



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

WINNIE ALENCAR LUCIANO

AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE CEPAS DE
***LACTOBACILLUS* ISOLADAS DE SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE**
FRUTAS

JOÃO PESSOA

2016

WINNIE ALENCAR LUCIANO

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE CEPAS DE
LACTOBACILLUS ISOLADAS DE SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE
FRUTAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, como requisito obrigatório a obtenção do grau de Bacharel em Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

JOÃO PESSOA

2016

L937a Luciano, Winnie Alencar.

Avaliação de propriedades probióticas de cepas de lactobacillus isoladas de subprodutos do processamento de frutas / Winnie Alencar Luciano. - - João Pessoa: [s.n.], 2016.

46f. : il.

Orientador: Evandro Leite de Souza.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

WINNIE ALENCAR LUCIANO

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE CEPAS DE
LACTOBACILLUS ISOLADAS DE SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE
FRUTAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Nutrição da Universidade Federal da Paraíba, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Bacharel em Nutrição, com linha específica em Microbiologia dos Alimentos.

Aprovado em ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Prof^o. Dr^o. Evandro Leite de Souza
Departamento de Nutrição/CCS/UFPB
Orientador

Prof^a. Estefânia Fernandes Garcia
Departamento de Gastronomia
Examinadora

Dr^a Janaína Maria Batista de Sousa
Universidade Federal da Paraíba
Examinadora

DEDICATÓRIA

A Deus, por cada benção concebida!

A minha mãe, Roberta, por todo amor, confiança, apoio e dedicação.

A minha avó, Antônia, por ser o alicerce da minha vida.

A todos os amigos que participaram dessa conquista.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida. Agradeço e enalteço o pai celeste por me conduzir diante de todos os obstáculos, me dando força e fé para enfrenta-los.

A minha mãe, agradeço por todos os anos de dedicação, amor, paciência, preocupação e apoio incondicional. Essa conquista é sua, por me educar sabiamente, sendo esse exemplo de pessoa em quem eu me espelho.

A minha avó, a base da minha vida. A senhora me ensinou a não desistir nunca, não importa quão grande seja o obstáculo. És a pessoa mais forte e guerreira que conheço. Sei que minha formatura sempre foi um sonho seu, e hoje estou realizando-o.

A minha querida tia, Lécia, por torcer verdadeiramente por essa conquista, me apoiando e incentivando durante todos esses anos. Muito obrigada!

Minhas irmãs de coração e sobrinhos, vocês são a alegria da minha vida. Agradeço todo amor e carinho.

Aos meus amigos, família que eu escolhi para ser minha! Em especial Thaís, Alberto, Kamila, Laiane e Adjane, vocês têm lugar privilegiado em meu coração e como já dizia Shakespeare *“Com o tempo aprendes que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que tens na vida, mas quem tens na vida”*. Quero tê-los em minha vida sempre! Meu muito obrigada pela amizade, pelas risadas, carinho, apoio, torcida e loucuras compartilhadas. As noites mal dormidas, os estresses com as provas, os dias de fome e cansaço se tornaram memórias felizes por serem partilhados com vocês.

A professora Dr^a Maria Lúcia da Conceição, pois foi quem deu o meu primeiro “sim”, me aceitando de coração aberto no laboratório. Obrigada por ser conselheira e amiga. És um ser iluminado, um exemplo de humildade, inteligência, dedicação e dignidade.

A Estefânia Fernandes Garcia. Você me deu esse privilégio imensurável de conhecer a pesquisa científica, me apresentando esse mundo que eu tanto amo hoje: O laboratório. Não tenho palavras para descrever a gratidão que sinto. Foi uma peça chave na minha formação, meu espelho para vida toda. Sem você eu não teria conseguido muito do que tenho hoje. Muito obrigada por todo carinho, conselhos, incentivos e ensinamentos.

Ao meu orientador, Prof^o. Dr^o Evandro Leite de Souza, por ter me aceitado como sua orientanda e pela confiança ao me conceder a oportunidade de estagiar na iniciação científica, oportunidade ímpar que me conduziu a buscar novos objetivos, fundamentais para minha futura vida profissional. Meus sinceros agradecimentos pelos valiosos ensinamentos e direcionamento, bem como pelo exemplo de profissionalismo.

Agradeço aos outros professores que possibilitaram a realização desse sonho, contribuindo para minha formação e aprendizado, em especial Prof^a. Dr^a Jailane Aquino e Prof^o Pamela Martins por todos os ensinamentos dentro e fora da sala de aula e durante o projeto de extensão. Tenho um carinho e admiração especial por ambas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que foi o órgão financiador desse trabalho

Por fim agradeço a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho. A caminhada até aqui não foi fácil, mas cada pessoa que passou pela minha vida, deixando um pouco de si comigo, tem sua participação nessa conquista. Assim, meu muito obrigada a todos vocês.

Saudações!

RESUMO

Probióticos são micro-organismos vivos, que quando ingeridos em quantidade suficiente, proporcionam benefícios à saúde de quem os consomem. Contudo, para serem incorporados como alimentos funcionais na dieta, necessitam de estudos detalhados que comprovem sua segurança e benefícios. As cepas selecionadas para uso como probiótico não podem ter características patogênicas nem devem transmitir genes de resistência a antibióticos e precisam sobreviver à passagem através do trato gastrointestinal e proliferar no intestino, a fim de garantir sua funcionalidade. Esse estudo foi desenvolvido para avaliar o potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus* spp. isoladas de subprodutos do processamento de frutas. Para avaliação do potencial probiótico foram realizados testes de sobrevivência a diferentes valores de pH e diferentes concentrações de sais biliares, antagonismo frente a bactérias patogênicas, sensibilidade a antimicrobianos e capacidade de sobrevivência ao trato gastrointestinal. As cepas apresentaram-se, no geral, tolerantes quando expostas a valores de pH ácido, onde algumas foram tolerantes a pH 3 durante duas e três horas. A capacidade de tolerância aos sais biliares também pode ser observada, sendo as bactérias capazes de tolerar a concentração de 1% por até três horas. Os resultados obtidos acerca do antagonismo frente a bactérias patogênicas variaram entre os testes utilizados, onde todas as estirpes foram capazes de formar halo de inibição quando a atividade antagônica foi testada na presença das células de *Lactobacillus*, enquanto que o sobrenadante livre de células de certas cepas não conseguiu inibir *Staphylococcus aureus* além de formarem halos menos expressivos que outras cepas testadas. Quando submetidas às condições simuladas do trato gastrointestinal, no geral, apresentaram boa viabilidade, mantendo valores elevados ao longo de todo o teste exceto duas estirpes que perderam viabilidade após 122 e 92 minutos simulação, respectivamente. A maioria parte das cepas testadas exibiram resistência aos antimicrobianos, em especial à Kanamicina, eritromicina e tetraciclina. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que as cepas testadas apresentam boa viabilidade e potencialidade para serem utilizadas como probióticos, sendo necessário o desenvolvimento de mais estudos que certifiquem a segurança de tais cepas a fim de incorporá-las em alimentos.

Palavras-chave: alimentos funcionais; resíduos; viabilidade.

ABSTRACT

Probiotics are living microorganisms that when ingested in sufficient amounts provide health benefits. However, to be incorporated as functional foods in the diet, probiotics require detailed studies to prove their safety and benefits. Strains selected for use as probiotics cannot have pathogenic characteristics or transmit antibiotic resistance genes and must survive passage through the gastrointestinal tract and proliferate in the gut in order to ensure their functionality. This study was designed to evaluate the probiotic potential of *Lactobacillus* spp. strains isolated from fruit processing by-products. To assess the probiotic potential, survival tests at different pHs and different concentrations of bile salts, antagonism against pathogenic bacteria, sensitivity to antimicrobial agents and survivability to the gastrointestinal tract were performed. Strains were in general tolerant when exposed to acidic pH, some of which were tolerant to pH 3 for two to three hours. Tolerance to bile salts was also observed, and bacteria were able to tolerate 1% concentration for up to three hours. The results obtained about antagonism against pathogenic bacteria varied among tests used, in which all strains were able to form inhibition halos when the antagonistic activity was tested in the presence of lactobacilli cells, while supernatant of cells free from certain strains failed to inhibit *Staphylococcus aureus* and formed less significant halos compared to other strains tested. When submitted to conditions of gastrointestinal tract simulation, in general, they showed good viability, keeping high values throughout the test except for two strains that lost viability after 122 and 92 minutes of simulation, respectively. Most of the strains tested exhibited antimicrobial resistance, in particular to kanamycin, tetracycline and erythromycin. The results obtained in this study indicate that the strains tested have good viability and potential to be used as probiotics, but further studies should be conducted to certify the safety of such strains in order to incorporate them into foods.

