



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Anna Giselle Cavalcanti Vaz Mendes Silva

IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PROBIÓTICA *IN VITRO*
DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJO DE COALHO
ARTESANAL PRODUZIDO NA REGIÃO DO AGRESTE MERIDIONAL DE
PERNAMBUCO

Recife, 2023



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

Anna Giselle Cavalcanti Vaz Mendes Silva

IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PROBIÓTICA *IN VITRO* DE
BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJO DE COALHO ARTESANAL
PRODUZIDO NA REGIÃO DO AGRESTE MERIDIONAL DE PERNAMBUCO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira

Coorientadores: Dr. José Erick Galindo Gomes
Prof. Dr. Marcelo Mendonça

Recife, 2023

Dados Internacionais de Catalogação na
Publicação Universidade Federal Rural
de Pernambuco Sistema Integrado de
Bibliotecas

Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos
pelo(a) autor(a)

S586i Silva, Anna Giselle Cavalcanti Vaz Mendes
IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PROBIÓTICA IN VITRO DE
BACTÉRIAS ÁCIDOLÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJO DE COALHO ARTESANAL
PRODUZIDO NA REGIÃO DO AGRESTE
MERIDIONAL DE PERNAMBUCO / Anna Giselle Cavalcanti Vaz Mendes Silva. - 2023.
63 f.

Orientadora: Keila Aparecida Moreira.
Coorientador: Jose Erick Galindo Gomes; Marcelo
Mendonca. Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-
Graduação em Biociência Animal, Recife, 2023.

1. Derivados lácteos. 2. Probióticos. 3. Queijo. 4. Segurança Alimentar. I. Moreira, Keila
Aparecida, orient. II. Gomes, Jose Erick Galindo ; Mendonca, Marcelo, coorient. III. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

**IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE PROBIÓTICA *IN VITRO* DE
BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJO DE COALHO
ARTESANAL PRODUZIDO NA REGIÃO DO AGRESTE MERIDIONAL DE
PERNAMBUCO**

Dissertação elaborada por

Anna Giselle Cavalcanti Vaz Mendes Silva

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira (Orientadora / Presidente)
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco

Profa. Dra. Bruna Maria Salotti de Souza
Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. Elizabete Rodrigues da Silva
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco

Dra. Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento
Universidade Federal do Ceará

Aqueles que me deram a vida e amor, meu pai José
Ailton e minha mãe Giselda Cavalcanti;

A quem é meu apoio e não me deixa desistir, minha
irmã, Anna Júlia;

A ele que segurou minha mão e disse: “vamos
juntos!”, meu esposo, Charles;

A quem deu sentido a todas as coisas, meu filho,
Guilherme.

Dedico.

Agradecimentos

A página mais difícil de ser escrita, mais que a interpretação estatística. Aquela que me transporta ao longo do tempo. Quanta coisa foi construída durante todo esse tempo, muito além de conhecimento, de ciência! Nenhuma palavra aqui escrita expressará o suficiente minha transformação e gratidão!

E dessa forma AGRADEÇO imensamente a Deus por ter preparado TUDO, ABSOLUTAMENTE TUDO. Cada pessoa, cada amostra de queijo, cada bactéria, cada alegria e cada dificuldade. Estava TUDO preparado para que esse momento chegasse. E somente Ele em sua infinita bondade, me sustentou quando achava que ia desmoronar!

Agradeço a Universidade Federal Rural de Pernambuco por todo suporte. Ao Programa de Pós-graduação Biociência Animal, por fornecer um excelente nível de conhecimentos e possuir um corpo docente comprometido com a formação de mestres e doutores. Agradeço imensamente a Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, que desde a graduação foi minha casa, agradeço a oportunidade de retornar e utilizar toda a estrutura necessária para o desenvolvimento dessa pesquisa.

A minha orientadora, Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira, que compartilhou muito além de conhecimentos técnicos. Que sempre esteve por perto para acolher as dúvidas técnicas e nossas inquietações. Sempre atenta e cuidadosa, foi fundamental ao longo de todo esse processo.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcelo Mendonça, e compartilhado seus ensinamentos ao longo destes dois anos e por ter me ensinado muito sobre resiliência, persistência.

Ao meu co-orientador, Dr. José Erick Galindo Gomes, por toda confiança e ensinamento ao longo deste período. Sempre me apoiando e incentivando a conquistar novos espaços e novas habilidades.

Aos professores da banca do Exame de Qualificação e de defesa do Mestrado, Profa. Dra. Bruna de Souza, Dra. Talita Camila Nascimento, Prof. Dr. Wellington Leal, por suas valiosas contribuições.

Aqueles que partilharam de cada momento e em alguns deles, sentiram a mesma alegria ou angústia, que jamais deixaram que eu sequer pensasse em desistir. Eu ofereço este momento e o meu mais Sincero eu te Amo, meus pais Giselda

Cavalcanti e José Ailton Mendes, meu esposo Charles Fábio, meu filho Carlos Guilherme e minha irmã Anna Júlia e meu cunhado Dhiego Medeiros.

Um agradecimento especial a todos os laticinistas, que abriram as portas dos seus estabelecimentos para a realização das coletas. Aos meus grandes amigos que se empenharam em me auxiliar, agindo algumas vezes como intermediários ou mesmo me levando aos estabelecimentos, George Martins, Felipe Pereira, Alify Antunes, Adalberto Leite. A equipe da ADAGRO em especial aos Fiscais Wilson Avelino e Fabricio Santos.

A todos os meus amigos do Centro Laboratorial de Apoio à Pesquisa da UFPE (CENLAG). A equipes do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia e Imunologia, que se tornaram verdadeiros companheiros de jornada, Lavinia Santos, Juliana Bernardo, Wisley Moraes, Allyson Godoi e Karla Mendonça. Além da super equipe do Laboratório de Microbiologia, Tecnologia Enzimática e Bioprodutos, Bruna Soares, Maria Tamires, Matheus Oliveira, Ana Cavalcanti, Andreza, Edson Flávio, Gleidson Lima, Ana Erundina, Mauricio, Cleyton Lima, Mariane Mendes, Matheus Souto.

Aos amigos que ligarei na hora que a “gasolina acabar”, que estavam nos bastidores sempre atentos para me oferecer uma palavra de apoio ou uma xícara de café!

A todos muito Obrigada!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

Marthin Luther King

Resumo

As bactérias ácido lácticas (BAL) são responsáveis pelo processo fermentativo em diversos alimentos, com papel de grande importância no setor de lácteos e principalmente na produção de queijo de coalho artesanal, devido a sua influência nas características sensoriais deste produto. Diante disto, o presente trabalho teve por objetivo identificar e analisar o potencial probiótico *in vitro* através das propriedades antimicrobianas e viabilidade nas condições do trato gastrointestinal de bactérias ácido lácticas presentes no queijo de coalho artesanal produzido no Agreste Meridional de Pernambuco. As BAL foram isoladas a partir de 60 amostras de queijo coalho artesanal oriundos de oito municípios distintos do agreste meridional de Pernambuco. Foram isoladas um total de 196 colônias com características fenotípicas sugestivas de BAL, sendo realizados os testes de coloração de Gram, catalase e identificação molecular com realização do sequenciamento do gene 16S rRNA foi amplificada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Do total de cepas isoladas 155 (79,08%) apresentaram-se com características fenotípicas sugestivas de BAL. Foram realizados os testes de suscetibilidade a antimicrobianos pelo método de difusão em disco, sendo avaliados 12 antibióticos. Das 155 cepas de BAL, 65,80% apresentaram sensibilidade superior a 50%. Posteriormente, a identificação molecular das bactérias, 36 cepas de BAL dos gêneros *Lactococcus*, *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus* e *Streptococcus*, foram selecionadas para a realização do teste *in vitro* de tolerância as condições do trato gastrointestinal. Obteve-se 61,11% (22/36) cepas com potencial probiótico após a avaliação dos resultados de antibiograma e tolerância ao trato gastrointestinal, sendo esta indicadas para a realização de mais testes que possam assegurar esse potencial e garantir maiores níveis de segurança para posterior aplicação em produtos funcionais.

Palavras-chaves: Derivados lácteos; Probióticos; Queijo; Segurança Alimentar

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are responsible for the fermentation process in various foods, with a very important role in the dairy sector and mainly in the production of artisanal coalho cheese, due to their influence on the sensory characteristics of this product. Therefore, this study aimed to identify and analyze the in vitro probiotic potential through antimicrobial properties and viability under the conditions of the gastrointestinal tract of lactic acid bacteria present in artisanal coalho cheese produced in the Agreste Meridional of Pernambuco. The BAL were educated from 60 Exception of artisanal coalho cheese destined for eight district municipalities in the southern agreste region of Pernambuco. A total of 196 colonies with phenotypic characteristics suggestive of BAL were treated, Gram color, catalase and molecular identification tests were carried out with the sequencing of the 16S rRNA gene was amplified by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. Of the total number of strains, 155 (79.08%) had phenotypic characteristics suggestive of BAL. Antimicrobial susceptibility tests were performed using the disk diffusion method, with 12 antibiotics evaluated. Of the 155 BAL strains, 65.80% had sensitivity greater than 50%. later, the molecular identification of the bacteria, 36 strains of LAB of the genera *Lactococcus*, *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus* and *Streptococcus*, were selected to carry out the in vitro test of tolerance to the conditions of the gastrointestinal tract. 61.11% (22/36) strains with probiotic potential were obtained after evaluating the antibiogram results and tolerance to the gastrointestinal tract, which is indicated for further tests that can ensure this potential and guarantee greater levels of safety for later in application functional products.

Keywords: Dairy derivatives; Probiotics; Cheese; Food Safety

Sumário

CAPÍTULO I Introdução Geral e Revisão da Literatura	15
1. Introdução	16
2. Revisão de literatura	17
2.1. Queijo de coalho artesanal	17
2.2. Bactérias ácido lácticas (BAL)	20
2.3. Probióticos	22
2.4. Resistência antimicrobiana	24
3. Objetivos	26
3.1. Geral	26
3.2. Específicos	26
4. Referências	27
CAPÍTULO II BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS ISOLADAS DE QUEIJO DE COALHO ARTESANAL PRODUZIDO NA REGIÃO DO AGRESTE MERIDIONAL DE PERNAMBUCO: PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS E VIABILIDADE NAS CONDIÇÕES DO TRATO GASTROINTESTINAL	36
1. Introdução	39
2. Material e Métodos	40
3. Resultados e Discussão	47
Referências	55

Lista de Abreviaturas

µg	Micrograma
µL	Microlitro
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAL	Bactérias ácido lácticas
BHI	Brain Heart Infusion
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
EUCAST	Comitê Europeu de Testes de Suscetibilidade Antimicrobiana
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
GRAS	Geralmente Reconhecido como Seguro
MRS	Man Rogosa and Sharpe
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
QPS	Presunção de Segurança Qualificada
TGI	Trato Gastrointestinal
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1. Queijo de coalho artesanal.....18

Figura 2. Fluxograma de produção do queijo de coalho artesanal.....19

Capítulo II

Figura 1. Localização geográfica dos municípios de coleta das amostras de queijo de coalho artesanal.....44

Lista de Tabelas

Capítulo I

Tabela 1. Classificação dos gêneros de bactérias ácido lácticas mais comuns em queijos de acordo com morfologia e tipo de fermentação do açúcar.....	21
Tabela 2. Critérios para a seleção de cepas probióticas.....	23
Tabela 3. Mecanismo de resistência a antibióticos.....	26

Capítulo II

Tabela 1. Antibióticos utilizados na realização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos com suas respectivas classes.....	46
Tabela 2. Classificação dos isolados quanto a sua suscetibilidade aos antibióticos testados de acordo com o tamanho do halo formado no teste de antibiograma....	47
Tabela 3. Avaliação da morfologia das BAL isoladas de queijo de coalho artesanal por município.....	49
Tabela 4. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de coalho artesanal.....	51
Tabela 5. Viabilidade (\log^{10} UFC/mL) de cepas de bactérias ácido lácticas após a simulação das condições do trato gastrointestinal, de amostras isoladas de queijo coalho artesanal da região do Agreste Meridional de Pernambuco.....	53

CAPÍTULO I:
Introdução Geral e Revisão da Literatura

1. Introdução

A atividade leiteira no Agreste de Pernambuco é considerada uma das principais atividades agropecuárias do estado e uma alternativa na geração de empregos e renda familiar, trazendo significativo desenvolvimento econômico para a região (VIANA, 2020).

A criação de bovinos para a produção de leite em Pernambuco é, majoritariamente, realizada em pequenas e médias propriedades, com emprego de mão de obra familiar (CONAB, 2021). No estado observa-se uma produção representativa de derivados lácteos, especialmente de queijos, particularmente nos municípios Pedra, Venturosa, Garanhuns, Correntes, São Bento do Una, Cachoeirinha e Altinho. O maior volume processado de leite nesta região é destinado para a produção de queijo de coalho, totalizando 58% do leite produzido no estado (TÁVORA E CAVALCANTI, 2017).

O queijo de coalho artesanal é um alimento típico da região Nordeste, presente na alimentação diária, com grande valor econômico e cultural, e por ser fabricado com leite cru, mantém as características próprias dadas principalmente pelas bactérias ácido lácticas presentes no leite (PAQUEREAU *et al.*, 2016; PERNAMBUCO, 2018).

