

**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE FORMIGA – UNIFOR-MG**  
**CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**LUIZA MOTA DE FARIA**

**POTENCIAL PROBIÓTICO IN VITRO DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS**  
**VEICULADOS EM LEITES FERMENTADOS FUNCIONAIS COMERCIAIS**

**FORMIGA – MG**

**2017**

LUIZA MOTA DE FARIA  
POTENCIAL PROBIÓTICO IN VITRO DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS  
VEICULADOS EM LEITES FERMENTADOS FUNCIONAIS COMERCIAIS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária do UNIFOR-MG, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Borges Acurcio

Coorientadora: Profa. Me. Priscila Mara Rodrigues Lima Pieroni

FORMIGA – MG

2017

Luiza Mota de Faria

POTENCIAL PROBIÓTICO IN VITRO DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS  
VEICULADOS EM LEITES FERMENTADOS FUNCIONAIS COMERCIAIS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Curso de Medicina Veterinária do UNIFOR-MG,  
como requisito parcial para obtenção do título de  
Bacharel em Medicina Veterinária.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Leonardo Borges Acurcio  
Orientador

---

Prof. Dr. Fabiano Santos Junqueira  
UNIFOR-MG

---

Prof. Me. Fabrício Rodrigues Amaral  
UNIFOR-MG

Formiga, 06 de julho de 2017

## **AGRADECIMENTOS**

Nada disso seria possível sem o apoio de algumas pessoas. Em primeiro lugar quero agradecer a minha mãe, Denise, que acreditou nos meus sonhos e objetivos e não mediu esforços para realizá-los. Ao meu pai, Marcelo que sempre me apoiou e acreditou nessa etapa. A minha irmã Bárbara que esteve ao meu lado por todo esse caminho. As madrinhas Dasirene, Danusa, Ceny e Dalila por todo incentivo, apoio, conselhos e presença constante. A Cássia pelo seu companheirismo de sempre, cumplicidade e paciência. Aos colegas da turma, em especial ao Miller e Laís, que caminharam comigo, tornando a luta mais leve. Aos professores, todos os agradecimentos possíveis, pelos conhecimentos adquiridos. Ao Dr. Fabiano pela amizade e companheirismo de sempre, ao meu orientador Leonardo (Leo) pela paciência e sabedoria; a minha coorientadora, Priscila que esteve sempre tentando me acalmar e me orientar com muita paciência. A minha tia Mara e tio Claudio pelo apoio de sempre. Aos demais amigos que a vida colocou no meu caminho, meus sinceros agradecimentos. E por último, mas não menos importante, quero agradecer a Deus por mais um sonho realizado, obrigada.

## RESUMO

Usado a milhares de anos para conservação do leite, a sua fermentação vem sendo utilizado até hoje. O leite fermentado é um dos veiculadores dos probióticos, que é um termo derivado do grego que significa “a favor da vida”. Probióticos são microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas e diárias, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Neste trabalho foram realizados quatro testes *in vitro*: teste de sensibilidade ao pH gástrico, teste de sensibilidade aos sais biliares, teste de antagonismo contra agentes patogênicos e teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. Os resultados obtidos foram satisfatórios, as amostras foram pouco sensíveis as injurias do trato gastrintestinal, inibiram os microrganismos patogênicos pelos testes de antagonismo *in vitro*, algumas amostras foram resistentes aos antimicrobianos e foram resistentes ao pH gástrico e sais biliares, permaneceram com suas contagens altas, as amostras testadas são realmente probióticas de acordo com os testes realizados.

Palavras-chave: bactérias ácido lácticas; lactobacilos; efeitos benéficos.

## **ABSTRACT**

Used since a long time ago as a conservation technique, milk has been fermented until nowadays. Fermented milk is an efficient way to deliver probiotic, which is derived from greek which means "in favor of life". Probiotics are live microorganism which when administered daily and in adequate amounts, confer health benefits to its host. This work's objective was to evaluate and qualify probiotic potential of commercial fermented milks through four in vitro tests: sensibility test to gastric pH, sensibility test to biliary salts, antagonism against pathogenic microorganisms and susceptibility test to antimicrobials. Obtained results were satisfactory, samples presented low sensibility to gastric (low pH) and intestinal (biliary salts) injuries, inhibition against pathogenic microorganisms and sensibility to most of the tested antimicrobials, except to those to which they present intrinsic resistance. According to the observed results, tested samples seem to be truly probiotics.

Keywords: lactic acid bacteria; beneficial effects; lactobacilli.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 - Resultados dos testes de antagonismo <i>in vitro</i> de bactérias ácido- lácticas contra microrganismos indicadores.....	27
--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de seis amostras de bactérias ácido-láticas isoladas de leites fermentados comerciais. ....	25
Tabela 2 - Percentual das susceptibilidades de seis amostras de bactérias ácido-láticas isoladas de leites fermentados comerciais a cada um dos antimicrobianos testados.....	25
Tabela 3 - Percentual de inibição de seis amostras de bactérias ácido-láticas isoladas de leites fermentados comerciais, em pH gástrico e sais biliares. ....	29



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAL	Bactérias Ácido Láticas
BHI	Brain Heart Infusion
CFO	Cefoxitina
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CRO	Ceftriaxona
EST	Estreptomicina
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
GEN	Gentamicina
GRAS	Generally Recognized As Safe
MRS	Man, Rogosa and Sharpe
OMS	Organização Mundial da Saúde
PEN	Penicilina
pH	Potencial Hidrogeniônico
TE	Tetracilina
UFC	Unidade de Formação de Colônias
UV	Ultravioleta
VA	Vancomicina

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA: OS PROBIÓTICOS .....	13
2.1. Histórico .....	13
2.2. Definições .....	14
2.3. Microrganismos utilizados como probióticos .....	15
2.4. Características desejáveis.....	16
2.5. Mecanismo de ação.....	17
2.6. Efeitos benéficos.....	18
2.7. Legislação.....	19
3. MATERIAL E MÉTODO .....	21
3.1. Teste <i>in vitro</i> de sensibilidade ao pH gástrico.....	21
3.2. Teste <i>in vitro</i> de sensibilidade aos sais biliares.....	21
3.3. Teste de antagonismo <i>in vitro</i> contra microrganismos patogênicos .....	22
3.4. Teste <i>in vitro</i> de suscetibilidade aos antimicrobianos .....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
4.1. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos das bactérias ácido-láticas isoladas de amostras de leites fermentados comerciais.....	25
4.2. Resultados referentes ao teste de antagonismo <i>in vitro</i> contra microrganismos patogênicos .....	27
4.3. Resultados referentes aos testes de sensibilidade a pH gástrico e sais biliares.....	29
5. CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	32

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos procedimentos mais antigos usados para a conservação do leite é a sua fermentação, que os seres humanos praticam há milhares de anos (TAMINE, 2002). Ao longo da história o uso de bactérias ácido lácticas (BAL) e de outros microrganismos em alimentos lácteos fermentados foi propagado. Gilliland (1985) afirmou vários benefícios que os microrganismos podem acrescentar aos alimentos: conservação de suas propriedades em termos nutricionais, adicionando sabor e maior segurança alimentar ao produto são algumas características citadas por ele. Deixando de ser apenas um método de conservação, a fermentação foi um meio de ampliar a vasta opção de produtos lácteos disponíveis para consumo. Isso levou a indústria de alimentos a perceber que os consumidores modernos estão cada vez mais preocupados com a saúde e que desejam ingerir alimentos que sejam saudáveis e de preferência capazes de prevenir doenças. É a busca incessante por novos produtos que promovam a saúde (MATTILA- SANDHOLM et al., 2002).

Oriundos da fermentação de leites, o leite fermentado é produzido de culturas específicas de microrganismos, os quais devem ser ativos, abundantes e viáveis no produto final até o final da sua vida útil (BRASIL, 2007). Os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* são os principais microrganismos lácticos usados na produção do lácteos fermentados. Bactérias pertencentes ao gênero *Lactocacillus* são as majoritariamente utilizadas para a produção desses leites fermentados e incorporam características sensoriais através da produção de ácidos e compostos carbonílicos no produto. Além disso, com a redução do potencial hidrogeniônico (pH), ocorre a inibição do crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos (ROBINSON, 1991).

