

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**



Dissertação de Mestrado

Potencial probiótico, tecnológico e aspectos de segurança de bactérias ácido-láticas isoladas de kefir e de kombucha

**Joseane Castanheira Machado
Bacharela em Nutrição**

Pelotas, 2021

Joseane Castanheira Machado

**Potencial probiótico e aspectos de segurança de bactérias ácido-láticas isoladas
de kefir e de kombucha**

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

Comitê de Orientação:
Prof. Dra. Simone Pieniz
Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva
Prof. Dra. Ângela Maria Fiorentini

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M149p Machado, Joseane Castanheira

Potencial probiótico e aspectos de segurança de bactérias ácido-láticas isoladas de kefir e de kombucha / Joseane Castanheira Machado ; Simone Pieniz, orientadora ; Wladimir Padilha da Silva, Angela Maria Fiorentini, coorientadores. — Pelotas, 2021.

68 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Caracterização. 2. Segurança. 3. Citotoxicidade. 4. Propriedades tecnológicas. I. Pieniz, Simone, orient. II. Silva, Wladimir Padilha da, coorient. III. Fiorentini, Angela Maria, coorient. IV. Título.

CDD : 664

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Joseane Castanheira Machado

**Potencial probiótico e aspectos de segurança de bactérias ácido-láticas isoladas
de kefir e de kombucha**

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

Data da Defesa: 26/11/2021

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Simone Pieniz (Orientadora)

Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^o. Dr^o. Wladimir Padilha da Silva (Co-orientador)

Doutor em Ciência de Alimentos pela Universidade de São Paulo

Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Fiorentini (Co-orientadora)

Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dr^a. Graciela Volz Lopes

Doutorado em Ciências Veterinárias na Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Isabela Schneid Kroning

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos Universidade Federal de Pelotas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. HIPÓTESE	12
3. OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo geral.....	12
3.2 Objetivos específicos	12
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
4.1 Kefir	13
4.2 Kombucha.....	14
4.3 Bactérias ácido-láticas (BAL).....	16
4.4 Probióticos	19
4.5 Benefícios à saúde humana	20
4.6 Potencial Tecnológico de Probióticos.....	24
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
5.1 Delineamento experimental	27
5.2 Amostras.....	27
5.3 Cepas bacterianas	27
5.4 Caracterização dos isolados.....	28
5.5 Aspectos de segurança	28
5.5.4 Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos de uso clínico.....	29
5.6 Atividade antimicrobiana.....	29
5.6.1 Teste de difusão em poços	29
5.7 Fermentação de glicose	30
5.8 Capacidade antioxidante	30
5.8.1 Preparação do sobrenadante bruto	30
5.8.2 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	30
5.9 Capacidade de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade.....	32
5.10 Tolerância a condições ácidas.....	32
5.11 Resistência aos sais biliares	33
5.12 Tolerância ao trato gastrointestinal de forma simulada	33

5.13 Ensaio de citotoxicidade (MTT).....	34
5.14 Análise estatística	34
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
6.1 Caracterização dos isolados de BAL.....	35
6.2 Aspectos de segurança	35
6.2.5 Suscetibilidade a Antimicrobianos	35
6.3 Avaliação das Propriedades Tecnológicas.....	38
6.3.1 Atividade Antimicrobiana.....	38
6.3.2 Fermentação de Glicose	40
6.4 Atividade Antioxidante	41
6.4.1 Capacidade antioxidante pelo método DPPH.....	41
6.4.2 Inibição da peroxidação lipídica pelo método de TBARS	43
6.5 Características probióticas	44
6.5.1 Tolerância às condições ácidas	49
6.5.2 Tolerância aos sais biliares.....	51
6.5.3 Tolerância ao trato gastrointestinal	53
6.6 Ensaio de citotoxicidade (MTT) de linhagens de células VERO	55
7. CONCLUSÃO.....	57
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
REFERÊNCIAS.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Capacidade de sequestro do radical DPPH por bactérias ácido-láticas isoladas de kefir de leite e de kombucha, após 1 h e 24 h.	43
Figura 2 – Atividade antioxidante de bactérias ácido-láticas isoladas de kefir de leite e de kombucha, analisada pelo método de TBARS após 1 h.	45
Figura 3 – Capacidade de autoagregação para os micro-organismos isolados para os tempos de 0, 2, 4 e 24h.	47
Figura 4 - Capacidade de coagregação para os micro-organismos isolados para os tempos de 0, 2, 4 e 24h.	48
Figura 5 - Capacidade de hidrofobicidade para os micro-organismos isolados para os tempos de 0 e 2h.	50
Figura 6 – Análise de resistência dos micro-organismos A2 e KAC às condições ácidas (pH).	52
Figura 7 – Tolerância dos isolados A2 e KAC em diferentes concentrações de sais biliares.	54
Figura 8 – Tolerância ao trato gastrointestinal de forma simulada de bactérias ácido-láticas isoladas de kefir de leite (A2) e de kombucha artesanal (KAC).	56
Figura 9 - Resultados do ensaio de citotoxicidade (MTT) para células VERO expostas a 0,001; 0,010 e 0,100 µg/mL da suspensão bacteriana do isolado A2.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Uso de probióticos e seus benefícios.	23
Tabela 2 – Delineamento experimental de identificação e caracterização dos isolados.	28
Tabela 3 - Perfil de suscetibilidade de isolados de bactérias ácido-láticas a antimicrobianos de uso clínico.	38
Tabela 4 - Análise da atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de kefir e de kombucha.	40

RESUMO

MACHADO, Joseane Castanheira. **Potencial probiótico e aspectos de segurança de bactérias ácido-láticas isoladas de kefir e de kombucha**. 2021. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Pesquisas científicas recentes têm revelado um crescente e notório interesse mundial pelo consumo de produtos benéficos à saúde. Nessa perspectiva, os probióticos têm ganhado uma grande visibilidade, por serem micro-organismos vivos que, ao serem ingeridos em quantidades adequadas, trazem benefícios à saúde do consumidor. Uma variedade de micro-organismos com potencial tecnológico e até mesmo probiótico, podem estar presentes em bebidas como o kefir e a kombucha. Assim, o consumo destes, pode favorecer a saúde humana, e conseqüentemente, têm sido objeto de estudo. Desta forma, objetivou-se no presente estudo caracterizar isolados de bactérias ácido-láticas (BAL) oriundas de kefir e de kombucha, quanto aos aspectos de segurança *in vitro*, avaliar o potencial tecnológico e probiótico dos isolados. Foi realizada a caracterização dos isolados, com testes de coloração de Gram, presença de catalase e morfologia. Após, foi avaliado aspectos de segurança por meio da atividade das enzimas gelatinase, DNase, hemolisina e susceptibilidade a antimicrobianos de uso clínico. As propriedades tecnológicas, foram verificadas por meio da atividade antimicrobiana frente a micro-organismos patogênicos pelo método de difusão em poços, produção de fermentação de glicose, determinação da capacidade antioxidante pelo método de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para analisar o potencial probiótico foram realizadas análises de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade, tolerância às condições do trato gastrointestinal simulada, tolerância a diferentes concentrações ácidas e tolerância aos sais biliares. Ainda, foi realizado ensaio de citotoxicidade empregando o método MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio], utilizando linhagens de células VERO. De acordo com os resultados obtidos, dos oito (n=8) isolados caracterizados pertencentes ao grupo de BAL (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7 e KAC), cinco (n=5) apresentam morfologia de cocos (A1, A3, A4, A5, A6) e três (n=3) de bacilos (A2, A7, KAC). Todos isolados apresentaram resultados negativos para os testes de gelatinase, DNase e hemolisina. Para o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, verificou-se que todos os isolados apresentaram suscetibilidade à vancomicina, penicilina, meropenem e cloranfenicol. Quanto a avaliação de propriedades tecnológicas, cinco (n=5) isolados (A1, A2, A3, A7 e KAC) apresentaram características antimicrobianas frente a todos os micro-organismos utilizados. Cinco (n=5) isolados (A1, A4, A6, A7, KAC) apresentaram metabolismo homofermentativo. Com o método de DPPH e TBARS, foi observado que todos os isolados apresentaram capacidade antioxidante. Para o teste de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade, os isolados A2 e KAC apresentaram os maiores percentuais destes parâmetros. Desta forma, dois (n=2) isolados (A2 e KAC) foram selecionados para realização dos testes de tolerância a diferentes concentrações ácidas, sais biliares e trato gastrointestinal simulado. Ambos isolados apresentaram tolerância ao trato gastrointestinal de forma simulada. Para o ensaio de citotoxicidade, o isolado A2 foi utilizado e após uma hora de exposição, a suspensão bacteriana não apresentou citotoxicidade nas linhagens de células VERO. Estes resultados são promissores, pois os micro-organismos em estudo apresentaram características desejáveis visando futuras aplicações em matrizes alimentares.

Palavras-Chave: Caracterização; segurança; citotoxicidade; propriedades tecnológicas.

ABSTRACT

MACHADO, Joseane Castanheira. **Probiotic potential and safety aspects of lactic acid bacteria isolated from kefir and kombucha**. 2021. 68f. Dissertation (Masters in Food Science and Technology) - Postgraduate Program in Food Science and Technology, Eliseu Maciel Agronomy Faculty, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

Recent scientific researches have revealed a growing and notorious interest in the consumption of products that are beneficial to health. From this perspective, probiotics have gained great visibility, as they are live microorganisms that, when ingested in enough numbers, bring benefits to the consumer's health. Beverages such as kefir and kombucha have a variety of microorganisms with probiotic potential. The consumption of these can promote human health, and consequently, have been the object of study. Thus, the aim of this study was to isolate, identify and characterize lactic acid bacteria (LAB) from kefir and kombucha with probiotic potential and to evaluate in vitro safety aspects. The isolation and characterization of microorganisms were carried out using Gram stain, presence of catalase and morphology tests. Afterwards, safety aspects were evaluated through the activity of gelatinase, DNase, hemolysin enzymes and susceptibility to clinically used antimicrobials. Furthermore, the cytotoxicity assay was performed using the MTT method using VERO cell lines. The technological properties were verified through the antimicrobial activity against pathogenic microorganisms by the well diffusion method, determination of the antioxidant capacity by the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) radical capture method and reaction to thiobarbituric acid (TBARS). To analyze the probiotic potential, analyzes of tolerance to conditions of the simulated gastrointestinal tract, tolerance to different acid categories and tolerance to bile salts were analyzed. According to the results obtained, of the eight (n=8) isolates formed belonging to the BAL group (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7 and KAC), five (n=5) showed cocci morphology (A1, A3, A4, A5, A6) and three (n=3) of bacilli (A2, A7, KAC). All isolates showed negative results for gelatinase, DNase and hemolysin tests. For the antimicrobial susceptibility test, it was found that all isolates showed susceptibility to vancomycin, penicillin, meropenem and chloramphenicol. Regarding the evaluation of technological properties, five (n=5) isolates (A1, A2, A3, A7 and KAC) showed antimicrobial characteristics against all the microorganisms used. Five (n=5) isolates (A1, A4, A6, A7, KAC) showed homofermentative metabolism. With the DPPH and TBARS method, it was observed that all isolates showed antioxidant capacity. For the self-aggregation, co-aggregation and hydrophobicity test, isolates A2 and KAC presented the highest percentages of these parameters. Thus, two (n=2) isolates (A2 and KAC) were selected to perform the tolerance tests to different concentrations of acids, bile salts and simulated gastrointestinal tract. Both isolates showed tolerance to gastrointestinal transit in a simulated way. For the cytotoxicity assay, the isolate A2 was used and after one hour of exposure, the bacterial suspension showed no cytotoxicity in the VERO cell lines. These results are promising, as the microorganisms under study showed desirable characteristics for future applications in food matrices.

Keywords: Probiotics; safety; cytotoxicity; technological properties.

1. INTRODUÇÃO

Pesquisas científicas na última década têm revelado um crescente e notório interesse pelo consumo de produtos benéficos à saúde. Dentre esses, estão o kefir (MAGALHÃES et al., 2011) e a kombucha (SANTOS, 2016). O kefir é uma bebida à base de leite, fermentado por uma simbiose de bactérias ácido-láticas (BAL) e de leveduras que permanecem aderidas em um composto de exopolissacarídeos e proteínas (WALSH et al., 2016; DIAS et al., 2018), e difere dos demais produtos lácteos, por ser preparado a partir da inoculação dos seus grãos, em leite cru (TAMANG et al., 2016). Normalmente, o kefir apresenta uma característica organoléptica com textura viscosa e sabor levemente azedo. Comumente, utiliza-se leite de vaca para sua preparação, mas também pode-se utilizar leite bubalino, ovino ou caprino (BOURRIE et al., 2016; FARAG et al., 2020).

O chá kombucha, por sua vez, tornou-se muito conhecido nos últimos tempos, por seus efeitos benéficos à saúde. Tem-se destacado como tendência no mercado mundial, em uma sociedade que busca cada vez mais consumir alimentos saudáveis (SANTOS, 2016). É uma bebida gaseificada obtida por meio da fermentação de chás verde ou preto, açucarados, adicionado de uma película de celulose, contendo uma combinação de bactérias e leveduras (CZAJA et al., 2006; VITAS et al., 2013). Em aerobiose, esta combinação de micro-organismos de kombucha convertem o chá e o açúcar, entre 7 a 10 dias, em uma bebida gaseificada (MALBAŠA et al., 2011).

Sua fermentação é resultante do metabolismo de uma colônia simbiótica de bactérias e leveduras presentes em um filme de celulose chamado de scoby (Colônia Simbiótica de Bactérias e Leveduras). Contudo, também pode ser denominado como kombucha mãe (CHAKRAVORTY et al., 2016; DE FILIPPIS et al., 2018). Dentre os micro-organismos predominantes neste produto, destacam-se as bactérias acéticas, as BAL em uma menor proporção e as leveduras osmotolerantes (TEOH e HEARD, 2004; JAYABALAN et al., 2014).

Produtos probióticos são definidos desta forma por apresentarem em sua composição micro-organismos vivos, que ao serem ingeridos em quantidades adequadas, trazem benefícios à saúde do consumidor (FAO/WHO, 2001). Para que um micro-organismo seja considerado probiótico, é necessário garantir sua viabilidade

após a passagem pelo trato gastrointestinal, adesão às células epiteliais, dentre outros (YAN e POLK, 2020). Sua eficácia clínica deve ser comprovada por meios de análises *in vitro*, *in situ* e *in vivo*, que comprovem seu potencial probiótico (SUEZ et al., 2019). Os gêneros com maior destaque nesta classe são *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, que possuem como principal característica, a produção de ácido láctico (MATHARA et al., 2008).

Bactérias ácido-láticas representam a principal fonte de alimentos probióticos, e podem ser aplicadas em diversas matrizes alimentares. Possuem, ainda, potencial inibitório de invasores patogênicos e deteriorantes e, concedem características sensoriais aos alimentos (SETTACHAIMONGKON et al., 2016). São responsáveis pela produção de ácido láctico, a qual é obtida pela fermentação de carboidrato. Também apresentam características Gram-positivas, não formadoras de esporos, catalase e oxidase negativa, ácido tolerantes, além de serem anaeróbias facultativas (SILVA et al., 2017).

Apesar de existir um número considerável de micro-organismos probióticos bem caracterizados e acessíveis para uso comercial, é desejado o isolamento e caracterização de novas linhagens, visto que muitos benefícios à saúde são exclusivos de cada micro-organismo (VASILJEVIC e SHA, 2008). Ademais, a composição exata da microbiota do kefir e da kombucha é variável, por depender da sua origem (JAYABALAN et al., 2014; AKALIN et al., 2018; SINDI; BADSHA; ÜNLÜ, 2020). Nesse sentido, o isolamento e a caracterização de novas linhagens oriundas de nichos pouco explorados, podem ser favoráveis para obtenção de micro-organismos com propriedades funcionais distintas (ORTU et al., 2007).

2. HIPÓTESE

Isolados bacterianos de kefir e de kombucha poderão apresentar potencial probiótico e tecnológico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar o potencial probiótico e tecnológico de BAL isoladas de kefir e de kombucha, bem como avaliar aspectos de segurança.

3.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar os isolados quanto a coloração de Gram, morfologia e catalase;
- b) Avaliar aspectos de segurança dos isolados quanto a capacidade de produzir enzimas gelatinase, DNase, hemolisina e resistência a diferentes antimicrobianos de uso clínico e avaliar *in vitro* a citotoxicidade frente a células VERO;
- c) Avaliar a capacidade tecnológica *in vitro* dos isolados quanto a capacidade de fermentação de glicose, antioxidante e atividade antimicrobiana;
- d) Avaliar o potencial probiótico *in vitro* dos isolados quanto a capacidade de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade, além da tolerância a diferentes concentrações de pH, sais biliares e trato gastrointestinal de forma simulada.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Kefir

Trata-se de uma bebida à base de leite cru, fermentada por grãos chamados de kefirano, uma matriz polissacarídica que possui em sua composição uma diversidade de espécies e subespécies de BAL, ácido acéticas e leveduras. De origem Caucasiana, o kefir é comumente utilizado no ocidente como uma bebida fermentada com propriedades medicinais. Dentre os benefícios mais conhecidos, destacam-se a redução dos sintomas de intolerância à lactose, a proteção contra micro-organismos nocivos, a simbiose da microbiota intestinal, a imunomodulação e a propriedade anticarcinogênica (BOURRIE et al., 2016).

