

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Nayara Martins Zille de Miranda

**CARACTERIZAÇÃO PROBIÓTICA DE LEVEDURAS ISOLADAS DE QUEIJO
MINAS ARTESANAL**

Diamantina

2020

Nayara Martins Zille de Miranda

**CARACTERIZAÇÃO PROBIÓTICA DE LEVEDURAS ISOLADAS DE QUEIJO
MINAS ARTESANAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Cíntia Lacerda Ramos

Diamantina

2020

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M672c	<p>Miranda, Nayara Martins Zille de Caracterização probiótica de leveduras isoladas de queijo minas artesanal / Nayara Martins Zille de Miranda, 2020. 57 p.: il.</p> <p>Orientadora: Cíntia Lacerda Ramos</p> <p>Dissertação (Mestrado– Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2020.</p> <p>1. Queijos. 2. Fermentos endógenos 3. Pingo. 4. Rala. 5. Leveduras 6. Probióticos. I. Ramos, Cíntia Lacerda. II. Título. VI. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p style="text-align: right;">CDD 664</p>
-------	---

Ficha Catalográfica – Sistema de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária: Viviane Pedrosa – CRB6/2641

CARACTERIZAÇÃO PROBIÓTICA DE LEVEDURAS ISOLADAS DE QUEIJO MINAS ARTESANAL

Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS,
nível de MESTRADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MESTRA EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Orientadora: Profa. Dra. Cintia Lacerda
Ramos

Data da aprovação: 01/10/2020

Profª. Dr.ª CÍNTIA LACERDA RAMOS - UFVJM

Profª. Dr.ª KARINA TEIXEIRA MAGALHÃES GUEDES - UFBA

Prof. Dr. FABRÍCIO FREITAS FERNANDES - UNIP

DIAMANTINA



Documento assinado eletronicamente por **Cintia Lacerda Ramos, Servidor**, em 01/10/2020, às 16:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



Documento assinado eletronicamente por **Karina Teixeira Magalhães Guedes, Usuário Externo**, em 16/12/2020, às 13:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



Documento assinado eletronicamente por **Fabício Freitas Fernandes, Usuário Externo**, em 17/12/2020, às 09:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufvjm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0183557** e o código CRC **9F5BCEFS**.

RESUMO

Por muitos anos, pesquisas e desenvolvimento de produtos relacionados a microrganismos probióticos manteve-se focado principalmente no grupo de bactérias ácido lácticas (BAL). No entanto, estudos sugerindo o uso de leveduras como probióticos têm despertado o interesse de vários autores, isto porque, as únicas espécies de leveduras disponíveis no mercado, atualmente, são *Saccharomyces boulardii* e *Kluyveromyces fragilis*. No presente estudo, 85 cepas de leveduras foram isoladas de amostras dos fermentos endógenos naturais (pingo e rala), utilizados para produção do Queijo Minas Artesanal (QMA) da região do Serro-MG, e identificadas pelo método de espectrometria de massa MALDI-TOF. Além disso, análises enzimáticas e propriedades probióticas dessas cepas foram avaliadas. Pela técnica de MALDI-TOF, foi possível identificar nove espécies de leveduras, sendo elas: *Yarrowia lipolytica*, *Kodamaea ohmeri*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida infanticola*, *Candida mesentérica*, *Candida catenulata*, *Candida intermédia*, *Trichosporon japonicum* e *Meyerozyma guilliermondii*. Na avaliação da atividade enzimática, sete leveduras demonstraram atividade lipolítica, sendo elas pertencentes às espécies *Y. lipolytica* e *T. japonicum*. Por outro lado, 22 isolados de leveduras apresentaram atividade proteolítica, pertencentes às espécies de *Y. lipolytica*, *K. ohmeri* e *K. lactis*. Todos isolados avaliados demonstraram tolerância a condição de acidez gástrica com pH 2,0 e 69 isolados suportaram a presença de sais biliares (0.3% oxgall). Quanto ao teste de autoagregação e hidrofobicidade, que avaliam características de superfície celular 12 isolados demonstraram considerável capacidade de autoagregação (> 30%) e hidrofobicidade (> 90,0%). Todos isolados selecionados demonstraram co-agregação com *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* superior a 30 %. Dentre estes, dois isolados pertencem à espécie *Y. lipolytica* e dois à espécie *K. ohmeri* apresentaram resistência aos antibióticos avaliados (Netilmicina, Norfloxacino, Sulfazotrin, Nitrofurantoina, Cefazolina e Ácido pipemídico). Nenhuma levedura apresentou atividade antagônica contra os patógenos avaliados. Os resultados obtidos demonstram que estes quatro isolados de leveduras (pertencentes às espécies *Y. lipolytica* e *K. ohmeri*) provenientes do processo produtivo do QMA apresentam potencial probiótico, e que poderão ser futuramente avaliadas em ensaios *in vivo* e ensaios clínicos.

Palavras chave: 1. Queijos 2. Fermentos Endógenos 3. Pingo 4. Rala 5. Leveduras 6. Probióticos

ABSTRACT

For many years, research and product development related to probiotic microorganisms have mainly focused on the lactic acid bacteria group (LAB). However, studies suggesting the use of yeasts as probiotics have increased many authors' interest because only the yeast *Saccharomyces boulardii* and *Kluyveromyces fragilis* are commercially available. In the present study, 85 yeast strains were isolated from samples of natural endogenous cheese ferment (pingo and rala), used to produce Minas Artisanal Cheese (QMA) in the Serro-MG region, and identified by the MALDI-TOF mass spectrometry method. Furthermore, qualitative enzymatic analyzes and probiotic properties of these strains were evaluated. By using the MALDI-TOF technique, it was possible to identify nine yeast species: *Yarrowia lipolytica*, *Kodamaea ohmeri*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida infanticola*, *Candida mesenteric*, *Candida catenulata*, *Candida intermedia*, *Trichosporon japonicum* and *Meyerozyma guilliermondii*. Regarding enzymatic evaluations, seven yeasts showed lipolytic activity, belonging to *Y. lipolytica* and *T. japonicum* species. While 22 yeast isolates showed proteolytic activity, belonging to *Y. lipolytica*, *K. ohmeri* and *K. lactis* species. All evaluated isolates demonstrated tolerance to gastric acidity with pH 2.0, and 69 isolates supported bile salts (0.3% oxgall) presence. Regarding the auto-aggregation and hydrophobicity assays, which evaluates cell surface characteristics, 12 isolates demonstrated capacity for auto-aggregation (> 30%) and hydrophobicity (> 90.0%). All selected isolates exhibited co-aggregation with *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, and *Listeria monocytogenes* greater than 30%. Amongst them, two isolates belonging to the species *Y. lipolytica* and two *K. ohmeri* showed resistance to the evaluated antibiotics (Netilmicina, Norfloxacino, Sulfazotrin, Nitrofurantoina, Cefazolina e pipemídico acid). No yeast showed antagonistic activity against the pathogens being assessed. The obtained results demonstrate that four yeast isolates (belonging to *Y. lipolytica* and *K. ohmeri* species) from the QMA production process have probiotic potential and may be evaluated in the future by *in vivo* and clinical trial experiments.

Keywords: 1. Cheeses 2. Endogenous Ferments 3. Pingo 4. Rala 5. Yeasts 6. Probiotics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Regiões produtoras de queijo Minas artesanal em Minas Gerais	11
Figura 2- Número de cepas e leveduras identificadas através da técnica de MALDI TOF e amostras de fermentos endógenos do queijo Minas artesanal da região do Serro-MG.	33
Figura 3- Dendrograma das leveduras identificadas através de perfis proteicos.	35
Figura 4- Isolados de leveduras do fermento “rala” e “pingo” que apresentaram atividade de lipase e os Índices de Atividade Enzimática (IE).	37
Figura 5 - Porcentagem de isolados de leveduras de cada espécie que apresentou atividade proteolítica	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Isolados de leveduras encontradas em cada tipo de fermento endógeno.	36
Tabela 2- Porcentagem, em ordem crescente, de autoagregação obtida para as leveduras isoladas dos diferentes fermentos endógenos.	41
Tabela 3- Porcentagem, em ordem crescente, de hidrofobicidade obtida para as cepas dos diferentes fermentos endógenos.	43
Tabela 4- Diâmetro (em milímetros) dos halos obtidos pelas cepas de leveduras sensíveis aos antibióticos.	45
Tabela 5- Resultados obtidos no ensaio de co-agregação com patógenos para as cepas obtidas dos diferentes fermentos endógenos.	46

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo Geral	13
2.2	Objetivos Específicos	13
3	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1	Queijo	14
3.1.1	<i>Histórico do queijo no mundo</i>	14
3.1.2	<i>Queijo artesanal no Brasil</i>	14
3.1.3	<i>Queijo Minas Artesanal</i>	15
3.1.4	<i>Produção queijeira na região do Serro</i>	16
3.1.5	<i>Legislação</i>	17
3.2	Probióticos	20
3.2.1	<i>Histórico</i>	20
3.2.2	<i>Microbiota intestinal</i>	21
3.2.3	<i>Mecanismos de ação e critérios para seleção de cepas probióticas</i>	22
3.2.4	<i>Efeitos benéficos dos probióticos</i>	24
3.3	Leveduras	25
3.3.1	<i>Leveduras como probióticos</i>	25
3.3.2	<i>Leveduras em queijos</i>	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1	Microrganismos e condições de cultivo	27
4.2	Identificação por MALDI-TOF	27
4.3	Atividade Enzimática	28
4.3.1	<i>Avaliação qualitativa da atividade lipolítica</i>	28
4.3.2	<i>Avaliação qualitativa da atividade proteolítica</i>	28
4.3.3	<i>Teste de tolerância ao NaCl</i>	29
4.4	Avaliação probiótica <i>in vitro</i>	29
4.4.1	<i>Tolerância a pH 2,0 à temperatura de 37°C</i>	29
4.4.2	<i>Análise de tolerância a bile</i>	29
4.4.3	<i>Autoagregação</i>	30
4.4.4	<i>Hidrofobicidade</i>	30
4.4.5	<i>Antibiograma</i>	31

4.4.6 <i>Co-agregação com patógenos</i>	31
4.4.7 <i>Antagonismo contra patógenos</i>	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Identificações das leveduras	33
5.2 Atividade enzimática	37
5.2.1 <i>Teste tolerância ao NaCl</i>	39
5.3 Caracterização probiótica das leveduras	39
5.3.1 <i>Tolerância às condições do trato gastrointestinal</i>	39
5.3.2 <i>Habilidade de autoagregação e hidrofobicidade</i>	40
5.3.3 <i>Antibiograma</i>	44
5.3.4 <i>Co-agregação e antagonismo com patógenos</i>	45
6 CONCLUSÃO	47
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1 INTRODUÇÃO

1 O Queijo Minas Artesanal (QMA) é considerado o produto final elaborado a partir do
2 leite cru adicionado do coalho e "pingo" (soro que escorre do queijo de 12 a 24 horas após a
3 fabricação). O pingo possui grupo microbiano diverso e complexo, incluindo bactérias
4 lactofermentativas e leveduras, que conferem ao queijo o seu sabor característico (MINAS
5 GERAIS, 2002a). Alguns produtores, em substituição ao uso do pingo, utilizam a “rala” como
6 fermento endógeno para resolver problemas de textura dos queijos que surgiram com a troca
7 das bancadas de madeira por ardósia ou inox. A rala consiste no resultado do queijo fabricado
8 em remessa anterior, que após o período de maturação, é ralado e utilizado (OLIVEIRA,
9 2018).

10 O QMA sobreviveu às pressões, apesar da modernização dos processos de produção,
11 que além de ter influência de tradições familiares, mantinham a fabricação em propriedades
12 afastadas dos grandes centros comerciais, espalhadas por colinas e vales do Estado de Minas
13 Gerais. Isso favoreceu para que se preservassem produtos com características individuais e de
14 valor social, cultural e econômico (EMATER, 2009).

15 Oito regiões são reconhecidas no Estado de Minas Gerais pela produção de Queijos
16 Artesanais, sendo elas a região do Serro, Canastra, Cerrado, Araxá, Campos dos Vertentes,
17 Triângulo Mineiro, Serra do Salitre e Serra da Mantiqueira (Figura 1), sendo esta última
18 reconhecida pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) em junho de 2020, através da
19 portaria nº 1985 (IMA, 2020). O mérito destinado a essas regiões configura-se pelo alto
20 índice de produção anual de queijos, além de características específicas que individualizam o
21 produto. No ano de 2019 foram produzidos em média 50 mil toneladas/dia e 219 mil
22 toneladas/ano de QMA por um total de, aproximadamente, 9 mil produtores estaduais
23 (EMATER, 2019).

Figura 1- Regiões produtoras de queijo Minas artesanal em Minas Gerais



Fonte: Adaptado de Amarante, J. O. A. Regiões demarcadas.

24 O QMA é um produto resultante de uma junção de fatores, sendo eles: socioculturais,
 25 pois criaram um modo individual de fazer os queijos que vai desde a manipulação do leite,
 26 dos coalhos, do soro (pingo), das massas e até mesmo de cura; fatores econômicos que estão
 27 associados à expressiva fonte de renda para numerosas famílias da região; fatores físico-
 28 naturais (como relevo, clima, vegetação, população microbiana) que propicia não apenas
 29 pastagens típicas, como também o desenvolvimento de bactérias e leveduras específicas
 30 possíveis apenas nos microclimas ali existentes (EMATER, 2009).

31 Uma característica importante na produção de QMA é que comumente não se faz o
 32 uso de culturas iniciadoras comerciais, sendo este papel realizado pela população microbiana
 33 láctica própria do ambiente, do leite cru e do fermento endógeno (pingo ou rala) nas regiões
 34 produtoras desse queijo. Dentre a microbiota presente no leite cru e no fermento endógeno, as
 35 mais conhecidas e estudadas são as bactérias do grupo ácido láctico (BAL) e uma diversidade
 36 de leveduras (DORES; FERREIRA, 2012).

37 Nos tempos atuais, cada vez mais se pesquisa sobre o desenvolvimento de alimentos
 38 funcionais que contêm microrganismos probióticos para promoção da saúde e prevenção de
 39 doenças (SAAD, 2006). Os probióticos são descritos pela Agência Nacional de Vigilância
 40 Sanitária (ANVISA) e pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) como
 41 microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo
 42 efeitos benéficos à saúde do indivíduo (ANVISA, 2002; FAO/WHO, 2002). Ainda, é possível

43 encontrar na literatura embasamentos científicos que descrevem os probióticos como
44 microrganismos vivos que conferem efeitos benéficos ao hospedeiro, quando administrados
45 na quantidade adequada. (HILL et al., 2014).

46 Nas últimas décadas, houve um perceptível e minucioso aumento nas
47 investigações/pesquisas relacionadas a cepas probióticas selecionadas, a fim de avaliar as
48 implicações no organismo humano (OUWEHAND; SALMINEN; ISOLAURI, 2002).
49 Contudo, é notável que a maioria das cepas probióticas descritas na literatura e
50 comercializadas pertencem ao grupo de bactérias ácido lácticas (BAL), especialmente
51 *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. Embora estudos avaliando potencial probiótico de
52 leveduras vem aumentando ultimamente, as únicas espécies disponíveis no mercado para
53 consumo humano são *Saccharomyces boulardii* e *Kluyveromyces fragilis* (CZERUCKA;
54 PICHE; RAMPAL, 2007; CHEN et al., 2014). Entretanto, tem-se comprovado que algumas
55 espécies de leveduras conferem benefícios ao organismo humano por serem tolerantes às
56 condições impostas ao trato gastrointestinal (TGI), resistentes às ações de antibióticos, isentas
57 na disseminação dos genes de resistência para patógenos, bem como fáceis de serem
58 eliminadas após a interrupção do consumo probiótico.

59 Dessa forma, a presente pesquisa visou identificar leveduras isoladas de fermentos
60 endógenos de QMA (pingo e rala), bem como avaliar o potencial enzimático e probiótico
61 destes isolados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

62 Identificar e avaliar o potencial enzimático e probiótico de leveduras isoladas de amostras de
63 fermentos endógenos (rala e pingo) de QMA da microrregião do Serro-MG.

2.2 Objetivos Específicos

- 64 ❖ Identificar as leveduras pela técnica de MALDI-TOF.
- 65 ❖ Avaliar qualitativamente a produção de lipases e proteases pelos isolados de leveduras.
- 66 ❖ Avaliar propriedades probióticas das leveduras isoladas, tais como tolerância as
67 condições do TGI, hidrofobicidade, antibiograma, autoagregação, co-agregação com
68 patógenos e antagonismo contra patógenos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Queijo

3.1.1 Histórico do queijo no mundo

69 Múltiplas teorias divergem sobre o marco inicial para o surgimento do queijo como
70 produto final e das técnicas de fabricação empregadas. Mas fato é que, a produção de queijos
71 é um dos métodos mais antigos de conservação do leite e, relatos documentados descrevem
72 sua origem em torno de 10.000 a.C. com o início do pastoreio (MASUI; YAMADA, 1999).