Keywords: functional foods; waste; viability

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Contagem de células viáveis de <i>Lactobacillus pentosus</i>	21
Figura 2. Contagem de células viáveis de <i>Lactobacillus fermentum</i>	21
Figura 3. Contagem de células viáveis de <i>Lactobacillus brevis</i>	22
Figura 4. Contagem de células viáveis de <i>Lactobacillus plantarum</i>	22
Figura 5. Contagem de células viáveis de <i>Lactobacillus paracasei</i>	23
Figura 6. Contagem de células viáveis quando expostos a soluções de sais de bile.....	24
Figura 7. Contagem de células viáveis de <i>Lactobacillus plantarum</i>	29
Figura 8. Contagem de células viáveis de <i>Lactobacillus paracasei</i>	29
Figura 9. Contagem de células viáveis de <i>Lactobacillus brevis</i>	30
Figura 10 Contagem de células viáveis de <i>Lactobacillus fermentum</i>	30
Figura 11. Contagem de células viáveis de <i>Lactobacillus pentosus</i>	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Halos de inibição frente a patógenos.....	25
Tabela 2. Resistência a antibióticos de <i>Lactobacillus</i> spp.....	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	12
2.2 PROBIÓTICOS.....	13
2.3 O GÊNERO <i>LACTOBACILLUS</i>	14
2.3.1 <i>Lactobacillus</i> como probiótico.....	15
2.4 PROCESSAMENTO DE FRUTAS.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 CEPAS BACTERIANAS.....	17
3.2 TESTES DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO.....	18
3.2.1 Tolerância a diferentes valores de pH.....	18
3.2.2 Tolerância a diferentes concentrações de sais de bile.....	18
3.2.3 Antagonismo frente a bactérias patogênicas.....	18
3.2.4 Resistência a antibióticos.....	19
3.3 SOBREVIVÊNCIA DAS CEPAS EM CONDIÇÕES SIMULADAS DO TRATO GASTROINTESTINAL (TGI).....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
4.1 TESTE DE TOLERÂNCIA A DIFERENTES VALORES DE PH.....	20
4.2 TESTE DE TOLERÂNCIA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SAIS DE BILE.....	23
4.3 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTAGÔNICA FRENTE A BACTÉRIAS PATOGÊNICAS.....	25
4.4 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS.....	27
4.5 CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA ÀS CONDIÇÕES SIMULADAS DO TRATO GASTROINTESTINAL.....	28
5 CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

Os consumidores têm buscado uma alimentação nutricionalmente mais equilibrada, aumentando a procura por produtos que além de boas características sensoriais estejam aliados à promoção da saúde. Essa mudança do perfil de exigência do consumidor tem despertado o interesse da comunidade científica na busca e compreensão da atuação de certos alimentos na diminuição de riscos de algumas doenças (MADI et al., 2011). Nesse cenário, destacam-se os alimentos funcionais. Esse termo foi introduzido no Japão, em meados dos anos 80, referindo-se à alimentos processados que contém ingredientes que além de fornecerem a nutrição básica são capazes de promover saúde (COLLI, 1998).

Os alimentos funcionais possuem mecanismos não previstos pela nutrição convencional que são capazes de promover saúde, entretanto, vale salientar que esses efeitos não se aplicam à cura de doenças (OLIVEIRA et al., 2002).

Os probióticos fazem parte dos componentes que formam essa categoria. Consistem em micro-organismos vivos, incorporados aos alimentos, capazes de exercer efeitos benéficos ao hospedeiro. Entretanto, para ser utilizado em alimento, o probiótico deve sobreviver às condições adversas às quais são expostos durante a passagem pelo trato gastrointestinal e colonizar o intestino, mesmo que temporariamente, a fim de exercer seus efeitos (COELHO, 2013).

Entre os representantes dos probióticos estão determinadas bactérias lácticas e outras bactérias, que fazem parte do grupo de micro-organismos capazes de exercer efeitos positivos no hospedeiro (OLIVEIRA et al., 2002). Estas bactérias possuem capacidade de desenvolvimento em diversos ambientes, podendo ser encontradas em alimentos como leite, carnes, vegetais, grãos, frutas e bebidas (GONCALVES et al., 2015).

Alguns dos benefícios atribuídos à ingestão de culturas probióticas estão principalmente relacionados a desordens intestinais e modulação da microbiota intestinal (SAAD, 2006). Entretanto, para que os produtos probióticos apresentem tais efeitos, faz-se necessária a ingestão de uma quantidade mínima viável desses micro-organismos por porção fornecida do alimento, sendo a dose necessária para tal efeito variada em função da cepa e do produto (WGO, 2011).

O mercado de produtos probióticos teve um crescimento importante nos últimos anos, sendo os de matrizes lácteas os mais disseminados. No Brasil, a venda de alimentos funcionais corresponde a aproximadamente 1% do total de alimentos, onde cerca de 65% desses são probióticos (GRANATO et al., 2010). Apesar de apresentarem maior distribuição

no mercado, os produtos probióticos baseados em matrizes lácteas não podem ser utilizados por muitos consumidores, por possuírem alergias a componentes do leite, intolerância à lactose, pela presença de colesterol entre outras razões (JIMÉNEZ, 2012). A limitada variedade de produtos probióticos no mercado e a crescente demanda por esses alimentos aumenta o interesse e a busca pelo desenvolvimento de alimentos probióticos utilizando outras matrizes que não a láctea, podendo ampliar os benefícios de tais alimentos a uma maior gama de consumidores (COELHO et al., 2009).

Outros alimentos tem mostrado potencial para a administração de culturas probióticas como produtos cárneos fermentados (MACEDO et al., 2005) e sucos de frutas (COSTA et al., 2013; SANTOS et al., 2008). A viabilidade da cepa incorporada na matriz alimentícia depende de fatores como: pH do produto, temperatura de estocagem, micro-organismos competidores e substâncias inibidoras (OLIVEIRA et al, 2002).

Vários estudos têm mostrado a presença de bactérias ácido-láticas em matrizes vegetais. Cepas dessas bactérias foram isoladas em rúcula, espinafre, frutas frescas, sementes e vegetais orgânicos não processados ((KRUGER, 2010; SATHE et al., 2007; TRIAS et al., 2008). Nesse contexto, matrizes de plantas podem constituir uma fonte alternativa de probióticos.

O consumo de frutas vem aumentando nos últimos anos, devido seu valor nutritivo e possíveis efeitos terapêuticos. A busca por esse tipo de alimento decorre do interesse da população por uma alimentação nutricionalmente equilibrada. Frutas e vegetais são fontes de micronutrientes, fibras e componentes com propriedades funcionais (VAN DUYN; PIVONKA, 2000). O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de frutas, conseqüentemente, é um dos países que mais produz resíduos agroindustriais. Atualmente são produzidas milhões de toneladas de resíduos resultantes do processamento agroindustrial, sendo muitos destes ricos em compostos bioativos (MELO et al., 2011), a exemplo dos resíduos de frutas provenientes do seu processamento para a indústria de polpas.

O aproveitamento dos subprodutos de frutas para obtenção de componentes com características funcionais pode ser uma alternativa promissora para a elaboração de novos ingredientes provenientes desse tipo de matriz. Então o objetivo do presente estudo foi avaliar propriedades probióticas de cepas de *Lactobacillus spp.* isoladas de subprodutos do processamento de frutas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Os efeitos benéficos de alguns tipos de alimentos sobre a saúde de quem os consomem já são conhecidos há muito tempo. O Japão foi o primeiro país a explorar o potencial terapêutico dos alimentos, onde em meados dos anos 80 foi introduzido o termo alimentos funcionais, fazendo referência à alimentos processados, similares em aparência aos alimentos convencionais, consumidos como parte da dieta, que contém ingredientes que além de fornecerem a nutrição básica são capazes de promover saúde (SOUZA, 2008). Segundo Roberfroid (2005), um alimento pode ser considerado funcional, quando for demonstrado que o mesmo afeta benéficamente uma ou mais função do organismo, além de garantir um efeito nutricional adequado, de modo que seja relevante não só para o bem-estar e a saúde como também para redução do risco de doenças.

Devem apresentar-se sobre forma de alimentos comum, sendo consumidos na dieta cotidiana, mas devem regular funções corporais de modo que auxiliem na proteção contra doenças crônicas degenerativas, a exemplo de hipertensão, diabetes e coronariopatias (SOUZA et al., 2003). O *International Life Science Institute* organizou em 1995 o *First International Conference of East-West Perspectives on Functional Food*. Vários foram os países participantes do encontro, estabelecendo-se após consenso a definição de alimentos funcionais, sua distinção de vitaminas, minerais e outros compostos usados na suplementação dietética e a demonstração científica de seus efeitos através de estudos laboratoriais e humanos a fim de serem incluídos ou não na classe de alimentos funcionais (SOUZA, 2008).

Seguindo a tendência mundial, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA elaborou a Resolução n. 18, esclarecendo as diretrizes básicas para comprovação das propriedades funcionais de um alimento (ANVISA, 1999). Esse regulamento objetiva que as alegações sejam comprovadas cientificamente, a fim de que o consumidor não seja induzido ao engano. Esses ingredientes devem ainda ser comprovadamente seguros para consumo. O enquadramento e registro de tais alimentos são previstos pela Resolução n. 19/1999 e Resolução n. 2/ 2002.

Fazem parte da lista da ANVISA (2008) para nutrientes e não nutrientes com alegação de propriedades funcionais: ácidos graxos eicosapentaenoicos (EPA) e docosaexaenoico (DHA), carotenoides, luteína, zeaxantina, fibras alimentares, frutooligossacarídeos, goma guar parcialmente hidrolisada, inulina, lactulose, polidextrose, quitosana, fitoesteróis, proteína

de soja e probióticos. Ainda de acordo com essa lista, as espécies bacterianas que possuem efeito probiótico comprovado são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade rhamnosus, *Lactobacillus casei* variedade defensis, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium*.

2.2 PROBIÓTICOS

O termo probióticos foi introduzido em meados da década de 60 por Lilly e Stillwell (1965), fazendo referência a um fator de origem microbiológica que estimula o crescimento de outros organismos. Atualmente, são definidos como micro-organismos vivos, não patogênicos, que possuem capacidade de exercer efeito positivo sobre a saúde de quem os consome, quando ingeridos em quantidade adequada (FAO/WHO, 2006). Várias espécies e gêneros compõem o grupo dos probióticos, contudo, as linhagens de maior importância comercial são as bactérias ácido lácticas, com destaque para os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium spp* (MEIRA, 2011).

Vários são os benefícios atribuídos à ingestão de culturas probióticas, onde alguns são bem elucidados e documentados, enquanto outros possuem potencial promissor. Alguns dos efeitos são: controle da microbiota intestinal, estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, promoção da resistência à colonização intestinal por patógenos, diminuição da população de patógenos por meio da produção de substâncias com propriedades antimicrobianas, promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose, estimulação do sistema imune, alívio da constipação, aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas (SAAD, 2006). Entretanto, de acordo com a lista de alegações de propriedade funcional aprovada pela ANVISA em julho de 2008, a quantidade mínima viável desses micro-organismos, necessárias para que um produto probiótico exerça seus efeitos deve estar situada entre 10^8 e 10^9 Unidade Formadora de Colônia (UFC) por porção fornecida do alimento.

A teoria para o mecanismo de ação desses micro-organismos é baseada em alterações no ecossistema intestinal. Os probióticos afetam as bactérias do intestino, provocando um aumento nas bactérias anaeróbias benéficas, concomitante à diminuição das populações patogênicas. Tais mudanças na microbiota intestinal estimulam o sistema imunológico da mucosa e o não-imunológico através do antagonismo frente aos patógenos potenciais, resultando nos efeitos benéficos provocados por tais micro-organismos (WGO, 2011).