A presença de uma microbiota específica em cada região de produção desses queijos artesanais, confere aos mesmos características sensoriais distintas de aroma, sabor e cor, muito apreciados pela população local (AGOSTINI *et al.*, 2018; AGAGÜNDÜZ *et al.*, 2021). Este derivado lácteo pode apresentar uma diversidade de microrganismos com potencial biotecnológico e funcional, principalmente bactérias ácido lácticas (BAL) provenientes do leite cru e do ambiente de fabricação (KAMIMURA *et al.*, 2019a, b).

As BAL fazem parte de um grupo de microrganismos produtores de ácido láctico a partir da fermentação de açúcares como a lactose, e podem ser isoladas de diferentes fontes, principalmente de leite e derivados lácteos (COSTA *et al.*, 2013). Esses microrganismos são capazes de exercer vários efeitos benéficos aos produtos, determinando características sensoriais desejáveis e peculiares aos mesmos, pela produção de enzimas e ácidos orgânicos. A acidez causada pela produção de ácido láctico durante a fermentação, proporciona características marcantes nos derivados lácteos, como queijos e iogurtes (BEUX *et al.*, 2020).

As BAL podem apresentar efeitos probióticos que ajudam na restauração da microbiota intestinal, além de promover saúde e bem-estar (WILKINS *et al.*, 2023). Além de atuar na manutenção do equilíbrio intestinal, melhora do peristaltismo e favorece a absorção de nutrientes pelo intestino (GARCÍA-BURGOS *et al.*, 2020; AGAGÜNDÜZ *et al.*, 2021), bem como efeitos imunomoduladores diminuindo casos de enteropatias nos hospedeiros, quando utilizados em quantidades adequadas (RAIZEL *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2017; GIAZZI, 2020).

Os microrganismos probióticos são definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, podem conferir algum benefício à saúde do hospedeiro (FAO; 2002). As BAL são intensamente pesquisadas, com o intuito de descobrir novos microrganismos reconhecidos como seguros GRAS (Generally Recognized as Safe) e com ação probiótica (HAN *et al.*, 2017; SRINIVASH *et al.*, 2023).

Neste contexto, o isolamento e caracterização de BAL presentes no queijo de coalho artesanal produzido no Agreste Meridional do estado de Pernambuco, poderão determinar características intrínsecas dos produtos lácteos regionais além de avaliar presença de potencial probiótico nos microrganismos avaliados.

2. Revisão de literatura

2.1. Queijo de coalho artesanal

A produção de queijos artesanais no Brasil ocorre de forma singular. Existem diversos tipos de queijo artesanais brasileiros produzidos com leite de vaca, cabra, ovelha e búfala, ou a partir da mistura do leite dessas diferentes espécies, o que proporciona características sensoriais únicas e peculiaridades na técnica de produção (KAMIMURA *et al.*, 2019; ARAÚJO *et al.*, 2020). Os queijos artesanais são produzidos predominantemente por pequenos produtores rurais e suas famílias, possuindo grande importância econômica, cultural e social (MENEZES, *et al.*, 2011; CABRAL *et al.*, 2016). Estima-se um total de 170 mil produtores de queijos artesanais no Brasil (MAPA, 2018).

O estado de Pernambuco se destaca por ser um dos primeiros estados a regulamentar a produção e comercialização de queijos artesanais pela Lei nº

13.376/2007, posteriormente alterada pela Lei nº 16.312 de 2018 (PERNAMBUCO, 2007). Nesse âmbito, o queijo de coalho artesanal é definido como aquele obtido por coagulação do leite cru, por meio de coalho ou outras enzimas coagulantes registradas no órgão competente, complementada ou não pela adição de bactérias lácticas específicas, podendo ser fresco, maturado, defumado e/ou adicionado de condimentos e especiarias (PERNAMBUCO, 2018).

O queijo de coalho (Figura 1) é um produto típico da região Nordeste, com destaque para os estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Devido às suas características intrínsecas, é um dos queijos mais tradicionais e possui um processo de fabricação simples com pouca tecnologia (BRITO, 2020), como mostrado na Figura 2.

Figura 1. Queijo de coalho artesanal



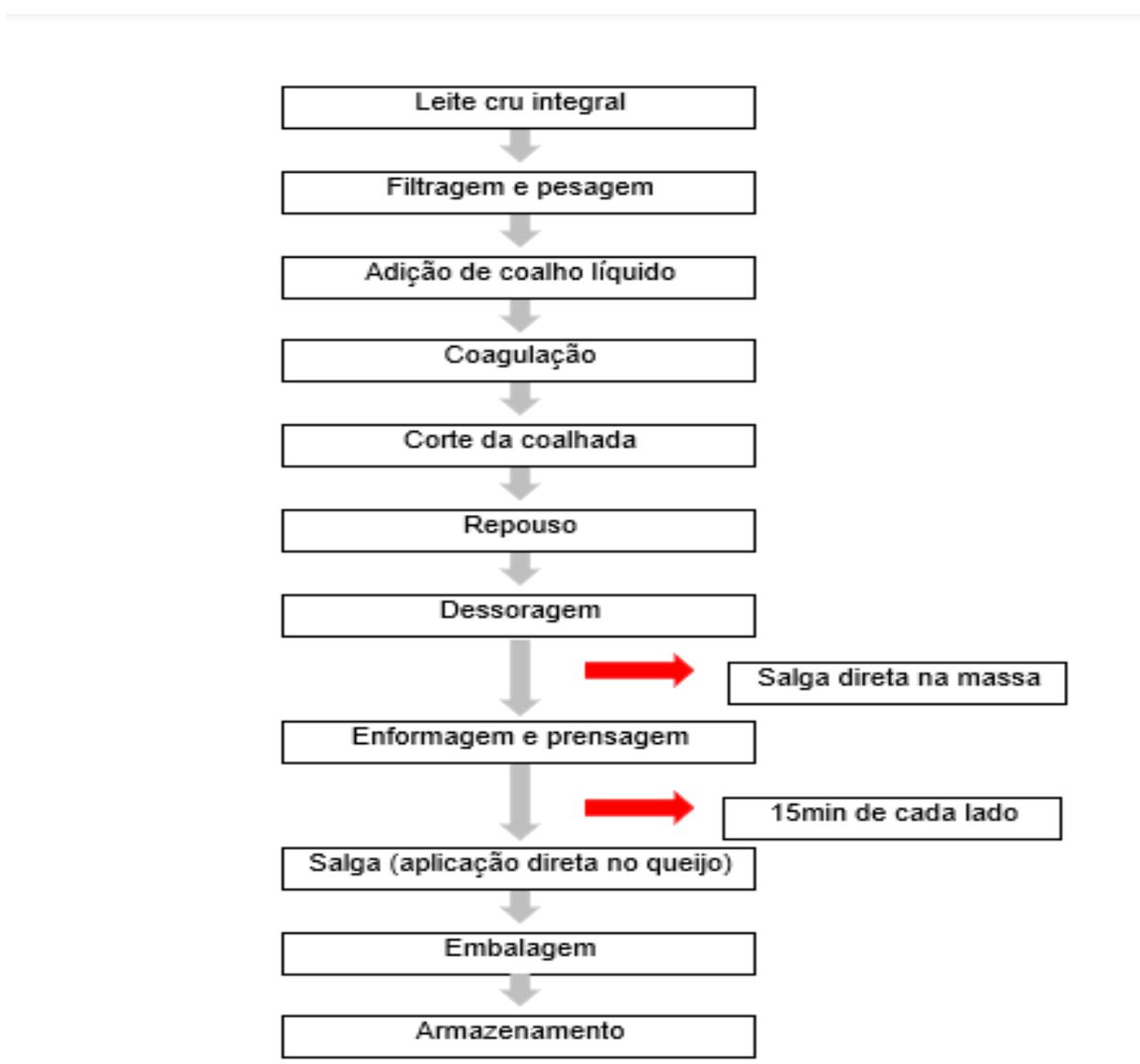
Fonte: Arquivo Pessoal (2022).

Amplamente consumido, apresenta sabor ácido, levemente salgado e é resistente ao calor, o que permite o seu consumo assado (SILVA *et al.*, 2012). Pelo Regulamento de Identidade e Qualidade, Instrução Normativa nº 30 de 2001, o queijo de coalho como um produto de consistência semidura e elástica, com textura compacta e macia, podendo apresentar olhaduras, com coloração branco amarelada uniforme (BRASIL, 2001).

Esse queijo apresenta propriedades sensoriais típicas e aroma particular associado a características como raça e nutrição das vacas, processo tecnológico

utilizado na fabricação (JHONSON, 2017; TERZIĆ-VIDOJEVIĆ, 2020), que influenciam diretamente na população microbiana que estará presente no leite cru (SIEZEN *et al.*, 2010; GOBBETTI *et al.*, 2015; TILOCCA *et al.*, 2020). Entre os microrganismos essenciais nesse processo estão as bactérias ácido lácticas (BAL) (BLUMA *et al.*, 2017; DOMINGOS-LOPES *et al.*, 2017).

Figura 2. Fluxograma de produção do queijo de coalho artesanal.



Fonte: Arquivo Pessoal (2023).

Uma composição microbiana diversificada abrangendo os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Weissella*, *Pediococcus* e *Leuconostoc*

tem sido associada a produtos artesanais (TULINI *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2014; CAVICCHIOLI *et al.*, 2017; SANT'ANNA *et al.*, 2017; PERIN *et al.*, 2017; MARTINS *et al.*, 2018). Os gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus* geralmente são os mais predominantes em queijos artesanais elaborados com leite cru, os quais não sofreram cozimento da massa, e podem tanto advir da matéria-prima quanto do meio ambiente, variando em quantidade conforme este ambiente, as condições de higiene do processo e a época do ano (EMBRAPA, 2009).

2.2. Bactérias ácido lácticas (BAL)

As BAL são parte de um grupo de microrganismos que apresenta diversas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas semelhantes (TAMANG, 2016). O termo bactérias ácido lácticas está relacionado a capacidade destas para fermentar os açúcares primários em ácido láctico pela via metabólica homofermentativa ou heterofermentativa (MILLS *et al.*, 2011) que compreendem aquelas que metabolizam glicose a ácido láctico, enquanto as heterofermentativas produzem além do ácido láctico, outros produtos como dióxido de carbono, ácido acético e etanol (CARR *et al.*, 2002). A classificação das BAL pode ser observada na Tabela 1

Tabela 1. Classificação dos gêneros de bactérias ácido lácticas mais comuns em queijos de acordo com morfologia e tipo de fermentação do açúcar.

Gênero	Morfologia	Temperatura ótima (°C)	Tipo de fermentação
<i>Lactococcus</i>	Cocos	30	Homofermentativa
<i>Streptococcus</i>	Cocos	42	Homofermentativa
<i>Enterococcus</i>	Cocos	42	Homofermentativa
<i>Leuconostoc</i>	Cocos	30	Heterofermentativa
<i>Lactobacillus</i>	Bacilos	30 e 42	Homofermentativa e Heterofermentativa

Fonte: Adaptado de CAR (2002).

Esse grupo de microrganismos pode estar associado a vegetais, produtos cárneos e principalmente produtos lácteos (CARR *et al.*, 2002; RIVERA-ESPINOZA *et al.*, 2010). As bactérias ácido lácticas estão naturalmente presentes no leite dos animais, em se tratando do leite de vaca são constituintes típicos da microbiota uma

composição heterogênea caracterizada pela abundância de BAL como *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Leuconostoc* e *Streptococcus* spp. (DEETH, 2017).

Essas bactérias são componentes essenciais de todas as variedades de queijo e desempenham papel fundamental durante sua fabricação e maturação. A microbiota do queijo pode ser dividida em dois grupos: BAL iniciadoras e microrganismos secundários não iniciadores (LINDNER *et al.*, 2008). Nos queijos artesanais é comum que o processo fermentativo seja realizado pela microbiota naturalmente presente no leite cru ou adicionada via soro-fermento. Enquanto, muitos queijos industriais necessitam da adição de cultura iniciadora comercial (MARTIN; LINDNER, 2022).

As BAL podem apresentar forma de cocos, bacilos, cocobacilos ou pleomorfas, são Gram-positivas, catalase e oxidase negativas, podendo apresentar pseudo catalase, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, capazes de realizar fermentação tanto em anaerobiose como em aerobiose (TAMANG *et al.*, 2016). A maioria dessas bactérias é inativada a temperaturas superiores a 70 °C, e normalmente, suportam até pH 3,8, além de sintetizarem um número elevado de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas (LIMA *et al.*, 2009).

Estritamente fermentadoras e desprovidas de citocromos, obtêm energia através da fermentação, precisamente por fosforilação ao nível de substrato. Através da fermentação de carboidratos, produzem ácido lático como principal ou único produto do seu metabolismo fermentativo da glicose (LUNARDI *et al.*, 2021).

De acordo com a definição de culturas microbianas alimentares, as cepas de BAL podem ser introduzidas deliberadamente na cadeia alimentar como cultura iniciadora, probiótico ou como um bioprotetor (BOURDICHON *et al.*, 2012). O grupo das BAL certamente é o mais importante relacionado à bioconservação, que se trata da aplicação de microrganismos ou seus metabolitos para estender a vida de prateleira e aumentar a segurança dos alimentos (STILLES, 1996).