73 Especula-se que na Mesopotâmia, mais precisamente na localização entre os rios Tigre
74 e Eufrates atual região do Iraque e Kuwait, por volta de 6.000 a.C., ocorreu a implementação
75 do cultivo de plantas e a criação de animais pela população local, com a finalidade de obterem
76 seus próprios alimentos (FOX et al., 2000). Dessa forma o leite além de consumido de forma
77 cru (*in natura*), transformou-se em subprodutos, sendo o queijo um deles.

78 Já no período da Roma antiga nota-se que a fabricação de queijos era tecnicamente
79 aprimorada e considerada inovadora para a época. Neste cenário surge o processo de
80 maturação. As casas eram adaptadas com ambientes específicos para a produção e “cura” dos
81 queijos, e estes disponibilizados a toda população, desde os nobres aos soldados (PERRY,
82 2004).

83 Entretanto, o crescimento exponencial da fabricação de queijos teve início no final do
84 século XIX e início do século XX (PERRY, 2004). Alcançou países da Europa, Oriente
85 Médio, Oceania, Américas do Sul e do Norte (BERGER et al., 1997). Tornou-se um produto
86 de consumo global, com centenas de variedades.

3.1.2 Queijo artesanal no Brasil

87 Sabe-se que o ponto de partida da pecuária leiteira no Brasil sobreveio logo após o
88 descobrimento, no período em que foram introduzidos os primeiros rebanhos de criação em
89 São Vicente – SP, por Martim Afonso de Souza em 1534. A edificação histórica exata torna-
90 se dificultada devido à baixa quantidade de menções sobre esta época (LEANDRO, 1987;
91 DIAS, 2006).

92 Referências comprovam que a primeira queijaria brasileira foi identificada na vila de
93 São Salvador, Estado da Bahia no ano de 1581 (DIAS, 2010). Mas, foi em meados do século
94 XVI ao final do século XVII, época caracterizada pelos ciclos da cana-de-açúcar e do ouro,
95 que a produção de queijos torna-se expressiva e rentável economicamente nas regiões de
96 Minas Gerais e no Sul do país, sendo estes fabricados de forma rudimentar e nas propriedades

97 dos produtores (LEANDRO, 1987; DIAS, 2010).

98 No século XIX, inicia-se uma acentuada temporada da fabricação de queijos e a
99 fundação de queijarias industriais, sendo a primeira delas localizada em 1888 na vila de
100 Mantiqueira, em Minas Gerais (DIAS, 2010). Contudo, a principal região produtora de
101 queijos neste período também situada em Minas Gerais, foi a região do Rio Grande, local de
102 onde os produtores transportavam mercadorias ao Rio de Janeiro (ALMEIDA;
103 FERNANDES, 2004).

104 A procedente chegada de imigrantes ao Brasil, durante os séculos XIX e XX,
105 possibilitou abundância, variedade e qualidade na fabricação de queijos no país,
106 principalmente em relação às regiões Sudeste e Sul. Após alguns séculos desde a vinda dos
107 rebanhos ao Brasil, percebe-se o notável crescimento na produção e comercialização de
108 queijos no país, bem como conquistas dedicadas aos produtores, especialmente a partir do ano
109 de 2002, fortalecida em 2012 (SERTÃO BRAS, 2017).

3.1.3 *Queijo Minas artesanal*

110 O QMA é possivelmente o mais antigo e tradicional queijo brasileiro, tendo início a
111 sua produção no século XIX (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994). No Estado de Minas
112 Gerais, foi introduzido pelos colonizadores Portugueses, procedentes da região da Serra da
113 Estrela, há alguns séculos, quando as primeiras fazendas de gado se constituíram, para dar
114 suporte à próspera exploração de ouro e diamante (EMATER, 2009). Atualmente, Minas
115 Gerais mantem a liderança nacional na produção de queijos, colaborando com um quarto da
116 produção total no país (ABRAS, 2019).

117 Através das condições ambientais como solo e clima de cada uma das regiões
118 produtoras de queijo artesanal no Estado, é possível individualizar e caracterizar os queijos,
119 com gosto, consistência, cheiro, microbiota e aparência próprias. Ao designar as
120 microrregiões queijeiras foram consideradas a vegetação predominante, altitude, temperatura
121 média anual e processo de produção (MENESES, 2006).

122 É um produto tradicionalmente encontrado na mesa cotidiana das famílias mineiras de
123 todas as classes sociais, seja nas grandes e pequenas cidades como na zona rural. Servido
124 puro, acompanhando um café ou em receitas como o tradicional pão de queijo, o queijo é
125 sinônimo de hospitalidade e socialização. Fazer e comer queijo são considerados a identidade
126 cultural do estado de Minas Gerais (IPHAN, 2008).

127 O Queijo Minas Artesanal, que já é destaque no estado de Minas Gerais e, no Brasil,
128 vem também adquirindo reconhecimento internacional, recebendo premiações no concurso
129 Mondial du Fromage de Tours, realizado em junho de 2017 na França. Os produtores das
130 microrregiões mineiras concorreram com 20 países e 700 tipos de queijo e conquistaram 11
131 medalhas, sendo um deles o prêmio Super Ouro para o queijo produzido em Araxá. O queijo
132 do Serro recentemente produzido por Túlio Madureira e nomeado “Queijo do Gir” foi
133 premiado com medalha de bronze (EMATER, 2017).

134 O reconhecimento desta produção de mais de três séculos, como patrimônio imaterial
135 do Estado de Minas Gerais e a legislação para estabelecer critérios de produção do QMA, têm
136 motivado pesquisas focadas na melhoria das condições das queijarias sem descaracterizar a
137 produção, oferecendo segurança aos consumidores, além de investimento para fomentar as
138 etapas do processo (MENESES, 2006; DORES; FERREIRA, 2012).

3.1.4 Produção queijeira na região do Serro

139 A edificação histórica da tradicional produção de queijo artesanal na região do Serro
140 se assemelha com a história da cidade que lhe dá o nome. Com o declínio processual do ciclo
141 do ouro, fez-se necessário investir e intensificar as atividades rentáveis em outros setores
142 econômicos, no qual, o setor agropecuário se destacou. Nessa perspectiva, o queijo foi o
143 produto de relevante fomento que garantiu sustentabilidade para a região. E, de forma
144 gradual, tornou-se emblema de representação cultural pelo sabor e modo de produção
145 característicos (EMATER, 2009).

146 Nas primeiras décadas de produção, todos os ingredientes utilizados para fabricação
147 do queijo artesanal do Serro eram obtidos nas propriedades rurais dos próprios produtores. O
148 único ingrediente proveniente dos centros urbanos era o sal. Ainda nos tempos atuais, grande
149 parte desta tradição continua sendo preservada, através dos ensinamentos repassados pelas
150 gerações familiares.

151 De acordo com o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), a região do Serro é
152 representada por onze municípios queijeiros: Alvorada de Minas, Conceição do Mato Dentro,
153 Dom Joaquim, Materlândia, Paulistas, Rio Vermelho, Sabinópolis, Santo Antônio do Itambé,
154 Serra Azul de Minas, Serro e Coluna.

155 Ao considerar os padrões culturais de fabricação, o queijo do Serro exhibe consistência
156 semidura, textura compacta, tom branco-amarelado, de paladar brando ao ligeiramente ácido.

157 Com forma cilíndrica pesando até 1 kg, altura de aproximadamente 5 cm (BARROSO;
158 GONÇALVES; BARBOSA, 2002). É caracterizado de forma individual, através de um
159 conjunto de fatores como a altitude, clima, umidade do ar, alimentação das vacas, que se
160 relacionam diretamente com a população microbiana presente no produto final.

161 Alguns produtores da região do Serro estão se aderindo ao novo fermento endógeno
162 denominado como “rala” ou “isca”. A troca do “pingo” pela “rala” por alguns produtores se
163 deu após a implementação da Lei Estadual nº 14.185/2002 e portaria nº 523 de 3 de julho de
164 2002 que regulamentou a produção artesanal do queijo do Serro (MINAS GERAIS, 2002a;
165 2002d). A lei solicita a utilização de instalações definidas pelo IMA. O Instituto define que o
166 material das bancadas deve ser: aço inoxidável, ardósia, fibra de vidro ou granito. Segundo os
167 produtores com a troca das bancadas de madeira, o “pingo” perdeu suas qualidades
168 microbiológicas, conseqüentemente alterando as características sensoriais do queijo,
169 principalmente a textura. Isto culminou na obtenção de queijos mais macios,
170 descaracterizando o queijo do Serro (IPHAN, 2008).

171 A “rala” é o fermento endógeno que vem resolvendo o problema da textura,
172 originando um queijo mais firme, o que é comprovado pelos menores valores de umidade
173 presente no produto. Este fermento é obtido a partir do queijo ralado, que é adicionado no
174 fundo do tanque de recepção do leite (IPHAN, 2008). No entanto, pouco se sabe sobre as
175 modificações microbiológicas ocorridas por essa modificação do processo de produção.

3.1.5 Legislação

176 A inocuidade dos alimentos é o termo utilizado como referência ao conjunto de
177 medidas que garantem que os alimentos não prejudiquem a saúde ou integridade física dos
178 consumidores. São ações preventivas que ocorrem através do controle de agentes patológicos.
179 O acometimento de doenças com origem alimentar provoca danos que são desagradáveis e
180 podem ser fatais ao homem, além de perdas econômicas para setores como o comércio
181 (FAO/OMS, 2006).

182 A produção do QMA demanda condições de manipulação elevadas, além de fazer uso
183 do leite cru. Isso permite que a complexa população microbiana do produto fique preservada,
184 mas o risco de contaminação torna-se exponencialmente maior. Por isso, atos normativos
185 específicos foram elaborados ao longo dos anos com a finalidade de regulamentar o processo
186 de fabricação e comercialização do queijo Minas.

187 A legislação de referência para os queijos produzidos no país era a portaria nº 146 de

188 07 de março de 1996, que regulamentava a qualidade dos produtos lácteos. Neste documento,
189 instituiu-se a obrigatoriedade da etapa de pasteurização ou procedimento térmico similar
190 como forma de tratamento do leite. Eram isentos de pasteurização os leites destinados a
191 queijos com tempo de maturação igual ou superior a 60 dias (BRASIL, 1996).

192 Contudo, os queijos artesanais produzidos em Minas Gerais além de serem fabricados
193 com leites que não passavam pela etapa de pasteurização, não permaneciam maturados por 60
194 dias (DORES, 2007). Assim, com o intuito preservar a qualidade do queijo artesanal no
195 Estado, o governo de Minas Gerais no ano de 2002, implementou a lei nº 14.185 de 31 de
196 janeiro. Ela aponta a forma de produção do queijo artesanal e caracteriza este como um
197 produto elaborado de acordo com a tradição e cultura da respectiva região no Estado.
198 Estabelece normas sobre parâmetros físico-químicos, microbiológicos, controle sanitário do
199 rebanho, instalações de queijarias, cadastramento, água para produção do queijo, rotulagem,
200 higiene, equipamentos, transporte, comercialização, infrações e penalidades (MINAS
201 GERAIS, 2002a).

202 Ainda em 2002, nas portarias nº 517 e 518 de 14 de junho, em parceria com o Estado,
203 o Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) – órgão destinado à execução de políticas
204 públicas, controle e certificação dos produtos agropecuários (IMA, 2002) – dispôs de
205 complementos à legislação, nos quais foram definidas regras higiênicas para rebanhos sadios
206 fornecedores de leite e prevenção a zoonoses, como a brucelose (MINAS GERAIS, 2002b).
207 Além disso, estabeleceram-se condições técnicas para a produção do QMA (MINAS
208 GERAIS, 2002c). E, em 3 de julho de 2002, a portaria nº 523 passa a ser vigente tratando
209 sobre as boas práticas de manipulação e técnicas higiênico-sanitárias (MINAS GERAIS,
210 2002d)

211 Na perspectiva de redefinir o tempo de maturação do queijo, que quando maturado no
212 período mínimo de 60 dias, tem a descaracterização do produto e danos econômicos, o Estado
213 estabeleceu a Instrução Normativa nº 15 de 15 de dezembro de 2011. E, dessa forma, passa a
214 ser concedida a possibilidade de fabricação do QMA com a maturação em um período inferior
215 a 60 dias, desde que haja relatos científicos que comprovem a redução de riscos para a saúde
216 dos consumidores e que não comprometa a qualidade e segurança do produto (BRASIL,
217 2011).

218 No ano de 2012, revogando a lei nº 14.185 de 2002, fica estabelecida a lei estadual nº
219 20.549 de 18 de dezembro, com a finalidade de contemplar toda a cadeia produtiva do queijo,
220 bem como ampliar a produção e propiciar métodos para a regularização fiscal e sanitária do

221 produtor (MINAS GERAIS, 2012).

222 Considerando as características específicas das microrregiões do Estado, definiram-se
223 diretrizes para o período mínimo de maturação através da Portaria nº 1305, de 30 de abril de
224 2013. O IMA categorizou 17 dias como período mínimo de maturação do QMA para a
225 microrregião do Serro e 22 dias para as microrregiões da Canastra, do Cerrado, de Araxá e do
226 Campo dos Vertentes.

227 Foi implementada em 14 de junho de 2018 a Lei nº 13.680 para dispor sobre o
228 processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma
229 artesanal. Anterior à publicação dessa lei, o QMA era comercializado entre Estados, desde
230 que apresentasse o selo do Serviço de Inspeção Federal (SIF), pertencente ao Ministério da
231 Agricultura. Entretanto, após a sanção legislativa em questão o SIF foi substituído pelo selo
232 Arte (de artesanato) (BRASIL, 2018).

233 O controle da qualidade dos inóculos utilizados como fermentos endógenos (pingo e
234 rala) no QMA, é outro aspecto relevante no sistema agroalimentar. Após amplo debate entre
235 produtores e políticos, foram estabelecidos na Lei Estadual 23.157 de 2018 regulamentos
236 técnicos sobre o pingo. O pingo (soro fermentado ou soro-fermento) é considerado pela Lei
237 como uma das matérias-primas necessárias para a elaboração do QMA (MINAS GERAIS
238 2018). Quanto a rala, nenhuma legislação faz referência da sua utilização para a fabricação
239 desse produto.

240 Em 18 de julho de 2019 houve a publicação da Lei nº 13.860 que condiz com uma
241 reivindicação antiga dos produtores. Nela, fica permitida a comercialização do QMA a nível
242 nacional, desde que, sejam cumpridas as exigências impostas por essa Lei. Para importação,
243 deverão ser atendidas, também, as normas estabelecidas pelo país importador (BRASIL,
244 2019).

245 A normativa mais recente tratando-se das regulamentações de produção e
246 comercialização do QMA corresponde à Portaria IMA nº 1.969, de 26 de março de 2020 que
247 revoga a Portaria IMA nº 1.305, de 30 de abril de 2013. O instituto agropecuário ao fazer o
248 uso de suas atribuições em editar normas sobre QMA definiu o período mínimo de maturação
249 do QMA de 14 dias para a microrregião de Araxá. Nas demais microrregiões não ocorreram
250 modificações quanto ao tempo de maturação (IMA, 2020). Além disso, considerando o
251 cenário pandêmico provocado pela disseminação do vírus Sars CoV-2, popularmente
252 conhecido como Covid-19, toda a cadeia produtiva do QMA deve seguir rigorosamente o
253 protocolo de segurança disponibilizado pelo Ministério da Saúde, assim como as diretrizes

254 estabelecidas no Regulamento Sanitário Internacional.

3.2 Probióticos

3.2.1 Histórico

255 A definição da palavra probiótico vem de origem grega e faz menção ao termo “pro-
256 bios” que significa para a vida (FOOKS; FULLER; GIBSON, 1999; OLIVEIRA et al., 2002).
257 Há relatos de que ao final do século XIX, na França, o pediatra Henry Tissier ao fazer análise
258 clínica, concluiu que crianças com bem-estar apresentavam grande quantidade de
259 bifidobactérias nas fezes, enquanto crianças com quadro clínico de diarreia exibiam ausência
260 desse gênero bacteriano (FAO/WHO, 2001).