O kefir pode ser elaborado não apenas com leite bovino fermentado, mas também com o ovino, o bubalino e o caprino (SURIASIH et al., 2012). Os grãos de kefir possuem aspecto leitoso e medem entre 3 a 20 mm de tamanho. O substrato produzido, contendo gás carbônico, etanol, soluções ácidas e compostos aromáticos, provém da atividade metabólica dos micro-organismos residentes na bebida, apresentando características organolépticas distintas e bioatividade original, a qual é dependente da composição microbiológica presente (SANTOS et al., 2015). Seu valor nutricional depende da forma de cultivo e da sua origem (BRASIL, 2007). Em seu composto, pode ser encontrado uma vasta diversidade de vitaminas, como as do complexo B, E, D e K, e minerais como cálcio, fósforo, aminoácidos essenciais e ácido fólico, que podem contribuir positivamente para as diversas fases da vida (OTLES e CADINGI, 2003). O pH da bebida varia 4,2 e 4,6 (MONTANUCI, 2010).

O kefir de água, diferentemente do kefir de leite, possui seus grãos transparentes, cuja sua matriz é composta por dextrano, com uma cultura bacteriana e de leveduras singular, onde a principal fonte energética encontra-se no açúcar mascavo, resultando uma bebida levemente gaseificada e refrescante (HSIEH et al., 2012).

De acordo com a legislação brasileira, o kefir é um leite fermentado, obtido por meio da inoculação de seus grãos, compostos de uma simbiose de micro-organismos ácido lácticos no leite pasteurizado ou estéril, com produção final de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono (BRASIL, 2007). Dentre os micro-organismos comumente

encontrados, destacam-se as bactérias do gênero *Lactobacillus* das subespécies *brevis*, *casei*, *kefiri*, *acidophilus*, *plantarum*, *Lactococcus* da subespécie *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Acetobacter* e *Saccharomyces* (BOURRIE et al., 2016).

Em estudos experimentais John e Deeseenthum (2015); Bourrie et al. (2016) e Hsu et al. (2018), evidenciam que o consumo da bebida pode restabelecer a microbiota intestinal, abrandar inflamações generalizadas e de estresse oxidativo, atenuar sintomas de intolerância à lactose e de doenças inflamatórias intestinais e, contribuir positivamente nos quadros clínicos de diabetes e dislipidemias.

Além da água e do leite, o kefir possui a capacidade de fermentar outros produtos, como sucos de frutas, bebidas à base de soja e até mesmo café, com aspecto a depender da matéria prima utilizada para a inoculação. As características organolépticas e composição microbiológica irão depender da origem, armazenagem e forma de cultivo (MIGUEL et al., 2010). Após a produção da bebida fermentada, ocorre a multiplicação dos grãos, tornando o cultivo crescente a cada processo e, desta forma, dificultando a padronização do produto (CAMPOLINA et al., 2017).

Apesar da dificuldade de padronização da bebida, em alguns países, já é observada a produção em larga escala, como na Alemanha, Áustria, Luxemburgo, França, Noruega, Suíça, República Tcheca, Eslováquia, Polônia e Israel. Na Rússia, Estados Unidos, Japão e Europa, a bebida tem sido utilizada principalmente por grupos de indivíduos com doenças crônicas não transmissíveis. No Japão, por exemplo, uma formulação patenteada está disponível no mercado, com adição de enzimas como a lipase, para a prevenção e controle da obesidade (FIGLER et al., 2006). No Brasil, o preparo normalmente é feito de forma artesanal com a fermentação espontânea dos grãos no leite cru, sem controle da temperatura ou do tempo (SURIASIH et al., 2012).

4.2 Kombucha

A kombucha é uma bebida fermentada e refrescante, com sua origem ainda incerta, mas com os primeiros registros datados em 221 a.c. Seu nome surgiu a partir de relatos que mencionam sua utilização para o tratamento de intercorrências digestivas por meio do médico coreano, chamado Kombu, em 414 a.c. (SANTOS, 2016).

A bebida pode ser preparada com chá preto ou verde, ambos preparados por infusão pelo tempo de 5 a 10 minutos. Ainda quente, o chá é adoçado com açúcar (branco ou mascavo), cerca de 50 em 100 g/L. Logo após resfriada, a bebida é armazenada em um recipiente de vidro, onde é acrescentado a “kombucha mãe”, também conhecida como scoby, uma película gelatinosa responsável pelo processo de fermentação, composta por polissacarídeos e uma colônia simbiótica de micro-organismos. Ao fim do processo, o recipiente de vidro é coberto com um pano, permitindo a passagem de ar e evitando, desta forma, a contaminação por esporos ou por insetos. Sua incubação pode levar de 7 a 21 dias, em temperatura ambiente (18 - 30°C). Ao longo da fermentação, com aproximadamente uma semana de cultivo, o scoby tende a aumentar o seu tamanho, dividindo-se em duas ou mais, dando origem a uma nova kombucha, chamada de kombucha “filha” (GREENWALT et al., 2000; JAYABALAN et al., 2014).

Essa associação de bactérias e leveduras, faz com que a matriz simbiótica apresente uma poderosa atividade antimicrobiana, inibindo o desenvolvimento de bactérias patogênicas em seu meio. Consequentemente, os micro-organismos com essa capacidade também podem aumentar o tempo de conservação quando adicionados nos alimentos, pois inibem a proliferação de micro-organismos indesejáveis (ABREU, 2015).

Sua composição microbiológica é variável e, assim como o kefir, irá depender da sua origem e das condições do cultivo. Dentre os micro-organismos isolados mais comuns, destacam-se as leveduras: *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Brettanomyces*/ *Dekkera*, *Candida*, *Torulospora*, *Kloeckera*/ *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torula*, *Torulopsis*, *Mycotorula* e *Mycoderma*” (SANTOS, 2016).

A ingestão do chá está associada ao emagrecimento, ao tratamento de úlceras gástricas (CHAKRAVORTY et al., 2016), restauração da microbiota intestinal, evitando assim, doenças intestinais causadas por bactérias e fungos, além de auxiliar o seu funcionamento (LEAL et al., 2018), bem como reduzir o colesterol, dentre outros (CASAROTTI et al., 2017).

A kombucha tem atraído a atenção dos consumidores, fato este que pode ser observado na indústria alimentícia, com um considerável crescimento do consumo desse produto nos últimos anos. Ainda, em alguns casos, a bebida está sendo consumida como uma alternativa para degustar bebidas não alcoólicas. Nos Estados Unidos, por exemplo, a bebida está tomando popularidade nos bares e cervejarias (KIM e KOUSHIK, 2020).

O Brasil, único país do mundo com legislação específica para kombucha (SUHRE, 2020), lançou por meio da Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019, instituída pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a qual estabelece padrões de identidade e de qualidade da kombucha em todo território nacional (BRASIL, 2019). Segundo esta legislação, a kombucha é uma bebida fermentada obtida por meio de fermentação anaeróbia e aeróbia do mosto, adquirida a partir da infusão do extrato de *Camellia sinensis* adoçado com açúcar e uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras microbiologicamente ativas (BRASIL, 2019).

Entre os parâmetros físico-químicos estabelecidos pela lei brasileira, o pH da kombucha deve estar entre 2,5 e 4,2. Segundo a normativa, em sua composição pode ser adicionado polpa de fruta, vegetais, extratos, especiarias, mel, entre outros aditivos permitidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2019).

4.3 Bactérias ácido-láticas (BAL)

O grupo de BAL possui uma ampla variedade de espécies disponíveis na natureza. São responsáveis pela produção de ácido lático, a qual é obtida pela fermentação de carboidrato. Também apresentam características Gram-positivas, não formadoras de esporos, catalase e oxidase negativa, ácido tolerantes, além de serem anaeróbias facultativas (SILVA et al., 2017). De acordo com a temperatura ótima de crescimento, essas bactérias podem ser classificadas como mesofílicas (20 a 30 °C) e termofílicas (35 a 45 °C) (ZHANG et al., 2013).

A utilização desses micro-organismos tem demonstrado um bom desempenho e um papel multifuncional em diversas áreas como saúde, alimentação e produções agrícolas (BINTSIS, 2018). Devido às suas características metabólicas conferem sabor, textura e odor próprio nos alimentos (DA COSTA et al., 2016), além de inibir

contaminação por competitividade, conferindo condições ácidas ao meio e por apresentarem maior resistência ao baixo pH, quando comparados aos demais micro-organismos, considerados deteriorantes indesejáveis e de origem patogênica (SETTACHAIMONGKON et al., 2016). Ademais, determinadas espécies possuem capacidade de produzir substratos com ação antimicrobiana ou bacteriocinas, o que fez aumentar seu uso como agentes bioconservadores pela indústria alimentícia (STEFANOVIC; FITZGERALD; MCAULIFFE, 2017).

Bactérias ácido-láticas possuem capacidade de produção ou degradação de gorduras, proteínas e carboidratos, bem como produção de componentes nutricionais importantes como vitaminas, tornando-se, desta forma, culturas funcionais e com efeitos terapêuticos (WEDAJO, 2015; BINTSIS, 2018). Por este motivo, são muito utilizadas em processos que envolvam fermentação sendo comumente adicionadas em produtos lácteos (EMBRAPA, 2011). Assim sendo, além das bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, as BAL são os micro-organismos mais utilizados como probióticos na alimentação humana.

Seu uso na fermentação de alimentos é uma das técnicas mais antigas utilizadas para conservação de alimentos. Até o século XX, antes da descoberta e da caracterização de BAL, não havia regulamentação específica para fermentação de alimentos (HAYEK e IBRAHIM, 2013). Para a produção de alimentos fermentados, era adicionado aos alimentos, uma amostra do produto do dia anterior. Apesar de ainda ser utilizado em alguns produtos artesanais, esse método não oferece padronização do produto final, o que torna uma grande desvantagem quando comparado com os métodos atuais disponíveis no mercado. Assim, foi observada a necessidade de uma cultura de partida, conhecida hoje como cultura *starter*, para a padronização do processo fermentativo. Atualmente, com o uso dessa cultura, é possível produzir alimentos fermentados em grande escala, com total controle do processo, sem alterar características indesejáveis no alimento, possibilitando uma produção padronizada em qualquer produto fermentado (BINTSIS e ATHANASOULAS, 2015).

Bactérias ácido-láticas possuem facilidade de adaptação em diferentes ambientes, e podem ser encontradas desde produtos alimentares como laticínios, carnes, vegetais, pães, assim como no corpo humano, como na mucosa, na boca, em

parte do aparelho reprodutor feminino e no intestino (HAYEK e IBRAHIM, 2013). Contudo, para que a aplicação industrial seja possível, estas devem resistir a condições extremas, como passagem no trato gastrointestinal, com capacidade de multiplicação e de colonização no intestino, bem como propagar os efeitos benéficos ao consumidor (PRIYODIP; PRAKASH; BALAJI, 2017).

De acordo com seu metabolismo, podem ser homofermentativas, quando produzem apenas o ácido láctico como produto final, ou heterofermentativas, quando além da produção de ácido láctico, produzem gás carbônico, etanol e outros compostos flavorizantes (LI et al., 2010). Bactérias ácido-láticas do gênero *Lactobacillus* e *Streptococcus* são as bactérias homofermentativas mais utilizadas em produtos de panificação, lácteos, bebidas como cervejas, dentre outros, pois o ácido láctico produzido por estas, pode ser utilizado como flavorizante, acidulante, tamponante e inibidor de bactérias indesejáveis (CAPELLARI, 2010; FORSYTHE, 2013). Já BAL pertencentes ao gênero *Weissella* spp. e *Leuconostoc* spp., fazem parte grupo de bactérias heterofermentativas e são aplicadas principalmente em produtos lácteos, como queijos, onde a produção de ácido pode conferir aroma característico no alimento (CAPELLARI, 2010; FORSYTHE, 2013).

São considerados do grupo de BAL os micro-organismos dos gêneros *Alloiococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella* e *Vagococcus* (CROWLEY et al., 2013). Para Sabo et al. (2014) e Loureiro (2015), os gêneros mais utilizados pela indústria alimentícia são *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Bifidobacterium*, *Vagococcus* e *Weissella*. O gênero *Lactobacillus* *plantarum* é caracterizado por possuir maior capacidade de adaptação e, conseqüentemente, encontra-se em uma vasta variedade de alimentos, podendo estar presente em derivados cárneos como salames e salsichas; em vegetais como chucrute e vinhos. Alguns autores consideraram o gênero *Lactobacillus* spp. como a principal BAL inibidora de bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* (DUARTE et al., 2016).

Para o isolamento e a identificação destes micro-organismos, é necessário utilizar o meio seletivo ágar *De Man Rogosa and Sharpe* (MRS) mais indicado para bactérias com morfologia de cocos, ou M17, meio de cultura mais indicado para BAL que possuem morfologia de bacilos (SILVA, 2016). Também faz se necessário realizar o teste de coloração de Gram, que por meio da bacterioscopia, é identificado o perfil morfológico do isolado, catalase e urease como testes bioquímicos (SILVA, 2016), além dos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), o método molecular mais utilizado para confirmação e identificação de gênero e espécie de micro-organismos (EMBRAPA, 2011; PERIN, 2016).

Por consequência, a investigação do potencial probiótico e biotecnológico de BAL, tornou-as um produto interessante para indústria nutracêutica e alimentícia, visto que ao adquirir informações de suas características, podem ser utilizadas em diferentes produtos, com potencial funcional, garantindo a segurança desses micro-organismos e prosperando novas terapias (SINGH; MAL; MAROTTA, 2017).

4.4 Probióticos

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001), probióticos são micro-organismos vivos que ao serem administrados em quantidades adequadas, transmitem benefícios à saúde do hospedeiro. Esse conceito foi baseado inicialmente em 1907, a partir da interpretação realizada pelo pesquisador Elie Metchnikoff, que na época, propôs o consumo de bebidas lácteas fermentadas com BAL, a fim de melhorar a saúde e buscar longevidade aos búlgaros (MARTÍN e LANGELLA, 2019).

O efeito protetor dos probióticos sobre a saúde está relacionado com a sua colonização no trato gastrointestinal humano a depender de cada espécie empregada (PARKER et al., 2018). Desta forma, exercem uma barreira de proteção à mucosa, podendo utilizar a inibição competitiva em sítios de ligação e de adesão no epitélio a seu favor, como excreção de bacteriocinas, acidificação do meio e produção de agentes com atividade antimicrobiana (PLAZA-DIAZ et al., 2019).

Contudo, para validação de um produto probiótico é necessário seguir alguns critérios estabelecidos pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e

Agricultura (FAO) / WHO (2002), tais como reconhecimento do gênero, espécie e subespécie do isolado; depósito em coleção internacional de culturas; análise de segurança; identificação da finalidade funcional *in vitro* e *in vivo*; comprovação dos benefícios à saúde do consumidor, com recomendação da quantidade do micro-organismo necessária para prover tais efeitos; concentração mínima de células viáveis durante o armazenamento e a descrição referente à eficácia do produto. Porém, não foi estabelecida a dosagem adequada para conceder tais benefícios. Alguns autores, estimam que a dose mínima deva ser de $10^5 - 10^6$ UFC/g ou mL, outros referem 10^7 UFC/ml (DING e SHAH, 2008; NUALKAELKUL e CHARALAMPOPOULOS, 2011).

4.5 Benefícios à saúde humana

Suas ações imunomoduladoras estão sendo observadas em diversas investigações científicas, seja *in vitro* ou *in situ* com animais ou seres humanos. Segundo Butel (2014) e Wang (2016), os probióticos ativam e controlam a resposta imune inata do ser humano, por meio das células epiteliais, dendríticas, macrófagos, estimulando a produção de imunoglobulina A (IgA), submetendo o hospedeiro a efeitos locais e sistêmicos. Ainda, têm sido relatados os efeitos benéficos como a restauração da disbiose intestinal (NATH et al., 2018; MARTÍN e LANGELLA, 2019; BUSTAMANTE et al., 2020).

Inicialmente, o reconhecimento da importância do intestino saudável para o bem estar e para a saúde humana, foi idealizado em meados do século XIX. Primeiramente, a bactéria do gênero *Bacillus acidophilus* foi isolada em fezes de recém nascidos (KNEIFEL BONAPARTE, 2003). Com o passar dos anos, em 1922, os pesquisadores Kopeloff e Cheney, observaram os efeitos benéficos dessa bactéria sob distúrbios gastrointestinais. A partir desta descoberta, a utilização de leite fermentado passou a ser aplicado em práticas terapêuticas (TURKMEN; AKAL; ÖZER, 2019).

O microbioma, conhecido como partes do corpo humano (intestino, pele e demais mucosas), onde encontra-se um vasto número de micro-organismos colonizadores (SENDER; FUCHS; MILO, 2016), tem sido estudado atualmente por abranger diversos genomas de micro-organismos distintos, a incluir, bactérias, fungos, vírus e parasitas. Acredita-se que o intestino humano possua cerca de 10^{13} a 10^{14}

células bacterianas, e que essa simbiose exerça uma função ímpar na saúde de cada indivíduo (FARIA et al., 2014).

Nas situações em que agentes externos alteram este ecossistema, seja por uso de antimicrobianos, alimentação, mudança de ambiente ou alterações no sistema imune, poderão causar propagação em massa de micro-organismos comensais e tornar o indivíduo susceptível a invasores patogênicos (ZHANG et al., 2017) e doenças metabólicas, incluindo obesidade e diabetes (FARIA et al., 2014), ritmicidade circadiana, condições nutricionais e resposta imune (HACQUARD et al., 2015).