Contudo, os mecanismos pelos quais os probióticos efetuam esses efeitos ainda não são bem elucidados. Acredita-se que envolvem modificações no pH, a produção de compostos antimicrobianos, competição com patógenos pelos sítios de ligação e por nutrientes, estimulação das células imunomoduladoras entre outras ações (MEIRA, 2011).

Para ser aplicado como probiótico, o micro-organismo utilizado, precisa ter identificação internacionalmente conhecida, além de atender a critérios de segurança, tecnológicos e funcionais. As considerações de segurança incluem: não ter histórico de patogenicidade, não estar associadas a outras doenças, ser estáveis geneticamente e não apresentar genes dominantes de resistência à antimicrobianos bem como transmiti-los (URNAU, 2012; OLIVEIRA et al., 2002). No que concerne aos aspectos tecnológicos, as cepas devem: ter propriedades sensoriais agradáveis, manter características desejáveis durante processamento e estocagem, ser viáveis durante o processamento e apresentar estabilidade no período de armazenamento do produto (MEIRA, 2011; SAARELA et al., 2000). Os critérios funcionais que devem ser atendidos para a o uso como probiótico são: estabilidade quando expostos a pH ácido e aos sais de bile, capacidade de adesão à mucosa intestinal, capacidade de colonização, ao menos temporariamente, do intestino, produção de compostos antimicrobianos e manter-se metabolicamente ativo a nível intestinal (OLIVEIRA et al, 2002).

Diversos produtos já são comercializados como probióticos, sendo os lácteos mais explorados pela indústria, tais como iogurte, outros tipo de leite fermentado, queijos e produtos não fermentados como sorvete e soro de leite. Outros produtos que não lácteos também vem recebendo a adição de probióticos, como maionese, sucos de frutas, produtos cárneos, produtos a base de aveia, salame, cereais entre outros, evidenciando um crescente interesse em formulações baseadas em outras matrizes (MEIRA, 2011).

2.3 O GÊNERO *LACTOBACILLUS*

Os *Lactobacillus* foram um dos gêneros de maior relevância no grupo das Bactérias Ácido Láticas, constitui um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas, apresentadas em forma de bastonetes, imóveis, não formadoras de esporos, catalase negativa, anaeróbios, que produzem ácido lático como principal produto resultante do metabolismo dos carboidratos (GAVA, 2008). Apresentam requisitos de crescimento complexos, requerendo baixa tensão de oxigênio, carboidratos fermentáveis, certas quantidades de vitaminas do complexo B, ácidos graxos insaturados livres, alguns minerais entre outros fatores (GOMES e MALCATA, 1999).

Podem ser divididos em três grandes grupos, baseados em suas características fermentativas, sendo eles: homofermentativos obrigatórios, heterofermentativos facultativos e heterofermentativos obrigatórios. Os *Lactobacillus* homofermentativos exclusivos fermentam apenas a glicose em ácido láctico, a citar como exemplo *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus* e *Lactobacillus salivarius*. Os heterofermentativos obrigatórios fermentam hexoses em ácido láctico, ácido acético, etanol e dióxido de carbono, apresentando como característica desse grupo a produção de gás a partir da glicose. São exemplos desse grupo *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus buchneri*. Entre os lactobacilos heterofermentativos facultativos estão as espécies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus curvatus*, caracterizados por fermentarem hexoses em ácido láctico com produção de gás a partir de gliconato e não pela glicose (BURITI e SAAD 2007; CHAVES, 2013).

Sua utilização na indústria de alimentos é bastante variada, estando envolvidos na produção de inúmeros produtos. Estão presentes em diversos tipos de alimentos, desde cereais, vegetais, queijos, produtos lácteos e bebidas fermentadas, a carnes e derivados. Essa ampla disseminação em diferentes matrizes decorre da sua ocupação em variados nichos, como solo, pele, trato gastrointestinal, sistema respiratório e vaginal de animais e humanos (SANDES, 2013).

2.3.1 *Lactobacillus* como probiótico

Bactérias do gênero *Lactobacillus* estão entre os micro-organismos probióticos mais importantes que vem sendo pesquisados. Fato decorrente do seu reconhecimento como parte da flora intestinal humana, bem como de seu amplo consumo de forma segura durante séculos, através de alimentos fermentados (FORSYTHE, 2013).

Os produtos lácteos são os mais disseminados no segmento dos probióticos, sendo os leites fermentados mais optados pela indústria para uso como veículo de culturas probióticas e/ou prebióticas (COSTA, 2013). No mercado brasileiro, os produtos probióticos estão praticamente restritos a tipos de leites fermentados, cenário diferente da Europa, Estados Unidos e Canadá, onde cereais e diversos tipos de queijo também estão disponíveis (RIBEIRO et al., 2009).

Preparações probióticas a partir de matriz láctea contendo *Lactobacillus* são amplamente referidas na literatura, onde as bebidas lácteas e leites fermentados com adição

dessas culturas são citados por diversos autores (CUNHA et al., 2008; GUEIMONDE, 2004; OLIVEIRA e SILVA, 2011; VIEGAS et al., 2010).

Dentre os produtos lácteos fermentados, o queijo tem sido sugerido como um melhor veículo de culturas probióticas que os demais (ONG et al., 2006). No geral, apresentam características que lhes conferem vantagens em relação a outros produtos, como pH menos ácido que iogurtes e leites fermentados, tornando o meio mais estável para sobrevivência dos micro-organismos probióticos (RIBEIRO, 2009).

Novos produtos com alegação funcional estão sendo elaborados, inclusive a partir de outras matrizes que não a láctea, onde várias espécies de lactobacilos vêm sendo utilizadas como cultura probiótica. Valencia (2015) elaborou sobremesa láctea probiótica com adição de *L. paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81, tendo como resultado um produto de boa qualidade e boa viabilidade como probiótico. Cepas foram testadas quanto a sobrevivência em sucos de frutas, apresentando crescimento significativo (NUALKAEKUL e CHARALAMPOPOULOS, 2011; COSTA et al., 2013; PIMENTEL et al., 2011). Os lactobacilos vêm sendo usados também na elaboração de embutidos e produtos cárneos fermentados (BOMDESPACHO et al., 2011; CAMPAGNOL et al., 2007; MACEDO, 2005).

2.4 PROCESSAMENTO DE FRUTAS

O processo de profissionalização da fruticultura no Brasil, objetivando produzir frutos em larga escala e de boa qualidade, vêm sendo marcado pela exploração de maiores áreas concomitante ao uso de novas tecnologias. Esse aumento significativo da agroindústria tem resultado em uma ampliação da produção de resíduos ou subprodutos (JUNIOR et al., 2006). Os resíduos são formados, dependendo do tipo de fruta, por cascas, caroços, sementes e bagaços, onde, apresentam em sua composição vitaminas, minerais, fibras, constituintes bioativos e antioxidantes (SOUSA et al., 2011).

A falta de conhecimento acerca do potencial desse material contribui para que o mesmo não seja reaproveitado, onde seu descarte coadjuva para o aumento da produção de lixo orgânico, que precisa ser descartado corretamente, a fim de se evitar maiores danos ambientais (NATALE et al., 2013). Todavia, esses resíduos apresentam elevada potencialidade, possuindo em sua estrutura vitaminas, minerais, frações não digeríveis e outros compostos com propriedades funcionais (SILVA, 2014).

No âmbito das frutíferas do Nordeste brasileiro, são destaques pelo grande volume de resíduo gerado o caju (*Anacardium occidentale*), maracujá (*Passiflora edulis*), melão

(*Cucumis melo*), abacaxi (*Ananas comosus*) e acerola (*Malpighia emarginata*) (PEREIRA et al., 2009). Além da criação de problemas ambientais, o descarte dos subprodutos representa perda de matérias-primas e energia (PELIZER, 2007).

Diante dessa realidade, estudos têm sido conduzidos para se investigar o valor nutritivo desses resíduos orgânicos, mostrando alternativas para utilização dos mesmos, reduzindo, assim, os problemas ambientais provocados pelo seu descarte na natureza (SOUSA et al., 2011). Melo et al. (2011) obtiveram resultados positivos quanto a presença de compostos bioativos e atividade antioxidante de bagaço de uva Isabel (*Vitis labrusca*), de uva Verdejo (*Vitis vinífera*) e de goiaba (*Psidium guajava*). Resultados semelhantes foram encontrados por Infante et al. (2013), observando atividade antioxidante significativa dos resíduos de abacaxi, maracujá, caju e manga. Outros autores também relataram a presença de compostos bioativos e atividade antioxidante de subprodutos de frutas (ARBOS et al., 2013; DAIUTO et al., 2014)

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo experimental foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos, Departamento de Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, Campus I, João Pessoa – PB.

3.1 CEPAS BACTERIANAS

A partir do banco de cepas de *Lactobacillus* spp., pertencentes ao Laboratório de Microbiologia e Bioquímica de Alimentos, previamente isoladas de frutas e seus subprodutos do processamento de polpas, cinco cepas foram selecionadas com base no desempenho apresentado em testes prévios do seu potencial probiótico. As mesmas foram mantidas a -20 °C, em caldo MRS com 20% de glicerol, sendo sua reativação realizada em caldo MRS a 37°C. Uma cepa de *Lactobacillus plantarum* (Lp49) e uma de *Lactobacillus brevis* (Lb59) isoladas a partir de resíduos de acerola (*Malpighia emarginata*), uma cepa de *Lactobacillus paracasei* (Lpa108), isolada de resíduo de graviola, *Annona muricata*, uma cepa de *Lactobacillus fermentum* (Lf111), isolada a partir de resíduo de graviola e uma cepa de *Lactobacillus pentosus* (Lpe129) isolada de resíduo de manga, *Mangifera indica* L.