261 Em 1907, Ilya Metchnikoff, verificou a longevidade de camponeses que apresentavam
262 hábito alimentar com grandes volumes de leite fermentado. A fermentação era concretizada
263 por bactérias produtoras de ácido lático presentes no leite e caracterizavam redução do índice
264 de câncer no intestino e proteção ao TGI (trato gastrointestinal).

265 Entretanto, foram os cientistas Lilly & Stillwel, que no ano de 1965 fizeram pela
266 primeira vez referência ao termo probiótico, para mencionar o efeito promotor de crescimento
267 que era exercido por determinados microrganismos. Anos depois, em 1974, Parker
268 determinou os probióticos como microrganismos ou elementos capazes de colaborar para o
269 equilíbrio intestinal (GOLDIN, 2011).

270 Atualmente, de forma global, eles são definidos como microrganismos vivos que,
271 quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro
272 (FAO/WHO, 2002; HILL et al., 2014). No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de
273 Vigilância Sanitária) estabeleceu critérios de acordo com a RDC nº241, de 27 de julho de
274 2018, para a seleção e uso probiótico em alimentos. A avaliação baseia-se em fatores como:
275 confirmação da linhagem do microrganismo, qualidade e efeito protetor. Essas
276 regulamentações para probióticos estão disponíveis no Guia para instrução processual de
277 petição de avaliação de probióticos pra uso em alimentos (ANVISA, 2019).

278 No mercado, a população microbiana comumente utilizada como probióticos é
279 diversa, incluindo bactérias como: *Lactobacillus acidophilus*, *L. sporogenes*, *L. plantarum*, *L.*
280 *rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. gasseri*, *L. crispatus*;
281 *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. brevis*, *B. lactis*, *B.*
282 *animalis*; *Leuconostoc mesenteroides*; *Enterococcus faecium*; e leveduras como:
283 *Saccharomyces cerevisiae* e *S.bourlardii* (AMARA; SHIBL, 2015).

284 Muitos produtos alimentares contendo microrganismos probióticos são categorizados
285 como alimentos funcionais com potencial terapêutico de prevenção a acometimentos
286 patológicos (TRIPATHI; GIRI, 2014). Isto porque, ao disputarem pela colonização intestinal,
287 induzem a propagação de microrganismos benéficos que potencializam os mecanismos de
288 defesa.

3.2.2 *Microbiota intestinal*

289 Por todo trato gastrointestinal é possível encontrar colonização microbiana. Do ponto
290 de vista anatômico, a porção entérica caracteriza-se por ser um complexo sistema do
291 organismo humano. É composto por intestino delgado (que se porcionam em duodeno, jejuno
292 e íleo) e intestino grosso. Conjugados, são responsáveis pela digestão, absorção e transporte
293 de nutrientes. Na região do cólon (intestino grosso), tem-se a incidência maior em quantidade
294 e diversidade de espécies microbianas. Isto ocorre, pois, nessa região há ausência de secreções
295 intestinais e profuso suprimento nutricional. No estômago e intestino delgado as condições
296 são desfavoráveis, pois apresentam ações do suco gástrico, sais biliares, secreções
297 pancreáticas e peristaltismo elevado (intestino delgado), além disso, essa região conta com o
298 trânsito alimentar acelerado, o que dificulta o processo de colonização (CORPO HUMANO,
299 2006).

300 Durante o período gestacional, o feto não possui microbiota no TGI. Posterior ao
301 nascimento, a microbiota começa a ser estabelecida e, ao longo dos anos atinge a maturidade
302 intestinal. Esse desenvolvimento é específico para cada indivíduo e influenciado por
303 condições como: a situação nutricional materna, tipo de parto, interação fisiológica,
304 alimentação, fatores ambientais externos, predisposição genética entre outras (VAARALA,
305 2003; ANDOH; FUJIYAMA, 2006; PENDERS et al., 2006; BEDANI; ROSSI, 2009; NEU,
306 2012).

307 Logo ao nascer, a colonização intestinal é determinada no recém-nascido por meio do
308 contato com a mucosa vaginal materna (NURIEL-OHAYON; NEUMAN; KOREN, 2016).
309 Contudo, pesquisas recentes especulam que o processo de lactação tem papel determinante no
310 transporte de microrganismos. Segundo a teoria, as bactérias seriam capazes de atravessar o
311 epitélio intestinal materno e migrarem para outras regiões, tais como as glândulas mamárias
312 (HARMSSEN et al., 2000; FUNKHOUSER; BORDENSTEIN, 2013; RODRIGUEZ, 2014).

313 Em indivíduos adultos saudáveis, a composição microbiana que coloniza a microbiota

314 intestinal, pode ser classificada em: autóctone (permanente) que se conserva fixo no
315 organismo. E, mesmo que o hospedeiro apresente desequilíbrio no TGI, esta microbiota, em
316 específico, consegue se recompor rapidamente; e alóctone (transitória) que se refere a
317 microrganismos de origem não-patogênica, capazes de conservar-se no organismo por tempo
318 determinado, como horas ou dias (TANNOCK, 1995; BRANDT; SAMPAIO; MIUKI, 2006).

319 Do ponto de vista funcional, é notável que a maioria dos probióticos não atuam no
320 TGI de forma permanente, contudo, estudos denotam que o tempo de ação é eficaz para que
321 ocorra a modulação intestinal (BEDANI; ROSSI, 2009).

322 Estima-se que haja uma variabilidade de mais de 500 espécies distintas de
323 microrganismos que possam colonizar o TGI. Grande parte destes são considerados
324 inofensivos ao hospedeiro e desempenham a importante função de defesa sobre a indesejável
325 presença de microrganismos patogênicos (ISOULARI; SALMINEM; OUWEHAND, 2004).
326 Mas, ainda assim, é inevitável o comparecimento esporádico de microrganismos que
327 provocam efeitos deletérios ao organismo. As espécies mais comuns são bactérias como
328 *Escherichia*, *Enterococcus faecalis*, *Bacteroidaceae* e outras (PARENTE; RICCIARD;
329 ADDARIO, 1994). Dessa forma, a indicação adequada para o uso de probióticos é
330 preconizada, com o intuito de reparar constantemente a microbiota intestinal, bem como
331 colaborar com os mecanismos de proteção ao organismo (PUUPPONEN-PIMIÃ et al., 2002;
332 WILLIAMS, 2010).

3.2.3 Mecanismos de ação e critérios para seleção de cepas probióticas

333 Diversos processos são descritos pela literatura a respeito do modo de ação dos
334 probióticos e, apesar de não estarem completamente delineados, sabe-se que podem agir de
335 forma individual ou conjunta. Os principais mecanismos envolvidos na promoção de saúde ao
336 TGI do hospedeiro são: modificações no metabolismo dos microrganismos, que ocorre
337 através da atividade enzimática; modulação da resposta imune, por meio da ampliação nos
338 níveis de anticorpos e da atividade de macrófagos; modulação da microbiota intestinal, pela
339 utilização de nutrientes e desenvolvimento de substâncias antimicrobianas (FULLER, 1989).

340 A microbiota de procedência láctica pode conferir benefícios a indivíduos com
341 resistência a lactose. Isto ocorre pela capacidade em degradar esse carboidrato, por meio da
342 atividade enzimática. Bactérias lácticas e algumas leveduras fabricam uma enzima denominada
343 b-D-galactosidase que facilita a desfragmentação das moléculas de lactose na mucosa

344 intestinal. Essa função é essencial para que o desconforto intestinal seja reduzido e a digestão
345 facilitada (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001).

346 Microrganismos probióticos são capazes de modular tanto a resposta imune específica
347 quanto a resposta imune não-específica, através do acionamento de macrófagos, citocinas,
348 produção elevada de imunoglobulinas, anticorpos e multiplicação de células T (OLIVEIRA et
349 al., 2002; PANCHENIAK, 2005). O mecanismo da microbiota probiótica sobre o sistema
350 imunológico ocorre sem que haja danos inflamatórios ao hospedeiro. Além disso, o consumo
351 simultâneo de um ou mais probióticos pode elevar a resposta imune. Entretanto, merece
352 ressalva, o fato de que nem todas as cepas probióticas possuem a mesma eficácia (KOPP-
353 HOOLIHAN, 2001; CALDER; KEW, 2002; VAN DE WATER, 2003).

354 O mecanismo de imunomodulação é consequência da relação dos receptores de
355 reconhecimento do hospedeiro (PRRs) com as moléculas preservadas da parede celular dos
356 microrganismos probióticos (MAMPs) (CROSS, 2002; OELSCHLAEGER, 2010). Ela
357 confere benefícios para o organismo humano ao prevenir possíveis desequilíbrios no TGI,
358 bem como quadros alérgicos e respiratórios. Para isso, é necessário que os probióticos
359 acionem o tecido linfóide - constituído pelas células intestinais e por placas de Peyer – que
360 por sua vez, promove a união dos linfócitos T e B com demais tecidos e produzem
361 imunoglobulinas (COPPOLA; TURNES, 2004).

362 A exclusão competitiva é um mecanismo que, por meio da disputa por sítios de
363 ligação, fabricação de substâncias antimicrobianas e competição por nutrientes na mucosa do
364 TGI, impossibilita a fixação de microrganismos patogênicos (KAUR; CHOPRA; SIANI,
365 2002; GUARNER; MALAGELADA, 2003; REDONDO, 2008).

366 O equilíbrio intestinal proporcionado pelas condições funcionais da imunomodulação
367 favorece o controle de alergias alimentares, doenças inflamatórias intestinais, correções de
368 quadros clínicos de diarreia e outros (ISOULARI; SALMINEN; OUWEHAND, 2004).

369 O uso de cepas probióticas para consumo humano deve seguir critérios de seleção.
370 Algumas abordagens podem ser usadas para avaliar a segurança de uma cepa, como: estudos
371 sobre as propriedades intrínsecas e a farmacocinética da cepa (relações dose-resposta e
372 recuperação fecal) e sobre as interações entre a cepa e o hospedeiro (SALMINEN et al.,
373 1998). Ainda, é de extrema necessidade que o microrganismo probiótico tenha caráter não-
374 patogênico, seja estável à ação dos sais biliares, tolerante à acidez gástrica, capaz de se aderir
375 e colonizar (mesmo que de forma temporária) a mucosa intestinal, produzir substâncias

376 antimicrobianas, e não transmitir genes de resistência a antibióticos (COLLINS,
377 THORNTON, SULLIVAN, 1998; LEE et al., 1999; SAARELA et al., 2000; STANTON et al.,
378 2003).

379 Mais recente, a ANVISA elaborou um guia dispendo de regulamentações sobre a
380 avaliação probiótica para uso alimentar. O objetivo deste guia consiste em orientar
381 interessados sobre as normas dispostas a respeito de ingestão de probióticos, além de indicar a
382 relevância das legislações que comprovem a segurança e qualidade dos microrganismos com
383 fins funcionais (ANVISA, 2019).

384 Ao adotar parâmetros para selecionar cepas probióticas, determinados atributos são
385 relevantes para garantir a eficácia, função tecnológica e biológica (SANDERS, 2008). Um
386 aspecto importante para ser considerado é a dosagem recomendada de ingestão. Os
387 probióticos devem ser consumidos a partir de produtos que contenham a mínima viabilidade
388 do microrganismo (TRIPATHI; GIRI, 2014). A dosagem terapêutica disponível no mercado da
389 levedura *S. boulardii*, foi aprovada pela ANVISA em 2016 e trata-se de preparações
390 farmacêuticas liofilizadas em cápsulas ou sachês com opções de 100 mg contendo $0,5 \times 10^9$
391 células de *S. boulardii* e 200 mg com $1,0 \times 10^9$ células de *S. boulardii*. De acordo com as
392 recomendações posológicas devem ser administradas duas cápsulas, duas vezes ao dia
393 (100mg) e duas cápsulas uma vez ao dia (200mg) nas alterações agudas da microbiota
394 intestinal e ingeridas uma cápsula, duas vezes ao dia (100mg) e uma cápsula uma vez ao dia
395 nas alterações crônicas da microbiota intestinal (FLORATIL, 2016).

3.2.4 Efeitos benéficos dos probióticos

396 As espécies microbianas com evidência por serem utilizadas para fins probióticos
397 configuram-se no grupo BAL, com destaque para os *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium*
398 spp. Os gêneros comumente disponíveis no mercado são formulados a base de *Lactobacillus*
399 *acidophilus*, *L. casei* e *L. rhamnosus*. Ainda, é possível encontrar produtos compostos com
400 cepas de *Enterococcus* e *Bacillus* (FERREIRA; TESHIMA, 2000).

401 As BAL favorecem a integridade da microbiota intestinal. Esse processo ocorre
402 através da fabricação de substâncias como o peróxido de hidrogênio e compostos
403 antimicrobianos (ácido lático e ácido acético). Em concomitância, essas substâncias
404 acidificam o pH do organismo humano e impedem a proliferação de microrganismos
405 patogênicos (MORAIS; JACOB, 2006). Estudos apontam que o consumo de probióticos a
406 base de linhagens isoladas do gênero *Bifidobacterium* sp., não conferem implicações

407 expressivas no TGI (AMAR et al., 2011; BOMHOF et al., 2014; STENMAN et al., 2014). A
408 ingestão de cepas de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. associadas sugerem resultados
409 considerados satisfatórios (ANDREASEN et al., 2010; EJTAHED et al., 2012).

410 As principais vantagens fornecidas ao organismo humano, através do consumo de
411 microrganismos probióticos são: digestão eficaz do carboidrato lactose para portadores de
412 intolerância; alívio entérico ao quadro clínico de constipação intestinal; restrição na
413 quantidade de colonização de patógenos no TGI, por meio da produção de compostos
414 antimicrobianos; modulação do sistema imune; reestabelecimento da microbiota intestinal
415 após terapia com antibióticos; equilíbrio da microbiota intestinal; capacidade elevada de
416 absorção e produção dos minerais e vitaminas, respectivamente (TUOHY et al., 2003).

417 Outros benefícios sugeridos pela literatura consistem na: prevenção para o risco de
418 câncer do cólon; minimização dos sintomas hipertensivos e da incidência de doenças
419 cardiovasculares; redução nos níveis de colesterol; inibição da progressão dos danos causados
420 pela bactéria patogênica *Helicobacter pylori* (KAUR; CHOPRA; SAINI, 2002; TUOHY et
421 al., 2003).

422 A diversidade de cepas de leveduras probióticas utilizadas para fins comerciais, ainda
423 é consideravelmente baixa. Nos últimos anos, entretanto, percebe-se o interesse de
424 pesquisadores em explorar os mecanismos e vantagens conferidos ao TGI, provenientes do
425 consumo de leveduras. Alguns dos benefícios de se trabalhar com esse grupo microbiano,
426 dão-se pela facilidade de eliminação após suspensão do tratamento, bem como possível
427 utilização concomitante ao uso de antibióticos (BLEHAUT et al., 1989; BODDY et al., 1991).

3.3 Leveduras

3.3.1 Leveduras como probióticos

428 No início do século XX, por volta de 1920, o pesquisador francês Henri Boulard, ao
429 procurar por leveduras termotolerantes que fossem viáveis para a fabricação de vinhos,
430 deparou-se com um gênero de levedura desconhecido. Um dos vilarejos pelo qual ele
431 trabalhava, havia sido afetado pela epidemia da cólera. Foi verificado então, que a
432 comunidade da vila estava consumindo chá com casca de lichia, para o combate dos quadros
433 de diarreias. O pesquisador ao analisar a casca da fruta tropical, percebeu que ela estava
434 envolvida por leveduras e que, na realidade, era este microrganismo o responsável pelo
435 controle da diarreia. Assim, o microrganismo foi nomeado de *S. boulardii* e é caracterizado
436 por ser uma levedura benéfica ao hospedeiro e resistente a temperaturas elevadas

437 (MCFARLAND; BERNASCONI, 1993).

438 A *S. boulardii* é uma das poucas linhagens de leveduras disponíveis no mercado
439 atualmente e, é considerada a mais prestigiada. É um microrganismo persistente à ação dos
440 sucos digestivos e de antibióticos. Consegue atingir o cólon em altas concentrações.
441 Entretanto, sua eficácia no organismo é ocasionada somente através do consumo cotidiano,
442 pois ela não coloniza o TGI (GAON et al., 2005). Em torno de 5 dias após a ingestão, não é
443 verificado a presença desse microrganismo mais nas fezes (MARTINS et al., 2005).

444 A comercialização de leveduras como probiótico teve início no ano de 1960, na
445 França, pelo “Laboratoires Biocodex”. Sua utilização para combate às desordens intestinais
446 está difundida por todos os continentes (MCFARLAND; BERNASCONI, 1993). No Brasil as
447 indústrias que disponibilizam esse probiótico, utilizam diferentes nomes comerciais tais
448 como: Floratil (Merck S. A.), Florent (Cifarma), Lactipan (Sigma Farma), Flomicin (Neo
449 Química), Repoflor (EMS Legrand), Florazin (Herald’s do Brasil Ltda) (SORIAK, 2007).