Além disso, as interações entre o microbioma e o sistema imune são complexas e irão depender do contexto. Podem estar envolvidas não apenas com a regulação de infecções, mas com doenças gastrointestinais não transmissíveis (ZHANG et al., 2017) além dos quadros extra-intestinais, dentre elas, de origem reumática (MAEDA; TAKEDA, 2019), distúrbios neurodegenerativos (MAIN e MINTER, 2017) e doenças carcinogênicas (CASAROTTI et al., 2017).

Dentre os principais benefícios atribuídos aos probióticos estão a redução do colesterol sérico; o decréscimo de reações alérgicas; a melhora na biodisponibilidade de nutrientes; a recuperação da saúde do trato urogenital; a elevação da produção de anticorpos IgA; a criação de barreira contra micro-organismos patogênicos invasores de mucosas e de tecidos epiteliais; a intervenção contra doenças inflamatórias intestinais; a coibição da constipação e o tratamento anticarcinogênico (CASAROTTI et al., 2017).

Outro benefício comum entre os probióticos é a melhora dos sintomas da intolerância à lactose, devido a capacidade de produção da enzima β -D-galactosidase da bactéria, uma proteína que possui como função hidrolisar a lactose em glicose e galactose, diminuindo a disponibilidade de lactose nas bebidas fermentadas e, consequentemente, no intestino humano (GHEYTANCHI et al., 2010).

A Tabela 1, representa esquematicamente a relação de determinadas doenças já relatadas na literatura, a espécie de micro-organismo com potencial efeito probiótico, bem como a dose recomendada, atribuída a cada gênero/espécie.

Tabela 1 – Uso de probióticos e seus benefícios.

Doenças/Condição	Micro-organismo	Dosagem por gênero/espécie	Referências
Autismo	<i>Bifidobacterium</i> + <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> + <i>Lactobacillus helveticus</i> e <i>reuteri</i>	8×10^8 UFC/dia	SANTOCCHI, E. et al. Gut to brain interaction in autism spectrum disorders: a randomized controlled trial on the role of probiotics on clinical, biochemical and neurophysiological parameters. BMC Psychiatry. v. 16, 183, 2016.
Obesidade	<i>B. longum</i>	1×10^9 UFC/dia	GUARDAMAGNA et al. Bifidobacteria supplementation: effects on plasma lipid profile in dyslipidemic children. Nutrition, v. 30, n. 7-8, p. 831–836, 2014.
Hipertensão	<i>L. helveticus</i> + <i>Streptococcus thermophilus</i>	2×10^8 UFC/dia	JAUHIAINEN, et al. Long-term intervention with Lactobacillus helveticus fermented milk reduces augmentation index in hypertensive subjects. Eur J Clin Nutr. v. 64, n. 4, p. 424-431, 2010.
Doença de Crohn	<i>Lactobacillus ssp</i> + <i>Bifidobacterium ssp</i>	75×10^9 UFC/dia	FUJIMORI et al. High dose probiotic and prebiotic cotherapy for remission induction of active Crohn's disease. J Gastroenterol Hepatol, 22, n. 8, p. 1199-204, 2007.
Fotoenvelhecimento	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1×10^{10} UFC/dia	LEE et al. Clinical evidence of effects of Lactobacillus plantarum HY7714 on skin aging: a randomized, double blind, placebo-controlled study. J Microbiol Biotechnol, v. 28, n. 12, p. 2160-2168, 2015.

Tabela 1 – Cont.

Gêneros	Indicação	Dosagem por Espécie	Referências
Osteoporose	<i>L. helveticus</i>	1x10 ⁹ UFC/dia	Parvaneh et al. Effect of probiotics supplementation on bone mineral content and bone mass density. Scien World J, v. 43, n. 2, 61-68, 2014.
Asma	<i>Lactobacillus gasseri</i>	2x10 ⁹ UFC/2x ao dia	Chen et al. Randomized placebo-controlled trial of lactobacillus on asthmatic children with allergic rhinitis. Pediatr Pulmonol, v. 45, n. 11, p. 1111-1120, 2010.
Depressão	<i>B. bifium</i> + <i>B. lactis</i> + <i>L. acidophilus</i> + <i>L. brevis</i> + <i>L. casei</i> + <i>L. salivarius</i> + <i>L. lactis</i>		Steenbergen et al. A randomized controlled trial to test the effect of multispecies probiotics on cognitive reactivity to sad mood. Brain Behav Immun, v. 48, p. 258-64, 2015.
Anemia	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	5x10 ⁹ UFC/dia	STROZZI GP; MOGNA L. Quantification of folic acid in human faeces after administration of Bifidobacterium probiotic strains. J Clinical Gastroenterol, v. 42, p. S179-S184, 2008.

4.6 Potencial tecnológico de probióticos

Bactérias ácido-láticas representam a principal fonte probiótica, podendo ser aplicadas em diversas matrizes alimentares como derivados lácteos, cárneos, vegetais e pães. Possuem ainda, potencial inibitório de invasores patogênicos e deteriorantes, e concedem características sensoriais aos alimentos (SETTACHAIMONGKON et al., 2016). Os produtos que mais oferecem culturas probióticas em sua composição são os de origem láctea. Entretanto, a procura por alimentos utilizados em restrições alimentares de origem patológica como intolerância à lactose e a colesterolemia, ou não patológica como veganismo e vegetarianismo, incentivou novos investimentos tecnológicos, expandindo este setor alimentar. Empresas estão lançando diversas alternativas no mercado, tais como geleias, cereais, frutas secas e demais produtos de origem vegetal com potencial probiótico (GRANATO et al., 2019). Os produtos lácteos são mais indicados para inoculação de cepas probióticas, pois dispensam mudanças tecnológicas expressivas para incorporar estas culturas e são capazes de protegê-las durante a passagem do trato gastrointestinal (GRANATO et al., 2019).

Contudo, para que BAL mantenham a viabilidade em determinado produto, algumas condições específicas são necessárias. Desta forma, a fim de otimizar este processo, compostos conhecidos como prebióticos como fibras de milho e inulina, têm sido utilizados, em especial, nos produtos lácteos, facilitando dessa forma, o desenvolvimento e a viabilidade de bactérias probióticas nestas bebidas (TURKMEN et al., 2019). Logo, iogurtes e leites fermentados representam uma categoria probiótica consolidada no mercado e oferecem uma contagem microbiológica apropriada durante sua vida na prateleira (GRANATO et al., 2019).

O queijo, por sua vez, contribui positivamente para o desenvolvimento de probióticos em seu meio, pois apresenta um pH mais básico quando comparado com os iogurtes, possibilitando a estabilidade perante a sobrevivência dos probióticos. Suas características nutricionais como perfil lipídico, protegem os micro-organismos durante a passagem pelo trato gastrointestinal, além de disponibilizar diversos nutrientes e menor teor de oxigênio, fatores importantes para o metabolismo bacteriano (PIMENTEL et al., 2019a). Nos queijos do tipo curado, os probióticos tendem a permanecer viáveis por longos períodos de tempo, acendendo o desenvolvimento desse tipo de

produto (SILVA et al., 2018a, b). Por outro lado, devido alguns quadros clínicos relacionados ao consumo de sódio, como a hipertensão, pesquisadores têm desenvolvido queijos probióticos com baixo teor deste mineral (FELÍCIO et al., 2016; SILVA et al., 2018a, b).

Já o soro de queijo, tem demonstrado ser extremamente atrativo pela indústria de biotecnologia de alimentos, estimulando cada vez mais a produção de diferentes opções de bebida a base de soro de leite. Esse interesse está relacionado com os avanços nas pesquisas que demonstram os efeitos benéficos do consumo do soro sob a saúde humana (AKAL, 2017).

A técnica de microencapsulação tem demonstrado ser uma boa alternativa tecnológica para aplicação industrial (CASTRO et al., 2015). Essa técnica possui como objetivo proteger as células de condições adversas do ambiente, por meio da incorporação de micro-organismos em uma matriz ou membrana de encapsulamento, a fim de obtê-las em concentrações controladas no local desejado (ARSLAN-TONTUL e ERBAS, 2017).

Devido ao pH neutro e elevada concentração de sólidos totais, produtos lácteos como sorvete corroboram à aplicação de células probióticas, promovendo proteção das mesmas (ERGIN et al., 2016), além de possuírem características sensoriais agradáveis ao consumidor (AKALIN et al., 2018). No entanto, a inserção de oxigênio durante seu processamento, a utilização de aditivos e de aromas que reduzem seu pH (ZANJANI et al., 2018) e o congelamento durante seu armazenamento, podem danificar, reduzir ou perder completamente a atividade metabólica dos probióticos (ERGIN et al., 2016). Nesse sentido, diversas alternativas têm sido propostas para melhorar essa condição, como seleção de linhagens, microencapsulação, adição de prebióticos e de glicerol, controle no congelamento e ajuste de pH (OZTURK et al., 2018).

Já as matrizes alimentares não lácteas, como sucos de frutas e outros vegetais têm sido apontadas como meios interessantes para aplicação de probióticos (GRANATO et al., 2019). Os sucos de frutas são vantajosos por serem saudáveis; serem compostos de vitaminas e de minerais; regularem a constipação e serem aceitos pela maioria da população. Porém, a presença desses micro-organismos pode alterar de forma negativa as suas características sensoriais, além do mais, alguns

componentes presentes nos sucos, podem prejudicar o desenvolvimento desses micro-organismos, tais como oxigênio, pH ácido, corantes e conservantes (PIMENTEL al., 2019b).

Diferentemente dos produtos lácteos, os sucos não dispõem de agentes alergênicos como lactose e caseína em seu meio. Outra característica importante a ser considerada é que sua matriz não possui culturas *starter* em seu meio, o que previne competição por nutrientes entre os micro-organismos. Por último, sua digestão tende a ser rápida, reduzindo o tempo dos probióticos em ambientes desfavoráveis como no ácido estomacal (PIMENTEL et al., 2019b).

Na panificação, há um desafio de incorporar as cepas probióticas devido a sensibilidade dos micro-organismos frente às altas temperaturas que esses produtos são expostos (ZHANG; LOU; SCHUTYSER, 2018). Como solução para essa problemática, tem-se utilizado bactérias esporuladas, especialmente na crosta do pão. Estudos estão sendo realizados para avaliar a possibilidade de impressão 3D na fabricação de estruturas alimentares probióticas à base de cereais. Para isso, estratégias tecnológicas precisam ser empregadas em conjunto, como o encapsulamento das bactérias probióticas para diminuir sua sensibilidade térmica (ZHANG; LOU; SCHUTYSER, 2018).

Sob outra perspectiva, o uso de probióticos na pecuária tem demonstrado resultados positivos. Na produção de suínos, sua utilização auxilia na modulação do sistema imune e, conseqüentemente, na saúde dos animais, tornando-se alternativas naturais ao uso de antimicrobianos, reduzindo poluentes ambientais (BARBA-VIDAL; MARTÍN-ORÚE; CASTILLEJOS, 2019).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Delineamento experimental

O presente estudo foi desenvolvido por meio dos ensaios *in vitro* descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Delineamento experimental de identificação e de caracterização dos isolados.

Variáveis Independentes	Variáveis Dependentes
Isolados (n=8)	Morfologia (Gram)
	Produção de catalase
	Fatores de virulência
	Atividade antimicrobiana
	Fermentação de glicose
	Capacidade antioxidante
	Autoagregação, coagregação e hidrofobicidade
	Tolerância às condições ácidas
	Tolerância aos sais biliares
	Tolerância ao trato gastrointestinal simulado
	Citotoxicidade
	Análise estatística

5.2 Amostras

Sete (n=7) isolados de kefir utilizados no estudo foram obtidos da Coleção Conservada em Estoque do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, da Faculdade de Agronomia, Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Campus Capão do Leão, localizado na cidade de Capão do Leão-RS. Um (n=1) isolado de kombucha foi obtido da Coleção Conservada em Estoque do Laboratório de Nutrigenômica, da Faculdade de Nutrição, da UFPEL, Campus Anglo, localizado na cidade de Pelotas-RS.

5.3 Cepas bacterianas

Foram utilizadas cepas de *L. fermentum* ATCC 9338, *S. aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes*, ATCC 7644, como controles positivos e *La. plantarum* ATCC 8014, *E. coli* ATCC 43895, *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* ATCC 15521 e *Salmonella* Enteritidis

ATCC 13076, como controles negativos ou indicadoras, nas diversas análises do estudo.

5.4 Caracterização dos isolados

Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Microbiologia e Laboratório de Nutrigenômica da UFPEL, localizado na cidade de Pelotas-RS Brasil. Todos os micro-organismos em estudo foram submetidos a testes de coloração de Gram e catalase.

5.5 Aspectos de segurança

A atividade da gelatinase foi determinada em meio de cultura preparado com 1% de extrato de levedura, 1,5% de triptona e 12% de gelatina. Os isolados ativados em caldo MRS por 24 h a 37 °C, foram transferidos para o meio contendo gelatina. Os tubos foram incubados a 30 °C por sete dias e, após este período, os mesmos foram mantidos sob refrigeração (8 °C) por 30 minutos. Os resultados foram observados a partir do estado físico do meio de cultivo; a transformação do estado sólido para líquido do meio significaria um resultado positivo para atividade da enzima. Como controles positivo e negativo foram utilizados *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 8739, respectivamente (PEREIRA et al., 2009).

A produção da enzima DNase foi determinada a partir da inoculação dos isolados, previamente ativados em caldo MRS por 24 h a 37 °C para o ágar DNase (Acumedia, EUA). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e para leitura dos resultados foi utilizado solução de ácido clorídrico na concentração de 1 N. O aparecimento de halos transparentes no entorno dos isolados denota resultado positivo para produção da enzima de acordo com CLSI (2020). Como controles positivo e negativo foram utilizados *S. aureus* ATCC 25923 e *L. sakei* sub.esp. *sakei* ATCC 15521, respectivamente (KATEETE et al., 2010).

Os isolados foram testados quanto à atividade hemolítica segundo Foulquié Moreno et al. (2003), utilizando ágar Sangue (7% v/v de sangue de cavalo) e incubação a 37 °C por 48 h. A interpretação dos resultados foi realizada da seguinte forma: α -hemólise - isolados que produziram zonas verdes em torno das colônias; γ -hemólise - não produziram qualquer efeito sobre as placas de ágar Sangue (foram consideradas

não hemolíticas). Isolados, que apresentaram zonas de lise de sangue ao redor das colônias foram classificadas como hemolíticas (β -hemólise). Como controle positivo foi utilizado *L. monocytogenes* ATCC 19114.

5.5.1 Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos de uso clínico

A suscetibilidade a antimicrobianos foi avaliada pelo teste de difusão em ágar Müller-Hinton (MH, Oxoid®), realizado de acordo com as normas do documento M100-S22 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020). Após o cultivo em caldo MRS a 37 °C por 24 h, foram preparadas suspensões das culturas, diluídas em solução salina 0,85% utilizando a escala de 0,5 de MacFarland até a obtenção de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia (UFC.mL⁻¹). Em seguida, com o auxílio de *swab*, as culturas foram semeadas em ágar MH e adicionados os discos impregnados com diferentes tipos de antimicrobianos (vancomicina-30 µg (VAN), penicilina-10 µg (PEN), Meropem-10 µg (MER), Eritromicina-15 µg (ERI) e cloranfenicol-30 µg (CLO)). Após, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e os diâmetros dos halos de inibição foram medidos utilizando paquímetro Digimess® e expressos em milímetros (mm).

5.6 Atividade antimicrobiana

5.6.1 Teste de difusão em poços

A atividade bacteriocinogênica dos isolados de BAL foi avaliada por meio do método de difusão em poços, utilizando-se o sobrenadante bruto, conforme descrito anteriormente. O método foi empregado de acordo com Lewus e Montville, (1991), com modificações. A atividade antimicrobiana foi testada frente aos seguintes micro-organismos indicadores: *E. coli* ATCC 8739, *L. monocytogenes* ATCC 19114, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. Enteritidis* ATCC 13076.

Alíquotas de 20 µL do sobrenadante bruto foram adicionadas sobre placas de Petri contendo Agar BHI com aproximadamente 10^5 UFC.mL⁻¹ de cada micro-organismo. Após a completa absorção da alíquota pelo meio de cultura, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A capacidade antimicrobiana dos isolados foi

considerada a partir da presença de halo de inibição no meio (≥ 5 mm). O experimento foi realizado em duplicata em dois experimentos independentes.

5.7 Fermentação de glicose

A capacidade de fermentar glicose com produção de gás (CO_2) foi determinada de acordo com Lima et al. (2009), a partir do cultivo de 24 h a 37 °C em caldo MRS. Os micro-organismos isolados foram re-inoculados (1% v/v) em caldo MRS suplementado com 3% de glicose (Synth®), em tubos de ensaio contendo tubos de Durham e incubados a 37 °C por 48 h. *L. fermentum* ATCC 9338 e *L. plantarum* ATCC 8014 foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. Nos tubos em que foi observada turbidez do meio e produção de gás, os isolados foram classificados como heterofermentativos, enquanto aqueles que apresentaram somente turvação do meio foram classificados como homofermentativos.

5.8 Capacidade antioxidante

5.8.1 Preparação do sobrenadante bruto

Os isolados foram inoculados em 10 mL em caldo MRS e incubados a 37 °C por 24 h. Após este período, as células foram centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante resultante foi neutralizado (pH 7,0) com hidróxido de sódio (NaOH) 1 M e aquecido à 75 °C por 10 minutos.