As BAL são eficientes produtoras de ácidos orgânicos e algumas estirpes produzem ainda as bacteriocinas que são peptídeos com atividade antimicrobiana frente a vários patógenos alimentares. Favaro *et al.* (2015), destacaram que as BAL presentes na microbiota autóctone de queijos artesanais desempenham papel de bioconservantes nestes alimentos. Além disso, diferentes estirpes possuem status de "geralmente reconhecido como seguro" (GRAS), justificado principalmente pelo

extenso uso ao longo da história da alimentação, com comprovação científica (MASKE *et al.*, 2021).

Ademais, algumas BAL possuem a capacidade de aderência e sobrevivência frente as condições adversas do trato gastrointestinal dos hospedeiros, atuando principalmente sobre a estabilidade e proteção deste ambiente, além de contribuir beneficentemente para o sistema digestivo e os processos do metabolismo, bem como na modulação da resposta imune local e sistêmica (GARCÍA-HERNANDÉZ *et al.*, 2016). Sendo assim, diversas cepas deste grupo são caracterizadas e comercializadas como bactérias probióticas de promoção à saúde (SAVIJOKI *et al.*, 2006).

2.3. Probióticos

A palavra “probiótico” é de origem grega que significa “para a vida”. Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades satisfatórias, conferem benefício à saúde do hospedeiro (FAO, 2002; FENSTER *et al.*, 2019; SHARMA *et al.*, 2022). Segundo o Codex Alimentarius (2003), um produto lácteo probiótico deve conter no mínimo 10^7 UFC/g no momento do consumo (OLIVEIRA *et al.*, 2002). No entanto, esses valores dependem do microrganismo utilizado, da forma de consumo e sua aplicação (NERO *et al.*, 2017).

Para que os microrganismos exerçam suas propriedades probióticas, devem após ingeridos, sobreviver, se multiplicar e se fixar ao epitélio intestinal, além de sobreviver as condições de estresse do trato gastrointestinal, como o suco gástrico, sais biliares e enzimas estomacais e intestinais (SANTOS *et al.*, 2015). Os principais representantes dos probióticos são as BAL dos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Weissella* (MOKOENA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2019).

Os mecanismos subjacentes aos efeitos benéficos dos probióticos em humanos são ainda desconhecidos, mas provavelmente são multifatoriais. Existem estudos que relatam a ação dos probióticos frente a microrganismos patogênicos e enfermidades, que incluem, competição por nutrientes como substratos de crescimento, melhoraria na função da barreira intestinal, aderência competitiva à mucosa e epitélio, produção de substâncias antimicrobianas e modulação do sistema imunológico (KHALIGH *et al.*, 2016; NAZIR *et al.*, 2018).

Conforme as sugestões da OMS - Organização Mundial da Saúde, FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e EFSA - Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, para determinar a capacidade probiótica, os microrganismos devem atender a critérios de segurança e funcionalidade, bem como apresentar algumas propriedades tecnológicas (Tabela 2).

Tabela 2. Critérios e propriedades para a seleção de cepas probióticas.

Critérios	Propriedades
Segurança	História de uso seguro; Identificação precisa (características fenotípicas e genotípicas); Sem efeitos adversos; Ausência de genes responsáveis pela resistência a antibióticos.
Funcionalidade	Estabilidade quando exposto a pH ácido e aos sais biliares; Capacidade de adesão à mucosa intestinal; Capacidade de colonização do intestino; Produção de compostos antimicrobianos; Manter-se metabolicamente ativo a nível intestinal.
Tecnológico e utilização	Fácil produção de altas quantidades de biomassa e alta produtividade de culturas; Viabilidade e estabilidade das propriedades desejadas durante congelamento, liofilização, preparação e distribuição do produto; Alta taxa de sobrevivência de armazenamento em produtos acabados; Garantia das propriedades sensoriais desejadas dos produtos acabados, na indústria alimentícia; Estabilidade genética; Resistência aos bacteriófagos.

Fonte: Adaptada de Meira (2011); Urnau (2012) e Tegegne *et al.* (2022)

Segundo a EFSA, os microrganismos são submetidos a um sistema de avaliação quanto aos níveis de segurança antes da liberação para utilização comercial, onde é estabelecida a identidade, possível patogenicidade e o uso final do microrganismo, gerando uma certificação de Presunção de Segurança Qualificada (QPS). Até o presente momento o status QPS é conferido para 38 BAL, sendo três espécies de *Pediococcus* (*Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus dextrinicus* e *Pediococcus pentosaceus*) e 35 espécies de *Lactobacillus* (EFSA, 2015; EFSA, 2018).

No Brasil, a aprovação para uso de probióticos para consumo está sujeita a avaliação prévia da Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), sendo baseada na RDC Anvisa nº241, de 27 de julho de 2018, que dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos (ANVISA, 2019).

Alimentos probióticos são tradicionalmente relacionados à base de laticínios, compreendendo o leite e seus produtos fermentados contendo microrganismos vivos da família das BAL. Esse segmento representa cerca de 74% da participação de mercado de produtos probióticos (SHARMA *et al.*, 2022). Sendo uma prática comum a utilização de culturas starters nos derivados lácteos, além da crescente utilização de BAL como probióticos, os riscos potenciais de transferência lateral de genes de resistência a antibióticos intrinsecamente existentes nestas bactérias são uma crescente preocupação (GUO *et al.*, 2017).

2.4. Resistência antimicrobiana

Os antimicrobianos são uma das invenções médicas mais importantes do século XX, com grande benefício no combate às bactérias, salvando inúmeras vidas (CUNHA *et al.*, 2019). No entanto, o número de infecções causadas por bactérias multirresistentes vem aumentando em todo o mundo, e se tornando uma grande ameaça de infecções com tratamentos difíceis (GAJDÁCS *et al.*, 2019). A resistência a antibióticos é um resultado evolutivo inevitável. Por meio das mutações genéticas, as bactérias conseguem evitar uma pressão seletiva letal, dessa forma, enquanto os antibióticos forem utilizados, as bactérias continuarão a desenvolver mecanismos de resistência (DODDS, 2017).

Vários fatores contribuem para o aumento da resistência, como o uso excessivo de antibióticos, diagnóstico inexato, automedicação, condições ambientais de saúde precárias, higiene pessoal inadequada e uso agrícola de forma indiscriminada (CHOKSHI, 2019).

De acordo com Poole (2002), a resistência pode ser intrínseca ou adquirida, e assim, a célula bacteriana dispõe de diversos mecanismos para resistir aos antibióticos (NUNZIATA *et al.*, 2022). A resistência intrínseca é uma característica própria, ou seja, da capacidade que determinada espécie ou gênero bacteriano possui de sobreviver na presença de determinado agente antimicrobiano. Em contraste, a

resistência adquirida está presente em algumas cepas, dentro de uma espécie geralmente suscetível ao antibiótico em questão, e pode se disseminar horizontalmente entre as bactérias (MATHUR, 2005; DAS *et al.*, 2020; NUNZIATA *et al.*, 2022)

Ao longo dos anos, os estudos direcionados a resistência a antibióticos começaram a ser estendidos as BAL, que vem sendo amplamente utilizadas como fermentadores ou probióticos. Estas, podem ser um canal crítico de disseminação e transferência de resistência para bactérias não patogênicas e patogênicas (WANG *et al.*, 2019). Somente nos últimos anos foi estabelecido pela EFSA 13 moléculas antimicrobianas para distinguir cepas resistentes de BAL, dentre elas ampicilina, canamicina, clindamicina, ciprofloxacina, colisitina, clorafenicol, eritromicina, estreptomicina, fosfomicina, gentamicina, tetraciclina, tilosina e vancomicina (EFSA, 2018).

Tabela 3. Mecanismo de resistência aos antimicrobianos.

Mecanismo	Ação
Efluxo	Capacidade de ejetar o antibiótico para fora da célula
Imunidade <i>by-pass</i>	Ligação de proteínas com o antibiótico, impedindo que ocorra a interação com o alvo
Mutação	Modificação do alvo, através de mutação ou ação enzimática
Inativação enzimática	Destruição ou modificação dos antibióticos pela ação de enzimas

Fonte: Adaptada de Nunzianta *et al.* (2022).

A existência de resistência intrínseca a alguns antibióticos como vancomicina, metronidazol e colistina, que podem atuar como uma vantagem de sobrevivência, quando administrados no intestino (DAS *et al.*, 2020). No entanto, a uma propensão por parte dessas bactérias de adquirirem resistência a antibióticos, que se mostravam sensíveis que anteriormente, pode ser adquirida devido a plasmídeos ou através de alguma mutação ou raramente através da obtenção de certos genes de resistência do ambiente. A realização de estudos que comprovam a ocorrência de resistência transferível a medicamentos exige o monitoramento rigoroso do índice de segurança de micróbios probióticos (EGERVÄRN *et al.*, 2009).

Segundo a ANVISA (2021), para que um probiótico seja utilizado em alimentos é necessário que o mesmo seja suscetível a pelo menos dois antibióticos clinicamente

relevantes, para que em caso de infecções haja tratamento disponível e eficaz. Dessa forma antes da aprovação comercial como probióticos, devem ser avaliados os pontos de corte para a interpretação da resistência aos medicamentos (DAS *et al.*, 2020).

3. Objetivos

3.1. Geral

Isolar e identificar BAL em queijo de coalho artesanal produzido no Agreste Meridional e analisar alguns critérios de segurança para as BAL isoladas.

3.2. Específicos

- Isolar BAL do queijo de coalho artesanal produzido no Agreste de Pernambuco;
- Realizar caracterização fenotípica das espécies de BAL isoladas;
- Verificar a suscetibilidade das BAL identificadas frente a antimicrobianos;
- Avaliar a resistência das BAL selecionadas as adversidades do trato gastrointestinal simulada *in vitro*.

4. Referências

AĞAGÜNDÜZ, D. et al. Dairy lactic acid bacteria and their potential function in dietetics: The food–gut–health axis. **Foods**, v. 10, n. 12, p. 3099, 2021.

AGOSTINI, Camila et al. Characterization of technological and probiotic properties of indigenous *Lactobacillus* spp. from south Brazil. **3 Biotech**, v. 8, p. 1-12, 2018.

ANVISA. **Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos Guia nº 21/2021 -versão 2.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5280930/guia+21+v2.pdf/dac5bf5f-ae56-4444-b53c-2cf0f7c15301>>.

ARAÚJO, J. P. A. et al. Uma análise histórico-crítica sobre o desenvolvimento das normas brasileiras relacionadas a queijos artesanais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, p. 1845-1860, 2020.

BEUX, S. et al. Selection of raw cow's milk thermophilic lactic acid bacteria obtained from southwest Parana, Brazil, with potential use as autochthonous starter. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, 2020.

BLUMA, A.; CIPROVICA, I.; SABOVICS, M. The influence of non-starter lactic acid bacteria on swiss-type cheese quality. **Journal of International Scientific Publications: Agriculture & Food**, v. 5, n. 1000023, p. 34-41, 2017.

BOURDICHON, F. et al. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. **International journal of food microbiology**, v. 154, n. 3, p. 87-97, 2012.

Brasil. (2001). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa DAS nº 30, de 26 de junho de 2001.** Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de manteiga da terra ou manteiga de garrafa; queijo de Coalho e queijo de Manteiga. Diário Oficial da União, Brasília, 16 jul. 2001. Disponível em: <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=16/07/2001&jornal=1&pagina=13&totalArquivos=219>. Acesso em: 28 maio. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 30, de 07 de agosto de 2013.** Revoga a Instrução Normativa nº 57. Diário Oficial da União, Brasília, 8 ago. 2013. Seção 1, p.19. Disponível em: https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/30808894/do1-2013-08-08-instrucao-normativa-n-30-de-7-de-agosto-de-2013-30808890. Acesso em: 17 maio. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lei nº 13.680, de 14 de junho de 2018. Altera a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, para dispor sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal.** Diário Oficial da União, Brasília, 15 jun. 2018. Seção 1, p.2. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2018/lei/l13680.htm Acesso em: 17 maio. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos.** Guia n. 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias--anvisa/2019/guia-orienta-sobre-instrucao-processual-de-probioticos>. Acesso em: 21 jan. 2021.

BRITO, L. P. et al. Bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho do nordeste brasileiro na produção de laticínios: Uma triagem para aplicação tecnológica. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. e5249108457-e5249108457, 2020.

CABRAL, M. L. B.; LIMA, M. S. F.; COSTA, E. F.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H. Queijos artesanais: fonte de bactérias ácido lácticas selvagens para formulação de fermentos tradicionais. 2016.

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

CAVALCANTE, J. F. M. et al. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Food Science and Technology**, v. 27, p. 205-214, 2007.

CAVICCHIOLI, V. Q. et al. Novel bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus* strains with antilisterial activity isolated from Brazilian artisanal cheese. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 4, p. 2526-2535, 2017.

CHOKSHI, A. et al. Global contributors to antibiotic resistance. **Journal of global infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 36, 2019.

CODEX. Codex Stan 243-2003: **Codex standard for fermented milks. 2003.** Rome: Codex Alimentarius Commission. Retrieved from http://www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS_243e.pdf

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, p. 1858-1866, 2013.