3.3.2 Leveduras em queijos

450 Nos queijos, as leveduras compõem parte fundamental da microbiota secundária desse
451 produto. São responsáveis por características específicas, como o flavor e a consistência
452 (EARLY, 1998). Além disso, os queijos apresentam condições que são fisiologicamente
453 favoráveis para a multiplicação desses microrganismos, como baixas temperaturas,
454 quantidade elevada de sal, concentrações reduzidas de pH e métodos de conservação
455 (JAKOBSEN; NERVHUS, 1996; LOUREIRO, 2000; BERESFORD et al., 2001).

456 As leveduras são capazes de fermentar a lactose, não exigem volume elevado de água
457 para se desenvolverem e produzem enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, que
458 colaboram para liberação de compostos percussores de aroma que irão compor as
459 características sensoriais do queijo (VILJOEN, 2001; LIMA et al., 2009).

460 As reações de lipólise e proteólise são os principais processos bioquímicos observados
461 na maturação do queijo. As reações proteolíticas conferem propriedades sensoriais únicas aos
462 queijos, atuando diretamente na textura, além da liberação de peptídeos. Já enzimas
463 lipolíticas, estão mais intimamente relacionadas com a liberação de compostos que irão
464 conferir sabor e aroma típicos aos queijos maturados (BERESFORD et al., 2001; GARDINI
465 et al., 2006).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos e condições de cultivo

466 Foram utilizadas 85 cepas de leveduras previamente isoladas dos fermentos endógenos
467 pingo e rala e pertencente a coleção de cultura do Laboratório de Biotecnologia da UFVJM. O
468 cultivo dos isolados foi realizado em meio de cultura complexo *Yeast Extract-Peptone-*
469 *Glucose* (YEPG), com formulação para caldo de 2% de glicose, 2% de peptona e 1% de
470 extrato de levedura. Para o preparo do meio de cultura sólido foram acrescentados 2% de
471 ágar. A incubação foi à 30° C por 24 horas. Os isolados foram estocados à -20° C em caldo
472 YEPG contendo 20% de glicerol para conservar a integralidade das linhagens.

473 As cepas patogênicas de *Salmonella* sp. CÓD-18, *Listeria monocytogenes* CÓD-09 e
474 *Escherichia coli* CÓD-17, foram cedidas pelo Laboratório de Higiene dos Alimentos do
475 Departamento de Nutrição e foram utilizadas nos testes de co-agregação com patógenos e
476 antagonismo contra patógenos. Essas bactérias foram reativadas em caldo enriquecido *Oxoid*,
477 *Roskilde, Dinamarca* (BHI). O crescimento ocorreu à temperatura de 35° C por 24 horas.

4.2 Identificação por MALDI-TOF

478 As identificações das leveduras ocorreram na Universidade Federal de Lavras
479 (UFLA), no Departamento de Microbiologia, por meio do reconhecimento das proteínas
480 ribossômicas, compatíveis com o banco de dados do equipamento de espectrometria de massa
481 (MALDI-TOF). Para a obtenção de proteínas ribossômicas das leveduras, foram necessárias
482 que elas fossem extraídas com ácido fórmico. Neste método, a extração foi realizada de
483 acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante do equipamento (Bruker Biotyper 2.2).
484 Porções de células cultivadas foram transferidas para tubos contendo 300 µl de água
485 deionizada, agitadas em vortex por 30 segundos e seguidas por adição de 900µl de etanol
486 puro. A suspensão foi novamente agitada em vortex por mais 30 segundos e então
487 centrifugadas por 2 minutos a 13000 rpm. Foram, então, adicionados 50µl de ácido fórmico
488 70%, 50µl de acetonitrila ao precipitado, e estes, agitados em vortex e centrifugados por 2
489 minutos a 13000 rpm. Os precipitados obtidos contendo as células lisadas foram inseridos nas
490 placas de 96 poços MALDI flex (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) contendo matriz
491 polimérica, aguardou-se completa evaporação do líquido e então as placas foram inseridas no
492 equipamento para análise. A cepa *Escherichia coli* K12 obtida da coleção de culturas
493 Portuguesa da Universidade do Minho (MUM, <http://www.micot.eca.deb.uminh.o.pt>) foi
494 usada para extração de proteínas, que foram então utilizadas como padrão para calibração

495 externa do MALDI-TOF MS. As análises foram realizadas no equipamento MALDI-TOF
496 microflex LT spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), usando o sistema
497 automático MALDI Biotyper 2.2. As análises foram realizadas em triplicata.

498 A etapa seguinte fundamentou-se na construção do dendrograma utilizando o *software*
499 Biotyperlog (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). O programa de informática agrupou as
500 linhagens de leveduras através da similaridade entre os isolados, baseado no padrão de
501 espectros obtidos e identificou com base nos espectros presentes no banco de dados.

4.3 Atividade Enzimática

4.3.1 Avaliação qualitativa da atividade lipolítica

502 Os isolados de leveduras obtidos foram submetidos ao teste de atividade de lipase e,
503 para isto, foi utilizada a metodologia modificada de Sperb et al. (2015). Inicialmente os
504 isolados armazenados foram reativados em caldo YEPG à 30°C por 24 horas. Para avaliação
505 qualitativa enzimática, alíquotas (0.00001 L) de suspensão microbiana foram inoculadas em
506 meio para analisar atividade lipolítica [1% (m/v) de peptona de caseína, 0.5% (m/v) NaCl,
507 0.01% (m/v) CaCl₂, 1% (m/v) de Tween-80, 1.5% (m/v) ágar]. As placas foram incubadas à
508 30°C por três dias. A avaliação qualitativa da atividade lipolítica foi realizada através da
509 observação da formação de halos ao redor das colônias. Os halos foram registrados (m) e o
510 índice de atividade enzimática (IE) foi calculado através da razão entre o diâmetro do halo de
511 atividade enzimática e o diâmetro da colônia após cultivo. O experimento foi realizado em
512 triplicata.

4.3.2 Avaliação qualitativa da atividade proteolítica

513 Para avaliação qualitativa da atividade de protease foi utilizada a metodologia
514 modificada de Oliveira et al. (2012). As leveduras foram reativadas conforme descrito acima e
515 inoculadas (0.00001 L) em ágar YEPG enriquecidos com 0.5% de leite em pó desnatado. As
516 placas foram incubadas a 30°C por 4 dias. Para leitura dos resultados, as placas foram
517 totalmente cobertas com HCl 1M e os diâmetros dos halos (m) foram registrados. O
518 experimento foi realizado em triplicata.

4.3.3 Teste de tolerância ao NaCl

519 O teste de tolerância ao NaCl foi realizado utilizando placas de Petri com meio YEPG
520 acrescentados com 0%, 6%, 9%, 12% e 15% de cloreto de sódio. As leveduras foram
521 reativadas conforme descrito acima e inoculadas (0.00001 L) em YEPG enriquecidos
522 acrescentados com 0%, 6%, 9%, 12% e 15% de cloreto de sódio a 30°C por 4 dias. Para
523 leitura dos resultados, as placas foram analisadas considerando o crescimento das colônias. O
524 experimento foi realizado em duplicata.

4.4 Avaliação probiótica in vitro

4.4.1 Tolerância a pH 2,0 à temperatura de 37°C

525 Os 85 isolados foram submetidos ao pH 2,0 sob temperatura de 37°C, conforme
526 Ramos et al. (2013). As células de leveduras foram plaqueadas em meio de cultura YEPG a
527 30°C por 72 h. Após, foi preparado caldo YEPG com pH ajustado para 2,0 usando HCl 1 N.
528 As leveduras foram inoculadas e incubadas por 3h a 37°C. Amostras (10 µL) foram
529 plaqueadas no tempo 0h e após 3h, em ágar YEPG. Os isolados que conseguiram se
530 desenvolver em pH 2,0 a 37°C após 72h foram selecionados para o teste seguinte.

4.4.2 Análise de tolerância a bile

531 A capacidade de tolerância a bile foi realizada de acordo com o método modificado de
532 Saini e Tomar (2017). Células de leveduras foram plaqueadas em meio de cultura YEPG a
533 30°C por 72 h. O caldo YEPG foi preparado com a adição de oxgall 0,3% (p/v). As leveduras
534 crescidas por 72h conforme descrito anteriormente foram então inoculadas no caldo com
535 oxgall e incubadas a 37°C por 150 min. A densidade óptica (DO) das amostras foram
536 avaliadas em espectrofotômetro a 600 nm no tempo inicial e final de incubação. Para
537 avaliação das leveduras tolerantes, foram selecionadas aquelas que apresentaram o valor de
538 DO superior, após o período de incubação, se comparados ao valor de DO prévio à etapa de
539 incubação. Isso mostra que as leveduras selecionadas conseguiram multiplicar-se perante a
540 presença dos sais biliares por 150 min, à temperatura similar do TGI.

4.4.3 Autoagregação

541 O teste de autoagregação foi realizado conforme descrito por Kos et al. (2003).
 542 Células de leveduras foram coletadas a partir de uma cultura de 24h de crescimento em caldo
 543 YEPG, lavadas duas vezes com tampão PBS e ressuspensas em mesmo tampão. Em seguida,
 544 a amostra foi avaliada no equipamento de espectrofotômetro com o ajuste do comprimento de
 545 ondas para $DO_{600nm} = 0,6$. As suspensões de células foram submetidas à agitação em vortex
 546 durante 10s e, subsequentemente, incubadas a $37^{\circ}C$ durante os tempos de 0h e 3h. A
 547 porcentagem de autoagregação foi determinada usando a equação:

$$\text{Autoagregação (\%)} = (1 - A_t/A_0) \times 100$$

548 Onde A_t representa a absorbância nos tempos $t = 3h$, e A_0 a absorbância no tempo $t =$
 549 $0h$. Resultados percentuais de autoagregação ($A_u\%$) $\leq 30\%$ foram considerados baixos, entre
 550 30% e 60% intermediários e $\geq 60\%$ altos. Foram selecionados para testes seguintes os
 551 isolados que apresentaram A_u acima de 30% .

4.4.4 Hidrofobicidade

552 A hidrofobicidade da superfície celular de cada cepa foi executada por meio da
 553 medição de adesão microbiana a hidrocarbonetos, de acordo com a metodologia citada por
 554 Binetti et al. (2013). Células coletadas a partir de uma cultura de 24h foram centrifugadas
 555 ($6000\text{ rpm}/10\text{min}$). A biomassa resultante foi lavada duas vezes com tampão PBS estéril,
 556 ressuspensa no mesmo tampão e avaliada no espectrofotômetro a DO_{600nm} . Em seguida, foi
 557 acrescentado 1mL de xileno para 3mL de suspensão com posterior agitação em vortex durante
 558 2 minutos. Com isso, as amostras foram incubadas durante 1h a $37^{\circ}C$ e as fases de água e
 559 xileno foram separadas durante este período. Ao término do processo, a fase aquosa foi
 560 extraída e a DO_{600nm} novamente avaliada. A hidrofobicidade da superfície celular ($H\%$) foi
 561 calculada com a fórmula:

$$\% H = [(DO_0 - DO) / DO_0] \times 100$$

562 Onde DO_0 e DO são as densidades ópticas antes e depois da extração com xileno,
 563 respectivamente. Resultados percentuais de hidrofobicidade ($H\%$) $< 90\%$ foram considerados
 564 baixos e $\geq 90\%$ altos. Foram selecionados os isolados que apresentaram $\%H \geq 90\%$.

4.4.5 Antibiograma

565 As cepas de leveduras foram testadas frente a diferentes antibióticos, conforme a
566 técnica adaptada de susceptibilidade a antimicrobianos descritos por Cebeci e Gürakan
567 (2003). As avaliações foram realizadas utilizando placas de Petri contendo Agar Mueller
568 Hinton (Himedia, Índia) inoculadas com cada cepa de levedura selecionada, previamente
569 crescidas por 24 h em caldo YEPG conforme já descrito. A inoculação da levedura foi
570 realizada por esfregação na superfície do meio de cultura, com o auxílio de swab. Em seguida,
571 discos de antibióticos com 6mm de diâmetro contendo antimicrobianos, foram distribuídos
572 sobre os meios de cultura e, após 72h a 37°C de incubação observou-se se houve a presença
573 de halos. Os antibióticos utilizados foram: Netilmicina 30mg (NET), Norfloxacino 10mg
574 (NOR), Sulfazotrim 25mg (SFT), Nitrofuratoína 300mg (NT), Cefazolina 30mg (CZ) e Ácido
575 Pipemídico 20mg (PP).

4.4.6 Co-agregação com patógenos

576 Para avaliar a co-agregação com patógenos, a metodologia utilizada foi de acordo com
577 descrito por Kos et al. (2003). As cepas de leveduras foram cultivadas em caldo YEPG por
578 24h a 30°C, enquanto os patógenos *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella*
579 *sp.* foram reativados em caldo BHI durante 24 h a 35°C. Suspensões de leveduras foram
580 preparadas conforme descrito no teste de autoagregação acima. Volumes iguais (2 mL) de
581 leveduras e suspensões de patógenos foram homogeneizados por agitação em vortex durante
582 10 segundos e incubados a 37 °C sem agitação 4 h. Os tubos controle continham 2 mL da
583 suspensão de cada amostra de levedura. A absorvância (DO_{600nm}) das misturas e controles
584 foram monitoradas após a incubação. A percentagem de co-agregação foi calculada de acordo
585 com a seguinte fórmula:

$$\text{Co-agregação \%} = [(Alab + Apat) - 2Amix / (Alab + Apat)] \times 100$$

586 Onde, Alab e Apat referem-se à DO_{600nm} da suspensão de células de leveduras e à
587 suspensão de células dos patógenos, respectivamente em tubos controle, e Amix representa a
588 absorvância da suspensão microbiana mista testada após 4 h.

4.4.7 Antagonismo contra patógenos

589 Para o teste de antagonismo foram empregadas três metodologias diferentes. A
590 primeira é conhecida como spot-on-the-lawn e foi executada com base na adaptação da
591 metodologia de Oliveira (2008). Em síntese, as cepas de leveduras foram plaqueadas em meio
592 de cultura sólido YEPG e incubadas por 48 horas a 30°C. As cepas das bactérias *Escherichia*
593 *coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella sp.* foram reativadas em meio de cultura líquido
594 BHI e diluídas em solução salina com base na escala Mc Farland, até que atingissem a
595 população de 10⁸. Em seguida, foi preparado o meio de cultura BHI semi-sólido e 1mL da
596 solução de células patógenas foram misturadas ao meio de cultura semi-sólido. Este meio de
597 cultura então, foi despejado na superfície das placas em que estavam as colônias de leveduras
598 e as amostras incubadas por 24h.

599 A segunda técnica denominada de difusão de poços e adaptada de Cintas e Miguel
600 (1995) foi realizada em meio de cultura sólido BHI. Com o auxílio de uma ponteira estéril,
601 foram feitos poços de aproximadamente 6mm no meio de cultura. A porção do meio de
602 cultura que permaneceu íntegra foi inoculada por esfregaço com células dos patógenos
603 fazendo uso de swab. Nos poços foram inseridos 20 µl de amostras de leveduras a serem
604 avaliadas. As placas foram incubadas por 72 h a 30°C. Para ambos os métodos foi esperado o
605 aparecimento de halo ao entorno das leveduras que apresentem atividade antagônica.

606 A terceira técnica empregada foi realizada de forma similar ao teste de antibiograma.
607 Meios de culturas contendo patógenos previamente crescidos foram inoculados por esfregaço
608 (com auxílio de *swabs*) sobre a superfície do meio de cultura Ágar Mueller Hinton. Em
609 seguida, discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro estéreis foram inoculados com 20 µl de
610 amostras de leveduras e dispostos sobre as placas contendo os patógenos. Foram consideradas
611 positivas, aquelas leveduras que apresentaram halo de inibição de crescimento do patógeno ao
612 redor do disco.