3.2 TESTES DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DOS ISOLADOS

3.2.1 Tolerância a diferentes valores de pH

Para desenvolvimento do teste, inicialmente caldo MRS foi inoculado e incubado a 37°C durante 24 horas. Caldos com crescimento visível sofreram ajuste de inóculo para obter-se OD_{625 nm} de 0,5 (absorbância) correspondente a cerca de 6 – 7 log.UFC.mL⁻¹. Os caldos foram centrifugados por 3 min. a 10.000 rpm e os pellets foram lavados duas vezes com tampão fosfato (PBS). A tolerância das cepas a diferentes valores de pH foi determinada a partir do ajuste do pH com Ácido Clorídrico 1M para 2; 3; 5 e 7,2 (controle) com posterior incubação a 37°C durante 0; 2 e 3 horas. A cada período de tempo o número de células viáveis foi determinado por contagem em placas utilizando-se a técnica da microgota (REHAIEM et al., 2014; SAARELA et al., 2006), com prévia incubação a 37°C/48 horas em anaerobiose.

3.2.2 Tolerância a diferentes concentrações de sais de bile

As cepas foram inoculadas em caldo MRS a 37°C por 24 horas. Para desenvolvimento do teste, inicialmente o caldo MRS foi inoculado e incubado a 37°C durante 24 horas. Caldos com crescimento visível sofreram ajuste de inóculo para obter-se OD_{625 nm} de 0,5 (absorbância) correspondente a cerca de 6 – 7 log.UFC.mL⁻¹. Os caldos foram centrifugados por 3 min. a 10.000 rpm e os pellets foram lavados duas vezes com tampão fosfato, sendo finalmente diluídos em soluções teste elaboradas com PBS com concentrações de 0%; 0,15%; 0,30% e 1% de sais biliares. As soluções foram incubadas a 37°C em banho maria, por 0; 1; 2 e 3 horas. A cada período de tempo, o número de células foi determinado por contagem em placa através da técnica de microgota (REHAIEM et al., 2014; SAARELA et al., 2006), com prévia incubação a 37°C/48 horas em anaerobiose.

3.2.3 Antagonismo frente a bactérias patogênicas

Na avaliação de antagonismo frente a bactérias patogênicas as cepas de lactobacilos foram testadas contra cepas de *Staphylococcus aureus* (INCQS 00015, origem ATCC 25923), *Salmonella enterica subsp. typhimurium* (INCQS 00150, origem ATCC 14028), *Salmonella enterica subsp. enteritidis* (INCQS 00258, origem 13076), *Listeria monocytogenes* (INCQS

00266, origem ATCC 7644) e *Escherichia coli* (INCQS 00219, origem 8739) utilizando-se a técnica *ágar spot test* e por meio de difusão em poço, segundo metodologia descrita por Ahmadora et al. (2013), com modificações.

Para a realização dos testes, caldo MRS foi inoculado com as cepas de lactobacilos e padronizado a $OD_{625nm} = 0,5$ correspondendo a $6 - 7 \log.UFC.mL^{-1}$. As cepas patogênicas foram inoculadas em caldo *brain-heart-infusion* (BHI), a $37^{\circ}C$ durante 24 horas, com inóculo ajustado a $OD_{625nm} = 0,1$.

- Ágar spot test: Nesse método, a partir do caldo inoculado com lactobacilo, foi transferida uma alíquota de 10 μL para placa de petri previamente preparada contendo ágar MRS, utilizando a técnica da microgota, em seguida as placas foram incubadas a $37^{\circ}C$, por 24 horas em anaerobiose. Após esse período, verteu-se uma sobre camada de 20 mL de ágar BHI semissólido contendo uma espécie de bactéria patogênica a ser testada. As placas foram novamente incubadas a $37^{\circ}C$, durante 24h em aerobiose. Após esse período foi realizada a leitura do halo de inibição utilizando-se um paquímetro (JACOBSEN et al., 1999)
- Difusão em poço: A partir do caldo MRS inoculado com lactobacilo obteve-se o sobrenadante livre de células (SLC) através de centrifugação do caldo e posterior filtração em membrana (0,22 μm). Previamente foi preparada uma placa de petri contendo ágar BHI semi-sólido inoculado com uma das espécies de bactérias patogênicas testadas. Poços de 5 mm foram realizados na placa e 50 μL de SLC foi adicionado ao poço. As placas foram incubadas a $37^{\circ}C/24$ horas em aerobiose. Após o período realizou-se a leitura do halo utilizando-se um paquímetro (VITALI et al., 2012).

3.2.4 Resistência a antibióticos

Para os testes de resistência aos antibióticos, estirpes bacterianas foram inoculadas (1%, v / v) em caldo MRS suplementado com os seguintes antibióticos: cloranfenicol, gentamicina, kanamicina, eritromicina, tetraciclina (Sigma), a concentrações finais de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 e 1024 $\mu g.ml^{-1}$ e ampicilina, clindamicina e vancomicina (Sigma), a concentrações finais de 0,125; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16; 32 e 64 $\mu g.ml^{-1}$. Os testes foram realizados em triplicata utilizando-se o método de microdiluição em caldo, de acordo com metodologia descrita por Argyri et al. (2013). Após a elaboração das microplacas e passadas às 24 horas de

incubação a 37°C avaliou-se a OD 625 nm em um leitor de microplacas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada segundo critérios da (CLSI, 2012) e EFSA, (2012).

3.3 SOBREVIVÊNCIA DAS CEPAS EM CONDIÇÕES SIMULADAS DO TRATO GASTROINTESTINAL (TGI)

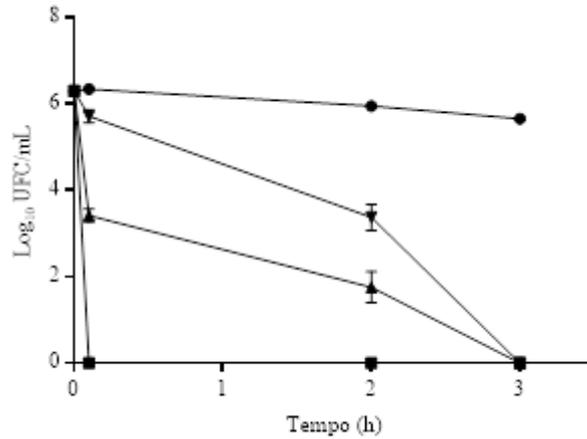
Inicialmente cada cepa teste foi inoculada em caldo MRS e incubada a 37°C/24 horas. Posteriormente foram incorporadas (1% v/v) em caldo MRS para serem submetidas a condições simuladas do trato gastrointestinal, a citar, fase de mastigação (100 U/mL de α -amilase, pH ajustado para 6,9 e tempo de exposição de 2 minutos a 200 rpm), esôfago-estômago (25 mg/mL de pepsina, pH ajustado gradualmente para 2,0 e tempo de exposição de 90 minutos a 130 rpm), duodeno (2 g/L de pancreatina e 12 g/L de sais biliares bovinos e tempo de exposição de 30 minutos a 45 rpm) e íleo (pH ajustado para 6,5 e tempo de exposição de 60 minutos a 45 rpm), de acordo com a metodologia descrita por Madureira et al. (2011) e Oliveira et al. (2014), Durante todo o teste, amostras do caldo MRS inoculado foram mantidas a 37°C sem exposição às condições de simulação do TGI, sendo utilizados como controle. A agitação mecânica foi utilizada para simular os movimentos peristálticos e o teste foi realizado em estufa incubadora a 37 °C com ajuste de rotação em cada fase. A simulação foi contínua, de modo que o volume de trabalho aumentou gradualmente a partir dos 25 mL da amostra inicial. A contagem de células viáveis foi realizada a partir da técnica da microgota (REHAIEM et al., 2014; SAARELA et al., 2006), com prévia incubação a 37°C/48 horas em anaerobiose.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TESTE DE TOLERÂNCIA A DIFERENTES VALORES DE PH

Para que possam ser capazes de exercer sua funcionalidade, as bactérias probióticas devem resistir ou tolerar a variações de pH, em especial ao pH ácido do estômago, e a secreções da bile ao longo do intestino delgado (ANDRADE et al., 2014). As cepas testadas apresentaram-se, no geral, tolerantes a exposição a valores de pH 3,0; 5,0 e 7,2 após duas e três horas, exceto Lpe129 (Figura 1), onde não foram detectadas células viáveis após duas horas de teste.

Figura 1. Contagem de células viáveis de *Lactobacillus pentosus* (Lpe129) quando expostos a diferentes valores de pH: controle - 7,2 (●); 2,0 (■); 3,0 (▲) e 5,0 (▼).



A contagem de todas as bactérias diminuiu no pH 2 nos primeiros minutos, onde a contagem bacteriana esteve abaixo do limite de detecção após duas e três horas. Cepas de *Lactobacillus* isoladas de queijo Parmegiano Reggiano por Solieri et al. (2014) perderam a viabilidade quando expostas ao pH 2. Em pH 3 verificaram-se diferentes comportamentos entre elas. Lf111 (Figura 2) e Lb59 (Figura 3) mostraram-se tolerantes mesmo após 180 minutos de exposição.

Figura 2. Contagem de células viáveis de *Lactobacillus fermentum* (Lf111) quando expostos a diferentes valores de pH: controle - 7,2 (●); 2,0 (■); 3,0 (▲) e 5,0 (▼).