Conab – Histórico mensal leite. Disponível em:< <https://www.conab.gov.br//info-agro/analises-do-mercado-agropecuário-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-leite?start=10>>

CUNHA, B. R.; FONSECA, L. P.; CALADO, C. R.C. Antibiotic discovery: where have we come from, where do we go?. **Antibiotics**, v. 8, n. 2, p. 45, 2019.

DAS, T. K. et al. Current status of probiotic and related health benefits. **Applied Food Research**, p. 100185, 2022.

DEETH, H. Optimum thermal processing for extended shelf-life (ESL) milk. **Foods**, v. 6, n. 11, p. 102, 2017.

DOMINGOS-LOPES, M. F. P. et al. Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. **Food microbiology**, v. 63, p. 178-190, 2017.

EGERVÄRN, M. et al. Transferability of a tetracycline resistance gene from probiotic *Lactobacillus reuteri* to bacteria in the gastrointestinal tract of humans. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 97, p. 189-200, 2010.

EMBRAPA AGROINDÚSTRIA TROPICAL. **Microbiota láctica de queijos artesanais.** Fortaleza, CE, dez. 2009. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agroindustria-tropical/busca-de-publicacoes/-/publicacao/748514/microbiota-lactica-de-queijos-artesanais>. Acesso em: 28/03/2019

EUCAST. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Opinion of the scientific committee on a request from EFSA on the introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. **EFSA Journal**, n. 187:, 2007

EUCAST. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. **EFSA Journal**, v. 10, n. 6, jun. 2012.

EUCAST. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Review of immune stimulator substances/agents that are susceptible of being used as feed additives: mode of action

and identification of end-points for efficacy assessment. **EFSA Supporting Publications**, v. 12, n. 12, dez. 2015.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. **EFSA Journal**, v. 16, n. 3, mar. 2018.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. **Organization Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food**, London, Ontario, Canadá, p. 1 - 11. 2002.

FAVARO, L.; PENNA, A. L. B.; TODOROV, S. D. Bacteriocinogenic LAB from cheeses—application in biopreservation?. **Trends in food science & technology**, v. 41, n. 1, p. 37-48, 2015.

FENSTER, K. et al. The production and delivery of probiotics: A review of a practical approach. **Microorganisms**, v. 7, n. 3, p. 83, 2019.

GAJDÁCS, M.; ALBERICIO, F. Antibiotic resistance: from the bench to patients. **Antibiotics**, v. 8, n. 3, p. 129, 2019.

GARCÍA-BURGOS, M. et al. New perspectives in fermented dairy products and their health relevance. **Journal of Functional Foods**, v. 72, p. 104059, 2020.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, Y. et al. Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. **Research in Veterinary Science**, v. 108, p. 125-132, 2016.

GIAZZI, A. et al. Propriedades tecnológicas das bactérias ácido lácticas isoladas na região norte do Paraná. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 18861-18877, 2020.

GOBBETTI, M. et al. Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 167-178, 2015.

GUO, H. et al. Characterization of antibiotic resistance genes from *Lactobacillus* isolated from traditional dairy products. **Journal of food science**, v. 82, n. 3, p. 724-730, 2017.

HAN, Q. et al. In vitro comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics. **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 391-400, 2017.

JOHNSON, M. E. A 100-year review: cheese production and quality. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 9952-9965, 2017.

KAMIMURA, B. A. et al. Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food microbiology**, v. 80, p. 40-49, 2019.

KAMIMURA, B. A. et al. Brazilian artisanal cheeses: an overview of their characteristics, main types and regulatory aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 5, p. 1636-1657, 2019.

KHALIGHI, A.; BEHDANI, R.; KOUHESTANI, S.. Probiotics: a comprehensive review of their classification, mode of action and role in human nutrition. **Probiotics and prebiotics in human nutrition and health**, v. 10, p. 63646, 2016.

LIMA, C. D. L. C. et al. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 61, p. 266-272, 2009.

LINDNER, J. De D. et al. Parmigiano Reggiano cheese: evolution of cultivable and total lactic microflora and peptidase activities during manufacture and ripening. **Dairy Science and Technology**, v. 88, n. 4-5, p. 511-523, 2008.

LUNARDI, A. et al. Bactérias ácido-láticas não iniciadoras (NSLAB): Um desafio à indústria do queijo. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 26383-26409, 2021.

MAPA. **MAPA divulga regras para venda de queijo artesanal no Brasil - FAESP/SENAR-SP/CAESP**. Disponível em: <<https://faespsenar.com.br/mapa-divulga-regras-para-venda-de-queijo-artesanal-no-brasil/>>. 2018.

MASKE, B. L. et al. Viruses in fermented foods: are they good or bad? Two sides of the same coin. **Food Microbiology**, v. 98, p. 103794, 2021.

MARTÍN, M. J. et al. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 27, p. 15-25, 2015.

MARTINS, M. C. de F. et al. Bacterial diversity of artisanal cheese from the Amazonian region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Food Research International**, v. 108, p. 295-300, 2018.

MATHUR, S.; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. **International journal of food microbiology**, v. 105, n. 3, p. 281-295, 2005.

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

MENEZES, S. M. Queijo de coalho: tradição cultural e estratégia de reprodução social na região Nordeste. **Revista de Geografia (Recife)**, v. 28, n. 1, p. 40-56, 2011.

MILLS, S. et al. Milk intelligence: Mining milk for bioactive substances associated with human health. **International dairy journal**, v. 21, n. 6, p. 377-401, 2011.

MONFERDINI, R.; DUARTE, K. M. R. Uso de probióticos na produção animal. **PUBVET**, v. 4, p. Art. 944-950, 2010.

MOKOENA, M. P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1255, 2017.

NAZIR, Y. et al. Probiotics and their potential preventive and therapeutic role for cancer, high serum cholesterol, and allergic and HIV diseases. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

NETO, L. G. G. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 245-250, 2005.

NUNZIATA, L. et al. Antibiotic resistance in wild and commercial non-enterococcal Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria strains of dairy origin: An update. **Food Microbiology**, p. 103999, 2022.

OLIVEIRA, M. N. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 1-21, 2002.

OLIVEIRA, J. L.; ALMEIDA, C.; SILVA B., N.. A importância do uso de probióticos na saúde humana. **Unoesc & Ciência-ACBS**, v. 8, n. 1, p. 7-12, 2017.

PAQUEREAU, B.; MACHADO, G.; CARVALHO, S. O queijo de coalho em Pernambuco: histórias e memórias. **Garanhuns, PE: Editora dos Autores**, 2016.

PERIN, L. M. et al. Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture-dependent and-independent methods. **Food microbiology**, v. 65, p. 160-169, 2017.

PERNAMBUCO. Lei nº 13.376, de 20 de dezembro de 2007. **Dispõe sobre o processo de produção artesanal do Queijo Coalho e outros produtos derivados do leite**. *Diário Oficial do Estado de Pernambuco*, Recife, 21 dez. 2007.

PERNAMBUCO. Agência de defesa agropecuária – ADAGRO. Portaria nº 007, de 04 de janeiro de 2018. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo de Coalho no Estado de Pernambuco**. Recife, 2018.

POOLE, K.. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. **Journal of applied microbiology**, v. 92, n. s1, p. 55S-64S, 2002.

QUEIROGA, R.C.R.E., *et al.* Nutritional, textural and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. **LWT - Food Science and Technology**, v.50, p.538-544, 2013.

RAIZEL, R. et al. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Ciência & Saúde**, v. 4, n. 2, p. 66-74, 2011.

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

SABO, S. et al. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 527-536, 2014.

SALAS, M. L. et al. Identification and quantification of natural compounds produced by antifungal bioprotective cultures in dairy products. **Food chemistry**, v. 301, p. 125260, 2019.

SANT'ANNA, F. M. et al. Assessment of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Minas artisanal cheese produced in the Campo das Vertentes region, Brazil. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, n. 4, p. 592-601, 2017.

SANTOS, K. M. O. et al. Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Dairy Science & Technology**, v. 95, p. 209-230, 2015.

SAVIJOKI, K.; INGMER, H.; VARMANEN, P.. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 71, p. 394-406, 2006.

SHARMA, R. et al. Barley-based probiotic food mixture: Health effects and future prospects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 29, p. 7961-7975, 2022.

SIEZEN, R. J. et al. Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. **Environmental microbiology**, v. 12, n. 3, p. 758-773, 2010.

SRINIVASH, M. et al. Probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from homemade fermented food products. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 11, p. 100517, mar. 2023.

STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International journal of food microbiology**, v. 36, n. 1, p. 1-29, 1997.

TAMANG, J. P.; WATANABE, K.; HOLZAPFEL, W. H. Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 377, 2016.

TAMANG, J. P.; WATANABE, K.; HOLZAPFEL, W. H. Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 377, 2016.

TÁVORA, L.E.M; CAVALCANTI, A.V.A. **Arranjo produtivo de laticínios em Pernambuco: plano de melhoria da competitividade**. Recife: SECTI/PE, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Inovação do Estado de Pernambuco, p. 179, 2017

TEGEGNE, B. A.; KEBEDE, B. Probiotics, their prophylactic and therapeutic applications in human health development: A review of the literature. **Heliyon**, p. e09725, 2022.

TERZIĆ-VIDOJEVIĆ, A. et al. Diversity of non-starter lactic acid bacteria in autochthonous dairy products from Western Balkan Countries-technological and probiotic properties. **Food Research International**, v. 136, p. 109494, 2020.

TILOCCA, B. et al. Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. **Journal of Proteomics**, v. 210, p. 103534, 2020.

TULINI, F. L.; WINKELSTRÖTER, L. K.; DE MARTINIS, E. CP. Identification and evaluation of the probiotic potential of *Lactobacillus paraplantarum* FT259, a bacteriocinogenic strain isolated from Brazilian semi-hard artisanal cheese. **Anaerobe**, v. 22, p. 57-63, 2013.

URNAU, D. *et al.* Isolation, identification and characterization for resistance to acid pH and presence of bile salts of probiotic strains from commercial fermented milks. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 384, p. 5–10, 2012.

VIANA, J. L. A. **Os resultados na cadeia de produção leiteira de Bom Conselho - PE a partir da implantação de uma agroindústria no município**. 2020. 147 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Geografia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2020.

WANG, K. et al. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Tianjin, China. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 1, p. 100006, 2019.

WILKINS, T.; SEQUOIA, J.. Probiotics for gastrointestinal conditions: a summary of the evidence. **American family physician**, v. 96, n. 3, p. 170-178, 2017.

CAPÍTULO II:

**BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJO DE COALHO
ARTESANAL PRODUZIDO NA REGIÃO DO AGRESTE MERIDIONAL DE
PERNAMBUCO: PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS E VIABILIDADE NAS
CONDIÇÕES DO TRATO GASTROINTESTINAL.**

**BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS ISOLADAS DE QUEIJO DE COALHO
ARTESANAL PRODUZIDO NA REGIÃO DO AGRESTE MERIDIONAL DE
PERNAMBUCO: PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS E VIABILIDADE NAS
CONDIÇÕES DO TRATO GASTROINTESTINAL**

Resumo

O queijo de coalho é um alimento típico da região Nordeste, produzido com leite cru mantendo as bactérias ácido lácticas oriundas do leite viáveis. O objetivo deste estudo foi identificar e analisar o potencial probiótico in vitro de bactérias ácido láctico (BAL) presentes no queijo de coalho artesanal produzido no Agreste Meridional de Pernambuco. O isolamento das BAL foi realizado utilizando um total de 60 amostras de queijo de coalho artesanal, provenientes de oito pertencentes à região do Agreste Meridional de Pernambuco. Após o isolamento, foram realizados testes fenotípicos de Gram e catalase e identificação molecular com realização do sequenciamento do gene 16S rRNA foi amplificada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Em seguida, foram realizados os testes de suscetibilidade a antimicrobianos pelo método de difusão em disco com avaliação de 12 antibióticos. No total foram testadas 155 bactérias ácido lácticas, onde 102 isolados apresentaram um nível de sensibilidade superior a 50%. Desses, os maiores índices de resistência foram atribuídos aos antibióticos cefoxitina (88,38%), penicilina (62,58%), meropenem (55,54%) e tetraciclina (54,83%). Posteriormente, foram selecionadas 36 cepas de BAL, a partir da sua identificação molecular, para realização do teste de tolerância as condições do TGI. Sendo estas pertencentes aos gêneros *Lactococcus*, *Lactiplantibacillus*, *Lacticaseibacillus* e *Streptococcus*. Quatorze cepas apresentaram uma redução inferior a $3 \log^{10}$ UFC/mL mantendo-se um número de bactérias viáveis igual a $4 \log^{10}$ UFC/mL após 360 minutos. Além disso, pode -se verificar que 83,33% (30/36) das cepas avaliadas permaneceram viáveis após a fase gástrica. Após a avaliação dos resultados de antibiograma e tolerância ao trato gastrointestinal obteve-se 61,11% (22/36) cepas com características que estimulam a evolução dos testes, sendo esta indicadas para a realização de testes adicionais que possam assegurar esse potencial

e garantir maiores níveis de segurança para posterior aplicação em produtos funcionais.

Palavras-chaves: Derivados lácteos; Probióticos; Queijo; Segurança alimentar.