Microrganismos vivos são denominados probióticos que oferecem benefícios à saúde do consumidor, além dos efeitos relacionados à nutrição quando ingeridos em quantidades recomendadas (FAO/WHO/OIE, 2003). Alívio dos sintomas de intolerância a lactose, modulação do sistema imunológico e da microbiota intestinal, tratamento e prevenção da diarreia, ação na diminuição do colesterol e ação anticarcinogênica são alguns dos efeitos desejáveis associados ao uso do leite fermentado (GUPTA; GARG, 2009; REID et al., 2002).

Existem fatores que contribuem para o desenvolvimento de uma nova geração de probióticos. Um exemplo são as diferentes regiões geográficas, que apresentam requisitos nutricionais e de saúde específicas para cada localidade. Além disso, a capacidade de sobreviver em matrizes alimentares locais, assim como a valorização de amostras probióticas isoladas localmente e os instrumentos tecnológicos disponíveis para o desenvolvimento de culturas industriais, é algo que individualiza e amplia as opções de pesquisas no tema (SYBESMA et al.; 2015). A busca de mais fontes de isolamento de microrganismos potencialmente probióticos, incluindo alimentos fermentados tradicionais de diferentes culturas e regiões geográficas, é uma tendência atual em diferentes compostos da biotecnologia microbiana (MAHASNEH; ABBS, 2010).

O objetivo deste trabalho é de avaliar, qualificar e obter resultados específicos de testes *in vitro* do potencial probiótico de microrganismos probióticos veiculados por meio de leites fermentados funcionais comerciais, encontrados com facilidade na rede varejista de Minas Gerais.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA: OS PROBIÓTICOS

### 2.1. Histórico

Há milhares de anos já se usava microrganismos como meio de promover a saúde do homem. Persa do Antigo Testamento (Gênesis 18:8) já mencionava esses benefícios de alimentos fermentados. Ele relata que “Abraão atribuiu sua longevidade ao consumo de leite azedo”. Mais à frente, Plínio, um romano historiador em 76 A.C., recomendava o uso de produtos lácteos fermentados para o tratamento de gastroenterites (SCHREZENMEIR; DE VRESE, 2001).

Ganhador do prêmio Nobel por seu pioneirismo nas descrições de fagocitose, o russo Elie Metchnikoff (1845-1916), foi o primeiro microbiologista a sugerir o consumo de leite fermentado para modular a microbiota digestiva. Sua teoria consistia na ideia de que metabólitos tóxicos produzidos pela microbiota intestinal poderiam ter um efeito adverso sobre o hospedeiro. Algumas bactérias degradavam proteínas que dependendo de suas concentrações tornavam-se tóxicas ao organismo. Ele sugeriu, para reduzir essa autointoxicação, manipular a microbiota intestinal, no intuito de diminuir ou substituir o número de bactérias putrefativas por meio da ingestão de leites fermentados com bactérias produtoras de ácido láctico. Isso foi hipotetizado baseado na observação de cidadãos búlgaros, que apresentavam uma expectativa de vida elevada e que eram grandes consumidores de produtos lácteos fermentados. Ele passou a defender o uso de alimentos fermentados a partir deste dado, supondo que os lactobacilos eram importantes para a saúde humana (METCHIKOFF, 2004; VASILIJVIC; SHAH, 2008; SHOTT, 1999).

Tissier foi outro pesquisador importante que contribuiu para o uso de probióticos. Em 1906, para modular a microbiota de crianças com diarreia, ele recomendou a administração de bifidobactérias, afirmando que essas bactérias poderiam competir com bactérias indesejáveis no intestino, eliminando as indesejáveis por ser tornar o microrganismo intestinal dominante (SHOTT, 1999). Recorrente de sua observação que a microbiota fecal de recém-nascidos amamentados no seio apresentavam mais bifidobactérias do que a microbiota fecal de crianças que haviam recebido fórmulas infantis, ele fundamentou sua teoria a

respeito da importância desse gênero bacteriano para a saúde intestinal (NICOLI; VIEIRA, 2000).

Vários outros pesquisadores deram continuação pela busca por bactérias benéficas para saúde humana, até que, em 1930, Minoru Shirota, que reconhecia a importância da medicina preventiva e modulação da microbiota gastrointestinal, isolou no Japão uma linhagem de *Lactobacillus* capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal. Denominada *Lactobacillus casei* linhagem Shirota, essa linhagem foi usada na produção de produto lácteo fermentado chamado “*Yakult*”, ainda atualmente comercializado com grande sucesso.

## **2.2. Definições**

O termo probiótico deriva-se do grego e significa “a favor da vida”, sendo o antônimo do termo antibiótico. Foi primeiramente empregado por Lilley e Stillwell (1965) para descrever substâncias secretadas por um microrganismo que acarreta o crescimento de outro microrganismo. Fuller (1989), posteriormente modificou este conceito, trazendo uma nova definição para probióticos: “suplemento alimentar constituído por microrganismos vivos que afeta benéficamente o animal hospedeiro graças a melhoria no balanço microbiano intestinal” (FULLER, 1989, p. 366).

Salminen et al. (1999), para incluir as amplas aplicações e dados científicos que mostram a ação benéfica de microrganismo não viáveis ou de seus componentes, definiram probióticos como preparações de microrganismo, ou seus elementos, que possuem efeito benéfico sobre a saúde e o bem-estar do hospedeiro. Alguns trabalhos sugerem que microrganismos não viáveis ou seus componentes podem também exercer algum efeito benéfico, apesar de algumas definições de probióticos destacarem a importância da sua viabilidade (OUWEHAND; SALMINEN, 1998; PENNER et al., 2005).

Schrezenmeir e Vrese (2001) propuseram que o termo probiótico deveria ser usado para designar uma preparação ou produto que contém microrganismos viáveis em números suficientes, que alteram a microbiota em um compartimento do hospedeiro e exerce efeitos a saúde. Esta definição enfatiza que outros

compartimentos do corpo além do intestino, podem ser alvos dos probióticos, onde uma alteração da microbiota poderia exercer um efeito benéfico extraintestinal.

Nos últimos anos muitas outras definições de probióticos foram publicadas. Atualmente a definição aceita internacionalmente é da Organização Mundial de Saúde (OMS) e da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentos, em inglês Food and Agriculture Organization (FAO), que define probióticos como “microrganismos vivos que, quando administrado em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro<sup>1</sup>” (GROVER et al., 2012, p. 5).

### **2.3. Microrganismos utilizados como probióticos**

Os microrganismos mais frequentes usados nas preparações probióticas são pertencentes aos gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*, com especial destaque para os lactobacilos. Os lactobacilos que se encontram em níveis altos no intestino do homem e de muitos mamíferos saudáveis, segundo a Administração Federal de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos, em inglês *Food and Drug Administration* (FDA) – órgão que regula alimentos e medicamentos, similar à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil –, são aqueles Geralmente Reconhecidos como seguros – em inglês *Generally Recognized As Safe* (GRAS). Alguns outros microrganismos também são estudados como probióticos: bifidobactérias, propionibactérias, *Ercherichia coli* EMO e Nissle 1917, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus toyoi* e a levedura *Saccharomyces boulardii* (OUWEHAND et al., 2002; SENOK, et al., 2005; MEILE et al., 2008). O que diferencia os probióticos em si são seus mecanismos de ação, o metabolismo e componentes antimicrobianos produzidos (MÄTTÖ et al., 2004; CZERUCKA et al., 2007; DOGI et al., 2008; LÓPEZ et al., 2010).

---

<sup>1</sup> Traduzido do inglês para o português: “potential modulators of gut-flora that change the gut composition in a beneficial manner and exert various health beneficial effects on the host” (GROVER et al., 2012, p. 5).