5.8.2 Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A reação ao ácido tiobarbitúrico foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Ohkawa et al. (1979). Primeiramente, foram incubados em banho maria a 80 °C, tubos de ensaio contendo água Mili Q e Azeite de Oliva Extra Virgem, e os tubos foram submetidos à oxidação por 100 μM de sulfato ferroso, por 10 min. Posteriormente, foram adicionados em cada tubo a amostra do sobrenadante bruto (relatado no item 5.8.1) de cada micro-organismo, Lauril Sulfato de Sódio (SDS) 8,1% sendo a alíquota de 200 μL ; Tampão de Ácido Acético pH 3,44 (500 μL) e Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 0,6% sendo 500 μL . Em seguida, os tubos foram incubados

novamente em banho maria a temperatura de 100 °C por 1 h. Os produtos da reação foram determinados por medida de absorbância em 532 nm em espectrofotômetro. A concentração de TBARS foi calculada por meio de uma curva padrão, utilizando concentrações conhecidas de 1,1,3,3- tetrametoxipropano. A curva padrão foi composta por concentrações de água destilada, malonaldeído (MDA) 0,03 mM, SDS 8,1% (200 µL), Tampão de ácido acético pH 3,44 (500 µL) e TBA 0,6% (500 µL), e incubados em banho maria à 100 °C, por 1 h. Os dados foram expressos em nmol de MDA.mL⁻¹.

5.8.3 Capacidade antioxidante pelo método DPPH (2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZIL)

O método DPPH utilizado foi realizado de acordo com Brand-Williams et al. (1995) baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. O DPPH será preparado na concentração de 60 µmol.L⁻¹, dissolvido em álcool metílico (CH₃OH), sendo, posteriormente, a solução homogeneizada e transferida para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado. A solução preparada foi usada apenas no dia da análise. Em um ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 0,1 mL do sobrenadante bruto (relatado no item 5.8.1) de cada micro-organismo para tubos de ensaio contendo 3,9 mL da solução dissolvida do radical DPPH (60 µmol.L⁻¹) e homogeneizada em vórtex. A solução controle foi realizada utilizando 0,1 mL da solução controle (composta por 40 mL álcool metílico 50%, 40 mL acetona 70% e 20 mL de água destilada) com 3,9 mL do radical DPPH (60µmol.L⁻¹) e, após homogeneização, foi armazenado no escuro por 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 12 h e 24 h, sendo que para a análise do sequestro de radicais livres foram utilizados o primeiro (1 h) e último período (24 h). Como branco utilizou-se o álcool metílico. A curva padrão foi realizada com concentrações entre 0-60 µmol.L⁻¹ de DPPH. Os resultados foram expressos em EC₅₀ (µg.mL⁻¹) que é definida como a concentração mínima do antioxidante necessária para reduzir 50% da concentração do DPPH inicial a partir do momento que o extrato atinge a estabilidade.

5.9 Capacidade de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade

As propriedades *in vitro* de autoagregação e coagregação foram realizadas conforme descrito por Collado et al. (2008) e a hidrofobicidade foi realizada como descrito por Vinderola e Reinheimer (2003), ambas com modificações. Suspensões celulares das culturas crescidas em caldo MRS a 37 °C por 24 h a uma absorbância de $0,25 \pm 0,02$ a 600nm, foram preparadas para os testes. A autoagregação foi determinada a 37 °C nos tempos de 2 h, 20 h e 24 h. A absorbância foi medida a 600nm e os resultados foram expressos em percentual, conforme $[1 - (A_{600nm} \text{ da suspensão inicial} / A_{600nm} \text{ da suspensão final}) \times 100]$. Para determinar a capacidade de coagregação do isolado ao patógeno *L. monocytogenes*, volumes iguais (2 mL de *L. monocytogenes* e 2 mL do micro-organismo avaliado) das suspensões celulares bacterianas foram misturados e incubados a 37 °C. A absorbância foi monitorada em 2 h, 4 h e 24 h. Os resultados foram expressos em percentual, conforme $[(A_{pat} + A_{isol})/2 - (A_{mix}) / (A_{pat} + A_{isol})/2] \times 100$, onde A_{pat} e A_{isol} representam a absorbância das suspensões bacterianas em separado em tubos controle e A_{mix} representa a absorbância das suspensões celulares misturadas nos diferentes tempos (0 h e 24 h). Para avaliar a adesão bacteriana ao hidrocarboneto, reagente tolueno (®Synth) foi empregado a suspensão celular (3 mL) foi agitada em vórtex por 60 segundos com 400 µL de octano. Depois de 2 h a 37 °C, a fase aquosa foi cuidadosamente removida e a absorbância a 600nm foi medida no espectrofotometro. A hidrofobicidade foi determinada como o percentual de adesão, conforme $[(A_0 - A) / A] \times 100$, onde A_0 e A são as absorbâncias antes e depois da extração com tolueno, respectivamente. O experimento foi realizado em duplicata.

5.10 Tolerância a condições ácidas

A resistência dos isolados sob diversas condições ácidas foi realizada de acordo com Erkkila e Petaja (2000), com algumas modificações. Bactérias ácido-láticas foram inoculadas em caldo MRS a 37 °C por 24 h. A resistência dos isolados sob diferentes condições ácidas foi avaliada em caldo MRS (pH 7,0) ajustado a pH 2,0; 3,0 e 4,0 com ácido clorídrico (HCL) concentrado, sendo que o pH 7,0 foi usado como controle. Um mililitro (1 mL) da cultura foi adicionado aos tubos contendo 10 mL de caldo MRS

acidificado. Após a exposição às condições ácidas por 0 h, 2 h, e 4 h, diluições seriadas de cada tempo foram inoculadas em placas contendo ágar MRS e incubadas à 37 °C por 24 h. Os dados foram expressos como valores de log.UFC.mL⁻¹. A viabilidade celular foi calculada com a seguinte equação: % de sobrevivência: contagem final (UFC.mL⁻¹) / controle (UFC.mL⁻¹) x 100.

5.11 Resistência aos sais biliares

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

5.12 Tolerância ao trato gastrointestinal de forma simulada

A avaliação de tolerância ao trato gastrointestinal foi avaliada de forma simulada conforme Huang e Adams (2004). Após 24 h de incubação a 37 °C foram separadas por centrifugação (1200 x g por 5 minutos) as células dos micro-organismos isolados, foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salina (0,85%) (PBS, @Laborclin), e ressuspensas em solução salina a 0,5%. Uma alíquota de 200 µL da suspensão celular foi ministrada a 0,3 mL de solução salina e 1 mL de suco gástrico ou intestinal simulado e incubados a 37 °C. A contagem de células viáveis foi realizada no tempo 0 h, 2 h e 4 h para a tolerância gástrica e para a determinação da tolerância ao trato no intestino delgado. O suco gástrico simulado consistiu em pepsina (3 mg.mL⁻¹) e pH 2 com ou sem a adição de leite integral; enquanto o suco intestinal simulado foi composto por pancreatina (1 mg.mL⁻¹), pH 8,0 com ou sem adição de 0,5% de sais biliares. O efeito da presença de um alimento na sobrevivência durante o trato gástrico em pH 2,0

foi avaliado da mesma forma, porém, substituindo a solução salina (0,85%) por 0,3 mL de leite integral reconstituído a 10% (m/v). A contagem do número de células viáveis durante a simulação pelo trato gástrico e pelo trato intestinal foi realizada nos tempos de 0 h, 2 h e 4 h em placas de Petri contendo ágar MRS. Os dados foram expressos como valores de $\log.UFC.mL^{-1}$.

5.13 Ensaio de citotoxicidade (MTT)

O ensaio de MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio] foi realizado de acordo com o método de Mosmann (1983). Em resumo, culturas de células VERO ($3,0 \times 10^5$ células. mL^{-1}) foram preparadas em placas de 96 poços; em seguida, foram adicionados 200 mL de diluições em série (0,02 a 2,5 $mg.mL^{-1}$) de suspensão bacteriana do isolado A2, ou 20 $mg. mL^{-1}$ SDS (controle positivo). E-MEM fresco foi usado como controle negativo. As placas foram incubadas por 24 h a $37^\circ C$ em atmosfera umidificada com 5% de CO_2 . Posteriormente, o meio foi retirado de todos os poços por sucção e adicionado a cada poço 50 mL de solução MTT 1 $mg. mL^{-1}$ (USB Corporation) preparada em meio E-MEM. As placas foram incubadas durante 4 h a $37^\circ C$. A solução de MTT foi removida cuidadosamente, e 100 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço, para dissolver os cristais de formazano. As placas foram agitadas suavemente durante 5 minutos, e os cristais foram completamente dissolvidos. Posteriormente, a absorbância foi lida em um leitor de microplaca 680 (Bio-Rad Laboratories) a 540nm.

5.14 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando a análise de variância Two-Way (ANOVA) com auxílio do programa GraphPad Prism 7.0 e o teste de comparação de médias (teste Tukey), tomando como base os níveis de significância maiores que 95% ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização dos isolados de BAL

No presente estudo foram selecionados oito (n=8) isolados os quais foram caracterizados como Gram-positivos e catalase negativa e destes, cinco (n=5) com morfologia de cocos (A1, A3, A4, A5, A6), provenientes de kefir e três (n=3) de bacilos (A2, A7, KAC), proveniente de kombucha artesanal.

6.2 Aspectos de segurança

Todos os isolados apresentaram resultados negativos para presença das enzimas gelatinase, DNase e β -hemolisina. No teste de gelatinase, enzima responsável por degradar proteínas como colágeno, hemoglobina, dentre outros peptídeos bioativos, todos os isolados apresentaram resultado negativo. Dias (2015) ao avaliar as propriedades funcionais de BAL isoladas de leite cru de ovelha, não observou a presença da enzima em nenhum de seus isolados.

Ao avaliar a presença da enzima DNase, responsável por degradar ácidos nucleicos, todos os isolados apresentaram resultados negativos. Nossos resultados corroboram com Luiz et al. (2015), os quais isolaram 50 BAL oriundas de leite caprino, e verificaram que nenhum dos isolados apresentou atividade da enzima.

Todos os isolados do presente estudo, apresentaram resultado negativo para a atividade hemolítica (α -hemólise), ou seja, as bactérias analisadas, não apresentaram nenhuma alteração de coloração ao redor das colônias em ágar Sangue. Este resultado é de suma importância visto que a enzima β -hemolisina possui capacidade de lisar eritrócitos humanos e animais (BARBOSA et al., 2010). Corroborando com o presente estudo, Uecker (2018), ao avaliar BAL de diferentes produtos lácteos, não encontrou a presença desta enzima em nenhum de seus isolados.

6.2.5 Suscetibilidade a Antimicrobianos

De acordo com a Tabela 3, pode ser observado os resultados de suscetibilidade dos isolados de kefir e de kombucha frente aos antimicrobianos de uso clínico.

Tabela 3. Resultados da suscetibilidade dos isolados à análise antimicrobiana. Os valores foram expressos em média \pm desvio padrão.

Isolados	*VAN	PEN	MER	ERI	CLO
Classificação CLSI (mm)	**R \leq 14-I-S \geq 17	R \leq 14-I-S \geq 15	R \leq 15-I-S \geq 21	R \leq 13-I-S \geq 23	R \leq 12-I-S \geq 18
***A1	17,0 \pm 0,01	23,0 \pm 0,02	25,0 \pm 0,01	36,0 \pm 0,03	32,0 \pm 0,02
A2	19,0 \pm 0,01	25,0 \pm 0,01	25,0 \pm 0,02	39,0 \pm 0,02	35,0 \pm 0,03
A3	18,0 \pm 0,03	25,0 \pm 0,02	25,0 \pm 0,02	38,0 \pm 0,02	39,0 \pm 0,02
A4	17,0 \pm 0,01	24,0 \pm 0,03	24,0 \pm 0,03	15,0 \pm 0,01	29,0 \pm 0,04
A5	18,0 \pm 0,02	23,0 \pm 0,04	25,0 \pm 0,02	15,0 \pm 0,02	34,0 \pm 0,02
A6	18,0 \pm 0,03	24,0 \pm 0,02	24,0 \pm 0,01	20,0 \pm 0,03	24,0 \pm 0,01
A7	17,0 \pm 0,02	24,0 \pm 0,02	25,0 \pm 0,02	21,0 \pm 0,02	23,0 \pm 0,02
****KAC	18,0 \pm 0,02	24,0 \pm 0,02	25,0 \pm 0,01	26,0 \pm 0,02	23,0 \pm 0,02

*Antimicrobianos: VAN: vancomicina; PEN: penicilina; MER: meropenem; ERI: eritromicina; CLO: cloranfenicol

**Classificação segundo CLSI: R: resistente; I: intermediário; S: sensível

***A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7: isolados de kefir de leite

****KAC: isolado de kombucha

Verificou-se que todos os isolados apresentaram suscetibilidade à vancomicina, penicilina, meropenem e cloranfenicol. Quando analisada a susceptibilidade dos isolados ao antimicrobiano eritromicina, os isolados A4, A5, A6 e A7 demonstraram sensibilidade intermediária por apresentar halo de inibição superior a 13 mm e inferior a 23 mm. Já os demais isolados (A1, A2, A3 e KAC) demonstraram sensibilidade a este antimicrobiano.

Essa avaliação é importante e necessária para garantir a segurança após a ingestão das cepas probióticas, embora as BAL sejam previamente consideradas seguras para o consumo (FAO/WHO,2002). Para aplicação alimentícia é de suma importância que os isolados apresentaram suscetibilidade aos antibióticos (DIAS, 2015), visto que sua resistência é passível de transmissão para os demais micro-organismos residentes na microbiota humana (CLSI, 2015). Desta forma, o assunto tornou-se uma grande preocupação para saúde pública, despertando a atenção dos pesquisadores e dos profissionais da saúde do mundo todo (SHARMA et al., 2014).

Lima (2018), ao analisar BAL resultantes da fermentação de grãos de kefir em leite ovino, encontrou suscetibilidade em todos os isolados, incluindo penicilina e clindamicina. Da mesma forma que Lima (2017), ao utilizar 10 antimicrobianos em 10 amostras de *Staphylococcus* isolados de queijo tipo minas artesanal, constatou suscetibilidade para oito (n=8) antimicrobianos, incluindo a vancomicina.

Faria (2017), ao investigar o potencial probiótico de micro-organismos veiculados em leites fermentados comerciais, certificou que todos os isolados apresentaram suscetibilidade à cloranfenicol e a penicilina. No entanto, as amostras apresentaram resistência à vancomicina, contrapondo os resultados da presente pesquisa. Porém, alguns gêneros de BAL podem apresentar resistência intrínseca à vancomicina, não sendo desta forma, um dado desfavorável, pois neste caso, a transmissão dos genes de resistência é contida (TEUBER et al., 1999).

Santos (2015), demonstrou em seu estudo que dos 10 antimicrobianos testados, incluindo eritromicina cloranfenicol, penicilina e vancomicina, também utilizados no presente estudo, demonstraram efeito de inibição sobre o crescimento de 13 isolados de BAL.

Omura (2014) realizou sua pesquisa com o objetivo de verificar a sensibilidade antimicrobiana de 11 isolados de BAL provenientes de leite humano, por meio do método de difusão de discos. Destas amostras analisadas, nenhuma apresentou resistência ao meropenem, o que corroborou com os resultados encontrados, onde não houve resistência dos isolados a este antimicrobiano.

Nesse aspecto, observou-se que o isolado A2 não possui perfil de resistência a nenhum dos antimicrobianos utilizados, da mesma forma que todos os isolados apresentaram suscetibilidade à vancomicina, penicilina, meropenem e cloranfenicol, não demonstrando risco à saúde do consumidor. Resultado promissor, uma vez que a capacidade de uma bactéria resistir aos antimicrobianos pode representar uma ameaça à saúde humana, por estar diretamente ligado à segurança alimentar (JERONYMO-CENEVIVA et al., 2014; FAO/WHOO, 2006).

6.3 Avaliação das Propriedades Tecnológicas

6.3.1 Atividade Antimicrobiana

Na avaliação da atividade antimicrobiana, dos oito (n=8) isolados, cinco (n=5) apresentaram potencial inibitório de crescimento (62,5%) contra as quatro culturas utilizadas como indicadoras (**Tabela 4**). Deve-se destacar que o isolado KAC, proveniente de kombucha, apresentou atividade antagonista contra todos os patógenos alimentares testados.

Tabela 4. Análise da atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de kefir e de kombucha. Os resultados foram expressos em milímetros (mm) \pm desvio padrão.

Isolado	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia</i> <i>coli</i> ATCC 43895	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> ATCC 7644
*A1	26,0 \pm 0,02	33,0 \pm 0,01	19,0 \pm 0,03	25,0 \pm 0,01
A2	39,0 \pm 0,01	26,0 \pm 0,02	20,0 \pm 0,04	16,0 \pm 0,02
A3	25,0 \pm 0,01	29,0 \pm 0,04	21,0 \pm 0,02	17,0 \pm 0,02
A4	18,0 \pm 0,02	00,0 \pm 0,00	19,0 \pm 0,01	19,0 \pm 0,03
A5	16,0 \pm 0,03	13,0 \pm 0,02	00,0 \pm 0,00	00,0 \pm 0,00
A6	00,0 \pm 0,00	00,0 \pm 0,00	19,0 \pm 0,02	16,0 \pm 0,02
A7	16,0 \pm 0,02	15,0 \pm 0,01	18,0 \pm 0,02	20,0 \pm 0,02
**KAC	15,0 \pm 0,01	16,0 \pm 0,02	19,0 \pm 0,01	15,0 \pm 0,02

* A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7: isolados de kefir de leite

** KAC: isolado de kombucha artesanal

Ao analisar o efeito inibitório dos isolados A1, A2, A3, A7 e KAC, observou-se a atividade antimicrobiana por meio da formação de halos inibitórios, indicando a inibição do crescimento de bactérias patogênicas, comuns em alimentos. Esta capacidade inibitória de BAL está diretamente ligada à produção de ácido por meio do metabolismo de carboidratos. Ademais, algumas espécies possuem a capacidade de produzir peptídeos, conhecidos como bacteriocinas e peróxido de hidrogênio que inibem o crescimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes (DE SOUZA BARBOSA et al., 2015; DIAS et al., 2018). Por isso, há um interesse crescente por aplicação de BAL produtoras de substâncias antimicrobianas em matrizes alimentares (CASTELLANO et al., 2017; YAZGAN et al., 2021).