ABSTRACT

Coalho cheese is a typical food from the Northeast region, produced with raw milk, keeping the lactic acid bacteria from the milk viable. The objective of this study was to identify and analyze the in vitro probiotic potential of lactic acid bacteria (LAB) present in artisanal coalho cheese produced in the Agreste Meridional of Pernambuco. The isolation of BAL was carried out using a total of 60 samples of artisanal coalho cheese, from eight belonging to the Agreste Meridional region of Pernambuco. After isolation, Gram and catalase phenotypic tests were performed and molecular identification with sequencing of the 16S rRNA gene was amplified by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. Then, antimicrobial susceptibility tests were carried out using the disk diffusion method, evaluating 12 antibiotics. In total, 155 lactic acid bacteria were tested, where 102 isolates showed a sensitivity level greater than 50%. Of these, the highest rates of resistance were attributed to the antibiotics cefoxitin (88.38%), penicillin (62.58%), meropenem (55.54%) and tetracycline (54.83%). Subsequently, 36 BAL strains were selected, based on their molecular identification, to carry out the test of tolerance to the conditions of the GIT. These belonging to the genera *Lactococcus*, *Lactiplantibacillus*, *Lactocaseibacillus* and *Streptococcus*. Fourteen strains showed a reduction of less than 3 log₁₀ CFU/mL, maintaining a number of viable bacteria equal to 4 log₁₀ CFU/mL after 360 minutes. Furthermore, it can be seen that 83.33% (30/36) of the evaluated strains remained viable after the gastric phase. After evaluating the results of antibiogram and tolerance to the gastrointestinal tract, 61.11% (22/36) strains were obtained with characteristics that stimulate the evolution of the tests, which are indicated for carrying out additional tests that can ensure this potential and guarantee higher levels of security for later application in functional products.

Keywords: Dairy derivatives; Probiotics; Cheese; Food safety.

1. Introdução

As bactérias ácido lácticas (BAL) são microrganismos industrialmente importantes devido ao seu uso para a produção de inúmeros alimentos fermentados e funcionais (LEROY e DE VUYST 2004; RHEE *et al.*, 2011). As BAL não são formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, aerotolerantes, heterofermentativas ou homofermentativas (SINGLA *et al.*, 2018). Devido às suas propriedades metabólicas, as BAL contribuem significativamente para o sabor, textura, valor nutricional e segurança microbiana dos alimentos fermentados, o que as tornam microrganismos industrialmente importantes (PORTO *et al.*, 2016; SINGLA *et al.*, 2017).

As BAL são responsáveis pelo processo fermentativo de diferentes alimentos, mas historicamente apresentam grande importância na utilização em alimentos de origem láctea (MOGENSEN *et al.*, 2002). Os produtos lácteos fermentados são consumidos em todo o mundo e apreciados pelas mais diversas culturas devido a suas características nutricionais, possuindo também relação com as características identitárias dos povos (PETROVA *et al.*, 2021).

O queijo de coalho artesanal é um produto típico da região Nordeste, fabricado com leite cru, com presença de uma microbiota endógena específica propiciando características sensoriais únicas. Além disso, chama atenção por ser um produto alimentício funcional e de potencial biotecnológico (PAQUEREAU *et al.*, 2016; AGOSTINI *et al.*, 2018; CAMPAGNOLLO *et al.*, 2018; PERNAMBUCO, 2018; KAMIMURA *et al.*, 2019; FERNADES *et al.*, 2021).

Os principais gêneros de BAL presentes em queijo de coalho artesanal são os *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*. Sendo os gêneros *Lactococcus* e *Enterococcus* geralmente são os mais predominantes em queijos artesanais elaborados com leite cru, e que não sofreram cozimento da massa. As BAL podem advir tanto da matéria-prima, quanto do meio ambiente, variando conforme o próprio ambiente, as condições de higiene do processo e a época do ano (MARGALHO *et al.*, 2021).

Esses microrganismos endógenos representados principalmente por BAL, desempenham um papel essencial na fabricação dos queijos artesanais (BRASIL, 2013; MARTINS *et al.*, 2015; KAMIMURA *et al.*, 2019), exibindo características como

produção de substâncias antimicrobianas (bacteriocinas), ácidos orgânicos, etanol, CO₂, peróxido de hidrogênio, diacetil, ácidos graxos, etc., resistindo em competição com outros microrganismos e promovendo a estabilidade microbiana do produto final (MARGALHO *et al.*, 2021). Além de apresentarem frequentemente potencial probiótico, contribuindo para a saúde dos consumidores a partir da modulação da resposta imunológica, prevenção de doenças e alterações gastrointestinais entre outros (MELLO *et al.*, 2022).

Muitas espécies BAL já possuem status de "geralmente reconhecida como segura" (GRAS), justificado principalmente pelo extenso uso ao longo da história da alimentação (MASKE *et al.*, 2021). Entretanto é necessário que outras características estejam alinhadas aos critérios de segurança, por exemplo, identificação inequívoca cepas do probiótico; ausência de genes responsáveis por resistência a antibióticos e/ou outros fenótipos de virulência (SANDERS *et al.*, 2005; SANDERS *et al.*, 2010 UWENHAND, 2015).

Portanto, o presente estudo teve por finalidade isolar e caracterizar bactérias ácido lácticas oriundas de queijos de coalho artesanal produzido no Agreste de Pernambuco, e avaliar alguns critérios de segurança para as BAL isoladas. Assim, o resultado da presente investigação permitirá a seleção de cepas para futuras aplicações industriais.

2. Material e Métodos

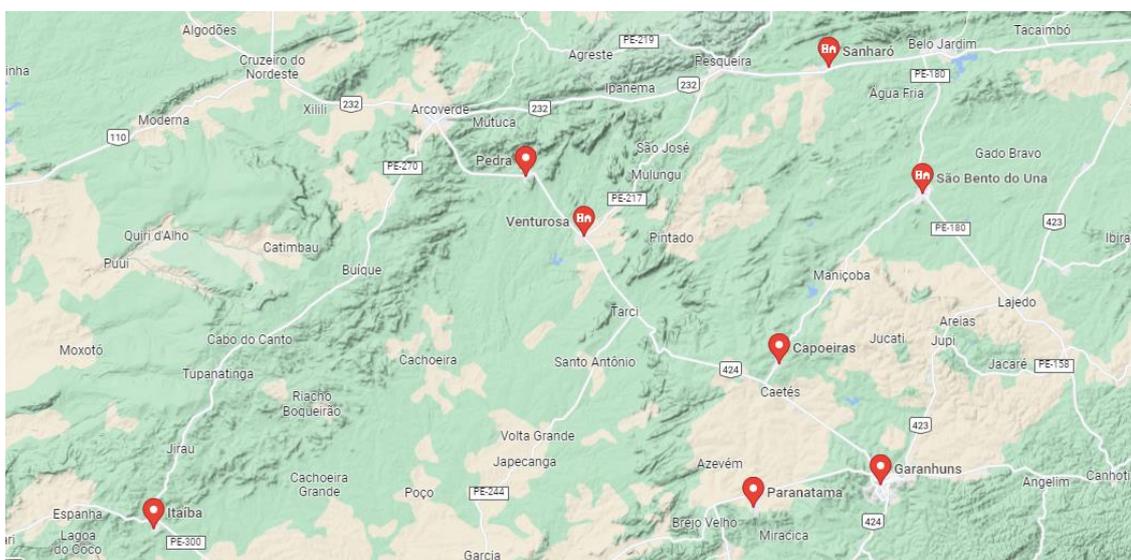
2.1 Amostragem

As bactérias ácido lácticas foram isoladas a partir das amostras coletadas. As amostras foram transportadas e acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável. Logo em seguida, encaminhadas ao Centro Laboratorial de Apoio à Pesquisa da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco (CENLAG – UFAPE), para os laboratórios de Microbiologia e Imunologia (LAPEMI), e Microbiologia, Tecnologia Enzimática e Bioprodutos (LMTEB), onde foram mantidas sob refrigeração (5 °C ±2 °C) e processadas em até 24 horas após a aquisição.

Foram coletadas um total de 60 amostras de queijo de coalho artesanal, provenientes de 30 propriedades diferentes (duas amostras de cada). As amostras foram obtidas em propriedades de oito municípios distintos, sendo eles: Venturosa (9);

Pedra (8); São Bento do Una (6); Garanhuns (2); Paranatama (2); Sanharó (1); Capoeiras (1) e Itaíba (1). Vale ressaltar que, todos esses municípios são pertencentes geograficamente a região do Agreste Meridional de Pernambuco, como observado na figura 1. Todas as amostras foram coletadas ao acaso, diretamente nas propriedades.

Figura 1. Localização geográfica dos municípios onde ocorreram as coletas das amostras de queijo de coalho artesanal.



Fonte: Arquivo Pessoal elaborado com recurso digital Google Maps, 2023

2.2 Isolamento das bactérias ácido lácticas

Para realização do isolamento das BAL, como descrito por Costa *et al.* (2018), foram processados 25 g das porções internas de cada amostra, os quais foram transferidos assepticamente para sacos plásticos estéreis, com 225 mL de água peptonada 1% (v/v). Em seguida as amostras passaram pelo processo de homogeneização em equipamento Stomacher (SpLabor, São Paulo) por três minutos. Alíquotas de 1 mL de cada amostra foram transferidas para tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada à 0,1% e diluições seriadas foram realizadas até 10^{-6} . Um total de 100 μ L de cada diluição semeados em placas de Petri pela técnica de inoculação em superfície em meio de crescimento ágar Man Rogosa and Sharp (MRS) e incubadas em jarras de anaerobiose a 30 °C por 72 horas. Após o crescimento,

realizou-se a seleção das BAL que foram cultivadas em placas de Petri ágar MRS a 37 °C entre 24 e 48 horas, sob condições de aerobiose. Após esta etapa, os isolados foram cultivados em caldo MRS a 37 °C por 24 horas e armazenados em tubos criogênicos com glicerol 20% (v/v) a -20 °C.

2.3 Caracterização fenotípica e identificação das bactérias ácido lácticas

As colônias características de BAL, selecionadas e isoladas, foram submetidas a caracterização fenotípica, pelo teste de coloração de Gram e produção de catalase.

2.3.1 Identificação genotípica dos isolados de BAL

As bactérias previamente caracterizadas fenotipicamente foram repicadas em caldo BHI e em seguida submetidas à extração de DNA genômico utilizando-se método de pérola de vidro (Sambrook; Russel, 2001). Brevemente, o pellet de 1 mL do cultivo de bactéria foi ressuspensão em 150 µL do tampão de lise STES (Tris-HCl 0,2M; NaCl 0,5M; SDS 0,1%; EDTA 0,01M; pH 7,6), ao qual foram adicionados aproximadamente 50 µL de pérolas de vidro e 150 µL de fenol-clorofórmio. Após centrifugação a 13.000 x g durante 5 minutos, o sobrenadante foi coletado e precipitado com álcool absoluto e acetato de sódio a 3M durante 20 minutos a -70 °C e uma nova centrifugação foi realizada durante 20 minutos a 13.000 x g e o pellet lavado com álcool 70%. A presença e a qualidade do DNA genômico foi verificada em gel de agarose a 0,8%, corado com SYBR Safe (Invitrogen) e visualizado por sistema de fotodocumentação sob luz ultravioleta.

A sequência do gene 16S rRNA foi amplificada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguindo recomendação descrita em Perin *et al.* (2017). Todas as amplificações foram padronizadas utilizando em cada reação 1 µL de DNA (~50 ng/µL), 0,5 µL de cada primer e 4 µL de FirePol MasterMix® (Solis Biodyne), completando o volume para 20 µL. As condições utilizadas para a amplificação do DNA genômico 16s rRNA foram de desnaturação inicial a 95 °C por 6 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, associação a 50 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minutos. Os produtos das reações de amplificação

foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com SYBR Safe (Invitrogen).

2.3.2 Sequenciamento produtos rRNA 16S amplificados

Após obtenção do segmento de rRNA 16S amplificados, foi procedido a fase purificação utilizando o kit Illustra GFX PCR DNA Purification (Cytiva), de acordo com as recomendações do fabricante. Após checagem em gel de eletroforese à 1%, os produtos de PCR foram submetidos a quantificação por espectrofotometria (Biomate3S Thermo Scientific) para determinação de pureza e quantidade de DNA. O sequenciamento genético para identificação a nível de gênero e espécie dos isolados de BAL foi realizado no Laboratório de Genética Molecular Humana – LGMH, do departamento de genética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os primers iniciadores utilizados para o sequenciamento foram os mesmos empregados na amplificação por PCR. O sequenciamento foi realizado por separação eletroforética em capilar em um sequenciador modelo *ABI 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Os dados do sequenciamento foram coletados com o *software Data Collection* (Applied Biosystems). Após a coleta, os dados passaram por uma inspeção de qualidade por meio do *Sequencing Analysis Software* (Applied Biosystems).

2.3.3 Análise de bioinformática

A edição e análise manual das sequências Forward e Reverse foram realizadas utilizando o software Bioedit (<https://bioedit.software.informer.com>) e o alinhamento das sequências consenso através do pacote MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; Version 11.0.13). Após edição completa dos *contigs*, estes foram submetidos ao BLAST na base de dados do *GenBank* através da página *web* do NCBI e avaliação pelo software online *EzBioCloud 16S rRNA gene-based microbiome*, a fim de investigar a correspondência na identificação do gênero e espécies.