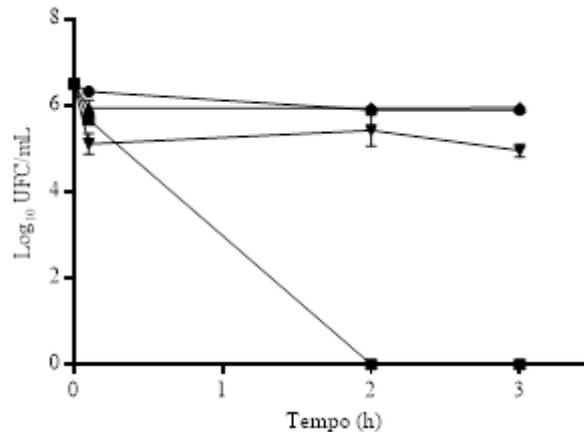
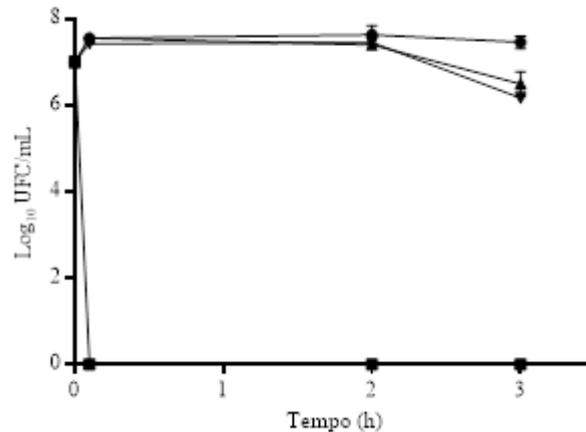


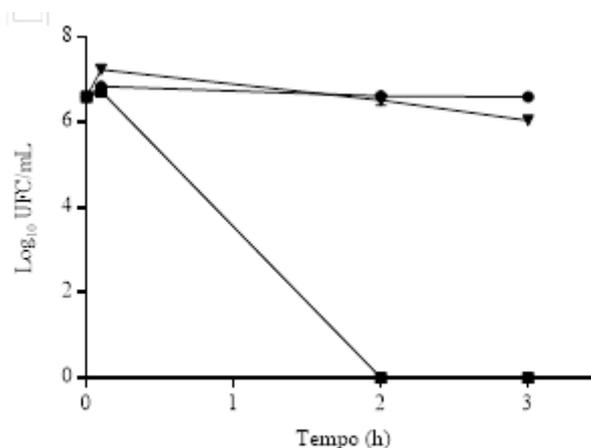
Figura 3. Contagem de células viáveis de *Lactobacillus brevis* (Lb59) quando expostos a valores de pH: controle - 7,2 (●); 2,0 (■); 3,0 (▲) e 5,0 (▼).



O pH do estômago situa-se, em média, entre 2,5 e 3,5, a depender da natureza do alimento, sendo esses valores maiores ou menores após a alimentação ou durante jejum. O alimento afeta ainda o tempo de trânsito estomacal, entretanto, a média de permanência é de duas a quatro horas (MEIRA et al., 2010). Assim, os lactobacilos do presente estudo que apresentaram células viáveis em valor de pH 3 por pelo menos duas horas podem vir a sobreviver à passagem pelo estômago a depender do alimento ao qual será vinculado.

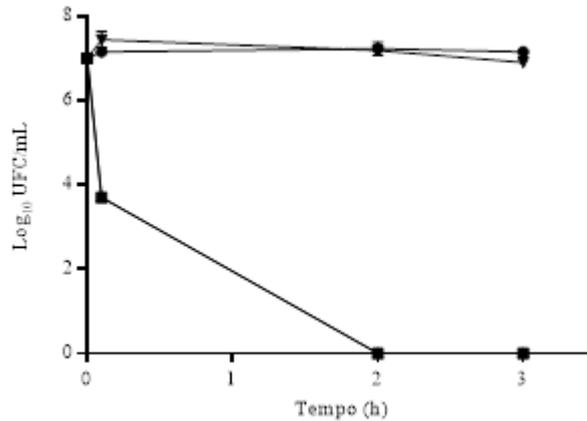
A cepa Lp49 (Figura 4) apresentou viabilidade quando exposta a pH 3,0 por 2 horas, reduzindo um ciclo de log. Tulumoglu et al. (2013) obteve dados diferentes ao analisar diferentes espécies de bactérias lácticas, onde observou redução significativa das contagens nesse valor de pH.

Figura 4. Contagem de células viáveis de *Lactobacillus plantarum* (Lp49) quando expostos a valores de pH: controle - 7,2 (●); 2,0 (■); 3,0 (▲) e 5,0 (▼)



Em pH 5 e 7,2 (controle) todas as bactérias testadas apresentaram viabilidade em todos os tempos de exposição. Os resultados da cepa de *L. paracasei* (Lpa108) são apresentados na Figura 5. Essa cepa mostrou bom crescimento em pH 3,0; 5,0 e 7,2. Entretanto, obteve decréscimo significativo quando exposta em pH 2,0 após os primeiros minutos

Figura 5. Contagem de células viáveis de *Lactobacillus paracasei* (Lpa108) quando expostos a valores de pH: controle - 7,2 (●); 2,0 (■); 3,0 (▲) e 5,0 (▼).



Meira, (2011) que relatou tolerância ao pH 3 e 4 de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha, entretanto, a contagem esteve abaixo do limite de detecção em pH 2 entre cepas testadas, semelhante à dados obtidos no presente estudo. Andrade et al., (2014), observaram resistência de *Lactobacillus spp.* isolados de queijos minas artesanais, mostrando capacidade de sobrevivência em pH 2 em todos os tempos testados, diferindo dos resultados aqui expostos.

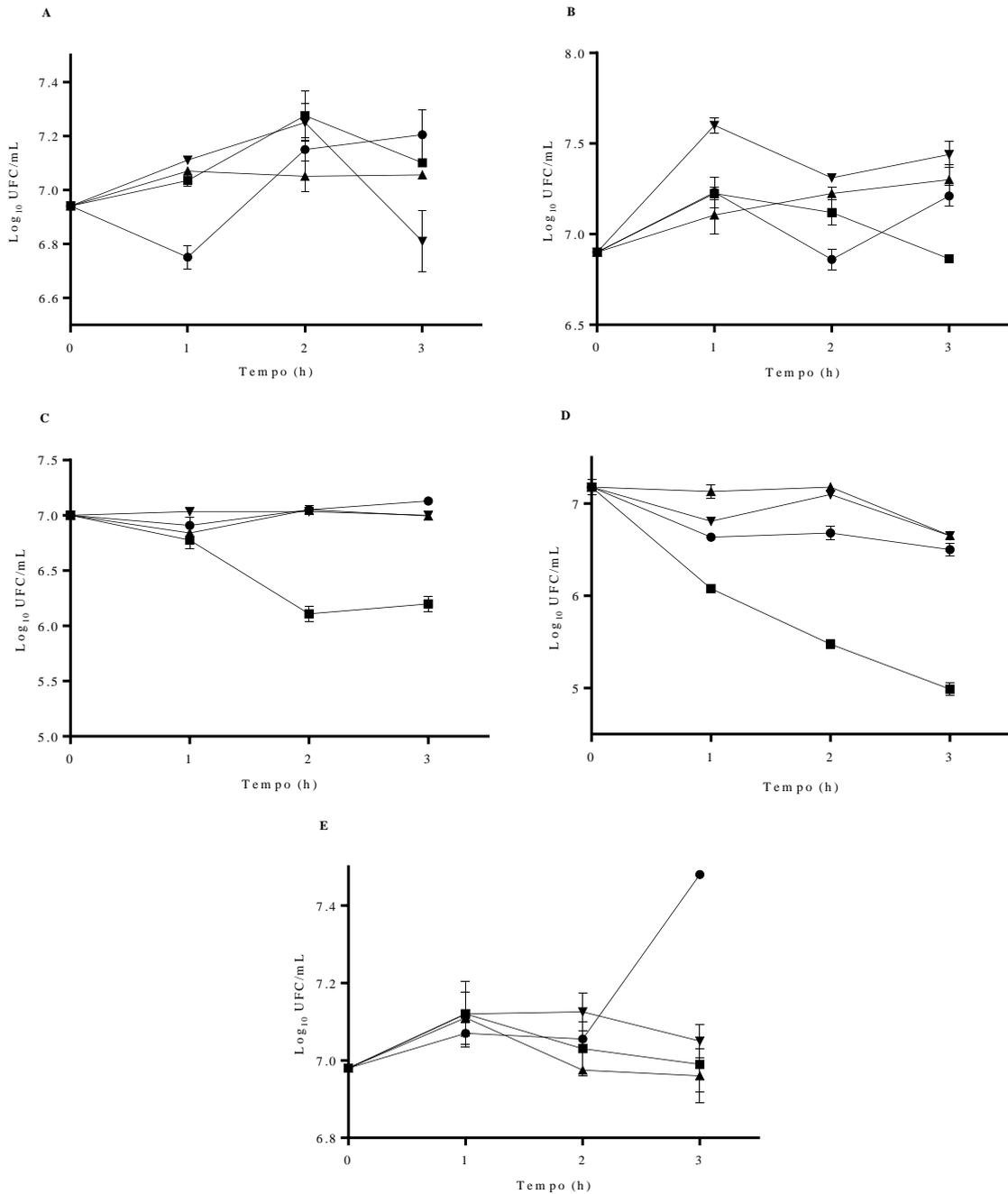
4.2 TESTE DE TOLERÂNCIA A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SAIS DE BILE

Microrganismos probióticos devem ser resistentes à ação da bile para que possam atingir as porções distais do intestino e colonizá-las (GIBSON; FULLER, 2000). Os sais biliares possuem capacidade de desestruturar a membrana celular, sendo tóxicos às células (MEIRA et al, 2010). A Figura 6 apresenta os dados de tolerância dos lactobacilos testados a diferentes concentrações de sais de bile.

As cepas mostraram-se viáveis quando expostas a concentrações de sais biliares de 0,15%; 0,30% e 1% após uma, duas e três horas, com contagens superiores a 5,18 log.UFC.mL⁻¹. As bactérias foram capazes de tolerar até mesmo a concentração de 1% após 3

horas. Diferente do resultado encontrado nesse estudo, nenhuma das linhagens de *Lactobacillus* avaliadas por Meira, (2011) foi viável na concentração de 1 % de sais de bile.

Figura 6 – Contagem de células viáveis (média \pm desvio padrão) (A) Lp49, (B) Lb59, (C) Lpa108, (D) Lf111 e (E) Lpe129 quando expostos a soluções de sais de bile a 0% - controle (●), 0,15% (■), 0,30% (▼) e 1% (▲).



A resistência de algumas bactérias Gram-positivas, especialmente linhagens presentes no trato gastrointestinal, à ação da bile pode ser justificada pela capacidade que algumas possuem em produzir a enzima sal biliar hidrolase. Essa enzima hidrolisa a ligação amida dos sais biliares conjugados, liberando sais biliares livres com menor capacidade detergente (MEIRA, 2011).

Outros autores relatam a resistência de cepas de bactérias ácido lácticas Gram-positivas a ação da bile, a citar Urnau et al., (2012), Andrade et al., (2014) e Tussolini et al., (2007).

