO, Emiliane Andrade. **Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de *Lactobacillus delbreuckii* UFV H2b20 e de inulina**. 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.
- ARGYRI A. A.; ZOUMPOPOULOU, G.; KARATZAS, K. G; TSAKALIDOU, E.; NYCHAS, G. E.; PANAGOUE, E. Z.; TASSOU, C. C. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. **Food Microbiology** v.33, p.282- 291,2013.
- ALMEIDA, L. B.; MARINHO, C. B.; SOUZA, C. S.; CHEIB, V. B. P. Disbiose intestinal. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 24, n. 1, p. 58-65, 2009.
- BALLUS, Cristiano Augusto et al. Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: revisão. **Boletim CEPPA**, v. 28, n. 1, p. 85-96, 2010.
- BARBOSA, J.; GIBBS, P. A.; TEIXEIRA, P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. **Food Control**, v. 21, n. 5, p. 651-656, 2010.
- BEAL, C. et al. Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. **Journal of dairy science**, v. 82, n. 4, p. 673-681, 1999.
- BEGLEY, Máire; HILL, Colin; GAHAN, Cormac GM. Bile salt hydrolase activity in probiotics. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1729-1738, 2006.
- BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J. P.; GUEGUEN, M. Probiotic properties of two *Lactobacillus* strains in vitro. **Milchwissenschaft**, v. 56, n. 12, p. 663-667, 2001.

BORDINI, Fernanda Weber. **Microencapsulação de *Pediococcus pentosaceus* P107 pela técnica de spray drying utilizando como material de parede soro de queijo, pectina e xantana**. 2019. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa agropecuária. Departamento de inspeção de produtos de origem animal. Instrução Normativa n. 46, de 23 de outubro de 2007b. *Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de Leites Fermentados*. **Diário Oficial da União**, p. 5, 24/10/2007.

BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 104, n. 4, p. 467–483, 2011.

CASAROTTI, Sabrina Neves; PENNA, Ana Lúcia Barretto. Acidification profile, probiotic in vitro gastrointestinal tolerance and viability in fermented milk with fruit flours. **International Dairy Journal**, v. 41, p. 1-6, 2015.

CARR, Frank J.; CHILL, Don; MAIDA, Nino. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical reviews in microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CHATEAU, N.; DESCHAMPS, A. M.; SASSI, A. Hadj. Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. **Letters in Applied Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 42-44, 1994.

CHOTIKO, Arranee; SATHIVEL, Subramaniam. Three protective agents for pectin-rice bran capsules for encapsulating *Lactobacillus plantarum*. **Food bioscience**, v. 16, p. 56-65, 2016.

Chr-Hansen. Probióticos. Acesso em: 02 de abril de 2020. Disponível em: <https://www.chr-hansen.com/pt>

CUNHA, Charlene Carvalho da. **Caracterização de *Enterococcus durans* LAB18se *Lactococcus lactis* subsp *lactis*R7 isolados de queijos**. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

DIAS, Mônica de Lucena Lira Aguiar et al. Physicochemical, sensory, and microbiological evaluation and development of symbiotic fermented drink. **Food Science and Technology**, v. 33, p. 805-811, 2013.

DORES, M. T.; SILVA, C. R. Evaluation of pre-inoculation aeration conditions used in the cultivation of lactic acid bacteria in liquid medium. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 03, p. 835-840, 2017.

ECKERT, Camila. **Bactérias lácticas: avaliação da resistência ao trato gastrointestinal simulado e encapsulamento com soros lácteos**. 2017. Dissertação de Mestrado.

ERKKILÄ, S.; PETÄJÄ, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat science**, v. 55, n. 3, p. 297-300, 2000.

FAN, Yu-jing et al. A probiotic treatment containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Enterococcus* improves IBS symptoms in an open label trial. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 7, n. 12, p. 987-991, 2006.

FAO / WHO. Orientações para a avaliação de probióticos na alimentação. London, 2002. 11 p.

FELICIO, T. L. et al. Physico-chemical changes during storage and sensory acceptance of low sodium probiotic Minas cheese added with arginine. **Food Chemistry**, v. 196, p. 628-637, 2016.

FERNANDES, Mayara Leal. **AVALIAÇÃO IN VITRO DO POTENCIAL DE SEGURANÇA, PROBIÓTICO E TECNOLÓGICO DE PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS ISOLADO DE LEITE DE OVELHAS**. 2017. Dissertação mestrado.

FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de bactérias lácticas caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa: Célia LLF Ferreira, 2003.

FIGUEIREDO, M. G.; PORTO, Ernani. Avaliação do impacto da qualidade da matéria-prima no processamento industrial do iogurte natural. **Rev Ind Latic**, v. 7, n. 42, p. 76-80, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF THE UNITED NATIONS AND WHO WORKING GROUP. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. [s. l.], p. 1–11, 2002.

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

FULLER, Roy; GIBSON, Glenn R. Probiotics and prebiotics: microflora management for improved gut health. **Clinical microbiology and infection**, v. 4, n. 9, p. 477-480, 1998.

FURLAN, Renato Luis; MACARI, Marcos; LUQUETTI, Brenda Carla. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. **Simpósio técnico de incubação, matrizes de corte e nutrição**, v. 5, p. 6-28, 2004.

FRANZ, Charles MAP et al. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. **Applied and environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p. 4385-4389, 2001.

GALLINA, Darlila Aparecida et al. Caracterização de leites fermentados com e sem adição de probióticos e prebióticos e avaliação da viabilidade de bactérias

láticas e probióticas durante a vida-de-prateleira. **Journal of health sciences**, v. 13, n. 4, 2011.

GALLINA, Darlila A. et al. Caracterização de bebida obtida a partir de leite fermentado simbiótico adicionado de polpa de goiaba e avaliação da viabilidade das bifidobactérias. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 386, p. 45-54, 2012.

GIESE, Simone et al. Caracterização físico-química e sensorial de iogurtes comercializados na região Oeste do Paraná. **Varia Scientia Agrárias**, v. 1, n. 1, p. 121-129, 2010.

GIRAFFA, Giorgio. Enterococci from foods. **FEMS microbiology reviews**, v. 26, n. 2, p. 163-171, 2002.

GOMAND, F. et al. Food matrix design for effective lactic acid bacteria delivery. **Annual review of food science and technology**, v. 10, p. 285-310, 2019.

GOTTELAND, M.; VIZCARRA, M.; MAURY, E. Efecto de un producto lácteo con probióticos y prebióticos sobre la función digestiva de sujetos sanos y constipados. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 37, n. 3, p. 340-351, 2010.

GRANATO, D.; MASSON, M. L.; RIBEIRO, J. C. B. Sensory acceptability and physical stability evaluation of a prebiotic soy-based dessert developed with passion fruit juice. **Ciência de Tecnologia em Alimentos**, Campinas, v. 32, n.1, p. 119-125, 2012.

HAVENAAR, Robert et al. Selection of strains for probiotic use. In: **Probiotics**. Springer, Dordrecht, 1992. p. 209-224.

HWANHLEM, Noraphat et al. Probiotic lactic acid bacteria from Kung-Som: isolation, screening, inhibition of pathogenic bacteria. **International journal of food science & technology**, v. 45, n. 3, p. 594-601, 2010.

HUANG, Yang; ADAMS, Michelle C. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 253-260, 2004.

IVANOVA, I. et al. Food or medicine? Future of lactic acid bacteria. \_\_\_\_\_. **Lactic acid bacteria-Most important genreses. Sofia University: Diagalprint Printing House**, p. 26-30, 2013.

JIN, L.Z.; HO, T.W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN. Probiotics in poultry: modes of action. **World's Poultry Science Journal**, v.53, p.351-368, 1997.

KAILASAPATHY, Kasipathy; HARMSTORF, I.; PHILLIPS, Michael. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 7, p. 1317-1322, 2008.

KAUR, A. et al. Probiotics and its health benefits. **Journal of Global Biosciences**, v. 3, n. 3, p. 686-693, 2014.

KITAHARA, K. *Pediococcus balcke* 1884. Bergey's manual of determinate bacteriology 1974.

KLU, Y. A. K.; CHEN, J. Effect of peanut butter matrices on the fate of probiotics during simulated gastrointestinal passage. *Lwt - Food Science And Technology*, Georgia, v. 62, n. 2, p.983-988, jul. 2015.

KURITZA, Leandro Nagae; WESTPHAL, Patrick; SANTIN, Elizabeth. Probiotics on poultry production. **Ciência Rural**, v. 44, n. 8, p. 1457-1465, 2014

LANKAPUTHRA, WE V.; SHAH, N. P.; BRITZ, M. L. Evaluation of media for selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species. **Food Australia**, v. 48, n. 3, p. 113-118, 1996.