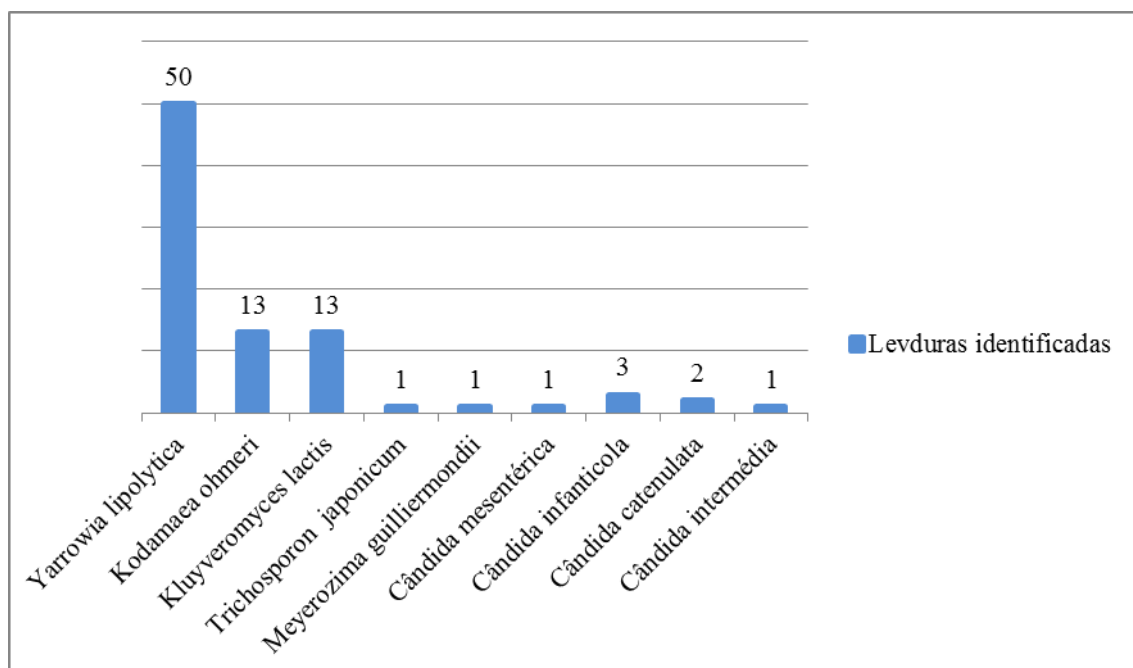
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificações das leveduras

613 Um total de 85 cepas de leveduras foram previamente isoladas de fermentos
614 endógenos naturais (pingo e rala) utilizados para produção de QMA de dois produtores
615 diferentes, e, identificadas através da técnica de MALDI-TOF. A identificação revelou a
616 presença de seis gêneros de leveduras e nove espécies (Figura 2).

617 Os resultados expressos pelo MALDI-TOF foram demonstrados em escores, no qual,
618 os valores variaram com a mínima de 2,09 para *Candida catenulata* e máxima de 2,40 para
619 *Kluyveromyces lactis*. De acordo com o protocolo da empresa fabricante, valores maiores que
620 1,99 conferem confiabilidade às identificações de espécies microbianas. Essas informações
621 reforçam a praticidade e segurança de uso do método MALDI-TOF para o reconhecimento de
622 leveduras, conforme também foi descrito nos trabalhos de Usbeck et al. (2014) e Amorin,
623 Schwan e Duarte (2016).

Figura 2- Número de cepas e leveduras identificadas através da técnica de MALDI TOF e amostras de fermentos endógenos do queijo Minas artesanal da região do Serro-MG.



624 Entre as espécies de leveduras encontradas, destacam-se a prevalência de *Yarrowia*
625 *lipolytica* com 50 isolados identificados, seguida pelas espécies *Kodamaea ohmeri* e

626 *Kluyveromyces lactis* com o total de 13 isolados de cada espécie. O estudo realizado por
627 Cardoso et al. (2015) com isolados de QMA da região do Serro, em todos períodos de
628 maturação e durante duas estações do ano, relata a presença de grandes quantidades de
629 isolados de *Kodamaes ohmeri*, assim como na presente pesquisa. De acordo com o trabalho
630 de Dias (2000) e Gardini (2006) foram identificadas em diversas amostras de leite e queijos
631 cepas de *Candida intermedia*. Outros isolados como, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia*
632 *membranifaciens* e *Saccharomyces cerevisiae* foram descritas por Lima et al. (2009) estavam
633 presentes em porções de leite, soro de leite, queijo e coalhada.

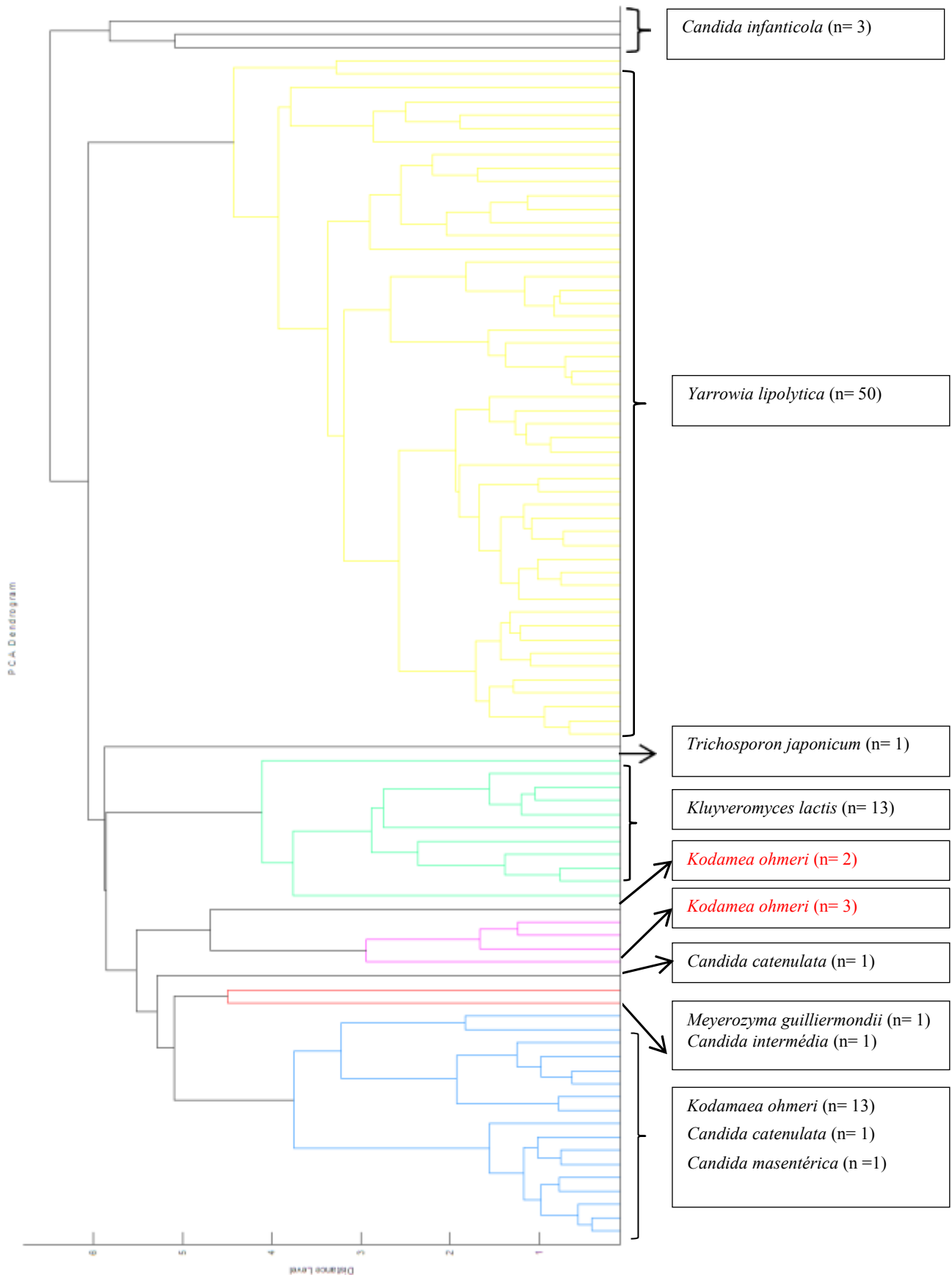
634 Conforme Borelli et al. (2006) cepas de *Kluyveromyces lactis* são de relevante
635 interesse comercial dos laticínios, por serem leveduras com capacidade de fermentar lactose.
636 Da mesma forma, segundo Freitas et al. (1999), as cepas de *Yarrowia lipolytica* detém a
637 importante capacidade de alterar as características organolépticas do queijo durante o
638 processo de maturação.

639 Os autores Martinez, Tesone e Quevedo (1986) descreveram que, a existência de
640 microrganismos como as leveduras em queijos se devem por fatores como: contaminação
641 durante a produção, manuseio de equipamentos e utensílios ao longo do processo, pela adição
642 de sal, através da técnica de maturação e provenientes do próprio leite utilizado na fabricação.
643 E, a distribuição dessa microbiota em amostras, pode ser influenciada por razões físico-
644 químicas, concentrações salinas e pH (BORELLI et al., 2006).

645 Após a identificação dos isolados, construiu-se um dendrograma para ilustrar a
646 semelhança entre as cepas, baseados nos espectros de perfis proteicos obtidos por MALDI-
647 TOF (Figura 3).

648 No início do estudo foram preparadas 90 amostras para o processo de identificação no
649 MALDI-TOF. Destas, cinco foram destacadas como bactérias, sendo quatro espécies de
650 *Pseudomonas azotoformans* e uma *Lactobacillus amylophilus*. No resultado dessas mesmas
651 amostras, a segunda possível probabilidade de identificação (> 90%) apontavam para
652 leveduras da espécie *Kodamaea ohmeri* (assinaladas em vermelho na Figura 3). E, apesar de
653 terem sido identificadas inicialmente como bactérias, apresentaram características
654 morfológicas de colônias e microscopia celular de leveduras. Por motivo de confiabilidade,
655 foi considerado inviável verificar o potencial tecnológico e probiótico dessas cinco amostras,
656 totalizando na pesquisa, a avaliação de 85 isolados. Em estudos futuros, será realizado o
657 sequenciamento de DNA para confirmar a identidade microbiana das cinco amostras exclusas.

Figura 3- Dendrograma das leveduras identificadas através de perfis proteicos.



658 Na Tabela 1, as espécies de leveduras que foram isoladas em cada fermento endógeno,
 659 divididas de acordo com os produtores de cada amostra. A rala apresentou maior variedade de
 660 isolados, bem como quantidade. Este resultado pode estar relacionado ao fato de que a rala se
 661 caracteriza por ser o queijo maturado e ralado de lotes anteriores. Assim, o complexo de
 662 leveduras que se estabelece nesse inoculo é superior ao pingo.

Tabela 1- Isolados de leveduras encontradas em cada tipo de fermento endógeno.

	Rala	Pingo
Produtor 1	<i>Yarrowia lipolytica</i> (47) <i>Kluyveromyces lactis</i> (2) <i>Trichosporon japonicum</i> (1) <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (1)	<i>Yarrowia lipolytica</i> (3) <i>Kluyveromyces lactis</i> (11) <i>Kodamaea ohmeri</i> (4) <i>Candida catenulata</i> (1)
Produtor 2	<i>Kodamaea ohmeri</i> (4) <i>Candida mesentérica</i> (1) <i>Candida catenulata</i> (1) <i>Candida intermédia</i> (1)	<i>Kodamaea ohmeri</i> (5) <i>Candida infanticola</i> (3)
Total	58	27

663 O estudo de Nóbrega et al. (2008) analisou a microbiota de leveduras presentes no
 664 pingo de QMA da região da Canastra e encontrou seis espécies diferentes, sendo elas
 665 *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspota*
 666 *delbruekii*, *Candida zeylanoides*, *Kodamaea ohmeri*. Enquanto no estudo de Borelli et al.
 667 (2006) realizado na Serra da Canastra, a quantidade de leveduras identificadas atingiu o
 668 número de 29 isolados. Esses resultados apontam que a integração das espécies de leveduras
 669 em produtos como o queijo é frequente, de forma a exercerem potencial favorável no que diz
 670 respeito às características sensoriais e enzimáticas (produção de enzimas proteolíticas e
 671 lipolíticas) do produto final (BORELLI et al., 2006).

672 Na literatura, atualmente, não há trabalhos científicos relacionados com a identificação
 673 e influência exercida por espécies de leveduras em ralas de queijos. Os dados apresentados
 674 nesse estudo são novos e demonstram serem relevantes, visto que, a quantidade de cultura
 675 microbiana encontrada na rala foi diversa.

676 A ausência de embasamento científico sobre a rala pode ser justificada, com o fato
 677 deste fermento endógeno não ser legalmente reconhecido pelo Estado, além disso, ser um
 678 inóculo opcionalmente incluso na produção de queijos exclusivamente da região do Serro e,
 679 até mesmo pela variabilidade de características organolépticas que esse composto pode
 680 apresentar. Foi possível também observar diferente composição microbiana entre os fermentos
 681 empregados nas duas propriedades, o que pode afetar as características organolépticas dos
 682 queijos obtidos pelos diferentes produtores.

5.2 Atividade enzimática

683 Foram avaliadas atividade lipolítica e proteolítica de 85 isolados de leveduras. Dessas,
 684 sete leveduras demonstraram atividade lipolítica e 22 proteolítica.

685 Em relação à atividade de lipase, seis isolados do fermento “rala”, sendo eles da
 686 espécie *Yarrowia lipolytica* e *Trichosporon japonicum* e um isolado do “pingo” da espécie
 687 *Yarrowia lipolytica* apresentaram atividade lipolítica que foram avaliadas a partir da formação
 688 de halos em volta das colônias e seus respectivos Índices de Atividades Enzimáticas (Fig. 4).

Figura 4- Isolados de leveduras do fermento “rala” e “pingo” que apresentaram atividade de lipase e os Índices de Atividade Enzimática (IE).



Levedura	IE
QI 1.3 – <i>Yarrowia lipolytica</i>	1,71
QI 2.6 – <i>Yarrowia lipolytica</i>	1,20
QI 5.2 – <i>Yarrowia lipolytica</i>	1,18
QI 9.1 – <i>Yarrowia lipolytica</i>	1,20
QI 10 – <i>Trichosporon japonicum</i>	1,66
QI 11 – <i>Yarrowia lipolytica</i>	1,46
QS 3.2 – <i>Yarrowia lipolytica</i>	1,40

O código QI significa fermento endógeno “rala” e QS fermento endógeno “pingo”.

689 As leveduras apresentaram crescimento com um diâmetro variando de 0.01 a 0.015 m
 690 e os halos variaram de 0.012 a 0.024 m. Após realizar o cálculo da razão entre o diâmetro do
 691 halo de atividade enzimática e o diâmetro da colônia, obtivemos resultados entre 1.18 e 1.71
 692 para atividade lipolítica (Figura 4). Segundo Gonçalves (2007), quando o resultado do cálculo
 693 do IE for igual ou superior a 1.0, o microrganismo é considerado promissor para produção da
 694 enzima.

695 Houve maior número de isolados de leveduras do fermento “rala” promissores para a
 696 produção da enzima lipolítica, além de apresentarem maiores IE em comparação com os
 697 isolados do “pingo”. A enzima lipase é responsável por hidrolisar triglicerídeos em ácidos
 698 graxos e glicerídeos parciais sendo importante na formação do aroma, porém não afeta a
 699 textura do queijo (BERESFORD et al., 2001).

700 Ao avaliar a atividade proteolítica das leveduras observou-se que 18 isolados
 701 (31.08%) do fermento “rala” pertencentes à espécie de *Yarrowia lipolytica* e 4 isolados
 702 (17.39%) do “pingo” pertencentes às espécies de *Kodamaea ohmeri* e *Kluyveromyces lactis*
 703 apresentaram resultados positivos após 3 dias de incubação. A porcentagem de isolados de
 704 cada espécie que obtiveram resultado positivo estão apresentados na Figura 5.

Figura 5 - Porcentagem de isolados de leveduras de cada espécie que apresentou atividade proteolítica



Levedura	Isolados com atividade proteolítica*
QI – <i>Yarrowia lipolytica</i>	04,55 % (01)
QI – <i>Yarrowia lipolytica</i>	13,64% (03)
QI – <i>Yarrowia lipolytica</i>	04,55 % (01)
QI – <i>Yarrowia lipolytica</i>	27,27% (06)
QI – <i>Yarrowia lipolytica</i>	09,09 % (02)
QI – <i>Yarrowia lipolytica</i>	18,18% (04)
QI – <i>Yarrowia lipolytica</i>	04,55 % (01)
QS – <i>Kodamaea ohmeri</i>	09,09 % (02)
QS – <i>Kluyveromyces lactis</i>	04,55% (01)
QS – <i>Kluyveromyces lactis</i>	04,55 % (01)

O código QI significa fermento “rala” e QS fermento “pingo”.

*Números entre parênteses representa quantidade de isolados positivos.