## 2.4. Características desejáveis

O microrganismo necessita ter algumas características importantes para que seja selecionado e utilizado como probiótico. Vários autores sugerem inúmeros critérios, alguns presentes no senso comum (FAO/WHO/OIE, 2003; OUWEHAND et al., 2002; VASILJEVIC & SHAH, 2008). São eles: (i) não apresentar certos mecanismos de resistência a antimicrobianos e a capacidade de transmiti-los com facilidade; (ii) modular a atividade imunológica; (iii) resistir às adversas condições do trato gastrointestinal; (iv) manter o hospedeiro protegido contra patógenos; (v) possuir propriedades tecnológicas satisfatórias; e (vi) existir estudos clínicos independentes, duplo-mascarados, randomizados e controlados com placebo, comprovando a eficácia do probiótico.

Uma linhagem de probióticos para uso em seres humanos deve preferencialmente ser isolada de seres humanos, o que é ressaltado por alguns autores como importância da especificidade do hospedeiro. É afirmado que um probiótico irá desenvolver seus benefícios quando estiver em um ambiente que seja similar ao que foi isolado, sendo assim hospedeiro-específico (SAARELA et al., 2000). Mesmo não pertencendo à origem humana ou animal, a levedura *S. boulardii* é reconhecida como probiótico e usada na indústria farmacêutica desde 1960. A mesma tem a capacidade de eliminar ou reduzir os efeitos de diferentes tipos de diarreias e infecções intestinais neutralizando diferentes tipos de toxinas, como as produzidas por *Clostridium difficile* (CZERUKA et al., 2007). Para alguns autores, uma característica relevante de um microrganismo probiótico é sua capacidade de aderência ao epitélio intestinal. O primeiro passo para a colonização (mesmo que seja temporária) de um microrganismo é a adesão às células epiteliais, o que permite uma modulação do sistema imune intestinal – devido ao contato do probiótico com o tecido linfóide associado ao intestino – e pode impedir a adesão de microrganismos patogênicos às células epiteliais intestinais (SALMINEN et al., 1999; OUWEHAND et al., 2002; LIONG, 2007; VASILEVIC & SHAH, 2008; GUGLIELMETTI et al., 2009).

Não são conhecidos probióticos capazes de aderir ao trato digestivo de adultos, mesmo depois de uma ingestão prolongada, sendo que a microbiota residente, ainda que desequilibrada, impede essa colonização. Por isso se torna indispensável a ingestão diária de um probiótico em quantidades adequadas, o que é fundamental



para manter níveis artificialmente elevados e em quantidade adequada no ecossistema digestivo, permitindo que ele desenvolva o efeito benéfico desejado (MARTINS et al., 2005). Além de permanecer viável durante sua passagem pelo sistema gastrintestinal, para que isso ocorra o nível populacional do probiótico deve ser suficientemente elevado para ter um impacto no local onde se espera que desenvolva a sua função. Considera-se na ecologia microbiana, que um microrganismo poderá agir no ecossistema onde ele se encontra somente quando presente em população igual ou superior a  $10^7$  células viáveis/g do conteúdo. Deve-se ter uma concentração de células viáveis do probiótico, a qual deve sofrer um ajuste na preparação inicial levando-se em conta a capacidade de sobreviver do microrganismo sem se multiplicar no tubo digestivo, assim como o efeito de diluição dos sucos intestinais, de maneira que atinja o mínimo de  $10^7$  células/g do conteúdo intestinal. Portanto, é considerado que a concentração em células vivas de probióticos no produto a ser ingerido deve estar pelo menos de  $10^8$  a  $10^9$  UFC/g (NICOLI; VIEIRA, 2000).

## 2.5. Mecanismo de ação

O objetivo do uso de probióticos é compensar falhas ou reforçar a atividade do ecossistema microbiano gastrintestinal já existente se em desequilíbrio ou com previsão de desequilíbrio (tratamento com antibiótico). Os mecanismos de ação propostos para explicar os efeitos benéficos dos probióticos são igualados aos encontrados na microbiota intestinal. São eles:

- Produção de substâncias inibidoras de microrganismos patogênicos: microrganismos produzem substâncias que inibem o crescimento de vários patógenos, como ácidos orgânicos, bacteriocinas, substâncias “*bacteriocina-like*”, substâncias similares a antibióticos, peróxido de hidrogênio (em ambientes aeróbicos), sideróforos, dentre outras (YILDRIM & JOHNSON, 1998; NARDI et al., 2005; RASTALL et al., 2005; LIONG, 2007; CHEIKHYOUSSEF et al., 2008).
- Competição por nutrientes e sítios de adesão: microrganismos usados como probióticos competem por sítios de adesão na superfície do epitélio intestinal e por nutrientes, inibindo, deste modo, a fixação e a nutrição de patógenos

(BERNET et al., 1994; NICOLI; VIEIRA, 2000; RASTALL et al., 2005; LIONG, 2007).

- Inibição da produção ou ação de toxinas: algumas espécies de probióticos são capazes de inibir a ação de microrganismos patogênicos, seja pela inibição da produção ou a ação de toxinas produzidas por estes, impedindo assim, sua atuação no epitélio intestinal (CZERUCZA et al., 1994; BRANDÃO et al., 1998).
- Modulação do sistema imune: é sugerido que a modulação da resposta imune específica e não-específica pode ser outro mecanismo pelo qual os probióticos protegem o hospedeiro contra as desordens gastrointestinais (NEUMANN et al., 1998; PODOPRIGORA et al., 1999; RASTALL et al., 2005; DOGI et al., 2008).

## 2.6. Efeitos benéficos

Em pesquisas de doenças infecciosas, inflamatórias e alérgicas, a terapia com probióticos tem atraído grande interesse. A finalidade dos ensaios clínicos envolvendo probióticos, nesse contexto, é a prevenção e o tratamento de doenças intestinais, seja em adultos ou crianças. As bactérias ácido-láticas e bifidobactérias têm mostrado um efeito protetor contra os sintomas agudos de doenças diarreicas em crianças, sendo a causa mais frequente de gastroenterites nas crianças a infecção por rotavírus. Saavedra et al. (1994) demonstram que a combinação de *Bifidobacterium bifidum* e *Streptococcus thermophilus* reduz o risco desta infecção em crianças. Outros autores demonstram a eficácia no tratamento e prevenção da diarreia associada a antibiótico devido ao uso de certos probióticos. A redução da incidência e duração da diarreia associada a antibióticos vem da combinação de *Bifidobacterium lactis* com *S. thermophilus* (CORRÊA et al., 2005).

Um problema a se destacar no tratamento com antibióticos é o desequilíbrio da microbiota intestinal que permite a multiplicação de patógenos oportunistas intestinais como *C. difficile*. Plummer et al. (2004) fez um ensaio clínico que sugere que a terapia com *L. acidophilus* e *B. bifidum* podem reduzir a incidência de diarreia associada a antibiótico, pois ela neutralizaria as toxinas produzidas por *Clostridium*. A “diarreia do viajante” atinge metade dos viajantes a áreas de risco com condições precárias de higiene. Embora sejam na maioria das vezes autolimitadas, causa desconforto para

os acometidos. Estudo demonstra que a combinação de linhagens probióticas, que tenham *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* diminuem significativamente (até 28%) a frequência da diarreia do viajante (LEAHY et al., 2005). Estudos *in vitro* e *in vivo* com camundongos mostraram uma proteção conferida pelos probióticos frente a outras infecções intestinais. Reid et al. (2002) obtiveram sucesso na redução da infecção por *Salmonella Typhimurium*, em camundongos, com o tratamento com lactobacilos. A melhora da infecção por salmonela também foi obtida pela administração de *B. longum* (SILVA et al., 1999; SILVA et al., 2004).

Os probióticos, em especial os do gênero *Lactobacillus*, unem-se a receptores intrínsecos da membrana do intestino, não sendo assim eliminadas pelos movimentos peristálticos. Dessa forma, conseguem competir com microrganismos patógenos como *Salmonella Typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli*, que não promoverão alterações no hospedeiro por não aderirem a ele (MARCO; PAVAN; KLEEREBEZEM, 2004).