Contrariamente, quando analisado o isolado A4 não foi observada atividade antimicrobiana frente ao micro-organismo indicador *S. aureus* (Gram-positivo), da mesma forma que, quando analisado a ação do isolado A5 não foi observada inibição frente a *E. coli* (Gram-negativo) e *L. monocytogenes* (Gram-positivo), e o mesmo foi observado quando analisado o isolado A6 frente a inibição de *S. Enteritidis* (Gram-negativo) e *S. aureus* (Gram-positivo).

A parede bacteriana consiste em uma das mais importantes estruturas da bactéria, é esta que fornece a resistência física as diferentes osmolaridades dos meios intra e extracelular, além de manter a forma da célula, serve como suporte para estruturas de locomoção do micro-organismo. A parede celular das espécies Gram-positivas possui uma camada de peptidoglicano espessa enquanto que as Gram-negativas possuem uma parede mais complexa, além de possuir uma camada de peptidoglicano, possui uma membrana externa composta de lipopolissacarídeo, o que torna a bactéria mais resistente a agressores externos e a ambientes ácidos (MOREIRA et al., 2015). No entanto, no presente estudo não foi observada variação no modo de ação entre os micro-organismos indicadores Gram-positivos ou Gram-negativos.

Análise semelhante realizada por Ribeiro (2019), demonstrou que das 154 amostras de BAL isoladas da microbiota de leite de búfala, 148 (96,1%) apresentaram atividade antagonista em pelo menos um dos micro-organismos testados, e 58 (37%) demonstraram capacidade antagonista frente a todos os micro-organismos alvo utilizados (*L. monocytogenes*, *S. aureus* e *S. Enteritidis*).

Após a constatação dos resultados, o presente estudo analisa futura aplicação dos isolados de grão de kefir e de kombucha em matrizes alimentares, por entender que estes isolados apresentam função antagônica perante a presença de micro-organismos potencialmente patogênicos.

É preciso salientar que, mesmo após a comprovação das atividades terapêuticas que um probiótico pode apresentar após sua ingestão, sua aplicação em indivíduos imunossuprimidos como doenças malignas, pós transplante de órgãos e bebês sob cuidados neonatais, deve ser realizado com muita precaução (KIM e KOUSHIK, 2020). O uso desses micro-organismos pode causar translocação bacteriana, desenvolvendo

infecções oportunistas e, como resultado, desenvolvendo quadros graves de pneumonia, endocardite e sepse (ZAWISTOWSKA-ROJEK e TYSKI, 2018).

6.3.2 Fermentação de glicose

Os isolados foram analisados quanto a produção de fermentação de glicose, teste importante para verificação da aplicabilidade dos micro-organismos nos alimentos. Quanto aos resultados, cinco (n=5) isolados (A1, A4, A6, A7 e KAC) foram considerados como homofermentativos, apresentando apenas turvação do meio, e três (n=3) isolados (A2, A3, A5) foram considerados heterofermentativos, produzindo gás em seu meio.

As bactérias homofermentativas, produzem o ácido láctico como o principal produto resultante da fermentação de glicose, já as heterofermentativas, podem produzir dióxido de carbono, ácido acético, etanol, aldeído e diacetileno, além do ácido láctico (HERMANS, 2013). Portanto, as BAL heterofermentativas, assim como os isolados A2, A3 e A5 deste estudo, além de conferir melhor sabor e textura aos alimentos, contribuem para o aroma do produto, devido à capacidade de produzirem compostos flavorizantes (PEREIRA et al., 2020). Os micro-organismos pertencentes a esse grupo, costumam fazer parte da fermentação secundária, favorecendo também a cura de queijos. No entanto, em produtos como iogurte, onde a produção de gás é indesejável, bactérias homofermentativas (A1, A4, A6, A7 E KAC) tornam-se a melhor opção, evitando desta forma, problemas com *flavor*, causados pela formação do ácido acético (KOSTINEK et al., 2007).

Silva (2019), ao avaliar o potencial tecnológico de BAL isoladas de leite caprino, observou que nenhum dos isolados apresentou a capacidade de produção de gás a partir da fermentação de glicose, concluindo que todos os isolados apresentam metabolismo homofermentativo. Já de Almeida Júnior et al. (2015), ao avaliar BAL oriundas de leite caprino, observou que dos 58 isolados, nove apresentaram produção de gás, características também apresentadas neste estudo.

6.4 Atividade Antioxidante

6.4.1 Capacidade antioxidante pelo método DPPH

Com o método empregado foi possível demonstrar capacidade antioxidante de todos os isolados (**Figura 1**), que por meio da redução do radical estável DPPH, promoveu mudança de sua coloração violeta escuro para violeta claro ou amarelo (SOUSA et al., 2007).

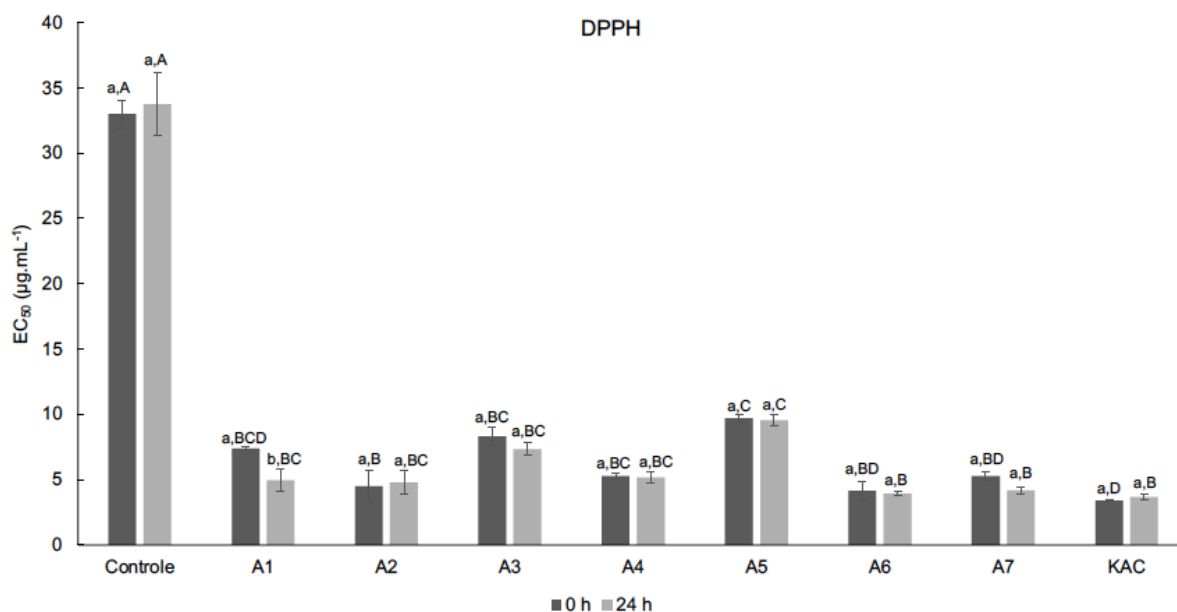


Figura 1 – Capacidade de sequestro do radical DPPH por bactérias ácido-láticas isoladas de kefir de leite e de kombucha, após 1 h e 24 h. Os resultados foram expressos em EC₅₀ µg mL⁻¹.

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) com o passar do tempo em um isolado.

Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os isolados.

A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7 – Isolados de kefir de leite.

KAC – Isolado de Kombucha artesanal.

Quando realizada a comparação dos isolados no período de 1 h e 24 h, apenas o isolado A1 apresentou diferença significativa, demonstrando que a concentração mínima para reduzir 50% do DPPH inicial, reduziu com o tempo de inibição, resultado favorável, já que a capacidade antioxidante do isolado é diretamente proporcional a concentração celular mínima capaz de reduzir o radical. Para os demais isolados, não

foram observadas diferenças significativas, mostrando que a capacidade antioxidante permaneceu a mesma ao longo de 24 h.

Ao comparar os isolados em um mesmo tempo (1 h ou 24 h), apurou-se que as amostras de A2, A6 e KAC apresentaram maior inibição do radical, indicando assim, um maior potencial antioxidante que os demais isolados analisados.

Em um estudo semelhante realizado por Nascimento (2017), o qual avaliou a capacidade antioxidante de duas amostras de leites fermentados por BAL suplementado com *E. faecium*, utilizando o método DPPH, foi observado que ambas amostras apresentaram capacidade de sequestro do radical DPPH, apresentando uma variação de $0,92 \pm 0,34\%$ a $18,23 \pm 0,89\%$ e de $1,19 \pm 0,10\%$ a $18,97 \pm 1,58\%$ em ambas amostras de leite fermentado.

De maneira geral, os antioxidantes são substâncias formadas a partir de vitaminas, de minerais, de enzimas e de coenzimas, que em baixas concentrações, possuem a capacidade de inibir a oxidação de substratos de maneira eficiente, atenuando os malefícios causados pela produção exacerbada de radicais livres. Ao entrarem em contato com um átomo desestabilizado, sua principal função é doar um elétron, para assim, evitar o processo oxidativo e amenizar os danos causados às células (ROCHA; SARTORI; NAVARRO, 2016).

Os radicais livres são átomos ou moléculas inorgânicas ou orgânicas que possuem um ou mais elétrons não pareados em sua última camada eletrônica. Essas moléculas reagem com qualquer composto localizado próximo a sua órbita externa, podendo assim, receber um elétron, conhecido como oxidação ou doar um elétron, chamado de redução (VALKO, 2007). Derivados de subprodutos do metabolismo aeróbio, estas substâncias quando produzidas de forma adequada, ao entrarem em contato com as células, possibilitam uma proteção antioxidante eficaz do meio, capaz de inativá-las (KASOTE, 2015), contudo, em altas concentrações, ou com um organismo deficiente em atividade antioxidante, sua presença pode causar estresse oxidativo, danificando as células (BARBOSA et al., 2013). Com a ingestão de alimentos naturais ricos em antioxidantes, as consequências das reações oxidativas podem ser diminuídas (ROLIM; PEREIRA; ESKELSEN, 2013). De acordo com os resultados

encontrados, todos os isolados demonstraram características antioxidantes desejáveis a futuras aplicações em alimentos.

6.4.2 Inibição da peroxidação lipídica pelo método de TBARS

Para estimar a peroxidação lipídica das amostras foi empregado o método de TBARS. Para isso, utilizou-se sulfato ferroso como pró-oxidante, e como substrato, utilizou-se azeite de oliva (ácido graxo monoinsaturado) (SOUZA et al., 2017).

Ao analisar o extrato de sobrenadante bruto dos isolados em estudo com o azeite de oliva, foi observada redução do processo oxidativo (**Figura 2**), indicando que todos os isolados apresentaram inibição significativa da peroxidação lipídica, sugerindo potencial ação antioxidante.

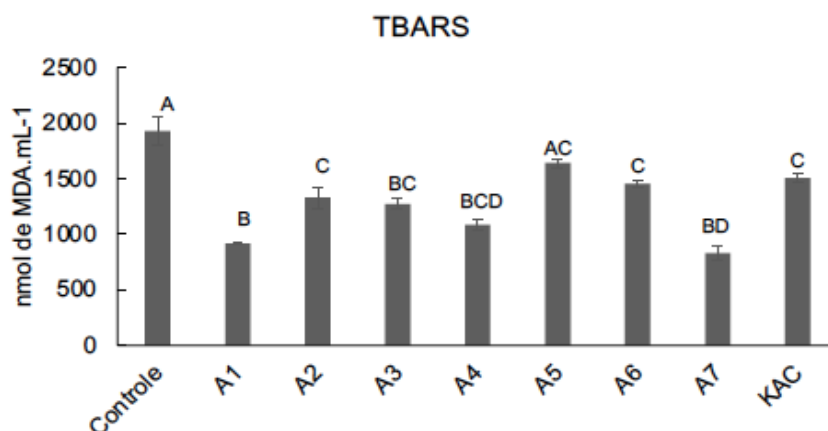


Figura 2 – Atividade antioxidante de bactérias ácido-láticas isoladas de kefir de leite e de kombucha, analisada pelo método de TBARS após 1 h. Os resultados foram expressos em nmol de MDA mL⁻¹.

Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os isolados.

A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7 – Isolados de kefir de leite.

KAC- Isolado de kombucha artesanal.

Souza (2019) ao avaliar a capacidade oxidativa de iogurtes a base de leite caprino, utilizando o método de TBARS, observou que todas as amostras apresentaram oxidação lipídica após o sétimo dia de armazenamento. Tal achado pode contribuir para alteração das características sensoriais do produto, pois a permanência desse processo implica em danos durante seu armazenamento, por estar diretamente relacionado aos

sabores rançosos indesejáveis (ESTRADA et al., 2011). A partir deste estudo, observou-se que a reação de oxi-redução dos produtos lácteos corresponde a sua composição lipídica e que, portanto, quanto maior a concentração de ácido graxo, maior será sua oxidação (TIMMONS et al., 2001).

A partir dos resultados encontrados, sugere-se que a aplicação dos isolados em estudo em uma matriz alimentar composta de ácido graxo, poderia apresentar maior durabilidade durante o período de armazenamento, visto que as bactérias adicionadas evitariam a oxidação lipídica do alimento.

6.5 Características probióticas

A autoagregação parece ser necessária para a adesão de linhagens probióticas às células epiteliais e, aliada a habilidade de co-agregação, podem formar uma barreira para prevenir a colonização por patógenos (COLLADO et al., 2008). Collado et al. (2007) fazem algumas considerações importantes sobre a inibição da adesão de patógenos pelos probióticos ao afirmar que esta habilidade parece depender tanto do probiótico como do patógeno, indicando alta especificidade.

Na **Figura 3** podem ser observados os resultados obtidos na avaliação da capacidade de autoagregação dos micro-organismos isolados em estudo. Por meio dos resultados, pode-se observar que os maiores percentuais de autoagregação foram observados nos isolados A2 (77,46%) e KAC (70,98%). Os valores de autoagregação aumentaram com o tempo de incubação, sendo melhor evidenciada a partir de 4 h até o período final de incubação (24 h). A maioria dos isolados apresentou mais de 50% de agregação após 24 h, o que pode sugerir capacidade de ligação no trato gastrointestinal.

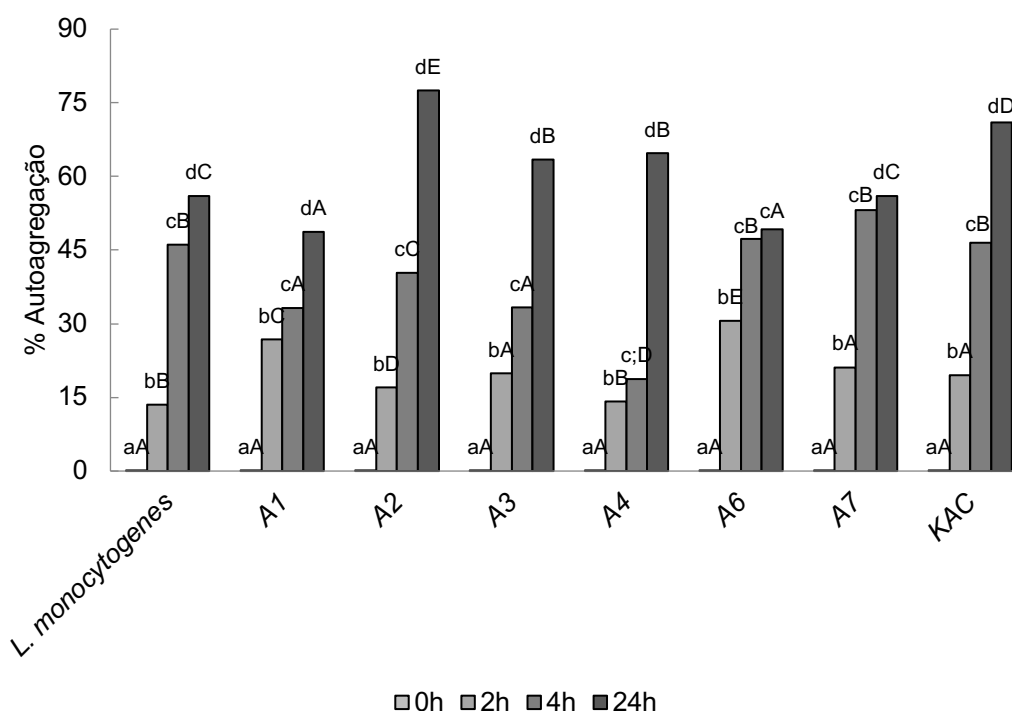


Figura 3 – Capacidade de autoagregação para os micro-organismos isolados para os tempos de 0, 2, 4 e 24 h.

Letras minúsculas iguais em um mesmo isolado indicam que não houveram diferenças significativas com o decorrer do tempo de análise.

Letras maiúsculas iguais em um mesmo tempo indicam que não ocorreram diferenças significativas entre os isolados.