705 A produção da enzima protease é de grande importância para a produção de queijos.
706 Estas enzimas possuem capacidade de hidrolisar as proteínas do leite, liberando peptídeos e
707 exopeptidases, que são essenciais para a formação de aroma e textura característicos dos
708 queijos (BERESFORD et al., 2001; GARDINI et al., 2006).

5.2.1 Teste tolerância ao NaCl

709 O teste de tolerância ao NaCl foi realizado em 48 leveduras (42 “rala” e 6 “pingo”).
710 Ao analisar os resultados, observou-se que em concentrações de NaCl de 6%, 9% e 12% das
711 48 leveduras apresentaram bom crescimento 90% (39 “rala” e 4 “pingo”), 92% (41 “rala” e 3
712 “pingo”) e 42% (22 “rala” e 0 “pingo”) respectivamente. Já 73% das leveduras toleraram a
713 concentração de 15% (32 “rala” e 3 “pingo”) de NaCl, apresentando um pequeno crescimento.

714 O processo de salga dos queijos é realizado com vários intuitos, dentre eles, sabor,
715 textura, prolonga a vida útil do produto realizando o controle microbiano, regular a atuação
716 enzimática controlando a etapa de maturação. A salga ajuda a controlar o crescimento
717 microbiano, selecionando a microbiota presente no queijo, devido alguns microrganismos não
718 serem tolerantes a concentrações mais elevadas de NaCl. Já relacionado à maturação, ou seja,
719 a atividade enzimática, a etapa de salga controla sua ação, visto que, lipases e proteases são
720 mais ativas em concentrações de 0.5 a 2.5% de NaCl na umidade, caso sejam submetidas a
721 concentrações maiores poderá retardar a maturação (PAULA et al., 2009).

5.3 Caracterização probiótica das leveduras

5.3.1 Tolerância às condições do trato gastrointestinal

722 De acordo com a capacidade de suporte ao pH ácido (2,0), que é prevalente na porção
723 gástrica do TGI (estômago) e sob a temperatura de 37°C, 85 cepas de leveduras foram
724 avaliadas. Todos os isolados testados responderam de forma positiva a esta condição. Assim,
725 foram eleitas para os próximos ensaios: *Yarrowia lipolytica* (50), *Kodamaea ohmeri* (13),
726 *Kluyveromyces lactis* (13), *Trichosporon japonicum* (1), *Meyerozyma guilliermondii* (1),
727 *Candida mesentérica* (1), *Candida infanticola* (3), *Candida catenulata* (2) e *Candida*
728 *intermédia* (1). A resistência às condições de acidez já era prevista, uma vez que os isolados
729 estudados nesta pesquisa foram extraídos de um produto que, naturalmente, possui baixo pH e
730 que sofre ação da produção de ácido lático.

731 Além da acidez gástrica, fez-se relevante avaliar a tolerância aos sais presentes na bile,

732 isto porque, são compostos com atividade antimicrobiana liberadas no intestino delgado após
733 o consumo alimentar. Os probióticos conseguem atingir o cólon de forma íntegra somente se
734 suportarem ação dos sais biliares. Neste estudo, das 85 cepas expostas ao teste, 16 não foram
735 resistentes, sendo elas 15 de amostras de rala e uma de amostra de pingo, ambas do produtor
736 1 e representadas pelas espécies de *Yarrowia lipolytica* e *Kluyveromyces lactis*. As demais
737 foram selecionadas para continuarem nas avaliações, pois apresentaram a contagem de células
738 viáveis após o período de incubação com exposição à bile desidratada.

739 O trabalho de Bove et al. (2013) analisou o tempo de colonização de microrganismos
740 no TGI e revelou que o índice de sobrevivência pode alterar-se em decorrência de condições tais
741 como cepa microbiana, a presença de alimento, bem como a capacidade de tolerância às
742 circunstâncias físico-químicas impostas pelo TGI.

5.3.2 Habilidade de autoagregação e hidrofobicidade

743 Um total de 69 isolados tolerantes as condições de baixo pH e bile foram avaliados
744 quanto a habilidade de autoagregação. Destes, 55 cepas foram selecionadas para o teste de
745 hidrofobicidade, conforme resultados exibidos nas tabelas 2 e 3. De acordo com os trabalhos
746 de Kechagia et al. (2013) e García-Cayuela et al. (2014), essas técnicas avaliam a minuciosa
747 habilidade dos microrganismos probióticos de se fixarem a células da mucosa intestinal.

748 A seleção dos microrganismos no ensaio de autoagregação ocorreu através da triagem
749 percentual, descartando as cepas com capacidade de autoagregação abaixo de 30%. No teste,
750 os valores oscilaram entre 16,5% a 88,5%. A menor porcentagem ocorreu para o isolado
751 *Kodamaea ohmeri* QS 2.2 e a maior porcentagem foi conferida ao isolado *Candida catenulata*
752 QS 1.2 (Tabela 5).

753 Dessa forma, um total de 14 isolados, sendo onze do pingo e três da rala, pertencentes
754 às espécies *Candida infanticola* (2), *Kluyveromyces lactis* (6), *Yarrowia lipolytica* (5) e
755 *Kodamaea ohmeri* (1) em amostras dos dois produtores, foram eliminadas.

756 Foram então selecionadas para teste de hidrofobicidade cepas pertencentes as
757 espécie *Yarrowia lipolytica* (32), *Kluyveromyces lactis* (4), *Kodamaea ohmeri* (12), *Candida*
758 *infanticola* (1), *Candida intermedia* (1), *Candida mesentérica* (1) *Candida catenulata* (2),
759 *Trichosporon japonicum* (1), *Meyerozyma guilliermondii* (1).

Tabela 2 - Porcentagem, em ordem crescente, de autoagregação obtida para as leveduras isoladas dos diferentes fermentos endógenos.

Cepas de leveduras	Autoagregação (%)	Cepas de leveduras	Autoagregação (%)
<i>K. ohmeri</i> – QS 2.2	16,5	<i>K. ohmeri</i> – QS 2.5	48,4
<i>Y. lipolytica</i> – QI 9.1	18,5	<i>Y. lipolytica</i> – QI 12	48,5
<i>Y. lipolytica</i> – QI 9.8	20,3	<i>Y. lipolytica</i> – QI 3.9	49,8
<i>K. lactis</i> – QS 4.3	23,6	<i>K. ohmeri</i> – QS 2.4	50,0
<i>C. infanticola</i> – 2QS 5.4	24,4	<i>Y. lipolytica</i> – QI 5.2	53,7
<i>Y. lipolytica</i> – QI 9.3	24,6	<i>Y. lipolytica</i> – QI 4.4	54,5
<i>K. lactis</i> – QS 3.10	24,9	<i>K. ohmeri</i> – 3QI 2.2	55,4
<i>Y. lipolytica</i> – QS 5.2	25,2	<i>Y. lipolytica</i> – QI 5.1	56,2
<i>C. infanticola</i> – 2QS 5.3	26,6	<i>Y. lipolytica</i> – QI 3.5	57,1
<i>K. lactis</i> – QS 3.5	27,3	<i>K. ohmeri</i> – 2QS 10.8	58,1
<i>K. lactis</i> – QS 6.2	27,6	<i>Y. lipolytica</i> – QI 9.6	58,6
<i>K. lactis</i> – QS 4.1	28,1	<i>Y. lipolytica</i> – QI 3.8	58,9
<i>K. lactis</i> – QS 3.9	29,3	<i>Y. lipolytica</i> – QI 1.3	59,6
<i>Y. lipolytica</i> – QS 3.1	29,5	<i>Y. lipolytica</i> – QI 1.2	60,6
<i>K. lactis</i> – QS 3.7	31,1	<i>Y. lipolytica</i> – QI 9.7	61,8
<i>Y. lipolytica</i> – QI 1.1	31,5	<i>Y. lipolytica</i> – QI 6.4	63,3
<i>Y. lipolytica</i> – QI 6.5	31,5	<i>K. ohmeri</i> – 3QS 5.6	63,9
<i>Y. lipolytica</i> – QI 7.3	31,5	<i>Y. lipolytica</i> – QI 3.6	64,3
<i>T. japonicum</i> – QI 10	32,4	<i>Y. lipolytica</i> – QI 3.7	65,7
<i>M. guilliermondii</i> – QI 8.1	35,0	<i>K. ohmeri</i> – 3QI 5.1	67,2
<i>K. lactis</i> – QS 6.1	35,1	<i>Y. lipolytica</i> – QI 9.4	67,2
<i>Y. lipolytica</i> – QI 4.2	35,8	<i>K. ohmeri</i> – QS 2.1	67,6
<i>Y. lipolytica</i> – QI 7.4	36,9	<i>C. intermédia</i> – 2QI 1.4	69,1
<i>K. lactis</i> – QS 3.4	37,1	<i>K. ohmeri</i> – 2QS 7.2	69,4
<i>Y. lipolytica</i> – QI 7.1	37,8	<i>C. catenulata</i> – 2QI 0.5	70,2
<i>Y. lipolytica</i> – QI 2.10	39,1	<i>Y. lipolytica</i> – QI 9.9	71,3
<i>K. lactis</i> – QI 8.2	40,0	<i>K. ohmeri</i> – 2QS 3.6	71,9
<i>C. infanticola</i> – 2QS 5.1	40,0	<i>Y. lipolytica</i> – QS 2.3	72,2
<i>Y. lipolytica</i> – QI 6.2	40,4	<i>Y. lipolytica</i> – QI 3.1	72,3

<i>Y. lipolytica</i> – QI 11	42,6	<i>K. ohmeri</i> – 2QI 10.6	72,3
<i>Y. lipolytica</i> – QI 2.1	44,4	<i>K. ohmeri</i> – 2QI 2.2	73,7
<i>C. mesentérica</i> – 3QI 5.6	46,2	<i>Y. lipolytica</i> – QI 6.6	76,7
<i>Y. lipolytica</i> – QS 3.2	46,3	<i>Y. lipolytica</i> – QI 6.1	77,0
<i>Y. lipolytica</i> – QI 4.1	46,5	<i>C. catenulata</i> – QS 1.2	88,5
<i>K. ohmeri</i> – 2QS 4.2	47,3		

Códigos de leveduras com iniciais QS são referentes aos isolados de pingo, enquanto iniciais QI remetem aos isolados da rala.

760 Quanto ao teste de hidrofobicidade, a exclusão ocorreu para amostras com resultados
761 percentuais abaixo de 90%. A variabilidade de valores estabeleceu-se entre 35,3% para a
762 espécie de *Trichosporon japonicum* QI 10 e 96,1% para *Yarrowia lipolytica* QI 3.5 (Tabela
763 6).

764 Sobre as outras espécies de leveduras inclusas nesse ensaio, 43 cepas não foram
765 aprovadas. Dessas, houve 31 isolados de pingo e 12 da rala, constituídos pelas espécies de
766 *Yarrowia lipolytica* (23), *Kodamaea ohmeri* (9), *Candida catenulata* (1), *Kluyveromyces*
767 *lactis* (4), *Candida mesentérica* (1), *Candida intermédia* (1), *Meyerozyma guilliermondii* (1),
768 *Trichosporon japonicum* (1) e *Candida infanticola* (1) em amostras de ambos os produtores.

769 Ademais, um total de 12 cepas, constituídas pelas espécies de *Yarrowia lipolytica* (8) e
770 *Kodamaea ohmeri* (4) foram definidas a atuarem nos testes finais propostos nesse estudo,
771 sendo eles: antibiograma, co-agregação com patógenos e antagonismo contra patógenos.

Tabela 3 - Porcentagem, em ordem crescente, de hidrofobicidade obtida para as cepas dos diferentes fermentos endógenos.

Cepas de leveduras	Hidrofobicidade (%)	Cepas de leveduras	Hidrofobicidade (%)
<i>T. japonicum</i> – QI 10	35,3	<i>Y. lipolytica</i> – QI 7.4	80,4
<i>K. lactis</i> – QI 8.2	41,8	<i>Y. lipolytica</i> – QI 6.6	80,8
<i>C. catenulata</i> – QS 1.2	42,0	<i>Y. lipolytica</i> – QI 7.1	81,0
<i>M. guilliermondii</i> – QI 8.1	43,6	<i>K. ohmeri</i> – 2QS 3.6	81,3
<i>C. intermédia</i> – 2QI 1.4	44,7	<i>K. ohmeri</i> – 2QI 2.2	81,7
<i>K. lactis</i> – QS 3.7	45,5	<i>K. ohmeri</i> – QS 2.1	82,7
<i>Y. lipolytica</i> – QI 11	48,9	<i>Y. lipolytica</i> – QI 1.1	83,7
<i>Y. lipolytica</i> – QI 3.1	55,4	<i>K. ohmeri</i> – 3QI 5.1	84,4
<i>K. lactis</i> – QS 3.4	60,1	<i>C. catenulata</i> – 2QI 0.5	84,6
<i>Y. lipolytica</i> – QI 4.2	66,3	<i>Y. lipolytica</i> – QI 7.3	85,1
<i>Y. lipolytica</i> – QI 3.6	66,3	<i>Y. lipolytica</i> – QI 2.1	87,2
<i>Y. lipolytica</i> – QI 3.9	66,6	<i>Y. lipolytica</i> – QI 5.2	87,3
<i>Y. lipolytica</i> – QI 5.1	67,3	<i>Y. lipolytica</i> – QS 2.3	89,0
<i>C. infanticola</i> – 2QS 5.1	68,1	<i>K. ohmeri</i> – 2QI 10.6	89,3
<i>Y. lipolytica</i> – QI 4.4	70,9	<i>Y. lipolytica</i> – QI 3.8	89,8
<i>K. lactis</i> – QS 6.1	71,6	<i>K. ohmeri</i> – QS 2.5	90,6
<i>Y. lipolytica</i> – QI 6.1	72,5	<i>K. ohmeri</i> – 2QS 10.8	90,6
<i>Y. lipolytica</i> – QI 2.10	73,5	<i>Y. lipolytica</i> – QI 1.2	91,9
<i>K. ohmeri</i> – QS 2.4	74,0	<i>Y. lipolytica</i> – QI 6.5	93,1
<i>Y. lipolytica</i> – QI 4.1	74,1	<i>Y. lipolytica</i> – QI 9.7	93,2
<i>Y. lipolytica</i> – QS 3.2	76,8	<i>K. ohmeri</i> – 2QS 4.2	93,3
<i>K. ohmeri</i> – 2QS 7.2	76,9	<i>Y. lipolytica</i> – QI 9.4	93,4
<i>Y. lipolytica</i> – QI 9.9	77,5	<i>Y. lipolytica</i> – QI 6.4	93,4
<i>K. ohmeri</i> – 3QS 5.6	79,6	<i>Y. lipolytica</i> – QI 6.2	93,7
<i>C. mesentérica</i> – 3QI 5.6	79,6	<i>Y. lipolytica</i> – QI 3.7	93,7
<i>Y. lipolytica</i> – QI 12	79,9	<i>Y. lipolytica</i> – QI 1.3	94,7
<i>Y. lipolytica</i> – QI 9.6	80,2	<i>Y. lipolytica</i> – QI 3.5	96,1
<i>K. ohmeri</i> – 3QI 2.2	80,2		

Códigos de leveduras com iniciais QS são referentes aos isolados de pingo, enquanto iniciais QI remetem aos isolados da rala.

5.3.3 Antibiograma

772 Para o teste de antibiograma, exame capaz de avaliar o perfil de sensibilidade e
773 resistência de bactérias e fungos frente aos antibióticos foi utilizada a técnica de disco-
774 difusão. Este é o método mais empregado para a avaliação da sensibilidade e/ou resistência à
775 antimicrobianos. O trabalho realizado por Nijs et al. (2003) aponta vantagens em utilizá-lo,
776 como: a variabilidade de antibióticos que podem ser avaliados, ser um método
777 financeiramente econômico, consistir em um procedimento fácil de ser executado, além de
778 permitir que vários microrganismos sejam aferidos ao mesmo tempo.

779 Na tabela 7 é possível interpretar os resultados obtidos no teste de antibiograma, em
780 que, um total de 6 espécies de leveduras demonstraram ser sensíveis a todos antimicrobianos,
781 sendo elas *Kodamaea ohmeri* QI, 2.5, *Yarrowia lipolytica* QI 9.7, *Yarrowia lipolytica* QI 3.5,
782 *Yarrowia lipolytica* QI 9.4, *Yarrowia lipolytica* QI 1.3 e *Yarrowia lipolytica* QI 6.2. Duas
783 cepas (*Yarrowia lipolytica* QI 6.5 e *Yarrowia lipolytica* QI 6.4) foram sensíveis apenas a
784 alguns antibióticos avaliados (Tabela 4). Por fim, quatro cepas (*Kodamaea ohmeri* 2QS 4.2,
785 *Kodamaea ohmeri* 2QS 10.8, *Yarrowia lipolytica* QI 3.7 e *Yarrowia lipolytica* QI 1.2) foram
786 resistentes a todos antibióticos testados.