Outro efeito atribuído ao uso de probióticos é a redução da intolerância à lactose. Atualmente, tem sido demonstrado que altos níveis de lactase são liberados por bactérias iniciadoras presentes no iogurte durante sua passagem pelo trato gastrointestinal. A lactose ingerida é então hidrolisada pela lactase, diminuindo sintomas de intolerância à lactose. *Bifidobacterium longum* tem sido investigado com potencial probiótico neste sentido, e há evidências de um efeito positivo na redução da intolerância à lactose em alguns indivíduos (JIANG et al., 1996; LEAHY et al., 2005).

## **2.7. Legislação**

Diversas apresentações de probióticos estão disponíveis no mercado. Eles são comercializados na forma de preparações farmacêuticas – cápsula ou sachê – ou de alimentos – iogurtes, leites fermentados, leite em pó, manteiga, maionese, queijos e sorvetes –, sendo constituídos por um único microrganismo ou uma combinação de vários deles (NICOLI; VIEIRA, 2000; SAAD, 2006).

Uma questão ainda não concluída pela literatura é a quantidade e frequência de consumo de probióticos necessários para assegurar os benefícios a eles

atribuídos. Para que um produto probiótico apresente a alegação de promoção à saúde, a ANVISA estabelece que a quantidade mínima viável da cultura deve estar situada na faixa de  $10^8$ - $10^9$  UFC (unidade formadora de colônias) por recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores são aceitos desde que comprovem sua eficácia.

Na documentação referente à comprovação da eficácia devem ser inclusos o laudo da análise do produto que prove a quantidade mínima viável do microrganismo até o final do prazo de validade e o teste da resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares. A quantidade do probiótico em UFC, contida na recomendação diária do produto pronto para consumo, deve ser declarada no rótulo, próximo à alegação: O microrganismo (indicar a espécie) contribui para o equilíbrio da flora intestinal. “Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis” (ANVISA, 2016). Os microrganismos considerados como probióticos segundo a ANVISA são: *L. acidophilus*, *L. casei Shirota*, *L. casei var. rhamnosus*, *L. casei var. defensis*, *L. paracasei*, *Lactococcus lactis*, *B. bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *lactis*), *B. longum* e *Enterococcus faecium*. As bactérias usadas na produção de iogurtes, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. salivarius* subsp. *thermophilus* não são considerados pela ANVISA como probióticos, por não possuírem efeito probiótico cientificamente comprovado.

### **3. MATERIAL E MÉTODO**

#### **3.1. Teste *in vitro* de sensibilidade ao pH gástrico**

A técnica utilizada para mensurar a sensibilidade ao pH gástrico foi adaptada de Santos et al., (2016). Os microrganismos isolados foram ativados em caldo *Man, Rogosa and Sharpe* (MRS-Difco) e incubados a 37°C, sob aerobiose, durante 48 horas. Os microrganismos foram plaqueados previamente ao ensaio nas diluições decimais seriadas a 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-6</sup> em ágar MRS (Difco), para definir o crescimento controle de cada uma das amostras de lactobacilos (incubação a 37°C, durante 48 horas, em aerobiose). Em seguida, um ml de cada amostra foi centrifugado em microtubos de 2,0mL (5000 g por cinco minutos), o sobrenadante foi descartado e as amostras foram expostas a um ml de solução salina 0,9% (NaCl – Synth), pH 2.0 (acrescida de 0,3g/L de pepsina - Sigma), durante uma hora. Após esse período, a fim de avaliar a viabilidade das células, foi feito um plaqueamento a partir de diluições decimais seriadas a 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-6</sup> em ágar MRS (Difco). As placas foram então incubadas a 37°C, durante 48 horas, em aerobiose. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados do plaqueamento feito previamente ao teste, para a observação do comportamento dos microrganismos estudados em ambiente estomacal artificial.

#### **3.2. Teste *in vitro* de sensibilidade aos sais biliares**

A técnica utilizada para mensurar a sensibilidade aos sais biliares foi adaptada de Santos et al., (2016). Os microrganismos isolados foram ativados em caldo MRS (Difco) e incubados a 37°C, sob aerobiose, durante 48 horas. Os microrganismos foram plaqueados previamente ao ensaio nas diluições decimais seriadas a 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-6</sup> em ágar MRS (Difco), para definir o crescimento controle de cada uma das amostras de lactobacilos (incubação a 37°C, durante 48 horas, em aerobiose). Em seguida, um ml de cada amostra foi centrifugado em microtubos de 2,0mL (5000 g por cinco minutos), o sobrenadante foi descartado e as amostras foram expostas a um ml de solução de caldo MRS (Difco) contendo 0,3% de oxgall (Difco) durante seis horas. Após esse período, a fim de avaliar a viabilidade das células, foi feito um plaqueamento a partir de diluições decimais seriadas a 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-6</sup> em ágar MRS

(Difco). As placas foram então incubadas a 37°C, durante 48 horas, em aerobiose. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados do plaqueamento feito previamente ao teste, para a observação do comportamento dos microrganismos estudados em ambiente intestinal artificial.

### **3.3. Teste de antagonismo *in vitro* contra microrganismos patogênicos**

Para a realização dos testes de antagonismos, as amostras dos leites fermentados foram previamente cultivadas em caldo MRS (Difco), a 37°C por 48 horas, sob aerobiose. Após duas ativações, cinco microlitros de cada cultivo de microrganismo foram colocados sobre o centro da superfície de uma placa de Petri, contendo ágar MRS (Difco), que foi incubado sob aerobiose a 37°C durante 48 horas. Após este período, as placas foram retiradas das câmaras de incubação com os *spots* no centro da placa devidamente crescidos. Foi colocado clorofórmio nas tampas destas placas, deixando-o agir por 30 minutos sob luz ultravioleta (UV). Com isto, eliminaram-se os microrganismos que cresceram nos *spots* e foi possibilitada a avaliação da ação de supostas substâncias inibidoras produzidas pelas bactérias e liberadas no meio de cultura. Em seguida, foram colocados 3,5 mL de ágar semi-sólido (0,75% BactoAgar, Difco, em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), ou MRS, Difco), contendo as bactérias reveladoras. A metodologia deste teste foi inicialmente proposta por Tagg, Dajami e Wannamaker (1976).

Microrganismos patogênicos (*Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Typhimurium ATTCC 14028, *Shigella flexneri* ATCC 12022 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213), foram inoculados em caldo BHI (Difco), e incubados a 37°C durante 24 horas. Para todos os microrganismos reveladores foram feitas duas ativações. Após crescimento dos microrganismos incubados, 10µL destes foram transferidos para o ágar semi-sólido (BHI ou MRS, Difco) que foi então vertido sobre placas de ágar MRS (Difco), após os 30 minutos de ação do clorofórmio e da luz UV. As placas foram incubadas a 37°C durante 48 horas, sob aerobiose. Então, a leitura dos halos de inibição foi realizada com auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo Digimatic Caliper, Mitutoyo Sul Americana Ltda, Suzano, São Paulo, Brasil). Este teste foi realizado em duplicata – um mesmo microrganismo

revelador aplicado em duas placas com o mesmo microrganismo isolado testado – com duas repetições.