2.4 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

A avaliação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos foi realizada pela técnica de disco-difusão proposta por Charteris *et al.* (1998) e como recomendado pelo EUCAST, 2021. Os doze antibióticos, representando nove classes, empregados no teste foram escolhidos conforme lista proposta pela EFSA (2012).

As BAL foram cultivadas em ágar MRS por 24 horas a temperatura de 37 °C, em seguida as colônias foram retiradas com alça bacteriológica e transferidas para tubos contendo 5 mL de solução salina 0,85% até atingirem a turbidez de 0,5 na escala de McFarland (aproximadamente 10⁸ UFC/mL). Logo após, os microrganismos foram inoculados em ágar Mueller Hinton adicionando 100 µL em superfície e os discos de antimicrobianos, em suas respectivas concentrações, foram adicionados (Tabela 1).

Tabela 1. Antibióticos utilizados na realização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos com suas respectivas classes.

Antibiótico	Concentração	Classe
Gentamicina	120 µg	Aminoglicosídeos
Eritromicina	15 µg	Macrolídeos
Clorafenicol	30 µg	Anfenicois
Tetraciclina	30 µg	Tetraciclinas
Vancomicina	30 µg	Glicopeptídeos
Amoxicilina com clavulanato	30 µg	Penicilinas
Ampicilina	10 µg	Penicilinas
Penicilina	10 UI	Penicilinas
Piperacilina com tazobactan	36 µg	Penicilinas
Meropenem	10 µg	Beta - lactâmico
Cefoxitina	30 µg	Cefalosporina
Ciprofloxacina	5 µg	Quinolona

Fonte: Arquivo pessoal (2023).

As placas foram incubadas a 30 °C por 24 horas em aerobiose. O controle de qualidade dos discos de antibióticos foi realizado utilizando uma cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922. Após incubação, as leituras dos halos de inibição foram realizadas

com a utilização de um paquímetro digital (684132; MTX), e o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos utilizados foi expressa em milímetros. Os isolados foram classificados como resistente, moderadamente suscetível e suscetível, segundo os valores de corte propostos por Chateris *et al.* (1998) e Toushik *et al.* (2021), para bactérias ácido lácticas com apresentado na tabela 2.

Tabela 2. Classificação dos isolados quanto a sua suscetibilidade aos antibióticos testados de acordo com o tamanho do halo formado no teste de antibiograma.

Antibiótico	Resistente	Moderadamente Suscetível	Suscetível
Amoxicilina com clavulanato 30 µg	≤18mm	19–20 mm	≥21 mm
Ampicilina 10 µg	≤12mm	13–15 mm	≥16 mm
Vancomicina 30 µg	≤14mm	15–16 mm	≥17 mm
Gentamicina 120 µg	≤12mm	-	≥13 mm
Eritromicina 15 µg	≤13mm	14–17 mm	≥18 mm
Tetraciclina 30 µg	≤14mm	15–18 mm	≥19 mm
Ciprofloxacina 5 µg	≤13mm	14–18 mm	≥19 mm
Clorafenicol 30 µg	≤15mm	16–20 mm	≥21 mm
Cefoxitina 30 µg	≤14mm	15–17 mm	≥18 mm
Penicilina 10 UI	≤19mm	20–27 mm	≥28 mm
Meropenem 10 µg	≤15mm	16–20 mm	≥21 mm
Piperacilina com tazobactan 36 µg	≤18mm	19–20 mm	≥21 mm

Fonte: Adaptado de Chateris *et al.* (1998) e Toushik *et al.* (2021).

2.5 Tolerância as condições simuladas do trato gastrointestinal

A avaliação da tolerância dos microrganismos as condições simuladas do trato gastrointestinal *in vitro* foi realizada conforme a metodologia descrita por Bautista-Galego *et al.* (2013). Para a fase gástrica foi preparada uma solução tampão com NaCl (2,05 g/L), KH₂PO₄ (0,6 g/L), CaCl₂ (0,11 g/L) e KCl (0,37 g/L). O pH foi ajustado para 2,0 com HCl 1 M, sendo esterilizada à 121 °C por 15 minutos. As cepas selecionadas das BAL foram cultivadas em caldo MRS centrifugadas (10000 x g, 10 min., 4 °C) e os pellets lavados em tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M, pH 7,2. Em seguida, as células bacterianas foram ressuspensas na solução da fase gástrica para

obter entre 8 e 9 log¹⁰ UFC/mL. A esta solução foi adicionada pepsina na concentração de 3 g/L, e incubada a 37 °C por 120 minutos em banho-maria. Já para a fase entérica foi preparada uma solução contendo Na₂HPO₄·7H₂O (50,81 g/L) e NaCl (8,5 g/L). O pH foi ajustado para 8,0 com KH₂PO₄ e a solução autoclavada à 121 °C por 15 min. Posteriormente, a esta solução adicionou-se pancreatina e sais biliares, nas concentrações de 1 g/L e 3 g/L, respectivamente. Após a conclusão da fase gástrica, alíquotas de 1 mL foram retiradas, centrifugadas, sendo as células lavadas em solução PBS, centrifugadas novamente e ressuspensas no mesmo volume com a solução da fase entérica. As amostras foram incubadas novamente por 360 min a 37 °C em banho-maria. Alíquotas de 1 mL foram retiradas nos tempos T0 (tempo zero) e T120 (tempo após 120 minutos) dos ensaios da fase gástrica e no tempo T360 (tempo após 360 minutos) no ensaio da fase entérica. Para estas alíquotas foram realizadas diluições seriadas de 10⁻⁴ até 10⁻⁸, em solução salina e logo em seguida estriadas em placas de Petri contendo ágar MRS, sendo incubadas a 37 °C durante 24 a 48 horas. A contagem das colônias foi realizada por micro-contagem e os resultados expressos em log¹⁰ UFC/mL. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Vale salientar ainda que todas as soluções de enzimas (pepsina e pancreatina), bem como os sais biliares, foram preparadas no dia da análise e esterilizadas por filtração usando um filtro de membrana de 0,22 µm (Merck Millipore Ltd., Cork, Irlanda) antes de cada uso.

2.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software estatístico IBM SPSS 25. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey foi aplicada para detectar diferenças estatísticas ($p < 0,05$) na viabilidade celular entre as cepas de bactérias ácido lácticas dentro do mesmo ensaio e de uma mesma cepa ao longo do ensaio de simulação das condições do trato gastrointestinal.

3. Resultados e Discussão

3.1 Caracterização fenotípica e identificação das bactérias ácido lácticas

A partir das 60 amostras de queijo de coalho artesanal coletadas, foram selecionadas e isoladas 196 colônias distintas com características de crescimento sugestivas de bactéria ácido láctica, como colônias relativamente pequenas, com formato arredondado, cor branca e bordas delimitadas, conforme descrito por Cavalcante *et al.* (2007).

Vale destacar que, das 60 amostras coletadas, 30 (50%) foram provenientes de dois municípios distintos, São Bento do Una e Venturosa. Isso se justifica devido ao fato destes municípios possuírem 70,83% das queijarias artesanais registradas no estado de Pernambuco (ADAGRO, 2022).

Para o teste de coloração de Gram, dos 196 isolados, 162 (82,65%) foram bactérias Gram-positivas. Com relação aos testes de catalase, dos 162 isolados Gram-positivos, 155 (79,08%) apresentaram-se como catalase negativos. Em se tratando da morfologia, os isolados apresentaram características de cocos foram um total de 71,61% cepas (111/155), 10,32% cepas foram bacilos (16/155) e 18,06% foram cocobacilos (28/155) Quando realizada uma avaliação da morfologia dos isolados por município observa-se que todos os municípios apresentaram a morfologia predominante de cocos, chegando a 100% dos isolados do município de Sanharó, conforme a tabela 3.

Tabela 3. Morfologia das bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de coalho artesanal por município, pertencentes geograficamente a região do Agreste Meridional de Pernambuco.

MUNICÍPIO	AMOSTRAS	COCOS		BACILOS		COCOBACILOS	
		N	%	N	%	N	%
Capoeiras	4	2	50	1	25	1	25
Garanhuns	5	3	60	1	20	1	20
Itaíba	8	7	87,5	0	0	1	12,5
Paranatama	11	5	45,45	3	27,27	3	27,27
Pedra	34	26	76,47	3	9,37	5	15,6
Sanharó	4	4	100	0	0	0	0
Venturosa	51	34	66,66	4	7,84	13	25,49
São Bento do Una	38	30	78,94	4	10,52	4	10,52
TOTAL	155	111	71,61	16	10,32	28	18,06

Como relatado por Forsythe (2013), as bactérias ácido lácticas são descritas como microrganismos Gram-positivos, catalase negativos, podem apresentar formato de cocos, bacilos ou cocobacilos, com células simples, duplas ou triplas, podendo ainda formar pequenas ou grandes cadeias.

De acordo com Albayrak e Duran (2021), 40 isolados de amostras de queijo branco, produzidos na Turquia com leite não pasteurizado e sem adição de culturas iniciadoras comerciais, apresentaram em sua totalidade serem Gram-positiva, bem como catalase e oxidase negativas e todos os isolados apresentaram formato de cocos.

Enquanto, um estudo realizado com leite cru e queijo colonial da região do Rio Grande do Sul, onde foram avaliadas 20 amostras em épocas diferentes do ano (verão e inverno), sendo possível isolar um total de 112 colônias com características de BAL, das quais 60 isolados apresentaram características de Gram-positivas e catalase negativas destas, 46,66% (28/60) apresentaram morfologia de bacilos e 53,33% (32/60) de cocos (HERMANNNS *et al.*, 2013).

Estudo semelhante realizado por Medeiros *et al.* (2016), 28 amostras de queijo de coalho produzidos no estado da Paraíba, 93% (425/456) apresentaram morfologia de cocos e 6,7% (31/456) de bacilos. Segundo Moraes *et al.* (2010), a população microbiana de cada produto lácteo varia de acordo com a região geográfica onde este

é produzido, podendo ser atribuída a variações em razão do leite utilizado, do clima predominante e dos métodos empregados no processamento

3.2 Suscetibilidade a antimicrobianos

As 155 bactérias ácido lácticas que foram isoladas e caracterizadas fenotipicamente através da morfologia, coloração de Gram e teste de catalase, foram avaliadas quanto a suscetibilidade à antibióticos. Os resultados da formação dos halos de inibição estão descritos na tabela 4, quanto o perfil de suscetibilidade antimicrobiana de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de coalho artesanal

As bactérias ácido lácticas são consideradas seguras, mas devido a sua grande utilização por parte da indústria, se faz necessário proteger os consumidores de quaisquer efeitos adversos, sendo a resistência a antibióticos por parte dessas cepas, um desses pré-requisito (HUMMEL *et al.*, 2007; SIGLA *et al.*, 2018). As diretrizes da FAO/OMS recomendam a realização de ensaios para a determinação de um padrão de suscetibilidade a antibióticos de cada cepa probiótica antes de seu consumo ou aplicação em alimentos (FAO/OMS, 2002).

Tabela 4. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de coalho artesanal.

ANTIMICROBIANO	SENSÍVEL		SENSIBILIDADE MODERADA		RESISTENTE	
	N	%	N	%	N	%
Amoxicilina com clavulanato	142	91,61	3	1,93	10	6,45
Ampicilina	132	85,16	3	1,93	20	12,90
Cefoxitina	16	10,32	2	1,29	137	88,38
Ciprofloxacina	66	42,58	62	40	27	17,41
Clorafenicol	129	83,22	1	0,64	25	16,12
Eritromicina	76	49,03	23	14,83	56	36,12
Gentamicina	104	67,09	2	1,29	49	31,61
Meropenem	52	33,54	17	10,96	86	55,48
Penicilina	29	18,70	29	18,70	97	62,58
Piperacilina com tazobactan	81	52,25	17	10,96	37	23,87
Tetraciclina	61	39,35	9	5,80	85	54,83
Vancomicina	96	61,93	22	14,19	37	23,87

Dos isolados avaliados foi possível detectar diferentes níveis de resistência a todos os antibióticos, como apresentado na tabela 4. Apenas três isolados foram completamente sensíveis a todos os antibióticos e quatro isolados apresentaram 91,66% de sensibilidade, nesses casos as resistências apresentadas foram a cefoxitina, eritromicina e tetraciclina. Enquanto um total de 102 isolados apresentaram um nível de sensibilidade superior a 50%, e os antimicrobianos com os maiores índices de resistência foram para cefoxitina (88,38%), penicilina (62,58%), meropenem (55,54%) e tetraciclina (54,83%).

Quanto a sensibilidade, foram observados os maiores valores respectivamente para a amoxicilina com clavulanato (91,61%), ampicilina (85,16%), clorafenicol (83,22%), gentamicina (67,09%), vancomicina (61,93%), e piperacilina com tazobactan (52,25%), em se tratando de sensibilidade moderada a ciprofloxacina foi considerável (40%). Logo, não houve nenhum antibiótico com 100% de índices de resistência ou sensibilidade.