LEE, H. Y. et al. Synthesis of conjugated linoleic acid by the linoleate isomerase complex in food-derived lactobacilli B. **Guide to Advanced Empirical Software Engineering**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 125301, 2017.

LILLY, Daniel M.; STILLWELL, Rosalie H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-748, 1965.

LODDI, M. M. et al. LDG Mannan oligosaccharide and organic acids on intestinal morphology integrity of broilers evaluated by scanning electron microscopy. **Proceedings of 11th European Poult. Sci**, 2002.

LOURENS-HATTINGH, Analie; VILJOEN, Bennie C. Yogurt as probiotic carrier food. **International dairy journal**, v. 11, n. 1-2, p. 1-17, 2001.

MAHASNEH, Adel M.; HAMDAN, Sarah; MAHASNEH, Sari A. Probiotic properties of *Lactobacillus* species isolated from local traditional fermented products. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 147, n. 3427, p. 1-7, 2015.

MARAGKOUDAKIS, Petros A. et al. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 3, p. 189-199, 2006.

MARCIAL-COBA, Martín Sebastián; KNØCHEL, Susanne; NIELSEN, Dennis Sandris. Low-moisture food matrices as probiotic carriers. **FEMS microbiology letters**, v. 366, n. Supplement\_1, p. i49-i59, 2019.

MARQUES, Juliana de Lima. **Caracterização fenotípica e molecular de bactérias ácido lácticas isoladas de presunto cozido e verificação do**

**potencial tecnológico e bacteriocinogênico contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.** 2014. Dissertação de Mestrado - Ciência e tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

MATSUMOTO, Kazumasa et al. The effects of a probiotic milk product containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the defecation frequency and the intestinal microflora of sub-optimal health state volunteers: a randomized placebo-controlled cross-over study. **Bioscience and Microflora**, v. 25, n. 2, p. 39-48, 2006.

MEIRA, Stela Maris Meister et al. Probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from Brazilian regional ovine cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 79, n. 1, p. 119-127, 2012.

MEIRA, Stela Maris Meiste. Potencial probiótico de bactérias lácticas e atividades biológicas de leite e queijos de ovelha. 2011.

MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. S289-S196, 2006.

MORAES, Paula Mendonça. Identificação molecular de bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru e queijo, e pesquisa de genes de bacteriocinas. 2011.

MORROW, L. E.; GOGINENI, V.; MALESKER, M. A. Probiotics in the intensive care unit. **Nutr. Clin. Pract.** V.27, n.2, p.235-241, 2012.

MOREIRA, Silvia Regina et al. Análise microbiológica e química de iogurtes comercializados em Lavras-MG. **Food Science and Technology**, v. 19, p. 147-152, 1999.

NORMA, F. I. L. 166 A: 1987. Contenido de Materia Grasa. Norma FL 151: 1991. Yogur. Extrato Seco. Norma FIL 150: 1991. **Yogur. Acidez. Norma FIL**, v. 163, 1992.

PANGHAL, Anil et al. Potential non-dairy probiotic products-A healthy approach. **Food bioscience**, v. 21, p. 80-89, 2018.

PAPAGIANNI, Maria; ANASTASIADOU, Sofia. Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. **Microbial cell factories**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2009.

PIENIZ, Simone et al. Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect. **Food Control**, v. 51, p. 49-54, 2015.

PORTO, Maria Carolina W. et al. *Pediococcus* spp.: an important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 3, p. 361-374, 2017.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMANCALEDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science & Technology**, v.13, p.3-11, 2002.

QUINTO, Emiliano J. et al. Probiotic lactic acid bacteria: a review. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, n. 18, p. 1765, 2014.

REDONDO, Nadia Cristina. Avaliação in vitro de características probióticas do enterococcus faecium CRL 183 e do Lactobacillus helveticus ssp jugurti 416. 2008.

RENYE JR, John A. et al. Characterization of antilisterial bacteriocins produced by Enterococcus faecium and Enterococcus durans isolates from Hispanic-style cheeses. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 261, 2009.