### 3.4. Teste *in vitro* de suscetibilidade aos antimicrobianos

O antibiograma foi realizado de acordo com a técnica de susceptibilidade antimicrobiana, pelo princípio de difusão em disco da droga, utilizando-se discos com concentrações pré-definidas das drogas e medindo-se o diâmetro dos halos de inibição conforme proposto por Charteris et al. (1998). Para a realização dos testes, as bactérias ácido-lácticas isoladas dos leites fermentados foram previamente cultivadas em caldo MRS (Difco), incubando-se a 37°C por 48 horas, sob aerobiose. Após o crescimento dos microrganismos, cada microrganismo ativado foi transferido para tubo de ensaio com rosca contendo 3,5 mL de salina 0,9% até que fosse atingida concentração equivalente a escala 0,5 de McFarland (que corresponde a uma população de 10<sup>8</sup> UFC/mL). Com uma zaragotoa estéril, cada cultura foi espalhada em uma placa de Petri tipo pizza (diâmetro de 14 cm) até que toda a superfície contendo ágar MRS (*Difco*) fosse coberta. Em seguida, foram distribuídos, de forma equidistante, 10 discos (Laborclin) contendo antimicrobianos de grupos químicos distintos. Foram utilizadas drogas pertencentes aos seguintes grupos químicos:

- Inibidores de síntese de parede celular, com ação bactericida, como os betalactâmicos: penicilina (PEN, 10U), ampicilina (AMP, 10µg); glicopeptídeos: vancomicina (VA, 30µg); cefalosporinas de terceira geração: ceftriaxona (CRO, 30µg), cefoxitina (CFO, 30µg);
- Inibidores de síntese de proteínas, com ação bacteriostática, como as tetraciclina: tetraciclina (TE, 30µg); aminoglicosídeos: gentamicina (GEN, 10µg), cloranfenicol (CLO, 30µg) e estreptomicina (EST, 30µg);
- Inibidores da multiplicação celular, com ação bactericida, como as quinolonas de terceira geração: ciprofloxacina (CIP, 5µg).

As placas de Petri, após a distribuição dos discos, foram incubadas em aerobiose a 37°C durante 48 horas. O controle de qualidade dos discos contendo os antimicrobianos foi realizado utilizando-se amostra de *Escherichia coli* ATCC 25922, de acordo com técnica proposta por Charteris et al. (1998). Em seguida, com auxílio de paquímetro digital (Mitutoyo Digimatic Caliper, Mitutoyo Sul Americana Ltda), foram

feitas as leituras dos diâmetros dos halos de inibição. Este teste foi realizado em duplicata com duas repetições. Os perfis de susceptibilidade a antimicrobianos das amostras avaliadas foram caracterizados de acordo com o 15<sup>o</sup> suplemento informativo da ANVISA (2005).



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Teste de susceptibilidade a antimicrobianos das bactérias ácido-láticas isoladas de amostras de leites fermentados comerciais

Os resultados referentes aos antibiogramas de seis amostras de bactérias ácido-láticas isoladas de leites fermentados comerciais estão representados nas TAB. 1 e 2.

Tabela 1 - Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de seis amostras de bactérias ácido-láticas isoladas de leites fermentados comerciais.

Amostra	TET	AMP	EST	CRO	CLO	CIP	CFO	GEN	VAN	PEN
EL	S	S	S	MS	S	S	R	R	R	S
YA	S	S	MS	S	S	S	R	R	R	S
AC	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S
CH	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S
PA	S	S	MS	MS	S	S	R	R	R	S
IT	S	S	MS	MS	S	S	R	R	R	S

Fonte: Teste realizado no Laboratório de Ecologia e Fisiologia dos Microrganismos (LEFM) ICB-UFMG, 2017. Elaboração própria.

Tabela 2 - Percentual das susceptibilidades de seis amostras de bactérias ácido-láticas isoladas de leites fermentados comerciais a cada um dos antimicrobianos testados.

Antimicrobiano	TET	AMP	EST	CRO	CLO	CIP	CFO	GEN	VAN	PEN
Resistência (%)	0	0	16,6	0	100	0	100	83,3	100	0
Moderada Sensibilidade (%)	0	0	50	50	0	0	0	0	0	0
Sensibilidade (%)	100	100	33,3	50	0	100	0	16,6	0	100

Fonte: Teste realizado no Laboratório de Ecologia e Fisiologia dos Microrganismos (LEFM) ICB-UFMG, 2017. Elaboração própria.

O estudo de suscetibilidade mostrou que todos os microrganismos foram resistentes a três antimicrobianos (ceftriaxona, gentamicina e vancomicina) e foram susceptíveis a outros quatro (tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol e penicilina), enquanto diferentes porcentagens de amostras foram resistentes aos demais antimicrobianos testados (estreptomicina, cloranfenicol, ciprofloxacino e cefoxitina).

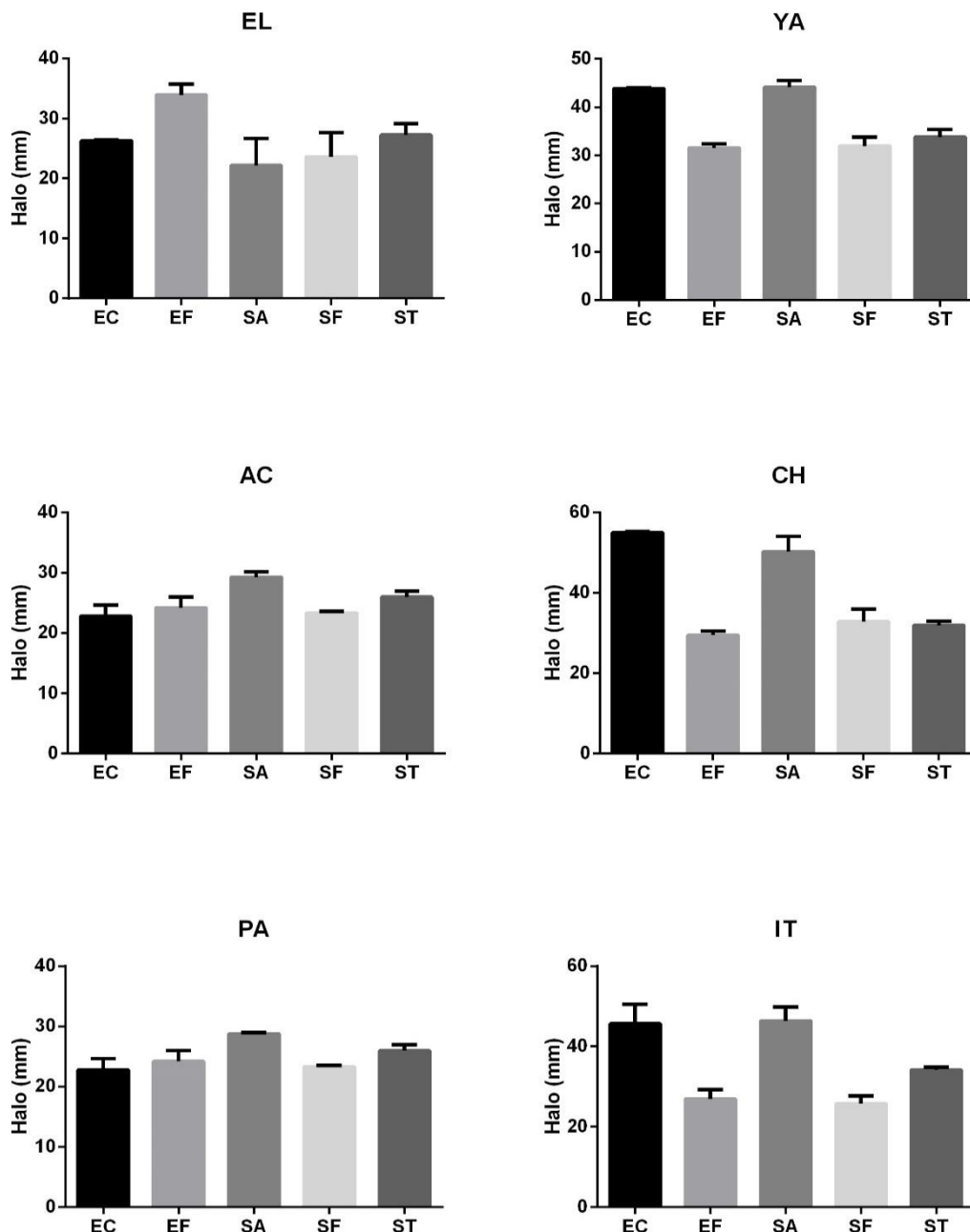
Costa et al. (2013) revelaram que há resistência à vancomicina em 100% das amostras de *Lactobacillus* spp. e *Weissella* spp. testadas, o que também foi observada em outros trabalhos (HERREROS et al., 2005; COPPOLA et al., 2005; OUOBA et al., 2008; RODRÍGUEZ-ALONSO et al., 2009), corroborando com a afirmação de que *Lactobacillus* e outros gêneros de bactérias ácido lácticas podem ter resistência intrínseca à vancomicina (TEUBER et al., 1999).