4.3 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTAGÔNICA FRENTE A BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

A produção de bacteriocinas e peptídeos bacterianos ou proteínas ativas, que agem contra outras bactérias é uma importante característica das BAL na inibição de patógenos (CLOSE, 2000). A pesquisa por bactérias ácido-láticas produtoras de substâncias antimicrobianas inibidoras de micro-organismo patogênicos vem sendo bastante difundida para o uso das mesmas na produção de alimentos (HERMANNNS, 2013), onde essas bacteriocinas podem vir a ser utilizadas como bioconservantes (ORTOLANI, 2009).

Na avaliação do antagonismo frente à patógenos pela técnica de difusão em poço, utilizou-se apenas o sobrenadante livre de células das bactérias lácticas. Os resultados obtidos nesse teste foram menos expressivos, tendo em vista a menor concentração de substâncias antimicrobianas presentes na ausência das células. Contudo, a presença de um halo de inibição, independente do diâmetro, é um indicativo de antagonismo frente a bactérias patogênicas (NETO et al., 2005). Os resultados de ambas as técnicas estão dispostos na Tab. 1. Bactérias ácido-láticas isoladas de queijo minas foram testadas contra micro-organismos indicadores, onde todas as cepas de lactobacilos apresentaram antagonismo contra esses patógenos em testes realizados por Costa et al., (2013) utilizando apenas substâncias antimicrobianas produzidas. Resultados semelhantes também foram encontrados por Sandes, (2013) onde bactérias lácticas isoladas foram capazes de inibir a maioria dos patógenos testados.

Tabela 1 – Halos de inibição em mm de BAL frente a patógenos

	<i>S. aureus</i>		<i>S. typhimurium</i>		<i>S. enteritidis</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>E. coli</i>	
	Difusão	Spot	Difusão	Spot	Difusão	Spot	Difusão	Spot	Difusão	Spot
Lp49	2,75	9	2,5	7,5	0,5	12	3	8	3	5,25
Lb59	-	4	2	6	1,5	5	2,5	4	2	4,5
Lpa108	-	7	3	8	3	8,25	2	8	4	8,5
Lf111	-	5	2	6,75	3	8,5	2	6	1,5	6
Lpe129	4	7	2,5	8,5	3	10,5	4	8	4,5	6,5

Lp49 = *Lactobacillus plantarum*, Lb59 = *Lactobacillus brevis*, Lpa108 = *Lactobacillus paracasei*, Lf111 = *Lactobacillus fermentum*, Lpe129 = *Lactobacillus pentosus*.

Na avaliação empregando-se a técnica de spot, as bactérias lácticas apresentaram maior atividade antagônica contra os patógenos testados. A atividade antimicrobiana é expressa através da formação de halo decorrente da inibição do crescimento das bactérias patogênicas. O halo é medido em milímetros, indicando atividade antimicrobiana. Todos os *Lactobacillus spp.* testados foram capazes de inibir as cepas das bactérias patogênicas. O *L. plantarum* (Lp49) apresentou halos de 5,25 mm a 12 mm de diâmetro, variando entre os diferentes patógenos, sendo seu antagonismo diante da *Escherichia coli* o seu menor resultado. Já o Lpe129 apresentou halos de 6,5 mm a 10,5 mm e assim como o Lp49, também apresentou menor atividade antagônica contra *E. Coli*, e maior contra *Salmonella enteritidis*. As cepas Lpa108 e Lf111 mostraram seus menores halos na presença de *Staphylococcus aureus*, medindo 7 mm e 5 mm respectivamente.

Bactérias ácido-láticas isoladas de leite e queijos artesanais foram capazes de inibir cepas de patógenos em estudo realizado por Hermanns, (2013). Utilizando metodologia semelhante a esse experimento Pereira; Gómes, (2007) obtiveram resultados positivos ao analisar a inibição de *E. coli* e *S. aureus* por *Lactobacillus acidophilus*.

Outros autores encontraram resultados semelhantes aos deste estudo como Guedes Neto et al., (2005) que revelaram a inibição de quatro cepas de *Lactobacillus spp.* frente a *Staphylococcus spp.* e *E. coli*. e Martins et al., (2006) que ao avaliarem bactérias ácido lácticas isoladas de suínos também verificaram cepas capazes de inibir a maioria dos microrganismos patogênicos as quais foram expostas.

4.4 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Os bons resultados obtidos através do uso de antibióticos na redução da ocorrência de doenças infecciosas e da mortalidade associada a esses levaram a uma extensa utilização dos mesmos. Diante do uso generalizado, muitas vezes em doses errôneas, surgiram os indícios de resistência dos micro-organismos patogênicos (CHAVES, 2013). A resistência bacteriana a antibióticos põe em risco a saúde pública, sendo um problema de amplitude mundial (CASTANHEIRA, 2013). Diante disso, micro-organismos que venham a ser utilizados como aditivo alimentar não devem possuir genes de resistência a antibióticos, bem como, não transferi-los.

A Tabela 2 apresenta os resultados do teste de sensibilidade aos antimicrobianos dos lactobacilos testados através da concentração inibitória mínima (CIM). As cepas são consideradas resistentes quando apresentam CIM maior que o breakpoint estabelecido pela EFSA (2012).

Tabela 2 – Resistência a antibióticos de *Lactobacillus* spp.

Cepas	CIMs (µg/ml)							
	Kan.	Chl.	Gen.	Amp.	Clin.	Van.	Eri.	Tet.
<i>Lactobacillus plantarum</i> (49)	256 ^R	2	64 ^R	0,25	1	64	1024 ^R	4
<i>Lactobacillus brevis</i> (59)	128 ^R	2	16	2	32 ^R	64	1024 ^R	1024 ^R
<i>Lactobacillus paracasei</i> (108)	1024 ^R	2	1024 ^R	64 ^R	64 ^R	64	1024 ^R	1024 ^R
<i>Lactobacillus fermentum</i> (111)	128 ^R	2	8	0,5	0,5	0,25	512 ^R	32 ^R
<i>Lactobacillus pentosus</i> (129)	256 ^R	2	64 ^R	0,25	1	0,125	256 ^R	16

^R Resistência de acordo com breakpoint da EFSA (2012). Kan.= kanamicina, Chl.=cloranfenicol, Gen.=gentamicina, Amp.=ampicilina, Clin.=clindamicina, Van=vancomicina, Eri.=eritromicina e Tet.=tetraciclina.

Todas as cepas testadas apresentaram resistência à kanamicina e eritromicina. Outras publicações mostraram a resistência de Lactobacilos a kanamicina. Resultados obtidos por Argyri et al., (2013) mostraram resistência da maioria dos isolados de bactérias ácido-láticas de azeitonas fermentadas frente a kanamicina. No mesmo estudo, cepas de Lactobacilos apresentaram resistência à gentamicina, tetraciclina, ampicilina e cloranfenicol. Resistência a kanamicina por lactobacilos e *Bifidobacterium spp.* foi vista em estudo feito por D'Aimmo et al., (2007). Diferindo dos resultados apresentados nesse trabalho, isolado de *L. plantarum* foram sensíveis a eritromicina (CHAVES, 2013). O mesmo foi observado em lactobacilos isolados de amostras de queijo-de-minas (COSTA et al., 2013). Em relação à gentamicina e tetraciclina a maioria dos *Lactobacillus spp.* também apresentou resistência. Essa resistência também foi observada em outros trabalhos (TEMMERMAN et al., 2003; LIU et al., 2009; AZEVEDO et al. 2000; BELLETTI et al., 2009).

Cepas sensíveis a antimicrobianos foram descritas anteriormente, contrapondo com os resultados do presente experimento. Todas as amostras testadas por Costa et al. (2013) foram sensíveis à eritromicina e tetraciclina. O mesmo foi encontrado por Andrade et al. (2014), onde todos os lactobacilos foram sensíveis a eritromicina.

Apesar de algumas bactérias apresentarem resistência a determinados antibióticos, entre elas cepas de *Lactobacillus spp.*, normalmente não é mediada por plasmídios, não sendo, assim, transmissível (SAARELA et al., 2000). A resistência desse gênero ao antimicrobiano vancomicina é uma característica comum (ANDRADE et al., 2014). Cepas de *Lb. rhamnosus* e *Lb. paracasei* foram resistentes a esse antibiótico, com CIM >250 µg/mL (FELTEN, 1999). O mesmo resultado foi obtido em outros trabalhos (LIU et al., 2009; TEMMERMAN et al., 2003; ACÚRCIO, 2011; RODRÍGUEZ-ALONSO et al. 2009; D'AIMMO et al., 2007).

4.5 CAPACIDADE DE SOBREVIVÊNCIA ÀS CONDIÇÕES SIMULADAS DO TRATO GASTROINTESTINAL

Um dos principais critérios para a seleção de micro-organismos probióticos e sua incorporação em alimentos é a sua tolerância às condições impostas pelo trato gastrointestinal (ROLIM et al., 2015). A matriz alimentar em que a estirpe é vinculada pode protegê-la das condições adversas ao longo do trato gastrointestinal, sendo a sobrevivência dependente tanto do probiótico quanto da matriz alimentar vinculada (CONCEIÇÃO, 2012).

As células de *L. plantarum* e *L. paracasei* apresentaram redução das contagens após exposição ao pH ácido referente ao estômago, com recuperação das contagens ao final do

experimento (Figura 7 e 8). Além de apresentarem valores de células viáveis próximos entre a primeira e a última fase, não se observou diferença significativa entre as bactérias expostas e não expostas à simulação. Resultados semelhantes foram mostrados por Conceição (2012), onde os lactobacilos cultivados em MRS, ao final da simulação, apresentaram contagens de células viáveis próximas entre as que foram ou não submetidas ao estresse.

Figura 7. Contagem de células viáveis de *Lactobacillus plantarum* (Lp49) expostos (●) ou não (■) às condições simuladas do trato gastrintestinal.