Diferentemente do encontrado por Margalho *et al.* (2020) ao avaliar 220 BAL isoladas de queijos artesanais produzidos no Brasil, onde os maiores índices de resistência foram à ciprofloxacina (81,4%), gentamicina (94,6%) e vancomicina (97,3%) e todos os BAL isolados eram resistentes à estreptomicina, além de apresentar sensibilidade a tetraciclina (95%), eritromicina (93,2%) e penicilina (76,4%), além de ter conseguido associar a presença da resistência à penicilina com o queijo coalho.

Analisando individualmente os resultados de resistência dos isolados por município estudado e por antibiótico testado, observou-se que as bactérias apresentaram resistência acima de 60% a cefoxitina em todos os municípios, sendo o único antibiótico apresentou níveis de 100% de resistência por município (Paranatama). Já amoxicilina e ampicilina as BAL apresentaram níveis de sensibilidade, superiores a 70% em todos os municípios, contrariando o esperado visto que os β -lactâmicos representaram uma classe amplamente utilizada nos rebanhos leiteiros, o que pode favorecer a seleção de cepas resistentes (SILVA *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2015; MESQUITA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2022).

Florez e Mayo (2017), encontraram resistência a tetraciclina (7/41) e eritromicina (2/41) em BAL isoladas de leite cru, que foram associadas a presença de gene de resistência que podem estar relacionados a disseminação desta característica.

Em estudo realizado por Nascimento *et al.* (2017), ao avaliar a ocorrência de resistência em 20 cepas de BAL, previamente isoladas de queijo muçarela de búfala produzidas na região sudeste do Brasil, identificaram que 100% das cepas de *Lactobacillus* (4/20) apresentaram resistência a tetraciclina.

A pecuária é um dos setores que possui alto potencial como reservatório de bactérias resistentes. Devido ao uso de antimicrobianos na produção animal de forma indiscriminada (BARON *et al.*, 2014; CHANTZIARAS *et al.*, 2014). Sua utilização em grande escala tem o poder de acelerar a seleção de microrganismos resistentes (CHEN *et al.*, 2019). Dentre os principais grupos de antimicrobianos utilizados na rotina das propriedades rurais tem-se os beta-lactâmicos, as cefalosporinas, penicilinas (SILVA *et al.*, 2015).

Segundo a EFSA (2012), quando uma linhagem bacteriana demonstra maior resistência a um antimicrobiano específico do que outras linhagens da mesma unidade taxonômica, há indício de resistência adquirida, sendo necessária informação sobre a base genética da resistência antimicrobiana.

3.3 Tolerância das BAL as condições simuladas do trato gastrointestinal

Para o teste de tolerância das condições do trato gastrointestinal, foram selecionadas 36 BAL após o resultado da identificação molecular (dados não apresentados). Destes microrganismos foram selecionadas 17 espécies de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 07 *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*, 05 *Streptococcus lutetiensis*, 02 *Lactococcus cremoris* subsp. *tructae*, 02 *Lactococcus garvieae* subsp. *bovis*, 01 *Lactococcus garvieae* subsp. *garvieae*, 01 *Lactiplantibacillus pentosus* e 01 *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans*.

Um total de 30 cepas de BAL, sendo elas todas as cepas de *L. cremoris* subsp. *tructae*, *L. lactis* subsp. *hordniae*, *L. garvieae* subsp. *bovis*, *Lactiplantibacillus pentosus*, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *tolerans*, 16 cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* (3, 19, 38, 40, 41,43,44,48, 54, 66, 88, 90, 97, 111, 143, 152) e uma de *S. lutetiensis* (163), sobreviveram com população acima de $4 \log^{10}$ UFC/mL até 360 minutos, quando as bactérias foram expostas as condições simuladas do TGI (Tabela 5), o que é equivalente a passagem das bactérias através do TGI humano. Um dos critérios básicos adotados para selecionar uma bactéria com potencial probiótico é a

avaliação da sua capacidade de resistência às condições de estresse presentes no trato gastrointestinal humano (KLU e CHEN, 2015; SHEHATA *et al.*, 2016; GARCIA *et al.*, 2016, SILVA *et al.*, 2021)

Tabela 5. Viabilidade (\log^{10} UFC/mL) de cepas de bactérias ácido lácticas após a simulação das condições do trato gastrointestinal, de amostras isoladas de queijo coalho artesanal da região do Agreste Meridional de Pernambuco.

Cepas		T ₀	Fase Gástrica	Fase Entérica
			(T ₁₂₀)	(T ₃₆₀)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	PE3	10,00±0,00 ^{Aa}	8,74±0,84 ^{Aabc}	8,10±1,23 ^{Aabcde}
	PE19	7,00±1,00 ^{Ac}	5,85±1,85 ^{Aefghi}	5,30±1,48 ^{Aabcdef}
	PE34	7,33±0,58 ^{Aabcd}	<4,00±0,00 ^{Bi}	<4,00±0,00 ^{Bf}
	PE38	8,53±1,29 ^{Aabcd}	5,33±0,58 ^{Bghi}	8,85±0,38 ^{Aab}
	PE40	7,67±0,58 ^{Aabcd}	7,63±0,35 ^{Aabcdefg}	7,16±1,04 ^{Aabcdef}
	PE41	>10,00±0,00 ^{Aa}	8,56±0,24 ^{Babcde}	7,59±0,36 ^{Cabcdef}
	PE43	9,33±1,15 ^{Aabc}	7,59±0,36 ^{Aabcdefg}	7,49±0,50 ^{Aabcdef}
	PE44	7,23±1,20 ^{Abcd}	4,45±0,77 ^{Bhi}	5,00±1,00 ^{ABbcdef}
	PE48	8,70±0,00 ^{Aabcd}	<4,00±0,00 ^{Bi}	4,43±0,75 ^{Bdef}
	PE54	7,04±0,26 ^{Ac}	4,23±0,40 ^{Bhi}	6,43±0,51 ^{Aabcdef}
	PE66	9,49±0,88 ^{Aabc}	8,2±0,17 ^{Aabcdef}	8,61±0,69 ^{Aabc}
	PE88	8,99±0,11 ^{Aabc}	<4,00±0,00 ^{Bi}	5,83±0,30 ^{Cabcdef}
	PE90	9,79±0,37 ^{Aab}	6,16±1,04 ^{Bcdefghi}	7,53±1,33 ^{ABabcdef}
	PE97	>10,00±0,00 ^{Aa}	8,30±0,70 ^{Babcdef}	7,77±1,07 ^{Babcdef}
	PE111	>10,00±0,00 ^{Aa}	7,83±0,26 ^{Babcdefg}	6,93±1,04 ^{Babcdef}
PE143	9,70±0,11 ^{Aabc}	9,13±0,19 ^{Aab}	7,10±0,11 ^{Babcdef}	
PE152	8,89±0,56 ^{Aabcd}	<4,00±0,00 ^{Bi}	5,33±0,31 ^{Cabcdef}	
<i>L. cremoris</i> subsp. <i>tructae</i>	PE9	7,70±2,06 ^{Aabcd}	5,75±0,67 ^{Afghi}	5,73±0,98 ^{Aabcdef}
	PE62	9,49±0,88 ^{Aabc}	6,48±0,73 ^{Bbcdefghi}	9,13±0,76 ^{Aa}
<i>L. lactis</i> subsp. <i>hordniae</i>	PE39	9,67±0,58 ^{Aabc}	8,16±0,41 ^{ABabcdef}	5,43±2,48 ^{Babcdef}
	PE57	8,42±1,09 ^{Aabcd}	6,00±1,00 ^{Bdefghi}	8,36±0,39 ^{Aabcd}
	PE60	8,72±1,52 ^{Aabcd}	7,49±1,32 ^{Aabcdefg}	7,26±0,24 ^{Aabcdef}
	PE61	8,21±0,32 ^{Aabcd}	6,26±1,17 ^{Acdefghi}	7,03±1,55 ^{Aabcdef}
	PE63	7,03±0,74 ^{Ac}	5,33±2,31 ^{Aghi}	5,20±1,56 ^{Aabcdef}

	PE112	9,83±0,30 ^{Aab}	7,53±0,40 ^{Babcdefg}	7,33±0,58 ^{Babcdef}
	PE156	7,05±0,26 ^{Ac}	<4,00±0,00 ^{Bi}	5,36±0,15 ^{Cabcdef}
<i>L. garvieae</i> subsp.				
	PE119	7,87±0,51 ^{Aabcd}	8,75±0,39 ^{Aabcd}	<4,00±0,00 ^{Bf}
<i>L. garvieae</i> subsp. <i>bovis</i>				
	PE123	8,78±0,16 ^{Aabcd}	9,41±0,16 ^{Ba}	4,16±0,28 ^{Cef}
	PE127	6,21±0,49 ^{Ad}	6,88±0,16 ^{Aabcdeh}	6,93±0,13 ^{Aabcdef}
<i>S. lutetiensis</i>				
	PE67	7,53±0,68 ^{Aabcd}	7,33±0,58 ^{Aabcdefg}	<4,00±0,00 ^{Bf}
	PE68	7,89±0,53 ^{Aabcd}	8,19±0,61 ^{Aabcde}	<4,00±0,00 ^{Bf}
	PE69	7,53±1,36 ^{Aabcd}	7,53±1,36 ^{Aabcdefg}	<4,00±0,00 ^{Bf}
	PE105	9,61±0,14 ^{Aabc}	8,60±0,52 ^{Babcd}	<4,00±0,00 ^{Cf}
	PE163	8,95±1,82 ^{Aabc}	<4,00±0,00 ^{Bi}	4,67±1,15 ^{Bcdef}
<i>Lacticaseibacillus</i>				
	PE87	7,93±0,89 ^{Aabcd}	7,43±0,98 ^{Aabcdefg}	7,77±0,68 ^{Aabcdef}
<i>Lactiplantibacillus</i>				
	PE99	8,00±0,30 ^{Aabcd}	8,37±0,77 ^{Aabcde}	7,77±1,97 ^{Aabcde}

T₀ = viabilidade no início do ensaio; T₁₂₀ = viabilidade após a simulação das condições gástricas (pH 2,0); T₃₆₀ = viabilidade após a simulação das condições intestinais (pH 8,0). Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa (p < 0,05) entre as cepas. Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa (p < 0,05) durante o ensaio para a mesma cepa. Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (n = 3).

Foi observada uma redução inferior a 3 log¹⁰ UFC/mL em 61,11% (14/36) das BAL avaliadas e mantendo-se um número de bactérias viáveis superiores a 4 log¹⁰ UFC/mL após a fase entérica. Diferente do encontrado por Souza *et al.* (2019) e Nascimento *et al.* (2019), que apresentaram redução significativa de no mínimo de 2 log¹⁰ UFC/mL entre a fase inicial ao avaliar respectivamente *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei* e *Enterococcus faecium* isolados de queijo mussarela de búfala.

Neste trabalho não existiu diferença estatística entre o início e o fim das análises para dezessete das cepas avaliadas, sendo todos os *L. cremoris* subsp. *tractae* (PE9, PE62), quatro *L. lactis* subsp. *hordniae* (PE57, PE60, PE61, PE63), uma cepa de *L. garvieae* subsp. *bovis* (PE127), todas as cepas de *L. pentosus* e *L. paracasei* subsp. *tolerans*, sete cepas de *L. lactis* subsp. *Lactis* (PE3, PE19, PE38, PE40, PE43, PE66, PE90).

Comparando a fase gástrica e intestinal, após a adição da bile e pancreatina pode se verificar que quatro cepas mantiveram os valores de no mínimo $4 \log^{10}$ UFC/mL de bactérias viáveis, sendo três de *L. lactis* subsp. *lactis* (PE48, PE97, PE111) e uma cepa de *L. lactis* subsp. *hordniae* (PE112) além de não diferirem estatisticamente nessa fase. Além disso quatro cepas de *S. lutetiensis* apresentaram população superior a $7 \log^{10}$ UFC/mL ao final da fase gástrica.

Durante o processo digestivo, aproximadamente 2,5 litros de suco gástrico, com pH em torno de 2,5 é liberado, resultando na morte da maioria dos microrganismos ingeridos (KIMOTO *et al.*, 2000; ARAUJO *et al.*, 2017). Desta forma, a capacidade de resistência ao suco gástrico, durante o processo digestivo, é um importante critério de seleção das BAL probióticas (AVAIYARASI *et al.*, 2016), pois a capacidade de resistir às condições ácidas no estômago e aos sais biliares no intestino delgado, implica em uma alta probabilidade de sobrevivência no TGI (VINDEROLA e REINHEIMER, 2003; ARAUJO *et al.*, 2017; REUBEN *et al.*, 2020; YASMIN *et al.*, 2020).

As BAL possuem a capacidade de empregar vários mecanismos para superar os danos, incluindo a manutenção do pH intracelular e a funcionalidade da membrana celular (WU *et al.*, 2014). Os mecanismos de resistência contra as condições do TGI são dependentes da espécie, geralmente, quanto menor a redução no número de bactérias viáveis após a digestão *in vitro*, melhor o probiótico (AYYASH *et al.*, 2021).

Além disso, é importante salientar que o efeito terapêutico de bactérias probióticas sobre o hospedeiro está relacionada com a sua concentração no lúmen do intestino, cujo valor deve ser de no mínimo $7 \log^{10}$ UFC/g de conteúdo fecal (KAILASAPATHY, 2013).