A2- Isolado de kefir de leite.

KAC- Isolado de kombucha artesanal.

A capacidade de autoagregação e coagregação entre bactérias exerce um papel fundamental na prevenção de colonização de micro-organismos patogênicos invasores (GARCÍA-CAYUELA et al., 2014). A agregação é um fenótipo que representa a capacidade de aderência da célula (KOS et al., 2003). As oscilações de pH na superfície da membrana celular e suas propriedades específicas podem influenciar a comunicação das bactérias com a mucosa do trato gastrointestinal, induzindo sua localização no intestino e sua funcionalidade (WASKO et al., 2014; HADDAJI et al., 2015), bem como, algumas proteínas associadas com a camada S da célula, que podem atuar como fatores de aderência, contribuindo diretamente com a capacidade de autoagregação e coagregação de uma bactéria (DEEPIKA e CHARALAMPOPOULOS, 2010).

A **Figura 4** mostra a capacidade de coagregação de cada isolado frente ao patógeno *L. monocytogenes*.

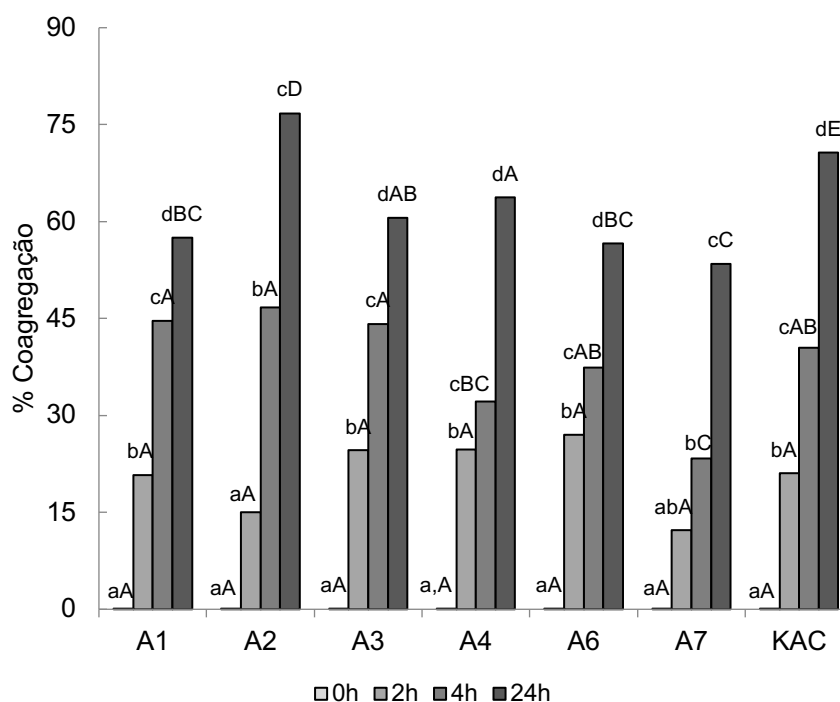


Figura 4 – Capacidade de coagregação para os micro-organismos isolados para os tempos de 0, 2, 4 e 24 h.

Letras minúsculas iguais em um mesmo isolado indicam que não houveram diferenças significativas com o decorrer do tempo de análise.

Letras maiúsculas iguais em um mesmo tempo indicam que não ocorreram diferenças significativas entre os isolados.

A2- Isolado de kefir de leite.

KAC- Isolado de kombucha artesanal.

De acordo com os resultados apresentados neste estudo, os isolados de A2 (76,77%), KAC (70,65%) e A4 (63,71%), apresentaram maiores percentuais de coagregação com o isolado de *L. monocytogenes*, obtidos em 24 h de análise.

A coagregação, capacidade das células de formar agrupamentos entre bactérias geneticamente distintas com agentes patogênicos, é essencial e desejável para que ocorra uma exclusão competitiva de micro-organismos indesejáveis na microbiota intestinal. Desta forma, ao excretar substâncias inibidoras, as cepas coagregantes controlam o ambiente e evitam que agentes patogênicos aja no local (COLLADO; MERILUOTO; SALMINEN, 2007; KAEWNOPPARAT et al., 2013).

Bao et al. (2010) em seu estudo, ao avaliar a capacidade de coagregação de espécies bacterianas de *Lactobacillus* frente a micro-organismos patogênicos (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Shigella flexneri*, *S. typhimurium*, *E. coli* O157), concluiu que a BAL impediu a ação de agentes potencialmente patogênicos ao intestino humano. Portanto, os isolados potencialmente probióticos precisam apresentar a capacidade de coagregar com estirpes patogênicas e sabe-se que os probióticos comerciais apresentam geralmente essa habilidade após 20 h de exposição, a depender das condições de incubação das amostras (COLLADO et al., 2007).

Paixão (2016) ao analisar a capacidade de coagregação de BAL frente a duas espécies de bactérias patogênicas (*S. Typhi* (ATCC 6539) e *L. monocytogenes* (ATCC 7644)), constatou que os resultados mais promissores foram obtidos no decorrer das 5 h, contudo, o autor sugere que o tempo de incubação pode ter influenciado, necessitando um tempo experimental maior. O autor ainda observou que a maior porcentagem média da atividade foi encontrada a partir da interação com *L. monocytogenes*, correspondente a 5,8%, o que foi considerado baixo. Em geral, as BAL pertencentes a espécie de *Lactobacillus* possuem uma maior capacidade de coagregação com isolados de *L. monocytogenes* (DIAS et al., 2013).

Ressalta-se ainda que, essa característica pode ser desejável se a outra cepa for probiótica, nesse sentido, a coagregação precisa ser analisada, pois havendo produção de bacteriocinas pelos probióticos a coagregação pode desempenhar uma função importante na prevenção de biofilmes, facilitando a eliminação dos agentes patogênicos na flora intestinal (TODOROV et al., 2011; TODOROV et al., 2012).

Resultados semelhantes foram obtidos por Nascimento (2017), que ao avaliar a capacidade de coagregação de novas linhagens de BAL probióticas, obteve as maiores concentrações após 24 h de incubação, com valores entre 67% e 72%. O autor ressalta que apesar dos isolados não produzirem compostos antimicrobianos, a produção de ácidos orgânicos pela bactéria, responsável pela alteração do pH do meio, pode representar uma certa desvantagem perante aos demais agentes patogênicos no meio.

Na **Figura 5** podem-se observar os resultados obtidos na avaliação da capacidade hidrofobicidade dos micro-organismos isolados. A capacidade de hidrofobicidade dos micro-organismos aumentou no decorrer do tempo avaliado, dentre

os isolados com maior capacidade de hidrofobicidade, destacam-se os isolados A2 com 40,79%, seguidos dos isolados KAC com 39,32% e A4 com 37,67%.

A capacidade de autoagregação juntamente com a hidrofobicidade pode ser usada para selecionar bactérias potencialmente probióticas (COLLADO et al., 2008).

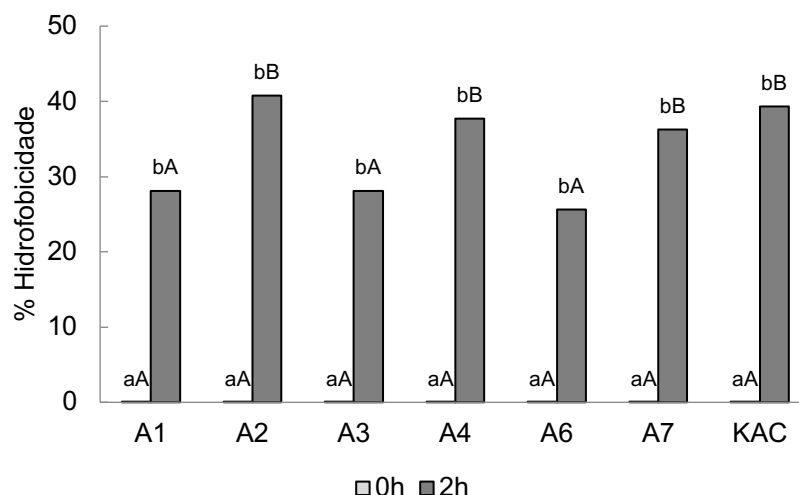


Figura 5 – Capacidade de hidrofobicidade dos micro-organismos no tempo de 2 h.

Letras minúsculas iguais em um mesmo isolado indicam que não houveram diferenças significativas com o decorrer do tempo de análise.

Letras maiúsculas iguais em um mesmo tempo indicam que não ocorreram diferenças significativas entre os isolados.

A2- Isolado de kefir de leite.

KAC- Isolado de kombucha artesanal.

Os resultados obtidos no presente estudo, são semelhantes ao encontrado por Araujo et al. (2016) que ao avaliar a capacidade de hidrofobicidade de BAL obtidas de queijo coalho, observou que a maioria dos isolados obtiverem valores médios de 20% a 30% de adesão e apenas um isolado apresentou índice a cima de 70%. Da mesma forma que Hermanns (2013), ao realizar o mesmo experimento, observou que dos cinco (n=5) isolados analisados, quatro (n=4) apresentaram percentual de hidrofobicidade maior que 70%, classificando-as como potencialmente hidrofóbicas.

Han et al. (2017), constatou em seu estudo que a maioria das BAL que apontaram alta capacidade de hidrofobicidade, também demonstraram alto índice de adesão as células Caco-2.

Para que uma bactéria possa aderir-se a mucosa intestinal e, assim colonizá-la, é necessário que haja interação entre adesinas, compostos da parede celular e receptores da mucosa intestinal. É a partir da relação desses elementos que a bactéria consegue aderir-se a mucosa, proporcionando maior segurança na presença do peristaltismo intestinal e pela passagem de fluidos que provocam eliminação dos micro-organismos para o exterior do organismo (GARCÍA-CAYUELA et al., 2014).

Com base nos resultados expostos até o momento, foram selecionados dois isolados para a continuidade do estudo. Assim, A2 e KAC foram analisados quanto a tolerância às condições ácidas, aos sais biliares e ao trato gastrointestinal. Ainda, após estas análises, foi realizada a análise de citotoxicidade do isolado A2 por meio do ensaio de MTT.

6.5.1 Tolerância às condições ácidas

A tolerância às condições ácidas está apresentada na **Figura 6**. De acordo com os resultados obtidos foi possível comparar o comportamento dos isolados frente aos diferentes pHs testados e, conforme o esperado, quanto mais ácido o meio, menor a concentração celular, apontando maior sensibilidade dos isolados em ambientes ácidos. Porém, observa-se que o aumento do pH não extingue a presença dos isolados, sugerindo sua tolerância às condições ácidas. Assim, os resultados do presente estudo demonstram que ambos os isolados, possuem capacidade de resistir a ambientes ácidos, semelhantes aos encontrados no trato gastrointestinal.

Araújo (2017) ao analisar a resistência de cinco (n=5) isolados de BAL provenientes de queijo coalho sob condições ácidas, verificou que estes apresentaram melhor viabilidade ao pH 3,0, sugerindo que o pH mais ácido influencia em seu desenvolvimento. O autor verificou ainda que a contagem de colônias submetidas ao pH 2,5, após 3 h de exposição, apresentou redução da sobrevivência das células, contudo, os valores permaneceram viáveis.

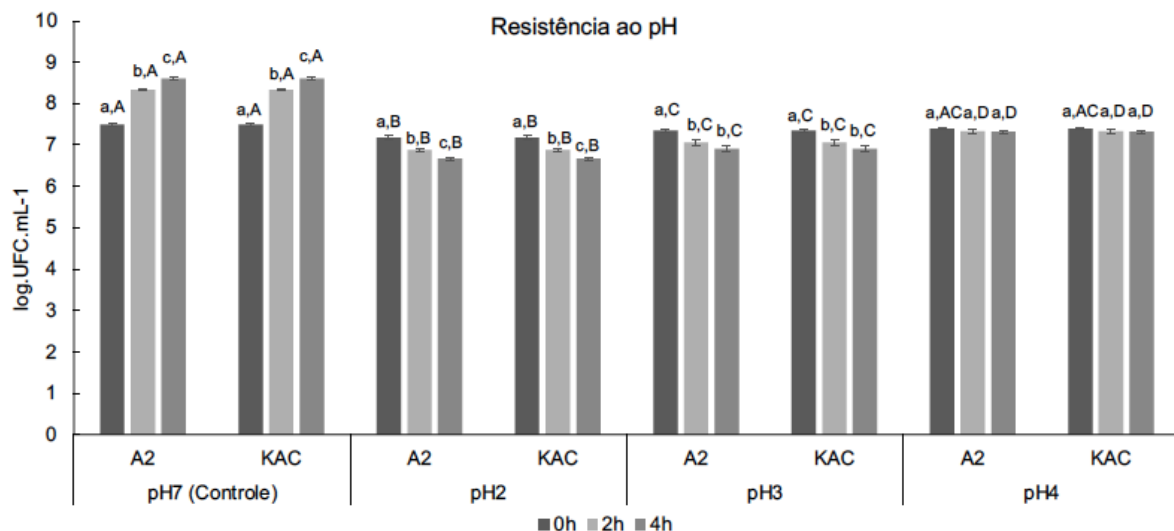


Figura 3 – Análise de resistência dos micro-organismos A2 e KAC às condições ácidas (pH).

Letras minúsculas iguais na mesma coluna e em um mesmo isolado indicam que não ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) com o decorrer do tempo.

Letras minúsculas iguais na mesma coluna e em um mesmo tempo indicam que não ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os isolados.

Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os pHs em um mesmo tempo.

A2- Isolado de kefir de leite.

KAC- Isolado de kombucha artesanal.

Após a ingestão alimentar, o suco gástrico, o qual possui pH de aproximadamente 2,5, é secretado pelo organismo, com o objetivo de promover a digestão, auxiliando na degradação dos alimentos consumidos (KIMOTO et al., 2000). Por isso, a sobrevivência de cepas probióticas na presença do suco gástrico durante a digestão, é uma importante característica a ser considerada para a sua seleção (AVAIYARASI et al., 2016). Comparando isolados de diferentes ambientes, os isolados de origem animal, comumente apresentam maior característica probiótica, devido a exposição similar ao ambiente originalmente encontrado (SAARELA et al., 2000).

Lima (2018) ao avaliar a taxa de sobrevivência de BAL isoladas de leite ovino fermentado por grãos de kefir em pH ácido, observou que todos os isolados apresentaram maior tolerância ao pH 5,0, porém ao serem expostos ao pH 2,0 e 3,0 apresentaram redução da viabilidade celular. O autor sugere que os isolados analisados não resistiram ao meio ácido devido ao longo tempo de amostragem (4 h).

Demais autores, sugerem que esse contato pode ter duração máxima de 3 h (REN et al., 2014; ARCHER e HALAMI, 2015). Após verificar que os mesmos isolados sobreviveram a simulação de digestão *in vitro* adicionado de leite, Lima (2018) conclui que pode existir viabilidade microbiana quando adicionados e consumidos junto a matriz alimentar, como o leite.

Ao realizar o teste de resistência ao trato gastrointestinal de forma simulada em BAL isoladas de kombucha, Garcia (2017) verificou que de forma geral, nas primeiras 3 h, todos os isolados apresentaram declínio da concentração, tanto em meio ácido, quanto em pH neutro. Para o mesmo período, foi observado que no pH 3,0, as bactérias apresentaram menor resistência quando comparado aos pH 5,0 e 7,2.

Assim, apesar de alguns autores terem encontrado resultados insatisfatórios ao avaliar a resistência bacteriana ao pH ácido estomacal, o leite pode apresentar efeito protetor sobre os micro-organismos fermentadores, podendo desta forma, facilitar a sobrevivência de micro-organismos probióticos em ambientes ácidos como do estômago (TUO et al., 2013).

6.5.2 Tolerância aos sais biliares

A tolerância dos isolados submetidos a diferentes concentrações de sais biliares está apresentada na **Figura 7**. Foi possível observar que, os dois isolados (A2 e KAC) apresentaram viabilidade celular em todos os tempos analisados, permanecendo estável em todas as concentrações analisadas.

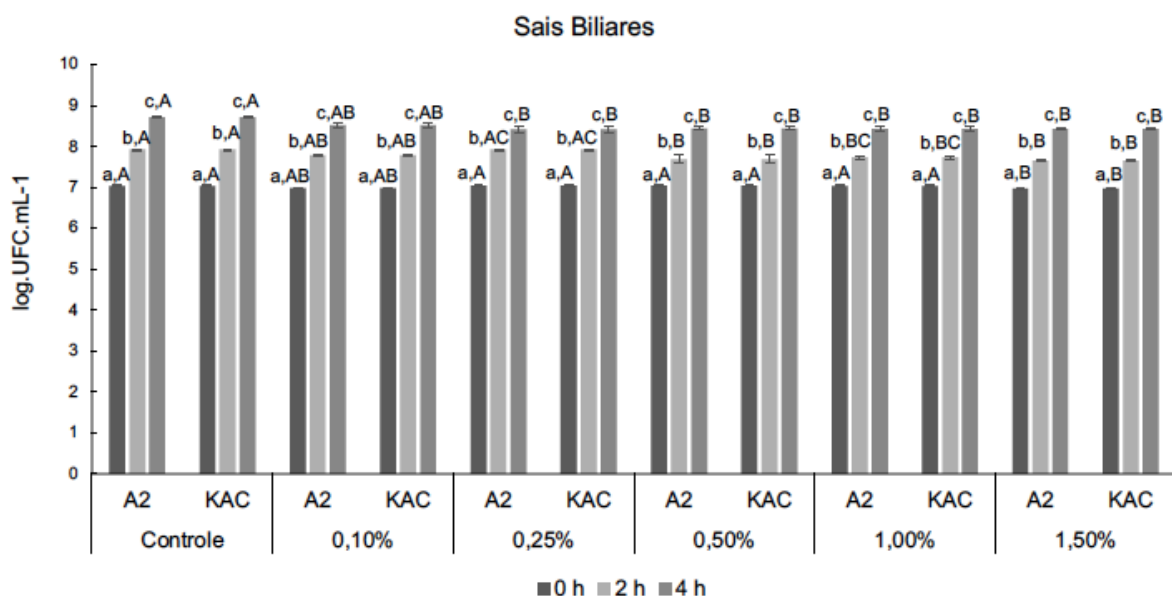


Figura 4 – Tolerância dos isolados A2 e KAC em diferentes concentrações de sais biliares.