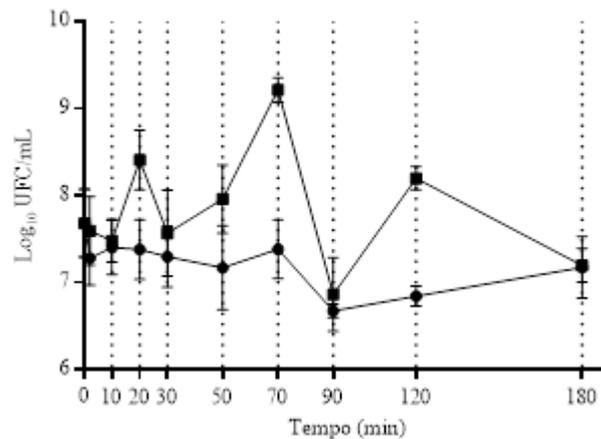
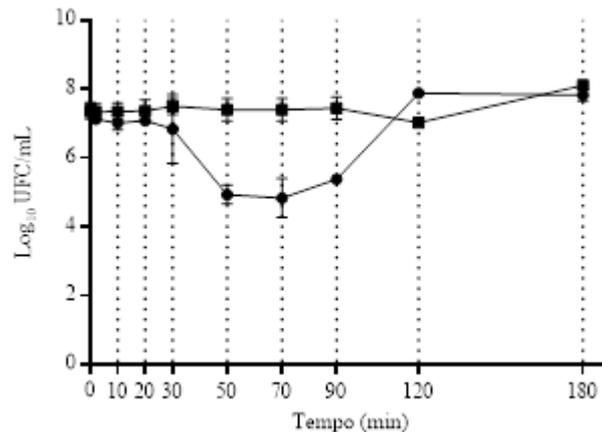


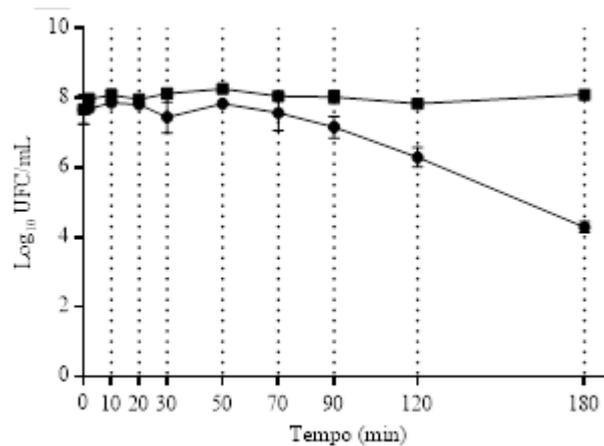
Figura 8. Contagem de células viáveis de *Lactobacillus paracasei* (Lpa108) expostos (●) ou não (■) às condições simuladas do trato gastrintestinal.



Cepas de *Lactobacillus acidophilus* em queijos armazenados por 15 e 30 dias foram capazes de sobreviver à simulação da passagem pelo trato gastrointestinal, apresentando diminuição de dois ciclos logarítmicos (CHAVES et al., 2009). A cepa de *Lactobacillus brevis* (Lb59) se comportou de maneira semelhante, evidenciando capacidade de

sobrevivência às condições as quais foi exposta, entretanto com diminuição das células viáveis (Figura 9).

Figura 9. Contagem de células viáveis de *Lactobacillus brevis* (Lb59) expostos (●) ou não (■) às condições simuladas do trato gastrointestinal.



Duas das cinco cepas testadas não apresentaram contagens ao final da simulação do trato gastrointestinal, onde as bactérias se encontraram abaixo do limite de detecção após 120 e 90 minutos de testes, respectivamente (Figura 10 e 11). Oliveira et al., (2014) obtiveram dados semelhantes, onde bactérias probióticas cultivadas em caldo MRS não mostraram crescimento após 122 minutos de exposição às condições simuladas do TGI.

Figura 10. Contagem de células viáveis de *Lactobacillus fermentum* (Lf111) expostos (●) ou não (■) às condições simuladas do trato gastrointestinal.

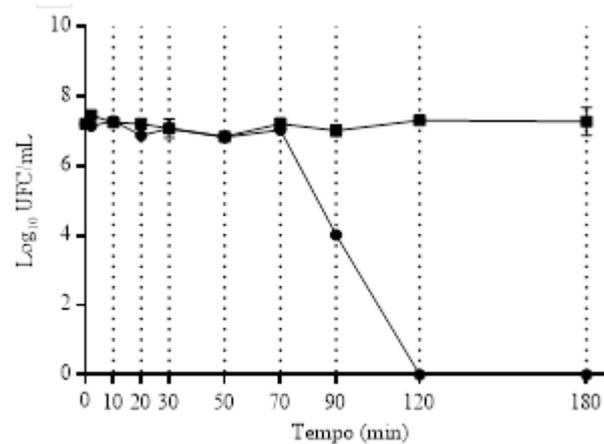
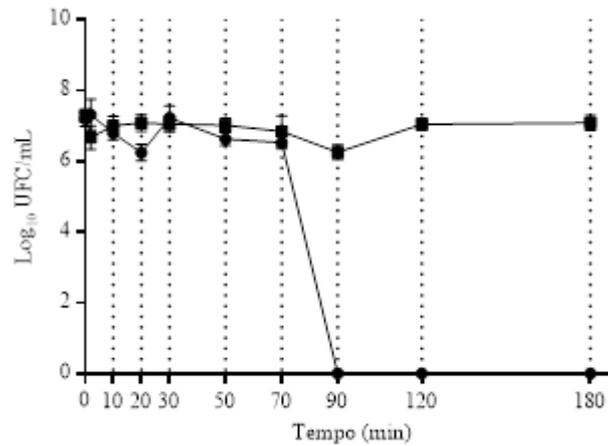


Figura 11. Contagem de células viáveis de *Lactobacillus pentosus* (Lp129) expostos (●) ou não (■) às condições simuladas do trato gastrointestinal.



Todas as cepas que não foram submetidas às condições de estresse mantiveram um padrão de resistência similar no decorrer do teste. Cepas de *Lactobacillus rhamnosus* testadas por Vamanu et al., (2011) apresentaram boa viabilidade após simulação das condições gástricas e intestinais. Outros autores também relataram capacidade de sobrevivência de micro-organismos probióticos ao trato gastrointestinal (MADUREIRA et al., 2005; BRINQUES, AYUB, 2009; MICHIDA et al., 2006; LIAN et al., 2003).

5 CONCLUSÃO

As cepas avaliadas apresentaram boa tolerância a pH 3 e concentração de 1% de sais biliares. Foram capazes ainda de produzir substâncias antimicrobianas, mostrando resultados positivos na inibição de patógenos em ambos os testes utilizados. Três dos cinco lactobacilos testados sobreviveram às condições adversas aos quais foram expostos durante a simulação do trato gastrointestinal. Entretanto, todos revelaram resistência a pelo menos 3 dos 8 antimicrobianos testados. Assim, diante dos testes desenvolvidos pode-se evidenciar que os lactobacilos apresentam potencial probiótico. Contudo, de maneira geral, todas as cepas devem ser investigadas em futuros estudos para avaliação da natureza da resistência a antibióticos, para maior segurança no uso dessas bactérias como culturas probióticas.

REFERÊNCIAS

ACÚRCIO, L.B. **Isolamento, enumeração, identificação molecular e avaliação de propriedades probióticas de *Enterococcus* isolados de leite de ovelha**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Brasília: ANVISA, 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Regulamento Técnico de procedimento para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais ou de saúde em sua rotulagem. Brasília: ANVISA, 1999.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedade Funcional e ou de Saúde. Brasília: ANVISA, 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Brasília: ANVISA, 2008.

ANDRADE, C. R. G. et al. Propriedades probióticas *in vitro* de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo minas artesanal da Serra da Canastra – MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, p.1592-1600, 2014.

ALVES, C.C.C. et al. *Lactobacillus acidophilus* and of direct acidification to minas frescal cheese production. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1559-1566, 2011.

ARBOS, K. A. et al. Atividade antimicrobiana, antioxidante e teor de compostos fenólicos em casca e amêndoa de frutos de manga. **Revista Ceres**, v. 60, n. 2, p.161-165, 2013.

ARGYRI, A. A. et al. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. **Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 282-291, 2013.

AZEVEDO, P.A. et al. Isolamento e caracterização de *Lactococcus garvieae*. **Revista AMRIGS**, v.44, p.81-84, 2000.

BELLETTI, N. et al. Antibiotic Resistance of Lactobacilli isolated from two Italian hard cheeses. **Journal of Food Protection**, v.72, p.2162–2169, 2009.

BOMDESPACHO, L. Q. et al. O emprego de okara no processamento de “hambúrguer” de frango fermentado com *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014. **Alimentação e Nutrição**, v. 22, n. 2, p.315-322, 2011.

BRINQUES, G. B.; AYUB, M. A. Z. Viabilidade de *Lactobacillus plantarum* imobilizados em diferentes condições em meios gastrointestinais simulados e sob condições de refrigeração. Oktoberforum-PPGEQ, 2009.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probiótico em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 57, n. 4, 2007.

CAMPAGNOL, P. C. B. et al. Salame elaborado com *Lactobacillus plantarum* fermentado em meio de cultura de plasma suíno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 883-889, 2007.

CASTANHEIRA, B. A. M. G. **Mecanismos de resistência à antibióticos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Lusófona de Humanidade e Tecnologias, Lisboa, 2013.

CHAVES, A. A. M. **Avaliação da suscetibilidade à antibióticos de *Lactobacillus plantarum* isolados de salsicharia tradicional portuguesa**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Zootécnica/Produção animal). Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2013.

CHAVES, G. de M. et al. Simulação do sistema gastrointestinal humano para avaliação de resistência de probiótico em queijo de coalho com leite de cabra. **Anais em: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, Campinas, 2009.

CLOSE WH. Producing pigs without antibiotic growth promoters. **Advances in Pork Production**, v. 11, p. 47-56, 2000.

CLSI. Performance Standards of Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement., CLSI document M100-22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, pp.151, 2012.

COELHO, J. C. **Elaboração de bebida probiótica a partir do suco de laranja fermentado com *Lactobacillus casei***.. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

COELHO, J. G. **Potencial probiótico de bactérias do gênero *bacillus***. Trabalho de conclusão de curso de Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

COLLI C. Nutracêutico é uma nova concepção de alimento. **Notícias SBAN**, v.1, p. 1-2, 1998.