RITA, Fernanda. **Influência da composição da matriz alimentar na viabilidade do Lactobacillus acidophilus La-5 em sobremesa de soja aerada simbiótica**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

RIVERA-ESPINOZA, Yadira; GALLARDO-NAVARRO, Yoja. Non-dairy probiotic products. **Food microbiology**, v. 27, n. 1, p. 1-11, 2010.

ROCHA, Cleonice et al. Elaboração e avaliação de iogurte sabor frutos do cerrado. **Boletim do CEPPA**, v. 26, n. 2, p. 255-266, 2008.

ROCHA, Isabela Poletto Masselli. Avaliação do efeito conservador de substância tipo bacteriocina produzido por *Pediococcus acidilactici* em suco de laranja. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP, 2020

RODAS, Maria Auxiliadora de Brito et al. Caracterização físico-química, histológica e viabilidade de bactérias lácticas em iogurtes com frutas. **Food Science and Technology**, v. 21, p. 304-309, 2001.

ROSOLEN, Michele Dutra. **Desenvolvimento de microcápsula simbiótica de liberação controlada e alta resistência térmica aplicada em diferentes matrizes alimentares**. 2020. [Ciência e Tecnologia de Alimentos]. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pelotas.

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

SALINAS, R. J. Hygiene quality of commercial yoghurts. **Alimentaria**, v. 178, n. 15, p. 27-30, 1986.

SCHOINA, Vasiliki et al. Use of *Pistacia terebinthus* resin as immobilization support for *Lactobacillus casei* cells and application in selected dairy

products. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 9, p. 5700-5708, 2015.

SCHITTLER, Liziane. **Isolamento e caracterização fenotípica e molecular de bactérias ácido lácticas bacteriocinogênicas em leite in natura da Região oeste de Santa Catarina**. 2012. 92pg. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS. 2012.

SILVA, Nadja Fernandes. **CARACTERIZAÇÃO IN VITRO DE PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)**. 2016. (Faculdade de Nutrição). Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Pernambuco.

SEHN, C. P. **Avaliação da atividade bacteriocinogênica e características probióticas do isolado Lactobacillus curvatus LC254 e da utilização da sua substância antimicrobiana em filmes biodegradáveis**. 2015. Tese de Doutorado. Tese de doutorado). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

SOARES, Mariana Batista. **Avaliação da sobrevivência de esporos de Bacillus sp. probióticos em matrizes alimentares e seus efeitos à saúde**. 2017. [Engenharia de Alimentos]. Universidade Estadual de Campinas.

SOCCOL, Carlos Ricardo et al. The potential of probiotics: a review. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 4, p. 413-434, 2010.

SHUKLA, Rishikesh; GOYAL, Arun. Probiotic potential of Pediococcus pentosaceus CRAG3: a new isolate from fermented cucumber. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 6, n. 1, p. 11-21, 2014.

TAMIME, A. Y. ROBINSON, R. K. **Yogur; ciencia y tecnologia**. Traducido por Maria de la Concepción Díaz de Villegas Soláns e Alvaro Rodríguez Sánchez Arévalo. Zaragoza: Acribia, 1991, 368p.

TAVAKOLI, Mahmoud et al. Characterization of probiotic abilities of Lactobacilli isolated from Iranian Koozeh traditional cheese. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 67, n. 1, 2017.

TEIXEIRA, Bruna; DA CONCEIÇÃO ALVES, Andressa; SEHN, Carla Pohl. IMOBILIZAÇÃO DE PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS PP 170 EM GRÃOS DE ARROZ. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 10, n. 2, 2018.

TUOHY, Kieran M. et al. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug discovery today**, v. 8, n. 15, p. 692-700, 2003.

UECKER, Júlia Neitzel. **Screening de bactérias ácido lácticas isoladas de leite e derivados com potencial probiótico**. 2017. Dissertação de Mestrado - Ciência e tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

VAN DE WATER, Judy; NAIYANETR, Phornnop. Yogurt and immunity: the health benefits of fermented milk products that contain lactic acid bacteria. **Handbook of fermented functional foods**, p. 113-144, 2003.

VIDHYASAGAR, Venkatasubramanian; JEEVARATNAM, Kadirvelu. Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties in vitro. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 235-243, 2013.

VINDEROLA, Celso Gabriel; REINHEIMER, Jorge Alberto. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, v. 36, n. 9-10, p. 895-904, 2003.

WANG, Lina et al. Relationship of biofilm formation and gelE gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. **Journal of endodontics**, v. 37, n. 5, p. 631-636, 2011.