Estes resultados demonstram uma alta taxa de sobrevivência de ao processo digestivo, de 83,33% (30/36) das cepas avaliadas que apresentaram habilidades para se manter viáveis a fase gástrica. Visto que, inúmeros estudos são realizados com o objetivo de aumentar a capacidade de sobrevivência das BAL no ambiente do TGI, incluindo seleção de cepas adaptadas as mudanças de pH, utilização de matrizes alimentares tamponadas (SOUZA *et al.*, 2019), técnicas de microencapsulação (MISRA *et al.*, 2021).

Para a seleção de cepas seguras de BAL com um melhor potencial probiótico, se faz necessário relacionar os dados obtidos no teste de antibiograma e os dados do teste de simulação ao TGI, de forma que se pode afirmar que 61,11% (22/36) cepas

que apresentaram os melhores resultados em relação a dados apresentados quanto as espécies estudadas individualmente, considerando um nível de sensibilidade ao teste de antibiograma superior a 50% e uma taxa de redução inferior a $4 \log^{10}$ UFC/mL de bactérias viáveis ao final da fase entérica, sendo dezesseis *L. lactis subsp. lactis* (PE3, PE38, PE41, PE44, PE54, PE66, PE88, PE90, PE111, PE143, PE152, PE62, PE60, PE61, PE63, PE156), duas cepas de *S. lutetiensis* (PE68, PE69), uma cepa de *L. garvieae subsp. garvieae* (PE119), *L. paracasei subsp. tolerans* (PE87) e *L. pentosus* (PE99). Diferindo do que foi encontrado em estudo realizado por Araújo (2017), onde se realizou a avaliação de 20 cepas de BAL isoladas de queijo de coalho do sertão paraibano, e apenas 25% (05/20) apresentaram potencial probiótico.

4. Considerações finais

As bactérias ácido lácticas, isoladas de queijo de coalho artesanal do agreste meridional de Pernambuco, apresentaram bons resultados quanto a sensibilidade a antimicrobianos e capacidade de sobrevivência às condições simuladas do TGI, o que as tornam promissoras candidatas a evolução dos testes de avaliação do potencial probiótico.

Visando desta forma a realização de uma seleção segura desses microrganismos e uma melhor compreensão quanto os mecanismos probióticos que envolvem sua ação e futuras aplicações biotecnológicas e industriais, recomenda-se que as cepas *L. lactis* susp. *lactis* (PE3, PE38, PE41, PE44, PE54, PE66, PE88, PE90, PE111, PE143, PE152, PE62, PE60, PE61, PE63, PE156), *S. lutetiensis* (PE68, PE69), *L. garvieae* subsp *garvieae* (PE119), *L. paracasei* subsp *tolerans* (PE87) e *L. pentosus* (PE99) sejam utilizadas para dar continuidade nos estudos.

Referências

ALBAYRAK, Ç. B.; DURAN, M. Isolation and characterization of aroma producing lactic acid bacteria from artisanal white cheese for multifunctional properties. **Food Science and Technology**, v. 150, 1 out. 2021.

ADAGRO - Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária do Estado de Pernambuco - Início. Disponível em:

<https://www.adagro.pe.gov.br/images/estabelecimentos_registrados_%C3%A1rea_animal-_abril_2022.pdf>.

AGOSTINI, C. *et al.* Characterization of technological and probiotic properties of indigenous *Lactobacillus* spp. from south Brazil. **3 Biotech**, v. 8, n. 11, p. 451, 15 nov. 2018.

ARAUJO; L. M.; Avaliação de propriedades probióticas de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de coalho do sertão da Paraíba. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2017. 72p.

AVAIYARASI, N. D., *et al.* In vitro selection, characterization and cytotoxic effect of bacteriocin of *Lactobacillus sakei* GM3 isolated from goat milk. *Food Control* 69, 124 e133. 2016.

AYYASH, M. M. *et al.* Invited review: Characterization of new probiotics from dairy and nondairy products—Insights into acid tolerance, bile metabolism and tolerance, and adhesion capability. **Journal of Dairy Science** Elsevier Inc., , 1 ago. 2021.

BARON S, *et al.* Impact of thirdgeneration-cephalosporin administration in hatcheries on fecal *Escherichia coli* antimicrobial resistance in broilers and layers. **Antimicrob Agents Chemother.** 58(9):5428-34. 2014

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº União, Brasília, 8 ago. 2013. Seção 1, p.19.** Disponível em: https://www.in.gov.br/materia//asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/30808894/do1-2013-08-08-instrucao-normativa-n-30-de-7-de-agosto-de-2013-30808890.

CAVALCANTE, J. F. M., *et al.*. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência e Tecnologia Alimentos.** v. 27(1), p. 205-214, 2007.

CAMPAGNOLLO, F. B. *et al.* Selection of indigenous lactic acid bacteria presenting anti-listerial activity, and their role in reducing the maturation period and assuring the safety of traditional Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 73, p. 288–297, 1 ago. 2018.

CHANTZIARAS I, *et al.* Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: A report on seven countries. **J Antimicrob Chemother.** 69(3):827-34. 2014.

CHARTERIS, W. P. *et al.* **Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic Lactobacillus Species** *Journal of Food Protection*. [s.l: s.n.].

CHEN Y, et al. Increasing Prevalence of ESBL Producing Multidrug Resistance *Escherichia coli* From Diseased Pets in Beijing, China From 2012 to 2017. **Front Microbiol.** 10:2852 2019.. doi: 10.3389/fmicb.2019.02852.

EUCAST. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **Campylobacter jejuni and coli - calibration of zone diameter breakpoints to MIC values.** Version 3.0, January 2020. Available online:
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_criteria/Validation_2020/Campylobacter_v_3.0_January_2020.pdf

EUCAST. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. **EFSA Journal**, v. 10, n. 6, jun. 2012.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. **Organization Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food**, London, Ontario, Canadá, p. 1 - 11. 2002.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013

FLÓREZ, A. B.; MAYO, B. Antibiotic resistance-susceptibility profiles of *Streptococcus thermophilus* isolated from raw milk and genome analysis of the genetic basis of acquired resistances. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. DEC, 22 dez. 2017.

GARCIA, E. F. *et al.* Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. **Frontiers In Microbiology**, v. 7, p.531-541, 2016.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01371>

HU, T. *et al.* Genome Analysis and Physiological Characterization of Four *Streptococcus thermophilus* Strains Isolated From Chinese Traditional Fermented Milk. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 28 fev. 2020.

HUMMEL, A. S. *et al.* Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 730-739, 2007.

KAMIMURA, B. A. *et al.* Brazilian Artisanal Cheeses: An Overview of their Characteristics, Main Types and Regulatory Aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** Blackwell Publishing Inc., , 1 set. 2019.

KAILASAPATHY, K. Commercial sources of probiotic strains and their validated and potential health benefits-a review. **International Journal of Fermented Foods**, v. 2, p.1-17, 2013.

KIMOTO, H., *et al.* In vitro studies on probiotic properties of Lactococci. **Milchwissenschaft**, 55(5), 245 e249. 2000.

KLU, Y. A. K.; CHEN, J. Effect of peanut butter matrices on the fate of probiotics during simulated gastrointestinal passage. **Lwt - Food Science And Technology**, v. 62, n. 2, p.983-988, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.02.018>

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.

MARGALHO, L. P. *et al.* Enterococcus spp. in Brazilian artisanal cheeses: Occurrence and assessment of phenotypic and safety properties of a large set of strains through the use of high throughput tools combined with multivariate statistics. **Food Control**, v. 118, 1 dez. 2020.

MARGALHO, L. P. *et al.* High throughput screening of technological and biopreservation traits of a large set of wild lactic acid bacteria from Brazilian artisanal cheeses. **Food Microbiology**, v. 100, 1 dez. 2021.

MARTÍN, M. J. *et al.* Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 27, p. 15–25, fev. 2015.

MEDEIROS, R. S. *et al.* Identificación de bacterias lácticas aislado de queso Coalho artesanal producidos en el Nordeste Brasileño. **CYTA - Journal of Food**, v. 14, n. 4, p. 613–620, 1 out. 2016.

MELO; T. C. S. Propriedades probióticas in vitro de bactérias ácido-láticas isoladas de Queijo Minas Artesanal da região de Campo das Vertentes, Minas Gerais. Dissertação. (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2022. 83p

MISRA, S.; PANDEY, P.; MISHRA, H. N. Novel approaches for co-encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: A review. **Trends in Food Science and Technology** Elsevier Ltd, , 1 mar. 2021.

MOGENSEN, G., *et al.* Food microorganisms-health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 377, 4-9, 2002.

MORAES, P. M. *et al.* Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. **LWT**, v. 43, n. 9, p. 1320–1324, 2010.

NASCIMENTO, L.C.S., *et al.* Probiotic potential and safety of enterococci strains. **Ann Microbiol** **69**, 241–252 (2019). <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1412-5>

OUWENHAND, A. C. The role of probiotics in digestive health. **Nutrition and Dietary -Supplements**, v. 2015, n. 7, p. 103-109, 2015

PAQUEREAU, B.; *et al.* **O queijo de coalho em Pernambuco: histórias e memórias**. – Garanhuns, PE: Ed. dos Autores, 146p. 2016.

PERNAMBUCO. Agência de defesa agropecuária - ADAGRO. **Portaria nº 007, de 04 de janeiro de 2018. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo de Coalho no Estado de Pernambuco**. Recife, 2018.

PERIN, L.M; *et al.* Bacterial ecology of artisanal Minas cheeses assessed by culture dependent and -independent methods. **Food Microbiology**. n. 65, p. 160- 169, 2017.

PETROVA, P., *et al.* Traditional Bulgarian dairy products: Ethnic foods with health benefits. **Microorganisms**, 9(3), 480, 2021.

PORTO, B. C. *et al.* Determinantes de virulência em Enterococcus endógenos de queijo artesanal. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 47, n. 1, p. 69–76, 2016.

RHEE, S. J., *et al.* Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. **Microbial Cell Factories** 2011, 10(Suppl 1):S5

REUBEN, R.C.; *et al.* Characterization and evaluation of lactic acid bacteria from indigenous raw milk for potential probiotic properties. **J. Dairy Sci.** 2020, 103, 1223–1237.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory.Press**, 3ª Ed. 2001.

SANDERS, M. E., *et al.* Weigh of evidence needed to substantiate a health effect for probiotics and prebiotics. Regulatory considerations in Canada, E.U., and U.S. **European Journal of Nutrition**, v. 44, p. 303-310, 2005.

SANDERS, M. E., *et al.* Food formats for effective delivery of probiotics. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, p. 65-85, 2010

SHEHATA, M. G. *et al.* Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. **Annals Of Agricultural Sciences**, v. 61, n. 1, p.65-75, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.aosas.2016.03.001>

SILVA B. C. U. Resíduos de antibióticos e antiparasitários em alimentos de origem animal. Araraquara: **Universidade Estadual Paulista**; 2015.

SILVA, N. F. *et al.* Caracterização *in vitro* de propriedades probióticas de bactérias ácido lácticas **R. bras. Tecnol. Agroindustr.**, v. 15, n. 1, p. 3556-3572, jan./jun. 2021

SINGLA, V. *et al.* **Techno-functional attributes of *Pediococcus* spp.: A Review** **Indian J Dairy Sci.** [s.l: s.n.].

SINGLA, V. *et al.* Antibiotic susceptibility profile of *Pediococcus* spp. from diverse sources. **3 Biotech**, v. 8, n. 12, 1 dez. 2018.

SOUZA, B. M. S. *et al.* *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus fermentum* Strains Isolated from Mozzarella Cheese: Probiotic Potential, Safety, Acidifying Kinetic Parameters and Viability under Gastrointestinal Tract Conditions. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 2, p. 382–396, 15 jun. 2019.

TARRAH, A., *et al.*. *In vitro* probiotic potential and anti-cancer activity of newly isolated folate-producing streptococcus thermophilus strains. **Front. Microbiol.** 2018a, 9,1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02214>.

TARRAH, A., *et al.* Differences in carbohydrates utilization and antibiotic resistance between *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from dairy products in Italy. **Curr. Microbiol.** 2018b, 75, 1334–1344.
<https://doi.org/10.1007/s00284-018-1528-7>.

TOUSHIK, S. H. *et al.* Korean kimchi-derived lactic acid bacteria inhibit foodborne pathogenic biofilm growth on seafood and food processing surface materials. **Food Control**, v. 129. 2021.

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**, v. 36, n. 9-10, p.895-904, 2003.
[https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00098-x](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00098-x)

WU Y., GUO C., TANG L. *et al* (2020) Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*. v. 5, p.434–435.
doi: 10.1016/S2468-1253(20)30083-2.

YADAV, M., SHUKLA, P. Probiotic potential of *Weissella paramesenteroides* MYPS5. Isolated from customary dairy products and its therapeutic application. 3 **Biotech** 12, 1–13, 2022. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-03074-2>.

YASMIN, I., M. *et al*. In vitro probiotic potential and safety evaluation (hemolytic, cytotoxic activity) of *Bifidobacterium* strains isolated from raw camel milk. **Microorganisms** 8:354. 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030354>