787 Quanto aos mecanismos de ação dos antibióticos utilizados, de acordo com dados da
788 Anvisa (2007), os antimicrobianos netilmicina e nitrofurantoina atuam como bactericidas
789 através da ligação ribossômica, inibição da síntese proteica e adesão a superfície celular. O
790 norfloxacino e o ácido pipemídico, por sua vez, inibem a síntese de DNA bacteriano, já o
791 sulfazotrim bloqueia o metabolismo do ácido fólico e a cefazolina impede a síntese da parede
792 celular microbiana. Esses antimicrobianos foram eleitos para o experimento, por possuírem
793 alvos de ação distintos no organismo. Dessa forma, foi possível avaliar as possíveis
794 interações desses microrganismos com as leveduras do estudo.

795 Embora não fosse esperado a sensibilidade de algumas cepas de leveduras aos
796 antibióticos foi importante avaliar as reação das diferentes cepas perante o contato com os
797 antimicrobianos. Mas, ainda assim estudos mais profundos precisam ser realizados para que
798 seja possível elucidar melhor essas interações.

799 O diâmetro dos halos de sensibilidade antimicrobiana para leveduras, não são
800 referenciados pela literatura. Embasamentos científicos demonstram valores padrões para as
801 espécies de bactérias

Tabela 4- Diâmetro (em milímetros) dos halos obtidos pelas cepas de leveduras sensíveis aos antibióticos.

Cepas de leveduras	NET (30mg)	NOR (10mg)	SFT (25mg)	NT (300mg)	CZ (30mg)	PP (20mg)
<i>K. ohmeri</i> - QS 2.5	25 (S)	29 (S)	24 (S)	21 (S)	21 (S)	10 (S)
<i>Y. lipolytica</i> – QI 6.5	28 (S)	29 (S)	26 (S)	- (R)	- (R)	16 (S)
<i>K. ohmeri</i> – 2QS 4.2	- (R)	- (R)	- (R)	- (R)	- (R)	- (R)
<i>Y. lipolytica</i> – QI 9.7	19 (S)	18 (S)	17 (S)	17 (S)	27 (S)	9 (S)
<i>K. ohmeri</i> – 2QS 10.8	- (R)	- (R)	- (R)	- (R)	- (R)	- (R)
<i>Y. lipolytica</i> – QI 3.5	24 (S)	28 (S)	26 (S)	18 (S)	20 (S)	10 (S)
<i>Y. lipolytica</i> – QI 3.7	- (R)	- (R)	- (R)	- (R)	- (R)	- (R)
<i>Y. lipolytica</i> – QI 1.2	- (R)	- (R)	- (R)	- (R)	- (R)	- (R)
<i>Y. lipolytica</i> – QI 9.4	28 (S)	26 (S)	25 (S)	18 (S)	27 (S)	11 (S)
<i>Y. lipolytica</i> – QI 6.4	- (R)	- (R)	- (R)	- (R)	- (R)	16 (S)
<i>Y. lipolytica</i> – QI 1.3	27 (S)	26 (S)	24 (S)	24 (S)	28 (S)	9 (S)
<i>Y. lipolytica</i> – QI 6.2	27 (S)	27 (S)	17 (S)	24 (S)	21 (S)	16 (S)

NET – Netilmicina; NOR – Norfloxacin; SFT – Sulfazotrin; NT – Nitrofurantoina; CZ – Cefazolina; PP:

Ácido pipemídico. (R): Isolados resistentes aos antibióticos e (S): Isolados sensíveis aos antibióticos. -: sem presença de halo.

5.3.4 Co-agregação e antagonismo com patógenos

802 A co-agregação de isolados das leveduras com bactérias patogênicas das espécies
803 *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* foi avaliada para os 12 isolados
804 previamente selecionados. Esse ensaio é um método alternativo em que se pretende avaliar a
805 capacidade dos microrganismos probióticos em impedir, por meio de mecanismos de ação, a
806 fixação de patógenos na microbiota intestinal.

807 Com relação ao estudo, de forma global, as leveduras obtiveram comportamentos
808 positivos frente às interações com os patógenos (Tabela 8). Os isolados de *Yarrowia lipolytica*
809 QI 9.4 e *Yarrowia lipolytica* QI 1.3, destacaram-se por apresentarem (>85%) de capacidade
810 em co-agregar com todos patógenos avaliados nesse trabalho. As únicas cepas que não
811 apresentaram capacidade de co-agregação com o patógeno bacteriano *Salmonella* sp. foram os
812 isolados *Kodamaea ohmeri* QS 2.5 e *Kodamaea ohmeri* 2QS 10.8.

813 Segundo o estudo de Boris et al. (1998), resultados como estes provocam um fator de
814 impacto positivo, visto que, a possibilidade de leveduras co-agregarem com patógenos

815 favorecem sua inibição e reduzem a prevalência no TGI.

Tabela 5- Resultados obtidos no ensaio de co-agregação com patógenos para as cepas obtidas dos diferentes fermentos endógenos.

Cepas de leveduras	<i>Salmonella</i> sp. (%)	<i>Listeria</i> (%)	<i>monocytogeneses</i>	<i>Escherichia coli</i> (%)
<i>K. ohmeri</i> - QS 2.5	-		+	+
<i>Y. lipolytica</i> - QI 6.5	+		++	++
<i>K. ohmeri</i> - 2QS 4.2	+		+	+
<i>Y. lipolytica</i> - QI 9.7	++		+	++
<i>K. ohmeri</i> - 2QS 10.8	-		+	+
<i>Y. lipolytica</i> - QI 3.5	+		+	++
<i>Y. lipolytica</i> - QI 3.7	+		+	+
<i>Y. lipolytica</i> - QI 1.2	+		+	+
<i>Y. lipolytica</i> - QI 9.4	++		++	++
<i>Y. lipolytica</i> - QI 6.4	++		+	+
<i>Y. lipolytica</i> - QI 1.3	++		++	++
<i>Y. lipolytica</i> - QI 6.2	++		+	++

Códigos de leveduras com iniciais QS são referentes aos isolados de pingo, enquanto iniciais QI remetem aos isolados da rala. -: índice de co-agregação abaixo de 30%; +: índice entre 30 e 60%; ++: valores percentuais acima de 60%

816 Nenhuma levedura apresentou atividade antagônica contra os patógenos *Salmonella*
 817 sp., *Listeria monocytogeneses* e *Escherichia coli* avaliados no presente estudo. Embora não
 818 haja atividade antagônica demonstrada pelos três métodos avaliados in vitro, as leveduras
 819 apresentaram capacidade de co-agregação com estes patógenos, o que auxilia também no
 820 controle destes microrganismos.

6 CONCLUSÃO

821 A princípio, 85 cepas de leveduras foram identificadas, sendo 58 obtidas da rala e 27
822 do pingo, de dois produtores distintos. Foram identificadas as espécies *Yarrowia lipolytica*,
823 *Kodamaea ohmeri*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida infanticola*, *Candida mesentérica*,
824 *Candida catenulata*, *Candida intermédia*, *Trichosporon japonicum* e *Meyerozyma*
825 *guilliermondii*. O fermento endógeno rala demonstrou maior variabilidade de espécies de
826 leveduras e também maior número de isolados (58) quando comparado com o pingo (27). Nos
827 experimentos realizados para avaliar a atividade enzimática, pode-se perceber que as
828 leveduras das espécies de *Yarrowia lipolytica* e *Trichosporon japonicum* apresentaram maior
829 atividade lipolítica, enquanto as espécies de *Yarrowia lipolytica*, *Kodamea ohmeri* e
830 *Kluyveromyces lactis* apresentaram atividade proteolítica, importante propriedade tecnológica,
831 que podem interferir nas características organolépticas do queijo.

832 Os ensaios de tolerância às condições do TGI, autoagregação, hidrofobicidade, co-
833 agregação com patógenos e resistência a antibióticos sugerem que algumas cepas das espécies
834 de *Yarrowia lipolytica* (QI 9.4 e QI 1.3) e *Kodamaea ohmeri* (2QS 10.8 e 2QS 4.2) podem
835 desempenhar funções probióticas. Dentre as quatro cepas com melhores desempenhos
836 probióticos, somente um isolado de *Y. lipolytica* (QI 1.3) apresentou atividade enzimática.
837 Isso pode ocorrer, porque as cepas apresentam características individuais mesmo sendo da
838 mesma espécie e, para o desenvolvimento de culturas iniciadoras com propriedades
839 tecnológicas e probióticas desejáveis, a mistura dos isolados pode ser indicado. Mas, ainda
840 assim, estudos são necessários para elucidar o comportamento destas cepas em queijos.

841 Embora haja relatos sobre a presença e identificação de leveduras em QMA e pingo,
842 não há relatos sobre isso para o fermento endógeno rala. Assim como há poucos dados sobre
843 avaliação probiótica de leveduras destes fermentos obtidos de QMA do Serro-MG. Os
844 resultados obtidos agregam conhecimentos que auxiliam na caracterização funcional e
845 microbiológica do QMA, bem como sugerem o uso de cepas de leveduras que podem ter
846 potencial probiótico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 847 ABRAS. Associação Brasileira de Supermercados. Com 25% da produção nacional, MG
848 aposta no queijo como saída para crise e geração de renda. Disponível em
849 <<https://www.abras.com.br/clipping.php?area=1&clipping=67836>> Acessado em: 20/05/2019.
- 850 ALMEIDA, E. F. L. de.; FERNANDES, M. R. Caracterização da microrregião da Canastra
851 como produtora de queijo Minas artesanal. São Roque de Minas: **EMATER-MG**, p.20, 2004.
- 852 AMAR, J. et al. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the
853 early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. **EMBO Mol**
854 **Med**, v. 3, n. 9, p. 559-572, set. 2011.
- 855 AMARA, A. A.; SHIBL, A. Role of Probiotics in health improvement, infection control and
856 disease treatment and management. **Saudi pharmaceutical journal**, v. 23, n. 2, p. 107-114,
857 2015.
- 858 AMORIN, J. C.; SHCWAN, R. F.; DUARTE, W. F. Sugar cane spirit (cachaça): effects of
859 mixed inoculum of yeasts on the sensory and chemical characteristics. **Food Research**
860 **International**, Lavras, v. 85, p. 76-83, abr. 2016.
- 861 ANDOH, A.; FUJIYAMA, Y. Therapeutic approaches targeting intestinal microflora in
862 inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol**, vol.12, n.28, p.4452-4460, 2006.
- 863 ANDREASEN, A. S. et al. Effects of *Lactobacillus acidophilus* NCFM on insulin sensitivity
864 and the systemic inflammatory response in human subjects. **Br J Nutr**, v. 104, n. 12, p. 1831-
865 1838, dez. 2010.
- 866
- 867 ANVISA. Antimicrobianos – Bases teóricas e uso clínico. Disponível em:
868 <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/lactamicos2.htm> Acessado em: 2007.
- 869
- 870 ANVISA. Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em
871 alimentos. Disponível em:
872 <http://portal.anvisa.gov.br/documents/3845226/0/Guia+Probioticos_Portal.pdf/e1bbf33e-719e-4f3e-84a0-7846bbe17972> Acessado em: 27/03/2019.
- 873
- 874 BARROSO, M. C.; GONÇALVES, E. A.; BARBOSA, M. A. Caracterização da Região do
875 Serro como produtora de queijo Minas artesanal (Dossiê), 2002.
- 876
- 876 BEDANI, R.; ROSSI, E. A. Microbiota intestinal e probióticos: Implicações sobre o câncer de
877 cólon. **Journal Português de Gastreenterologia**, v.16, n.1, 2009.

- 878 BERESFORD, T. P. et al. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy**
879 **Journal**, v.19, p.259-274, 2001.
- 880 BERGER, W. et al. Elaboración de queijo fundido – Una Guía Joha. Ed. BK Giulini Chemie.
881 Landerburg 1993 – Copyright 1997.
- 882 BINETTI, A. et al. Yeasts from autochthonal cheese starters: technological and functional
883 properties. **J Appl Microbiol**, v.115, p. 434– 444, 2013.
- 884 BLÉHAUT, H. et al. Disposition kinetics of *Saccharomyces boulardii* in man and rat.
885 **Biopharm. Drug. Disp.**, v. 10, p. 353-364, 1989.
- 886 BODDY, A.V. et al. Influence of antibiotics on the recovery and kinetics of *Saccharomyces*
887 *boulardii* in rats. **Pharm. Res.**, v. 8, p. 796- 800, 1991.
- 888 BOMHOF, M. R. et al. Combined effects of oligofructose and *Bifidobacterium animalis* on
889 gut microbiota and glycemia in obese rats. **Obesity (Silver Spring)**, v. 22, n. 3, p. 763-771,
890 mar. 2014.
- 891 BORELLI, B. M. et al. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the
892 region of Serra da Canastra, Brazil. **World Journal Microbiol Biotechnol**, Belo Horizonte, v.
893 22, p. 1115-1119, fev. 2006.
- 894 BORIS, S. et al. Adherence of human vaginal Lactobacilli to vaginal epithelial cells and
895 interaction with uropathogens. **Infection and Immunity**, v. 8, n. 66, p. 1985-1989, 1998.
- 896 BOVE, P. et. al. Lactobacillus plantarum passage through an oro-gastro-intestinal tract
897 simulator: Carrier matrix effect and transcriptional analysis of genes associated to stress and
898 probiosis. **Microbiological Research**, p.351e359, 2013.
- 899 BRANDT, K.; SAMPAIO, M.; MIUKI, C. Importance of the intestinal microflora. **Pediatrics**,
900 v.28, n.2, p. 117-127, 2006.
- 901 BRASIL. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de
902 Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 mar.
903 1996.
- 904 BRASIL. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de
905 Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou
906 de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 de julho de 2002.
- 907 BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº57, de
908 15 de dezembro de 2011. Considera a necessidade de estabelecer critérios adicionais para

- 909 elaboração de queijos artesanais. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 15 dez., 2011.
- 910 BRASIL. Lei nº 14 de junho de 2018 a Lei nº 13.680. Dispõe sobre o processo de fiscalização
911 de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. **Diário Oficial da**
912 **União**, Brasília, DF, 14 jun., 2018.
- 913 BRASIL. Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019. Dispõe sobre a elaboração e a
914 comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. **Diário Oficial da União**,
915 Brasília, DF, 19 jul.2019.
- 916 CALDER, P. C.; KEW, S. The immune system: a target for functional foods? **Br. J. Nutr.**,
917 Wallingford, v.88, p.S165-S176, 2002.
- 918 CARDOSO, V. M. et al. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of
919 a traditional Brazilian cheese. **Food Research International**, Diamantina, v. 69, p. 331–340,
920 dez. 2015.
- 921 CEBECI, A., CÜRAKAN, C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum*
922 strains. **Food Microbiology**, v.20, p.511-518, 2003.
- 923 CHEN, P. et al. Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and
924 α -glucosidase inhibitory activity. **Food Control**, v. 35, p. 65-72, 2014.
- 925 CINTAS, I.; MIGUEL, L.1995. Caracterización bioquímica y genética parcial de la pediocina
926 L50, una nueva bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* L50 aislado de embutidos
927 crudos curados. 1995. Tese de Doutorado. Universidade Autônoma de Madri. Spain, 1995.
- 928 COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for
929 human applications. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.8, p.487-490, 1998.
- 930 COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta immune. **Ciência Rural**, v.34, n.4,
931 p.1297-1303, 2004.
- 932 CORPO HUMANO. www.corpohumano.hpg.ig.com.br. Acessado em: 15/01/2020.
- 933 CROSS, M. L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli
934 and their role in protection against microbial pathogens. **Immunology and Medical**
935 **Microbiology**, n. 34, p. 245-253, 2002.
- 936 CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: yeast as probiotics -
937 *Saccharomyces boulardii*. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v.26, n.767-778, 2007.
- 938 DIAS, J. C. 500 anos de Leite no Brasil. Barleus, 148p, 2006.