Para os aminoglicosídeos testados (gentamicina e estreptomicina), as amostras foram pouco resistentes, sendo que para gentamicina 16,6% foram resistentes e para estreptomicina foi uma porcentagem maior de 83,3% resistentes. Costa et al. (2013) mostrou que a grande maioria das amostras de BAL testadas por eles (91,66%) foram resistentes à estreptomicina e 41,67% das amostras foram resistentes à gentamicina. Charteris et al. (1998b) relataram que todas as amostras avaliadas foram resistentes a estes dois antimicrobianos. Entretanto, Cebeci e Gurakam (2003) observaram que apenas 27% das amostras de *Lactobacillus plantarum* de diferentes origens foram resistentes a gentamicina. Para Coppola et al. (2005), 98% das amostras estudadas foram resistentes a gentamicina. Rodríguez-Alonso et al. (2009) observaram 15,8% de resistência a estreptomicina e nenhuma amostra resistente a gentamicina.

Andrade et al. (2014) observaram amostras de *Lactobacillus* spp. resistentes à tetraciclina (100%), o que também foi descrito por outros autores (PERIN et al., 2000; TEMMERMAN et al., 2002; KLARE et al., 2007), contrapondo com os resultados do presente experimento. Em concordância com os dados aqui apresentados, Charteris et al. (1998) relataram que 100% das amostras de *Lactobacillus* spp. foram sensíveis à tetraciclina, e a maioria das amostras testadas pelos autores foram resistentes à gentamicina, estreptomicina e ciprofloxacina, o que foi também similar ao encontrado no presente trabalho, exceto para a ciprofloxacina. Temmerman et al. (2002) observaram resistência das amostras de *Lactobacillus* spp. à penicilina, o que não se repetiu nas amostras probióticas isoladas de leites fermentados comercialmente disponíveis. Belletti et al. (2009) encontraram alta porcentagem de *Lactobacillus* spp. resistentes à gentamicina, penicilina e vancomicina; e sensíveis à tetraciclina, o que foi diferente do encontrado no presente estudo para o caso de penicilina, por exemplo, mostrando a grande variação desse aspecto entre as diferentes amostras de probióticos estudadas.

## 4.2. Resultados referentes ao teste de antagonismo *in vitro* contra microrganismos patogênicos

Gráfico 1 - Resultados dos testes de antagonismo *in vitro* de bactérias ácido-láticas contra microrganismos indicadores.



Fonte: Teste realizado no Laboratório de Ecologia e Fisiologia dos Microrganismos (LEFM) ICB-UFMG, 2017. Elaboração própria.

Nota: em cada gráfico EC = *Escherichia coli*; EF = *Enterococcus faecalis*; AS = *Staphylococcus aureus*; SF = *Shinella flexneri* e ST = *Salmonella Typhimurium*

O GRAF. 1 apresenta as médias dos diâmetros de halos de inibição em milímetros obtidos de três repetições. As médias dos halos de inibição para cada bactéria reveladora das amostras de *Lactobacillus* spp., isoladas de amostras de leites fermentados, foram mais expressivas sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Enterococcus faecalis* e *Salmonella* Typhimurium demonstraram também uma alta inibição pela maior parte das amostras. Contradizendo aos estudos realizado por Costa et al. (2013), que obtiveram a menor inibição dentre os microrganismos indicadores patogênicos ocorreu no antagonismo contra *S. aureus*. De acordo com Neto (2004), todos os *Lactobacillus* spp. isolados das amostras de queijo coalho foram capazes de inibir o crescimento das cepas de *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli*. Sendo este fato relevante, pois um patógeno de grande importância nos alimentos é o *Staphylococcus* spp (SENA, 2000), além de ser importante causador de certas doenças e intoxicações veiculadas por alimentos.

Resultados similares aos aqui apresentados do antagonismo *in vitro* de bactérias ácido-lácticas frente a bactérias reveladoras também foram encontrados por outros autores. Alexandre et al. (2002) os quais demonstraram atividade antagonista de bactérias lácticas contra *S. aureus*. Guedes Neto et al. (2005) que verificaram inibição de *Lactobacillus* spp. contra *Staphylococcus* spp. e *E.coli*. Costa et al. (2013) onde relataram atividade antagonista de *Lactobacillus* spp. contra *Staphylococcus* spp. e *E.coli*. Todos esses dados confirmam o importante mecanismo das bactérias ácido-lácticas probióticas de antagonizar e inibir microrganismos patogênicos de interesse para a saúde pública e de relevância para a qualidade dos produtos de origem animal.

#### 4.3. Resultados referentes aos testes de sensibilidade a pH gástrico e sais biliares

Tabela 3 - Percentual de inibição de seis amostras de bactérias ácido-láticas isoladas de leites fermentados comerciais, em pH gástrico e sais biliares.

Amostra	Contagem (UFC/mL) - Percentual de redução (%)		
	Inicial	Pós suco gástrico artificial	Pós sais biliares
EL	3,95 x10 <sup>9</sup>	9,10 x10 <sup>8</sup> - 8,72	2,82x10 <sup>8</sup> - 14,48
YA	6,00 x10 <sup>9</sup>	8,87x10 <sup>8</sup> - 6,64	3,25x10 <sup>8</sup> - 11,94
AC	6,55x10 <sup>9</sup>	9,13x10 <sup>8</sup> - 8,04	2,48x10 <sup>8</sup> - 13,21
CH	5,55 x10 <sup>9</sup>	9,13 x10 <sup>8</sup> - 8,49	2,86x10 <sup>8</sup> - 12,96
PA	5,30 x10 <sup>9</sup>	9,70 x10 <sup>8</sup> - 7,58	2,30x10 <sup>8</sup> - 14,01
IT	5,05 x10 <sup>9</sup>	7,80 x10 <sup>8</sup> - 8,36	2,24x10 <sup>8</sup> - 13,94

Fonte: Teste realizado no Laboratório de Ecologia e Fisiologia dos Microrganismos (LEFM) ICB-UFMG, 2017. Elaboração própria.

Após o tratamento em acidez equivalente ao do estômago humano (pH 2,5), os resultados demonstraram que as amostras de bactérias ácido-láticas apresentaram baixa redução nas suas contagens (em média 8%, aproximadamente, o que representa algo em torno de 1 log, baseado na concentração inicial). Como os lactobacilos são microrganismos que produzem ácido lático e gostam de ambientes ácidos (acidófilos), os mesmos usualmente apresentam resistência a esse ácido para garantir sua sobrevivência (GILLILAND, 1985).

Os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com o observado por Vinderola e Reinheimer (2003), pois bactérias ácido-láticas probióticas apresentaram maior resistência a pH baixo que outras bactérias ácido-láticas não probióticas, visto que o processo de seleção desses microrganismos envolve esse tipo de resistência.

Resultados similares da sensibilidade *in vitro* ao pH gástrico de bactérias ácido-láticas também foram encontrados por outros autores. Chou e Weimer (1999) relataram tolerância de amostras de *L. acidophilus* probiótico ao pH 3,5. Araújo et al. (2009) indicaram que a cultura de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, uma amostra com potencial probiótico veiculada em certos produtos de origem animal, exibiu resistência a baixos valores de pH. Tambekar e Bhutada (2010) também observaram em seus estudos *Lactobacillus* spp. com potencial probiótico tolerantes ao ácido gástrico (pH 2,0).