Letras minúsculas iguais na mesma coluna dentro de um mesmo isolado indicam que não ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) com o decorrer do tempo de análise.

Letras minúsculas iguais na mesma coluna e em um mesmo tempo indicam que não ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os isolados.

Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações de sais biliares.

A2- Isolado de kefir de leite.

KAC- Isolado de Kombucha artesanal.

Os sais biliares apresentam um papel importante na eliminação de micro-organismos patogênicos invasores. Essas substâncias quando em contato com agentes patogênicos, solubilizam a membrana plasmática por meio de sua ação detergente. Contudo, sua ação age em qualquer micro-organismo ingerido. Para atuarem benéficamente sobre a saúde humana, os probióticos precisam sobreviver a presença de sais biliares e se aderirem a mucosa intestinal do hospedeiro (PINO et al., 2019; SANDERS et al., 2019).

Rotta et al. (2020) encontraram resultados semelhantes aos do presente estudo. Ao avaliarem a resistência de BAL provenientes de leite, observaram que dois ($n=2$) dos três ($n=3$) isolados apresentaram viabilidade estável ao longo do experimento. Já no estudo conduzido por Malveira (2017), ao avaliar BAL isoladas de bezerros recém-

nascidos, observaram que todos os isolados apresentaram resistência às concentrações 0,3 e 0,5% de sais biliares e mais de 90% resistiram a concentração de 1%.

A sobrevivência e a viabilidade de BAL em ambientes adversos do trato gastrointestinal são propriedades importantes e fundamentais para que uma linhagem seja considerada probiótica. Quanto maior a resistência *in vitro*, maior a chance de a bactéria sobreviver à passagem pelo estômago e intestino *in vivo* (WENDLING e WESCHENFELDER, 2013). Dessa forma, os isolados utilizados no presente estudo, demonstram grande capacidade probiótica quando relacionada a tolerância aos sais biliares.

6.5.3 Tolerância ao trato gastrointestinal

O intestino humano serve de abrigo para bilhões de micro-organismos que formam a microbiota humana. Nele ocorrem interações e atividades metabólicas importantes para a fisiologia humana que contribuem para o sistema imunológico (LOZUPONE et al., 2012). Suas regiões, podem ser acometidas por diversos micro-organismos invasores, causadores de doenças infecciosas (SANDERS, 2011). No entanto, sabe-se que as condições ácidas do intestino, facilitam a competitividade de BAL por apresentarem maior tolerância ao baixo pH extra e intracelular, combatendo micro-organismos patogênicos (PATEL, 2012; SCHNEIDER, 2016).

Com o objetivo de encontrar BAL que resistam às condições do meio intestinal, foi realizado o teste de tolerância ao trato gastrointestinal de forma simulada e os resultados estão demonstrados na **Figura 8**. Por meio dos resultados obtidos observou-se que, ambos isolados demonstraram maior tolerância quando expostos a enzima pepsina/ pepsina + leite e pancreatina/ pancreatina + sais biliares. Porém, observou-se maior viabilidade quando analisada pancreatina e pancreatina + sais biliares. Importante destacar também, que neste experimento quando aplicada pepsina + matriz alimentar (leite) observou-se viabilidade semelhante ao experimento somente com pepsina.

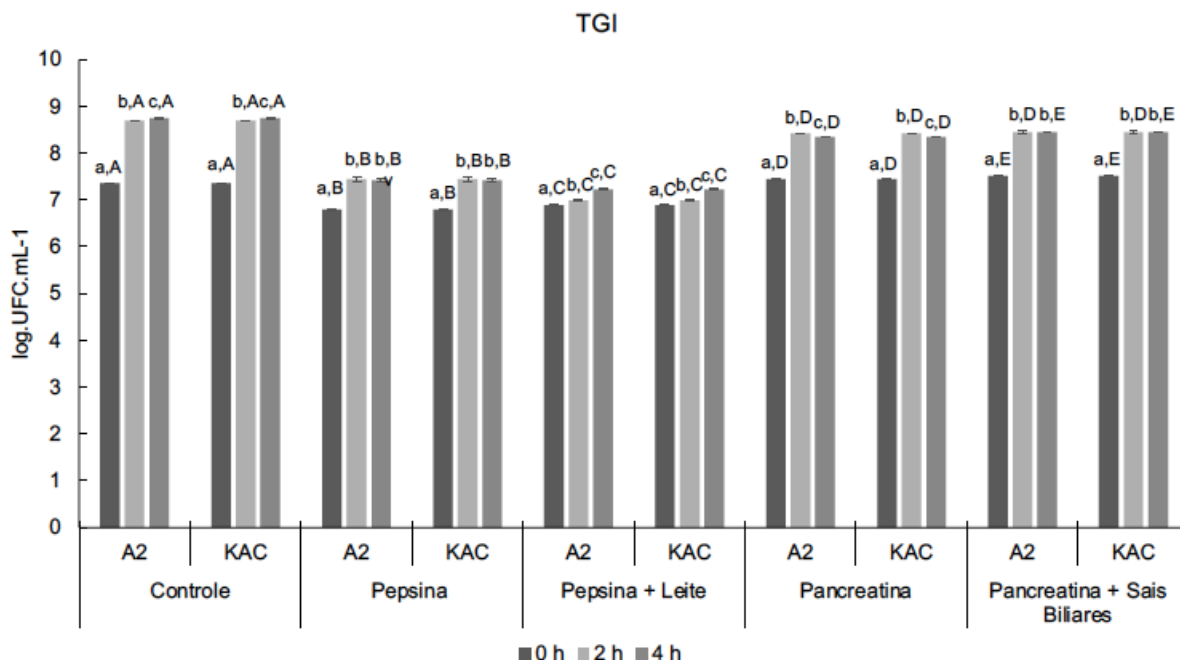


Figura 8 – Tolerância ao trato gastrointestinal de forma simulada de bactérias ácido-láticas isoladas de kefir de leite (A2) e de kombucha artesanal (KAC).

Letras minúsculas iguais na mesma coluna e em um mesmo isolado indicam que não ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) com o decorrer do tempo de análise.

Letras minúsculas iguais na mesma coluna e em diferentes isolados, quando comparados ao mesmo tempo, indicam que não ocorreram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os isolados.

Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não ocorreram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

A2 – Isolado de kefir de leite.

KAC- Isolado de kombucha artesanal.

Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Hermanns (2013), onde a BAL isolada de queijo artesanal, apresentou um declínio do crescimento com o uso de pepsina no tempo 0 e um aumento da viabilidade após 1 h de tratamento.

Da mesma forma que André (2020), ao realizar o teste de tolerância ao suco gástrico, observou que todos os isolados apresentaram viabilidade semelhante ao controle. O mesmo autor, verificou que quando simulado o suco intestinal com o uso de pancreatina + sais biliares, todas as bactérias apresentaram viabilidade em todos os tempos analisados e, assim como no presente estudo, após 4 h de exposição, a viabilidade aumentou para ambos isolados.

Com a grande diversidade e inúmeras opções de aplicações de BAL nas áreas de clínica e indústria alimentícia, houve a necessidade de correlacionar as duas áreas,

empregando a biotecnologia como instrumento de promoção à saúde animal e humana (ORTEGA et al., 2016).

Assim como realizado nesta pesquisa, a prospecção de BAL com potencial probiótico e biotecnológico torna-se um potente estudo de forma a contribuir positivamente para a indústria nutracêutica e alimentícia, utilizando micro-organismos seguros e eficazes que agreguem produtos funcionais a serem aplicados em novas terapias (LIMA et al., 2017).

6.6 Ensaio de citotoxicidade (MTT) de linhagens de células VERO

Para a realização do teste de citotoxicidade, foi selecionado o isolado A2, por apresentar resultados satisfatórios nos ensaios já empregados e por demonstrar melhor capacidade tecnológica, por meio da análise dos resultados de atividade antimicrobiana.

A viabilidade das células VERO após 1 h de interação com a suspensão bacteriana do isolado A2, está demonstrada na **Figura 9**. O isolado A2 apresentou maior citotoxicidade às células na concentração de 0,010 µg/mL, sendo possível observar redução significativa da viabilidade de células VERO nesta amostragem. A concentração de 0,001 e 0,100 µg/mL, apresentaram a menor toxicidade observada em relação ao controle, não indicando diferença significativa entre os tratamentos.

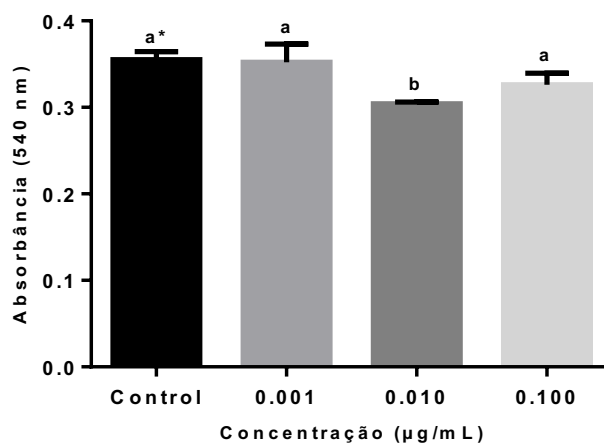


Figura 9 – Resultados do ensaio de citotoxicidade (MTT) para células VERO expostas a 0,001; 0,010 e 0,100 µg/mL da suspensão bacteriana do isolado A2.

*Letras iguais não apresentam diferença significativa entre os tratamentos.

Sabe-se que, para um micro-organismo ser utilizado como probiótico e exerça seus efeitos positivos a saúde do hospedeiro, além de ser capaz de resistir a passagem pelo trato gastrointestinal e colonizá-lo, é necessário aderir-se ao epitélio intestinal. O método MTT, empregado para avaliar a conservação epitelial, baseia-se em aferir a viabilidade celular de acordo com a atividade metabólica das enzimas mitocondriais das células vivas. A leitura é realizada a partir da redução do sal solúvel (de coloração amarela) pelas células epiteliais, em cristais (de coloração azul/violeta). Com a intensidade da coloração, é possível observar a contagem celular viável, e constatar a citotoxicidade pela leitura de medida de absorbância em espectrofotômetro (ISSO, 2009 e FRESHNEY, 2010).

Sendo assim, devido às dificuldades envolvidas em analisar a adesão bacteriana *in vivo*, principalmente em humanos, o presente estudo, avaliou a citotoxicidade bacteriana em modelo *in vitro*, utilizando o método MTT, com o objetivo de prosperar isolados potencialmente aderentes sem causar danos ao epitélio intestinal. Outros autores demonstraram citotoxicidade em níveis semelhantes utilizados neste estudo. Souza (2019) que ao utilizar concentrações de 0,010 µg/mL de *L. plantarum* em células HT-29, encontrou maior toxicidade em sua amostra. Fochesato et al. (2020), utilizando células VERO, avaliaram o potencial citotóxico de *Saccharomyces cerevisiae* RC016 e *Lactobacillus rhamnosus* RC007, e observaram que a viabilidade celular foi menor quando utilizado a cepa de *L. rhamnosus*. Os mesmos autores, constataram que a monocamada do tecido utilizado não foi afetada, detectando somente uma alteração de pH do meio.

Autores sugerem que a diminuição significativa de viabilidade celular encontrada em ensaios de citotoxicidade, ocorre devido a acidificação do meio causado pela própria bactéria durante a fermentação de glicogênio e produção de ácido lático (PESSOA et al., 2017; FOCESATO et al., 2020). Com os resultados obtidos, sugere-se que o isolado A2 não apresentou citotoxicidade às células intestinais utilizadas, tampouco alterou o pH do meio capaz de agredir o tecido celular.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados analisados, constatou-se que dos oito (n=8), sete (n=7) isolados provenientes de kefir de leite e um (n=1) isolado de kombucha artesanal podem ser caracterizados como pertencentes ao grupo de BAL, apresentam segurança microbiológica, atividade antimicrobiana contra patógenos, capacidade antioxidante e dois isolados (A2 e KAC) apresentaram tolerância a condições do trato gastrointestinal *in vitro*, visando uma possível aplicação futura em matriz alimentar. Assim, por se tratarem de propriedades benéficas e desejáveis, evidencia-se a importância do estudo e de pesquisas de novos probióticos para futuras aplicações e implementações em matrizes alimentares.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante deste fato, torna-se imprescindíveis a realização de testes complementares para caracterização do potencial probiótico, sequenciamento do DNA genômico dos isolados em estudo por meio do 16S rRNA; aplicação em matrizes alimentares diversas (lácteas ou não lácteas) e avaliação sensorial dos produtos alimentícios suplementados.

Por fim, futuros estudos *in vivo* poderão ser desenvolvidos para confirmarem os possíveis benefícios que estes isolados proporcionam à saúde do hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. R. de. **Identificação e Caracterização do Potencial Probiótico de Bactérias Isoladas do Leite e do Queijo Caprino**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Campus de Sobral, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2015.
- AKAL, C. **Benefits of whey proteins on human health**. In: Watson, R.R., Collier, R.J., Preedy, V.R. (Eds.), *Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan*. AcademicPress, London, 2017.
- AKALIN, A.S. et al. Enrichment of probiotic ice cream with different dietary fibers: structural characteristics and culture viability. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p. 37-46, 2018.
- ANDRÉ, J. A. M. **Seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico provenientes de queijo colonial**. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas à Saúde), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Francisco Beltrão-PR, 2020.
- ARAUJO, Leonardo Martins. **Avaliação de propriedades probióticas de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo coalho do sertão da Paraíba**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.
- ARCHER, A. C.; HALAMI, P. M. Probiotic Attributes of *Lactobacillus fermentum* Isolated from Human Feces and Dairy Products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 8113-8123, 2015.
- ARSLAN, T. S.; ERBAS, M. Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. **LWT-Food Science and Technology**, v. 81, p. 160-169, 2017.
- BAO, Y. et al. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. **Food Control**, v. 21, n. 5, p. 695-701, 2010.
- BARBA-VIDAL, E.; MARTÍN-ORÚE, S. M.; CASTILLEJOS, L. Practical aspects of the use of probiotics in pig production: A Review. **Livestock Science**, v. 223, p. 84-96, 2019.
- BARBOSA, J.; GIBBS, P.A.; TEIXEIRA, P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in North of Portugal. **Food Control**, v. 21, n. 5, p. 651-656, 2010.
- BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARBOSA, S., M. et al. Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. **Food Microbiology**, v. 46, p. 254-262, 2015.
- BATTIKH H. et al. Antibacterial and Antifungal Activities of Black and Green Kombucha Teas. **Journal of Food Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 231-236, 2013.
- BINTSIS, T. Lactic acid bacteria: their applications in foods. **Journal of Bacteriology & Mycology**, v. 6, n. 2, p. 89-94, 2018.
- BINTSIS, T.; ATHANASOULAS, A. Dairy starter cultures, In: Papademas P, Editor, *Dairy Microbiology, A Practical Approach*. Boca Raton: CRC Press, 2015.
- LEWUS, C. B., MONTVILLE, T. J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 13, n. 2, p. 145-150, 1991.
- BOURRIE B.; WILLING B.; COTTER P. The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 647, p. 1-17, 2016.

- BRASIL. Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, agosto de 2007.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019. Seção. In: Brasília, D.F. Resolve: **Estabelecer o Padrão de Identidade e Qualidade da Kombucha em todo o território nacional, na forma desta Instrução Normativa e do seu anexo**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019.
- BUSTAMANTE, M. et al. Probiotics and prebiotics potential for the care of skin, female urogenital tract, and respiratory tract. **Folia Microbiologica**, v. 65, n. 2, p. 245-264, 2020.
- BUTEL, M.J. Probiotics, gut microbiota and health. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 1, p. 1-8, 2014.
- CAMPOLINA, G.A. et al. Elaboração e caracterização físico-química de antepastos funcionais utilizando kefir e semente de chia. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 3, p. 24-31, 2017.
- CAPELLARI, Jaqueline Boldt. **Biossíntese de ácido láctico por *Lactobacillus amylovorus* a partir de resíduos agroindustriais**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2010.
- CASAROTT, S.N., et al. In vitro assessment of safety and probiotic potential characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from water buffalo mozzarella cheese. **Annals of Microbiology**, v. 67, p. 289-301, 2017.
- CASTELLANO, P. et al. Strategies for pathogen biocontrol using lactic acid bacteria and their metabolites: a focus on meat ecosystems and industrial environments. **Microorganisms**, v. 5, n. 38, p. 1-25, 2017.
- CASTRO, J.M. et al. Biocheese: a food probiotic carrier. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-11, 2015.
- CHAKRAVORTY, S. et al. Kombucha tea fermentation: microbial and biochemical dynamics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, n. 2, p. 63-72, 2016.
- CLSI (2020). **M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing**. 1st ed. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1980.
- COLLADO, M.C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens: In vitro evaluation of different method. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, n. 1, p. 71-74, 2007.
- COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 1065-1073, 2008.
- CORONA, O. et al. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 572-581, 2016.
- COSTA, E. F. D. et al. Artisan cheese: a potential source of wild lactic acid bacteria to obtain new starter cultures. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 3, n. 4, p. 207-215, 2016.
- CROWLEY, S.; MAHONY, J.; SINDEREN, D. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 93-109, 2013.