CONCEIÇÃO, L. L. **Comportamento de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 sob condições prevalentes no trato gastrointestinal humano**. Dissertação (Magister Scientiae), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.

COSTA, H. H. S. et al. Potencial probiótico in vitro de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.6, p.1858-1866, 2013.

COSTA, M. G. M. et al. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. **Food Chemistry**, v. 139, p. 261-266, 2013.

CUNHA, T. M. et al. Physico-chemical, microbiological and rheological evaluation of dairy beverage and fermented milk added of probiotics. **Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 103-116, 2008.

D'AIMMO, M. R. et al. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and Bifidobacterium spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. **Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 35-42, 2007.

DAIUTO, E. R. et al. Composição química e atividade antioxidante da polpa e resíduos de abacate 'Hass'. Revista Brasileira de Fruticultura. **Sociedade Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 2, p. 417-424, 2014.

European Food Safety Authority – EFSA. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. **EFSA Journal**, v. 10, n. 6, p. 2740, 2012.

FELTEN, A. et al. *Lactobacillus* species identification, H₂O₂ production, and antibiotic resistance and correlation with human clinical status. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n.3, p. 729e733, 1999.

FAO/WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2006.

GARCIA, E. F. et al. Development and quality of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lact acid bacteria. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, n. 8, p. 947-956, 2012.

GAVA, J. A.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia dos alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Livraria Nobel, 2008.

GIBSON GR; FULLER R. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 391S-394S, 2000.

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

GONCALVES, H. et al. "Preparações probióticas utilizando poupa de banana e *Lactobacillus acidophilus* em fermentação sólida". **Anais do XI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica** [=Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, n.3]. ISSN Impresso: 2446-8711. São Paulo: Blucher, 2015.

GRANATO, D. et al. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. **Food Science and Food Safety**, v. 9, p.292-302, 2010.

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 queijo de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 2, p.245-250, 2005.

GUEIMONDE, M. et al. Viability and diversity of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations included in commercial fermented milks. **Food Research International**, v. 37, p. 839-850, 2004.

HERMANNNS, G. **Potencial bacteriocinogênico e probiótico de bactérias ácido lácticas isoladas de leite e queijo artesanais**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

INFANTE, J. et al. Atividade antioxidante de resíduos agroindustriais de frutas tropical. **Brazilian Journal of Food Nutrition**, v. 24, n. 1, p.87-91, 2013.

Jacobsen, C.N. et al. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus spp.* by In Vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans **Applied and Environmental Microbiology** v.65, p. 4949 – 4956, 1999.

JIMÉNEZ, J. A. S. **Elaboración de jugos de fruta con adición de bacterias ácido lácticas com potencial probiótico**. Dissertação (Mestrado em desenvolvimento e gestão de processos com ênfase de bioprocessos). Universidade de la Sabana, Chía, 2012.

JÚNIOR, J. E. L. et al. Physical-chemical characterization of tropical fruit by-products for use in animal feed. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n. 1, p.70-76, 2006.

KOMATSU, T. R. et al. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, 2008.

KRUNGER, M. F. **Caracterização de bacteriocinas produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* MK02R isolado de rúcula (*Eruca sativa* Mill.) e avaliação do seu potencial probiótico utilizando o modelo dinâmico TIM-1**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010

LIAN, W. et al. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 3, p. 293-301, 2003.

LILLY, D.M., STILLWELL, R.H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747e748, 1965.

LIMA, J. R.; LOCATELLI, G. O.; FINKLER, L.; LUNA-FINKLER, C. L. Incorporation of encapsulated *Lactobacillus casei* into type curd cheese. **Revista Ciência & Saúde**, v. 7, n. 1, p.27-34, 2014.

LIU, C. et al. Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 22, n. 5, p. 401e412, 2009.

MACEDO, R. E. F. **Utilização de culturas lácticas probióticas no processamento de produto cárneo fermentado**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MADI, L. et al. *Brasil food trends 2020*. São Paulo: Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) e Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (FIESP), 2011.

MADUREIRA, A. R. et al. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, p. 465-470, 2011.

MADUREIRA, A. R. et al. Survival of probiotic bacteria in a whey cheese vector submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6, p. 921-927, 2005.

MARTINS, O. D. A. Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagonista frente a microorganismos indicadores. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 5, n. 1, p. 53-59, 2006.

MEIRA, S. M. M. et al. Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha. *Brazilian Journal of Food Technology*, n. 12, p. 75-80, 2010

MEIRA, S. M. M. **Potencial probiótico de bactérias lácticas e atividades biológicas de leite e queijo de ovelha**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MELO, P. S. et al. Phenolic composition and antioxidant activity of agroindustrial residues. **Ciência Rural**, v. 41, n. 6, p. 1088-1093, 2011.

MICHIDA, H. et al. Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 73-78, 2006.

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

NATALE, W. et al. Uso fertilizante do subproduto da agroindústria processadora de goiabas em pomar comercial de goiabeiras. **Anais. III Simpósio Internacional sobre Gerenciamento de Resíduos Agropecuários e Agroindustriais**. São Paulo, 2013.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; V Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NETO, L. G. et al. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from artisanal and industrial “coalho” cheese against indicator microorganisms. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p.245-250, 2005.

NUALKAEKUL, S.; CHARALAMPOPOULOS, D.; Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p.111-117, 2011.

OLIVEIRA, M. E. G. et al. Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 241-247, 2014.

OLIVEIRA, M. N. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, 2002.

OLIVEIRA, C. P.; SILVA, J. A. Leite fermentado probiótico e suas implicações na saúde. **Revista Verde**, v. 6, n. 3, p. 25-31, 2011.

ONG, L. et al. Development of probiotic cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 446–456, 2006.

ORTOLANI, M. B. T. **Bactérias ácido-láticas autóctones de leite cru e queijo minas frescal: Isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009.

PEREIRA, L. G. R. et al. Aproveitamento dos Coprodutos da Agroindústria Processadora de Suco e Pó de Frutas para Alimentação de Ruminantes. **Embrapa Semi-Árido.** ISSN 1808-9992. Petrolina, 2009.

PEREIRA, E.S. et al. Energetic value from by-product of the brazil agroindústria. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 58, n. 223, 2009.

PEREIRA, V. G.; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, p. 229-240, 2007

PELIZER, L. H. et al. Utilização de Resíduos Agro-Industriais em Processos Biotecnológicos como Perspectiva de Redução do Impacto Ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, v. 2, n. 1, p. 118-127, 2007

PIMENTEL, T. C. et al. Néctar de pêssego potencialmente simbiótico. **Alimentação e Nutrição**, v. 22, n. 3, p.455-464, 2011.

REHAIEM, A. et al. Assessment of potential probiotic properties and multiple bacteriocin encoding-genes of the technological performing strain *Enterococcus faecium* MMRA. **Food Control**, v. 37, p.343-350, 2014.

RIBEIRO, E. P. et al. Development of Brazilian Minas soft cheese with *Lactobacillus acidophilus* produced with retentates by ultrafiltration of milk. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 19-23, 2009.

Roberfroid, M. B. Introducing inulin-type fructans. **British Journal of Nutrition**, v.93, p. 13-25, 2005.

- RODRÍGUEZ-ALONSO, P. et al. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria and *Micrococcaceae/Staphylococcaceae* isolates from artisanal raw milk cheeses, and potential implications on cheese making. **Journal Food Science**, v. 74, p. 284-293, 2009.
- ROLIM, F. R. L. et al. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. **Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 807-813, 2015.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.
- SAARELA, M. et al. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1477-1482, 2006.
- SAARELA, M. et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197-215, 2000.
- SANDES, S. H. C. **Seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico para uso como promotor de crescimento ou como adjuvante imune em vacinas de mucosa na pecuária bovina**. Dissertação (Mestrado em Genética), Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2013.
- SANTOS, J. S. et al. Grape juice supplemented with *Lactobacillus acidophilus* na oligofrutose. **Ciências Agrárias**, v. 29, n. 4, p. 839-844, 2008.
- SATHE, S. J. et al. Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 6, p. 2622-2628, 2007.
- SILVA, A. C. **Potencial de resíduos agroindustriais como fontes de compostos bioativos**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, 2014.

SOLIERI, L. et al. Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmegiano Reggiano cheese by *in vitro* screening and principal component analysis. **Food Microbiology**, v. 38, p. 240-249, 2014.

SOUZA, M. A. F. **Laboratórios aos pontos de venda: uma análise da trajetória dos alimentos funcionais e nutracêuticos e sua repercussão sobre a questão agroalimentar.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2008.

SOUZA, M. S. B. et al. Nutritional characterization and antioxidant compounds in pulp residues of tropical fruits. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 554-559, 2011.

SOUZA, P. H. M. et al. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**. v. 37, n. 2, p. 127-135, 2003.

TEMMERMAN, R. et al. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. **Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 1-10, 2003.

TRIAS, R. et al. Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. **International Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 231-236, 2008.

TULUMOGLU, S. et al. Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces. **Anaerobe**, v. 24, p. 36-42, 2013.

URNAU, D. et al. Isolamento, identificação e caracterização quanto à resistência ao pH ácido e presença de sais biliares de cepas probióticas de leites fermentados comerciais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, p. 5-10, 2012.

VALENCIA, M. S. **Desenvolvimento de sobremesa láctea cremosa de chocolate adicionada de fruto-oligossacarídeo e *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* LBC 81.** Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

VAMANU, E. et al. The Viability of the *Lactobacillus Rhamnosus* IL4.2 Strain in Simulated Gastrointestinal Conditions. **Animal Science and Biotechnologies**, v. 44, p.1, 2011.

VAN DUYN MA, PIVONKA E. Overview of the health benefits of fruit and vegetable consumption for the dietetics professional: selected literature. **Journal of American Dietetic Association**, v. 100, n. 12, p.1511-1521, 2000.

VIEGAS, P. P. et al. Quality of functional fermented milks produced by the use lactic acid bacteria isolated from coalho cheese. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 2, p.460-467, 2010.

VITALI, B. et al. Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. **Food Microbiology**, v. 31, p. 116-125, 2012.

WGO – World Gastroenterology Organisation. **Guias práticas da OMGE: Probióticos e prebióticos**, 2008.