No intestino delgado, a sensibilidade a sais biliares ocorre através da ação detergente à membrana celular que são constituídas de ácidos graxos e lipídeos das bactérias (GUCHTE et al., 2002). Das amostras testadas aos sais biliares, todas obtiveram uma pequena inibição de crescimento a presença de sais. Mesmo inibidas permaneceram viáveis por todo período de análise. O que possibilita ser usado como probiótico, pois sua concentração permaneceu mais elevada que  $10^7$  UFC/g (CHARTERIS et al., 1998). Costa et al. (2013), mostraram que as amostras de bactérias ácido lácticas foram na sua maioria sensíveis aos sais biliares, diferente dos testes realizados nesse trabalho. Chateau et al. (1994) e Vinderola e Reinheimer (2003) observaram que bactérias ácido-lácticas de diferentes origens também sofreram a variabilidade de susceptibilidade a sais biliares, contradizendo os resultados deste trabalho, os quais confirmam que as amostras testadas são realmente probióticas por conseguirem se manter em altas quantidades mesmo após a exposição aos sais biliares.

Os testes mostraram que as amostras de lactobacilos probióticos veiculados por leites fermentados, apresentam de fato, tolerância às injúrias do trato gastrointestinal, feito uma devida seleção das amostras quanto ao seu potencial probiótico. A partir dos resultados obtidos, as bactérias ácido-lácticas dos produtos testados podem exercer efeitos benéficos no intestino, pois suas contagens não são reduzidas pela passagem no trato gastrintestinal.

## 5. CONCLUSÃO

Os microrganismos veiculados por leites fermentados comerciais confirmaram, através dos testes *in vitro* realizados no atual trabalho, que há realmente um potencial probiótico associado a esses microrganismos, o que demonstra a seriedade dos laticínios em fornecer um produto de qualidade e que promova a saúde dos seus consumidores.

Além disso, pelo seu valor comercializado, se torna um “remédio caseiro” de baixo custo, acessível a todos, sendo consumido pela população, principalmente aqueles que prezam por alimentação saudável.

Ainda cabe ressaltar que é necessário que seja um produto de alta qualidade e para que seus efeitos desejáveis sejam plenos, deverá conservar sua população bacteriana alta (acima de  $10^7$  UFC/g). Especial atenção também deve ser dispensada à temperatura ideal de conservação do produto até o final do seu prazo de validade nas prateleiras

## REFERÊNCIAS

ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, M.R; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.54, p.424-428, 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. Dez. 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>. Acesso em: 10 de junho de 2017.

ARAÚJO, E. A.; CARVALHO, A.; LEANDRO, E.S; MORAES, C. A.; FURTADO, M. M. Produção de queijo tipo cottage simbiótico e estudo de sobrevivência das células probióticas quando expostas a diferentes estresses. **Pesq. Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.39, p.11-118, 2009.

BELLETTI, N.; GATTI, M.; BOTTARI, B.; NEVIANI, E.; TABANELLI, G.; GARDINI, F. Antibiotic Resistance of Lactobacilli isolated from two Italian hard cheeses. **Journal of Food Protection**, USA, v.72, p.2162–2169, out. 2009.

BERNET, M.F.; BRASSART, D.; NEESER, J.R.; SERVIN, A.L. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. **Gut**, United Kingdom, v.35, p.483-489, abr. 1994.

BRANDÃO, R.L.; CASTRO, I.M.; BAMBIRRA, E.A.; AMARAL, S.C.; FIETTO, L.G.; TROPIA, M.J.M.; NEVES, M.J.; SANTOS, R.G.; GOMES, N.C.M.; NICOLI, J.R. Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 64, p. 564-568, 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, seção 1, p.5, 24 de out. de 2007.

CEBECI, A.; GURAKAN, C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. **Food Microbiology**, Amsterdã v.20, p.511-518, 2003.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **Journal of Food Protection**, USA, v.61, p.1636-1643, 1998.

\_\_\_\_\_. Development and application of an in vivo methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied. Microbiology**, New Jersey v.84, p.759-768, 1998b.



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

CHEIKHYOUSSEF, A.; POGORI, N.; CHEN, W.; ZHANG, H. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacterias: From production to their application. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã v.125, p. 215-222, 2008.

CHOU, L.S.; WEIMER, B. Isolation and characterization of acid and bile tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, Pennsylvania, v.82, p.23-31, 1999.

COPPOLA, R.; SUCCI, M.; TREMONTE, P.; REALE, A.; SALZANO G.; SORRENTINO, E. Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. **Le Lait**, Paris, v.85, p.193-204, 2005.

CORRÊA, N. B. O.; LIMA, F. M. L. S.; NICOLI, J. R.; PÉRET, L. A. F.; PENNA, F. J. A randomized placebo-controlled trial of Bifidobacterium lactis and Streptococcus thermophilus for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. **Journal of Clinical Gastroenterology**, USA v.39, p.385-389, 2005

COSTA, H.H.S.; SOUZA, M.R.; ACURCIO, L.B. Potencial probiótico *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.65, p.1858-1866, 2013.

CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics - *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, New Jersey, v. 26, p. 767-778, set. 2007.

DOGI, C.A.; GALDEANO, M.; PERDIGÓN, G. Gut immune stimulation by non pathogenic Gram (+) and Gram (-) bacteria. Comparison with a probiotic strain. **Cytokine**, Amsterdã, v.41, p. 223-231, mar. 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. WORLD HEALTH ORGANIZATION. WORLD ORGANIZATION OF ANIMAL HEALTH. Joint WHO/FAO/OIE expert. In: WORKSHOP ON NON-HUMAN ANTIMICROBIALS USAGE AND ANTIMICROBIALS RESISTANCE SCIENTIFIC ASSESSMENT. Geneva, Switzerland, 2003. 117p.

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

GILLILAND, S.E. (Ed). **Bacterial Starter Cultures for Food**. EUA: CRC Press, out. 1985. 175p.

GROVER, S.; RASHMI, H. M.; SRIVASTAVA A. K.; BATSHI C. K. Probiotics for human health –new innovations and emerging trends. **Gut Patogens**, p. 1-14, 2012.

GUCHTE, M.; SERROR, P.; CHERVAUX, C.; SMOKVINA T.; EHRLICH, S. D.; MAQUIN, E. Stress responses in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v.82, p.187-216, ago. 2002.

GUEDES NETO, L.G.; SOUZA, M.R.; NUNES, A.C.; NICOLI, J. R.; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente amicroorganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, p.245-250, set. 2005.

GUGLIELMETTI, S.; TAMAGNINI, I.; MINUZZO, M.; ARIOLI, S.; PARINI, C.; COMELLI, E.; MORA, D. Study of the adhesion of *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 to human intestinal cell lines. **Current Microbiology**, India, v.59, p. 167-172, ago. 2009.

GUPTA, V.; GARG, R. Probiotics. **Indian Journal of Medical Microbiology**, India, v.27, p.202-209, 2009.

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

JIANG, T.; MUSTAPHA, A.; SAVAIANO, D.A. Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. **Journal of Dairy Science**, Pennsylvania, v.79, p.750-757, mai. 1996.

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

LEAHY, S.C.; HIGGINS, D.G.; FITZGERALD, G.F.; van SINDEREN, D. Getting better with bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Amsterdã, v.98, p. 1303-1315, 2005.

LILLEY, D.M.; STILWELL, R.H. Probiotics growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, Washington DC, v. 147, p. 747-748, 1965.

LIONG, M. Probiotics: A Critical review of their potential role as antihypertensives, immune modulators, hypocholesterolemics, and perimenopausal treatments. **Nutrition Reviews**, Amsterdã, v.65, p. 316-328, jul. 2007.

LÓPEZ, P.; GUEIMOND, M.; MARGOLLES, A.; SUÁREZ, A. Distinct *Bifidobacterium* strains drive different immune responses *in vitro*. **International Journal of Food Microbiology**, New Jersey, v.138, p. 157-165, mar. 2010.

Mahasneh, A. M., & Abbs, M. M. Probiotics and traditional fermented foods: The eternal connection (Mini-Review). **Jordan Journal of Biological Sciences**, Jordania, 3(4), 133-140, 2010.

MARCO ML, PAVAN S, KLEEREBEZEM M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. **Current Opinion in Biotechnology**, New Jersey, 17: 204-210, abr. 2004.