- 939 DIAS, J. C. Uma longa e deliciosa viagem: o primeiro livro da história do queijo no Brasil.
940 São Paulo: Berleus, 161p . 2010.
- 941 DORES, M. T. das. Queijo minas artesanal da Canastra maturado à temperatura ambiente e
942 sob refrigeração. 2007. 107 p. Dissertação (M.S. em Ciência e Tecnologia de Alimentos) –
943 Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- 944 DORES, M. T; FERREIRA, C. L. L. F. Queijo Minas Artesanal, tradição centenária: ameaças
945 e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)**. v.2, n.2., p.26-34,
946 Dezembro, 2012.
- 947 EARLY, R. Tecnologia de los productos lácteos. **Aspen Published**, Inc, 1998.
- 948 EJTAHED, H. S. et al. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic
949 patients. **Nutrition**, v. 28, n. 5, p. 539-543, maio 2012.
- 950 EMATER-MG. Caracterização da região do Serro como produtora de queijo minas artesanal.
951 (Dossiê), 2009.
- 952 EMATER-MG. **Queijo Mineiro é premiado na França**. Jornal Estado de Minas, Minas
953 Gerais, 14 de junho de 2017. Disponível em: <<https://www.em.com.br/app/noticia/econo>
- 954 EMATER-MG. Seminário de queijos artesanais de minas discute os avanços na legislação e
955 tecnologias para o setor. Disponível em:
956 http://www.emater.mg.gov.br/portal.do?flagweb=novosite_pagina_interna&id=23933
957 Acessado em: 25/07/2019.
- 958 FAO. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Comissão do código alimentarius. **Codex**
959 **alimentarius**. Higiene dos alimentos: textos básicos. Brasília: Organização Pan-Americana da
960 Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, p. 64, 2006.
- 961 FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder Milk
962 with live lactic acid bacteria. 2001.
963
- 964 FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint working group report on
965 drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, 2002.
- 966 FERREIRA, C. L. L.; TESHIMA, E. Prebióticos, estratégia dietética para a manutenção da
967 microbiota colônica desejável. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v.16,
968 set./out. p. 22-25, 2000.
- 969 FLORATIL. www.floratil.com.br/bula. Acessado em: 17/09/2020.

- 970 FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut
971 microbiology. **International Dairy journal**. v.9, p.53-61, 1999.
- 972 FOX, P. F. et al. Cheese: Historical Aspects. Fundamentals of Cheese Science. Gaithersburg,
973 Maryland. Aspen Publication, v.1, p.1. 2000.
- 974 FREITAS, A. C. et al. Role of dominant microflora of Picante cheese on proteolysis and
975 lipolysis. **Int. Dairy J.**, v.9, p.593-603, 1999.
- 976 FULLER, R. Probiotics in man and animals. **The Journal of Applied Bacteriology**, v.66, n.5,
977 p.365-378, 1989.
- 978 FUNKHOUSER, L. J.; BORDENSTEIN, S. R. Mom knows best: the universality of maternal
979 microbial transmission. **PLoS Biol**, v.11, n.8, p. e 100-163, 2013.
- 980 FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P de. Tecnologia de Queijos – Manual técnico
981 para produção industrial de queijos. 1. ed. São Paulo-SP: Editora Dipemar Ltda., 1994.
- 982 GAON, D. et al. Effects of *Lactobacillus* strains and *Saccharomyces boulardii* in persistent
983 diarrhea in children. **Medicina**, v. 63, p. 293-298, 2003.
- 984 GARCÍA-CAYUELA, T. et.al. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains
985 showing an aggregation phenotype. **Food Res Int**, c.57, p. 44–50, 2014.
- 986 GARDINI, F. et al. Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese
987 cheese. **Food Microbiology**, Lisboa, v. 23, p. 641–648, Feb. 2006.
- 988 GOLDIN, B. R. Probiotics and Health: From History to Future. In: KNEIFEL, W.,
989 SALMINEN, S. **Probiotics and Health Claims**. Ames: Wiley-Blackwell, 1 ed., p. 1 -16,
990 2011.
- 991 GONÇALVES, Flavia Augusta Guilherme. Produção de lipase extracelular por leveduras em
992 cultivo submerso. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestre em Ciência de Alimentos,
993 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- 994 GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, London,
995 v.360, p.512-518, 2003.
- 996 HARMSSEN, H. J. *et al.* Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed
997 infants by using molecular identification and deletion methods. **J Pediatric Gastroenterol**
998 **Nutr**, v.30, n.1, p. 61-67, 2000.
- 999 HILL. et al. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus
1000 statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews**

- 1001 **Gastroenterology e Hepatology**, v.11, p. 506-514, 2014.
- 1002 IMA - INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria nº 517, de 14 de junho de
1003 2002. Estabelece normas de defesa sanitárias para rebanho fornecedores de leite para a
1004 produção de queijo Minas artesanal. Belo Horizonte: **Secretaria de Estado de Agricultura,**
1005 **Pecuária e Abastecimento**, 14 jun. 2002.
- 1006 IMA- INSTITUTO MINEIRO DE AGROPECUÁRIA. Portaria nº 1985, de 10 de junho de
1007 2020. Identifica a região da Mantiqueira como produtora do Queijo Artesanal Mantiqueira de
1008 Minas. Belo Horizonte: **Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento**,
1009 16 jun. 2020.
- 1010 IPHAN- DEPARTAMENTO DE PATRIMONIO IMATERIAL. **Modo Artesanal de Fazer**
1011 **Queijo de Minas**. Brasília, 2008.
- 1012 ISOULARI, E.; SALMINEM, S.; OUWEHAND, A. C. Probiotics. **Best Practice & Res.**
1013 v.18, p.299-313, 2004.
- 1014 JAKOBSEN, M.; NARVHUS, J.; Yeasts and their possible beneficial and negative effects on
1015 the quality of dairy products. **International Dairy Journal**. v.6, p.755-768, 1996.
- 1016 KAUR, I. P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **Eur.**
1017 **J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v.15, p.1-9, 2002.
- 1018 KECHAGIA, M. et.al. Health benefits of probiotics: a review. **ISRN Nutr**, p.651–657, 2013.
- 1019 KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **J. Am.**
1020 **Diet. Assoc.**, Chicago, v.101, p.229-241, 2001.
- 1021 KOSS, B. et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus*
1022 M92. **J. Appl. Microbiol.**, c.94, p.981-987, 2003.
- 1023 LEANDRO, J. J. Queijos: origens, tipos, fabricação, conservação e usos. São Paulo:
1024 **Summus**, 151 p. 1987.
- 1025 LEE, Y.K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. *Handbook of probiotics*. New
1026 York: Wiley, 1999. 211p.
- 1027 LIMA, C. D. L. C. et al. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-
1028 minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de**
1029 **Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n.1, p. 266-272, nov. 2009.
- 1030 LOUREIRO, V. Spoilage yeasts in foods and beverages: characterisation and ecology for

- 1031 improved diagnosis and control. **Food Research International**. v.33, p.247-256, 2000.
- 1032 LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **Int. Dairy J.**,
1033 Amsterdam, v.11, p.1-17, 2001.
- 1034 MARTINEZ, E. B.; TESONE, S.; QUEVEDO, F. Survey of the microbiological quality of
1035 adult bovine rennet extracts. **Journal of Food Protection**, v. 49, p. 507-509, 1986.
- 1036 MARTINS, F. S. et.al. Utilização de leveduras como probióticos. **Rev. Biol. Ciências Terra**.
1037 v.5, p.1519-1530, 2005.
- 1038 MASUI, K.; YAMADA, T. Queijos franceses. Rio de Janeiro: **Ediouro**, 1999.
- 1039 MCFARLAND, L.V.; BERNASCONI, P. *Saccharomyces boulardii*: A review of an innovative
1040 biotherapeutic agent. **Microbial Ecology in Health and Diseases**, v. 6, p. 157- 171, 1993.
- 1041 MENESES, J. N. C. Queijo Artesanal de Minas: patrimônio cultural do Brasil. vol. 1
1042 Ministério da Cultura, Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (Dossiê
1043 interpretativo), 2006.
- 1044 MINAS GERAIS. Lei estadual nº 14.185. Dispõe sobre o processo de produção do Queijo
1045 Minas Artesanal e dá outras providências. **Secretaria de Agricultura, Pecuária e**
1046 **Abastecimento de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 31 de janeiro de 2002. 2002a.
- 1047 MINAS GERAIS. Portaria nº 517. Estabelece normas de defesa sanitária para rebanhos
1048 fornecedores de leite para a produção do Queijo Minas Artesanal. **Secretaria de Agricultura,**
1049 **Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 14 de junho de 2002. 2002b.
- 1050 MINAS GERAIS. Portaria nº 518. Dispõe sobre requisitos básicos das instalações, materiais e
1051 equipamentos para a fabricação do Queijo Minas Artesanal. **Secretaria de Agricultura,**
1052 **Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 14 de junho de 2002. 2002c.
- 1053 MINAS GERAIS. Portaria nº 523. Dispõe sobre as condições higiênico-sanitárias e boas
1054 práticas na manipulação e fabricação do Queijo Minas Artesanal. **Secretaria de Agricultura,**
1055 **Pecuária e Abastecimento de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 03 de julho de 2002. 2002d.
- 1056 MINAS GERAIS. Lei nº 20549, de 18 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a produção e a
1057 comercialização dos queijos Artesanais de Minas Gerais. **Diário do Executivo**, 2012.
- 1058 MINAS GERAIS. Lei nº 23.157, de 18 de dezembro de 2018. Dispõe sobre a produção e a
1059 comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. **Diário do Executivo**, 2018.
- 1060 MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática
1061 pediátrica. **J. Pediatr.**, v. 82, n. 5, p. 189-197, nov. 2006.

- 1062 NEU, J. Gastroenterology and nutrition: neonatology questions and controversies.
1063 Philadelphia,. **Elsevier Saunders**, 316 p , 2012.
- 1064 NIJS, A. et al. Comparison and evaluation of osiris and sirsca 2000 antimicrobial
1065 susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory. **Journal of Clinical Microbiol.**
1066 v. 41, p. 3627–3630, 2003.
- 1067 NÓBREGA, J. E. et al. Variações na microbiota leveduriforme do fermento endógeno
1068 utilizado na produção do Queijo Canastra. **Revista Instituto Laticínio “Cândido Tostes”**,
1069 Viçosa, v. 63, n. 364, p. 14-18, set./out. 2008.
- 1070 NUERIEL-OHAYON,M.; NEUMAN, H.; KOREN, O. Microbial Changes during Pregnancy,
1071 Birth, and Infancy. **Front Microbiol**, v.7, n., p.1031, 2016.
- 1072 OELSCHLAAGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions – a review. **International Journal**
1073 **of Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 300, p. 57 - 62, 2010.
- 1074 OLIVEIRA, M. N. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos.
1075 **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002.
- 1076 OLIVEIRA, R. B. P. Produção e purificação parcial de substâncias semelhantes a
1077 bacteriocinas com atividade contra *Listeria monocytogenes*, in vitro e em salsichas. 2008.
1078 91p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade
1079 Federal de Minas, Belo Horizonte, 2008.
- 1080 OLIVEIRA, A. C. S. et al. **Comparação entre três bioprocessos para a produção de**
1081 **enzimas proteolíticas utilizando resíduos agroindustriais**. Revista Brasileira de Tecnologia
1082 Agroindustrial, Curitiba, v. 6, n. 2, p.822-831, 2012.
1083
- 1084 OLIVEIRA, S. P. P. et al. Características físico-químicas de queijo Minas artesanal do Serro
1085 fabricados com pingo e com rala. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 73,
1086 n. 4, p. 235-244, out/dez, 2018.
- 1087 OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial
1088 effects. **Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications**. p.279-289, 2002.
- 1089 PANCHENIAK, E. F. R. Isolamento, seleção, caracterização bioquímica e molecular para
1090 produção e avaliação do potencial probiótico de *lactobacillus reuteri* LPB P01-001 em suínos.
1091 2005. 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná,
1092 Curitiba, 2005.
- 1093 PARENTE, E.; RICCIARD, A.; ADDARIO, G. Influence of pH on growth and bacteriocin

- 1094 production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. **Appl.**
1095 **Microbiol. Biotechnol.**, Washington, v. 41, n. 4, p. 388-394,1994.
- 1096 PAULA, J. C. J.; CARVALHO, A. F.; FURTADO, M. M. Princípios básicos de fabricação de
1097 queijo: do histórico à salga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n.
1098 367, p. 19-25, 2009.
- 1099 PENDERS, J. et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early
1100 infancy. **Pediatrics**; n.118, p.511-21, 2006.
- 1101 PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Revista**
1102 **Química Nova**. v. 27, nº 2, mar./abr. 2004.
- 1103 PUUPPONEN-PIMIÃ, R. et al. Development of funcional ingredientes for gut health. **Trends**
1104 **Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.13, p.3-11, 2002.
- 1105 RAMOS, C. L. et al. Strain specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*,
1106 *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. **Food**
1107 **Microbiol.** v.36, p.22–29, 2013.
- 1108 REDONDO, N. C. Avaliação *in vitro* de características probióticas do *Enterococcus faecium*
1109 CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus* SSP jugurti 416. Dissertação (Mestrado em Alimentos
1110 e Nutrição)- Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2008.
- 1111 RODRIGUEZ, J. M. The origino of human milk bacteria: is there a bacterial enterro-
1112 mammary pathway during late pregnancy and lactation? **Adv Nutri**, v.5, n.6, p.779-784,
1113 2014.
- 1114 SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências**
1115 **Farmacêuticas**. v.42, n.1, São Paulo Janeiro/Março, 2006.
- 1116 SAARELA, M. et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **J.**
1117 **Biotech.**, Amsterdam, v.84, p.197-215, 2000.
- 1118 SAINI, K.; TOMAR, S. K. In vitro evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus* cultures
1119 of human origin capable of selenium bioaccumulation. **LWT**, v. 84, p. 497-504, 2017.
- 1120 SALMINEN, S. et al. Demonstration of safety of probiotics - a review. **International**
1121 **Journal of Food Microbiology**, v. 44, n. 1-2, p. 93-106, 1998.
- 1122 SANDERS, M. E. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. **Clinical Infectious**
1123 **Diseases**, v. 46, n. 2, p. 58-61, 2008.
- 1124 SERTÃO BRAS. História dos queijos artesanais no Brasil. 2017. Disponível em:

- 1125 <[https://www.sertaobras.org.br/2017/08/31/um-pouco-da-historia-da-producao-e-da-cura-de-](https://www.sertaobras.org.br/2017/08/31/um-pouco-da-historia-da-producao-e-da-cura-de-queijos-artesanais-no-brasil/)
1126 [queijos-artesanais-no-brasil/](https://www.sertaobras.org.br/2017/08/31/um-pouco-da-historia-da-producao-e-da-cura-de-queijos-artesanais-no-brasil/)> Acessado em: 31/08/2017.
- 1127 SORIAK (Ed.). P.R. Vade-Mécum – Vade-mécum de medicamentos. 12. ed. São Paulo, 2006-
1128 2007. 1 CD-ROM.
- 1129 SPERB, J. G. C. et al. Análise qualitativa da produção de lipases e biossurfactantes por fungos
1130 isolados de resíduos oleosos. **Engevista**, v. 17, n. 3, p. 385-397, 2015.
- 1131 STANTON, C. et al. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods.
1132 In: FARNWORTH, E.R., ed. *Handbook of fermented functional foods*. Boca Raton: CRC
1133 Press, 2003. p.27-58.
- 1134 STENMAN, L. K. et al. Potential probiotic *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* 420 prevents
1135 weight gain and glucose intolerance in diet-induced obese mice. **Benef Microbes**, v. 5, n. 4, p.
1136 437-445, dez. 2014.
- 1137 TANNOCK, G.W. Normal Microflora. London: Chapman & Hall, 1995.
- 1138 TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during
1139 processing and storage. **Journal of functional foods**, v. 9, p. 225-241, 2014.
- 1140 TUOHY, K. M. et al. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug**
1141 **DiscoveryToday**. v.8, n.15, p. 692-700, 2003.
- 1142 USBECK, J. C. et al. Wine yeast typing by MALDI-TOF MS. **Applied Microbiology and**
1143 **Biotechnology**, Alemanha, v. 98, p. 3737–3752, Apr. 2014.
- 1144 VAARALA, O. Immunological effects of probiotics with special referece to Lactobacilli.
1145 **Clinical. Exp. Allergy**, v.33, n.12, p.1634-1640, 2003.
- 1146 VAN DE WATER, J. Yogurt and immunity: the health benefits of fermented milk products
1147 that contain lactic acid bacteria. **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton:
1148 CRC Press, p.113-144, 2003.
- 1149 VILJOEN, B. C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments.
1150 **International Journal of Food Microbiology**, v.69, n.2, p.37-44, 2001.
- 1151 WILLIANS, N. T. Probiotics. **American Journal of Health-System Pharmacy**, 2010.