MARTINS, F.S.; TIAGO, F.C.P.; BARBOSA, F.H.F.; PENNA, F.J.; ROSA, C.A.; NARDI, R.M.D.; NEVES, M.J.; NICOLI, J.R. Utilização de leveduras como probióticos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Sergipe, v. 5, p. 1-13, 2005.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, Amsterdã, v. 12, n. 2-3, p. 173-182, 2002.

MATTO, J.; MALINEN, E.; SUIHKO, M.L.; ALANDER, M.; PALVA, A.; SAARELA, M. Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, New Jersey, v.97, p. 459-470, 2004.

MEILE, L.; BLAY, G.L.; THIERRY, A. Safety assessment of dairy microorganism: *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*. **International Journal of Food Microbiology**, New Jersey, v. 126, p. 316-320, set. 2008.

METCHNIKOFF, I.I. **The prolongation of life**: optimistic Studies. (reprinted edition 1907). New York, USA: Springer. 2004, 360p.

NARDI, R.M.D.; SANTORO, M.M.; OLIVEIRA, J.S.; PIMENTA, A.M.C.; FERRAZ, V.P.; BENCHETRIT, L.C.; NICOLI, J.R. Purification and molecular characterization of antibacterial compounds produced by *Lactobacillus murinus* strain L1. **Journal of Applied Microbiology**, Amsterdã v.99, p. 649-656, 2005.

NETO, L. G. G. **Produção de queijo de coalho em Pernambuco: isolamento e identificação de *staphylococcus* spp e de bactérias ácidoláticas e de sua atividade antagonista *in-vitro***. 2004. 48 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

NEUMANN, E.; OLIVEIRA, M.A.P.; CABRAL, C.M.; MOURA, L.N.; NICOLI J.R.; VIEIRA, E.C.; CARA, D.C.; PODOPRIGORA, G.I.; VIEIRA, L.Q. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germ-free mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 31, p. 1565-1573, 1998

NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q. Probióticos, prebióticos e simbióticos: Moduladores do sistema digestivo. **Revista Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 28, p. 34-38, 2000.

OUOBA, L.I.I.; LEI, V.; JENSEN, L.B. Resistance of potencial probiotic lactic acid bacteria and of African and European origin to antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, v.121, p. 217-224, 2008.

OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.J. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. **International Dairy Journal**, Amsterdã, v. 8, p. 749-758, 1998.

OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.J.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 82, p. 279-289, 2002

PENNER, R.; FEDORAK, R.N.; MADSEN, K.L. Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal diseases. **Current Opinion in Pharmacology**, Amsterdã, v. 5, p. 596-603, 2005.

PERIN, C.; RAMOS, G. Z.; BECKER, F.L.. Isolamento e caracterização de *Lactococcus garvieae*. **Revista AMRIGS**, Porto Alegre, v.44, p.81-84, 2000.

PLUMMER, S.; WEAVER, M.A.; HARRIS, J.C.; DEE, P.; HUNTER, J. *Clostridium difficile* pilot study: effect of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhea. **International Microbiology**, Espanha, v.7, p. 59-62, 2004.

PODOPRIGORA, G.I.; COMUNIAN, L.B.; PIMENTEL, E.F.; MOURA, L.N.; CARA, D.C.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C. Study of stimulatory effect of bifidobacteria on the host mononuclear phagocyte system using gnotobiotic animal models. **Anaerobe**, Amsterdã, v. 5, p. 509-512, 1999.

RASTALL, R. A.; GIBSON, G. R.; GILL, H. S.; GUARNER, F.; KLAENHAMMER, T. R.; POT, B.; REID, G.; ROWLAND, I. R.; SANDERS, M. E. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. **FEMS Microbiology Ecology**, New Jersey, v. 52, p. 145-152, 2005

REID, G. D.; CHARBONNEAU, S.; GONZALEZ, G.; GARDINER, J. E.; BRUCE, A. W. Ability of *Lactobacillus* GR-1 and RC-14 to stimulate host defences and reduce gut translocation and infectivity of *Salmonella typhimurium*. **Preventive Nutrition and Food Science**, Coreia, v.7, p. 168-173, 2002.

ROBINSON, R.K. **Therapeutic properties of fermented milks**. New York: Elsevier, 1991. 185p.

RODRÍGUEZ-ALONSO, P.; FERNÁNDEZ-OTERO, C.; CENTENO, J. A.; GARABAL, J. I. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria and Micrococcaceae/Staphylococcaceae isolates from artisanal raw milk cheeses, and potential implications on cheese making. **Journal of Food Science**, New Jersey, v.74, p.284-293, 2009.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.42, p. 1-16, 2006.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; HATTO, J.; MATTILA SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, Amsterdã, v.84, p. 197-15, 2000.

SAAVEDRA, J.M.; BAUMAN, N.A.; OUNG, I.; PERMAN, J.A.; YOLKEN, R.H. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. **The Lancet**, London, v. 344, p. 1046-1049, 1994

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y.; LEE, Y.K. Probiotics: how should they be defined? **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdã, v. 10, p. 107-110, 1999.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, USA, v. 73, p. 361S-364S, 2001.

SENA, M. J.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; MORAIS, C. F. A.; CORRÊA, E. S.; SOUZA, M. R. Características físico-químicas de queijo de coalho comercializado em Recife, PE. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 74, p. 41-44, 2000.

SENOCK, A. C.; ISMAEEL, A. Y.; BOTTA, G. A. Probiotics: facts or myths. **Journal of Clinical Microbiological**, Washington DC, v. 11, p. 958-966, 2005.

Santos, T. T.; ORNELLAS, R. M. S.; ARCUCIO, L. B.; OLIVEIRA, M. M.; NICOLI, J. R.; DIAS, C. V.; TROVATTI, A. P. Characterization of lactobacilli strains derived from cocoa fermentation in the south of Bahia for the development of probiotic cultures. **LWT - Food Science and Technology journal**, Amsterdã, v. 73, p. 259-266, nov. 2016.

SHORTT, C. The probiotic century: historical and current perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdã, v. 10, p. 411-417, 1999.

SILVA, A. M.; BAMBIRRA, E. A.; OLIVEIRA, A. L.; SOUZA, P. P.; GOMES, D. A.; VIEIRA, E. C.; NICOLI, J. R. Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella typhimurium* in conventional and gnotobiotic mice. **Journal of Applied Microbiology**, New Jersey, v. 86, p. 331-336, 1999.

SILVA, A. M.; BARBOSA, F. H. F.; DUARTE, R.; VIEIRA, L. Q.; ARANTES, R. M. E.; NICOLI, J. R. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. **Journal of Applied Microbiology**, New Jersey, v. 97, p. 29-37, 2004.

SYBESMA, W.; KORT, R.; LEE Y-K. (2015). Locally sourced probiotics, the next opportunity for developing countries? **Trends in Biotechnology**, Amsterdã, 33(4), 197-200, 2015.

TAMBEKAR, D. H.; BHUTADA, S. A. Acid and bile tolerance, antibacterial activity, antibiotic resistance and bacteriocins activity of probiotic *Lactobacillus* species. **Recent Research in Science and Technology**, India, v.2, p.94-98, 2010.

TAMIME, A.Y. Fermented milks: a historical food with modern applications – a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 56, suppl. 4, p. S2-S15, 2002. GILLILAND, S.E. (Ed). **Bacterial Starter Cultures for Food**. EUA: CRC, 1985. 175p.

TEMMERMAN, R.; POT, B.; HUYS, G.; SWINGS, J. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdã, v.81, p.1-10, fev. 2002.

TEUBER, M.; MEILE, L.; SCHWARZ, F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**., v.76, p.115-137, 1999.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, Amsterdã, v. 18, p. 714-728, 2008.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, Amsterdã, v.36, p.895-904, 2003.

YILDIRIM, Z.; JOHNSON, M.G. Characterization and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. **Journal of Food Protection**, USA, v. 6, p. 47-51, 1998.