- De ALMEIDA JÚNIOR, W.L.G. et al. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. **Food control**, v. 53, p. 96-103, 2015.
- DEEPIKA, G.; CHARALAMPOPOULOS, D. Surface and adhesion properties of *Lactobacilli*. **Advances in applied microbiology**, v. 70, p. 127-152, 2010.
- De FILIPPIS, F. et al. Different temperatures select distinctive acetic acid bacteria species and promotes organic acids production during Kombucha tea fermentation. **Food Microbiology**, v. 73, p. 11-16, 2018.
- DELANO, D., S., et al. **Modulação dos hormônios leptina e grelina e seus receptores em tilápias-do-nilo sob duas condições, jejum e recém alimentadas após cultivo experimental utilizando dietas suplementadas com probióticos**. Anais Da Mostra Nacional de Iniciação Científica E Tecnológica Interdisciplinar, 2020.
- DIAS, F.S. et al. Screening of *Lactobacillus* isolated from pork sausages for potential probiotic use and evaluation of the microbiological safety of fermented products. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 6, p. 991-998, 2013.
- DIAS, M. R. S. **Avaliação das propriedades funcionais de bactérias lácticas isoladas de leite cru de ovelha**. Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- DIAS, P. A.; SILVA, D. T.; TIMM, C. D. Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de grãos de kefir. **Ciência Animal Brasileira**, v.19, p. 1-8, e-40548, 2018.
- DING, W. K.; SHAH, N.P. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. **International Food Research Journal**, v. 15, n. 2, p. 219-232, 2008.
- DUARTE, M. C. K. H. et al. Ação antagonista de *Lactobacillus acidophilus* frente a estirpes patogênicas inoculadas em leite fermentado. **Journal of Bioenergy Food Science**, v. 6, n. 2, p. 6626-6636, 2016.
- DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. Tea, Kombucha, and health: a review. **Food Research International**, v. 33, n. 6, p. 409-421, 2000.
- EMBRAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual técnico Caracterização Molecular de Bactérias Lácticas Endógenas de Queijo de Coalho**, 2011.
- ERGIN, F. et al. Application of cold- and heat-adapted *Lactobacillus acidophilus* in the manufacture of ice cream. **International Dairy Journal**, v. 59, p. 72-79, 2016.
- ERKKILA, S.; PETAJA, E. Screening of Commercial Meat Starter Cultures at Low pH and in the Presence of Bile Salts for Potential Probiotic Use. **Meat Science**, v. 55, n. 3, 297-300, 2000.
- ESTRADA, J. D. et al. Developing a strawberry yogurt fortified with marine fish oil. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 12, p. 5760-5769, 2011.
- FAO/WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Food and Agriculture Organization of the United Nation and World Health Organization Working Group Report, 2002.
- FAO/WHO. **Health and nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria**. Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, Córdoba, 2001.
- FAO/WHO. **Probiotics in food**. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutrition. Rome, Italy, 2006.

- FARAG, M. A. et al. The Many Faces of Kefir Fermented Dairy Products: Quality Characteristics, Flavour Chemistry, Nutritional Value, Health Benefits, and Safety. **Nutrients**, v. 12, n. 2, 1-23, 2020.
- FARIA, A. et al. Interplay between anthocyanins and gut microbiota. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 29, p. 6898-6902, 2014.
- FARIA, L. M. **Potencial probiótico in vitro de microrganismos probióticos veiculados em leites fermentados funcionais comerciais**. Trabalho de Conclusão de Curso. Medicina Veterinária, Centro Universitário de Formiga, Formiga-MG, 2017.
- FELÍCIO, T.L. et al. Physico-chemical changes during storage and sensory acceptance of low sodium probiotic Minascheese added with arginine. **Food Chemistry**, v. 196, p. 628-637, 2016.
- FIGLER, M. et al. Effect of special Hungarian probiotic kefir on fecal microflora. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 7, p. 1129-1132, 2006.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.
- FOCHESATO, A.S. et al. Cytotoxicity in Vero cells and cytokines analyses in Balbc mice as safety assessments of the probiotic mixture *Saccharomyces cerevisiae* RC016 and *Lactobacillus rhamnosus* RC007 for use as a feed additive. **Letters in Applied Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 400-404, 2020.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- FOULQUIÉ-MORENO, M. R. et al. Isolation and Biochemical Characterisation of Enterocins Produced by Enterococci from Different Sources. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 2, p. 214-229, 2003.
- FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques**. 6a ed. New Jersey: Wiley, 2010.
- GARCIA, E. F. **Bactérias Lácticas isoladas de subprodutos de processamento de frutas: avaliação do potencial probiótico e viabilidade tecnológica em sucos de frutas**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.
- GARCÍA-CAYUELA, T. et al. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. **Food Research International**, v. 57, p. 44-50, 2014.
- GARRIGA, M. et al. Potentially Probiotic and Bioprotective Lactic Acid Bacteria Starter Cultures Antagonise the *Listeria monocytogenes* Adhesion to HT29 Colonocyte-like Cells. **Beneficial Microbes**, v. 6, n. 3, p. 337-343, 2015.
- GHEYTANCHI, E. et al. Study on b-galactosidase enzyme produced by isolated lactobacilli from milk and cheese. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 6, p. 454-458, 2010.
- GRANATO, D. et al. **Probiotic Food Development: An Updated Review Based on Technological Advancement**. Encyclopedia of Food Security and Sustainability, 2019.
- GREENWALT, C. J; STEINKRAUS, K. H; LEDFORD, R. A. Kombucha, the Fermented Tea: Microbiology, Composition, and Claimed Health Effects. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 7, p. 976-81, 2000.
- HACQUARD, S. et al. Microbiota and Host Nutrition across Plant and Animal Kingdoms. **Cell Host Microbe**, v. 17, n. 5, p. 603-616, 2015.

- HADDAJI, N. et al. Acid stress suggests different determinants for polystyrene and HeLa cell adhesion in *Lactobacillus casei*. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 7, p. 4302-4309, 2015.
- HAN Q., et al. In vitro comparison of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Harbin dry sausages and selected probiotics. **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 391-400, 2017.
- HASLER, C. M; BROWN, A. C. Position of the American dietetic association: functional foods. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109, n. 4, p. 735-746, 2009.
- HAYEK, S. A; IBRAHIM S.A. Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. **Food and Nutrition Science**, v. 4, n. 11A, p. 73-87, 2013.
- HERMANN, G. **Potencial bacteriocinogênico e probiótico de bactérias ácido lácticas isoladas de leite e queijos artesanais**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.
- HSIEH, H.H. et al. Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 1, p. 73-81, 2012.
- HSU, Y. J. et al. Kefir Supplementation Modifies Gut Microbiota Composition, Reduces Physical Fatigue, and Improves Exercise Performance in Mice. **Nutrients**, v. 10, n. 7, p. 1-16, 2018.
- HUANG, Y.; ADAMS, M. C. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 253-60, 2004.
- HUQ, T. et al. Alginate based nanocomposite for microencapsulation of probiotic: Effect of cellulose nanocrystal (CNC) and lecithin. **Carbohydrate polymers**, v. 168, p. 61-69, 2017.
- JAYABALAN, R. et al. A Review on Kombucha Tea – Microbiology, Composition, Fermentation, Beneficial Effects, Toxicity, and Tea Fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 538-550, 2014.
- JERONYMO-CENEVIVA, A. B. et al. Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated from Water-Buffered Mozzarella Cheese. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 6, n. 3-4, p. 141-56, 2014.
- JOHN, S. M; DEESEENTHUM, S. Properties and benefits of kefir: A review. **Songklanakarin Journal of Science & Technology**, v. 37, n. 3, p. 275-282, 2015.
- KAERNOPPARAT, S. et al. In vitro probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. **Anaerobe**, v. 22, p. 6-13, 2013.
- KATEETE, D. P. et al. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar Improve the Efficiency of the Tube Coagulase Test. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 9, n. 23, p. 1-7, 2010.
- KIM, J.; KOUSSHIK, A. Current Trends in Kombucha: Marketing Perspectives and the Need for Improved Sensory Research. **Beverages**, v. 6, n. 1, p. 1-19, 2020.
- KNEIFEL, W.; BONAPARTE, C. **Acidophilus milk**. In B. Caballero (Ed.). Encyclopedia of food sciences and nutrition. London: Elsevier Applied Sciences Publ., 2003.
- KOS, B. et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 981-987, 2003.
- KOSTINEK, M. et al. Characterization and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 342-51, 2007.

- KOTHARI, D.; PATEL, S.; KIM, S. K. Probiotic supplements might not be universally effective and safe: A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 111, p. 537-547, 2019.
- LEAL, J. M. et al. A review on health benefits of kombucha nutritional compounds and metabolites. **CYTA Journal of Food**, v. 16, n. 1, p. 390-399, 2018.
- LI, Y.; CUI, F. **Microbial lactic acid production from renewable resources**. Sustainable Biotechnology. Springer: Netherlands, 2010.
- LIMA, C.D.L.C. et al. Bactérias ácido lácticas e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da serra do salitre, minas gerais Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária E Zootecnia, 2009.
- LIMA, Í. A. et al. Caracterização física, química e microbiológica de presunto cru desossado adicionado de lactulose. *Brazilian Journal of Food Technology*, 2017.
- LIMA, I. R. B. **Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de amostras de estafilococos isoladas de queijo minas artesanal**. Trabalho de Conclusão de Curso. Medicina Veterinária. Centro Universitário de Formiga, Formiga-MG, 2017
- LIMA, Meire dos Santos Falcão. Caracterização microbiológica, bioquímica e funcional do leite de ovelha fermentado por grãos de kefir. Tese (Doutorado em Biologia Aplicada à Saúde). Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências, Recife, 2018.
- LOUREIRO, D. S. P. M. **Estudos da bacteriocina produzida por *Lactobacillus plantarum* B391 para potencial utilização na Indústria**. Dissertação (Mestrado em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar). Instituto Politécnico de Viana do Castelo, Viana do Castelo, 2015.
- LOZUPONE, C. A. et al. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. **Nature**, 489, p. 220–230, 2012.
- LUIZ, W. et al. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. **Food Control**, v. 53, p. 96-103, 2015.
- MAEDA, Y.; KIYOSHI, T. Host–Microbiota Interactions in Rheumatoid Arthritis. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 51, p.1-6, 2019.
- MAIN, B. S.; MINTER, M. R. Microbial immuno-communication in neurodegenerative disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, n. 151, 1-8, 2017.
- MALBAŠA, R.V. et al. Influence of starter cultures on the antioxidant activity of kombucha beverage. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1727-1731, 2011.
- MALVEIRA, D. S. **Bactérias lácticas com potencial probiótico provenientes de bezerros nelore criados no norte de Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2013.
- MARTÍN, R.; LANGELLA, P. Emerging Health Concepts in the Probiotics Field: Streamlining the Definitions. **Frontiers and Microbiology**, v. 10, n. 1047, p. 1-5, 2019.
- MATHARA, J. M. et al. Functional Properties of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Maasai Traditional Fermented Milk Products in Kenya. **Current in Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 315-321, 2008.
- MATTILA-SANDHOLM, T. et al. Technological Challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2–3, p. 173-182, 2002.
- MIGUEL, M. G. C. P. et al. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1523-1528, 2010.
- MONTANUCI, F. D. **Bebidas de Kefir com e sem inulina em versões integral e desnatada: elaboração e caracterização química, física, microbiológica e**

- sensorial**. Dissertação (Mestrado em em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2010.
- MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. A. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, S189-97, 2006.
- MOREIRA, J. L. B. et al. Visualização bacteriana e colorações. E-book. Fortaleza : Imprensa Universitária, 2015. 68 p. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/16672>. Acesso em: 03 de janeiro de 2022.
- NASCIMENTO, L. C. S. **Seleção de novas linhagens de bactérias ácido-láticas probióticas e aplicação de *E. faecium* em leite**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2017.
- NATH, A. et al. Biological Activities of Lactose-Based Prebiotics and Symbiosis with Probiotics on Controlling Osteoporosis, Blood-Lipid and Glucose Levels. **Medicina**, v. 54, n. 98, p. 1-28, 2018.
- NUALKAEKUL, S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. **International of Food Microbiology**, v. 146, n. 2, p. 111-117, 2011.
- OHKAWA, H.; OHISHI, H.; YAGI, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.
- OMURA, M. H. **Características probióticas e de segurança de bactérias do ácido láctico predominantes em leite humano**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2014.
- ORTEGA, M. et al. Formulación y evaluación de una galleta elaborada con avena, linazay pseudofruto del caujil como alternativa de un alimento funcional. **Multiciencias**, v. 16, n. 1, 2016, p. 76-86, 2016.
- ORTU, S. et al. Identification and Functional Characterization of *Lactobacillus* Strains Isolated from Milk and Gioddu, a Traditional Sardinian Fermented Milk. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 11, p. 1312-1320, 2007.
- OTLES S.; CAGINDI O. Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 1-10, 2003.
- OZTURK, H.I.; DEMIRCI, T.; AKIN, N. Production of functional probiotic ice creams with white and dark blue fruits of *Myrtus communis*: the comparison of the prebiotic potentialson *Lactobacillus casei*431 and functional characteristics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p.339-345, 2018.
- PAIXÃO, I. S. F. **Caracterização de Bactérias Ácido Lácticas autóctones de leite de cabra e sua funcionalidade no queijo coalho caprino artesanal**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2014. Petrolina, 2016.
- PARKER, E.A. et al. Probiotics and gastrointestinal conditions: An overview of evidence from the Cochrane Collaboration. **Nutrition**, v. 45, p. 125-134, 2018.
- PARVEZ, S. et al. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 6, p. 1171-85, 2006.
- PATEL, S.; GOYAL, A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. **Biotechnology Journal**, v. 2, n. 2, p. 115-125, 2012.
- PEREIRA, M. T. et al. Importância Das Bactérias Ácido Lácticas E Não Starter (NSLAB) Na Tecnologia de Produção Dos Derivados Lácteos. **Ensaio**, v. 24, n. 4, p. 348-352, 2020.

- PEREIRA, V. et al. Characterization for Enterotoxin Production, Virulence Factors, and Antibiotic Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolates from Various Foods in Portugal. **Food Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 278-282, 2009.
- PERELMUTER, K.; FRAGA, M.; ZUNINO, P. In vitro Activity of Potential Probiotic *Lactobacillus Murinus* Isolated from the Dog. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, n. 6, p. 1718-1725, 2008.
- PERIN, Luana Martins. **Diversidade molecular da microbiota Láctica bacteriocinogênica de Leite de cabra e caracterização de seu potencial bioconservador para a produção de queijo minas. Minas Gerais**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2016.
- PESSOA, W.F.B. et al. In Vitro Activity of Lactobacilli with Probiotic Potential Isolated from Cocoa Fermentation against *Gardnerella vaginalis*. **BioMed Research International**, v. 2017, 3264194, 2017.
- PIMENTEL, T.C. et al. **Minas frescal cheese as a probiotic carrier**. In: mérillon, J.M., RAMAWAT, K.G. (Eds.). Reference Series in Phytochemistry. Springer International Publishing: Switzerland, 2019a.
- PIMENTEL, T. C. et al. Fruit Juices as Probiotic Foods. **Sports and Energy Drinks**, v. 10, p. 483-513, 2019b.
- PINO, A. et al. Piacentinu Ennese PDO Cheese as Reservoir of Promising Probiotic Bacteria. **Microorganisms**, v. 7, n. 254, p. 1-22, 2019
- PLAZA-DIAZ, J. et al. Mechanisms of Action of Probiotics. **Advances in Nutrition**, v. 10, n. 1, p. S49–S66, 2019.
- PRISCO, A.; MAURIELLO, G. Probiotic ation of foods: A focus on microencapsulation tool. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 27-39, 2016.
- PRIYODIP, P.; PRAKASH, P. Y.; BALAJI, S. Phytases of Probiotic Bacteria: Characteristics and Beneficial Aspects. **Indian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 2, p. 48-154, 2017.
- REDONDO, Nadia Cristina. **Avaliação in vitro de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416**. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Araraquara-SP, 2008.
- REN, D. et al. In vitro Evaluation of the Probiotic and Functional Potential of *Lactobacillus* Strains Isolated from Fermented Food and Human Intestine. **Anaerobe**, v. 30, p. 1-10, 2014.
- RIBEIRO, J. L. **Potencial tecnológico, probiótico e antagonista da microbiota láctica de leite de búfalas**. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Brasília, Brasília, 2019.
- ROLIM, M.E.S.; PEREIRA, M.A.; ESKELSEN, M.W. Envelhecimento cutâneo “versus” efeitos do resveratrol: uma revisão de literatura. **Revista eletrônica Estácio Saúde**, v. 11, p. 1139-1152, 2013.
- ROTTA, I. S. et al. Bactérias Ácido Láctico Potencialmente Probióticas Isoladas de Leite Não Pasteurizado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 75, n. 3, p. 178-189, 2020.
- SABO, S. et al. Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 527-536, 2014.

- SANDERS, M.E. et al. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, p. 605-616, 2019.
- SANDERS, M.E. Impact of probiotics on colonizing microbiota of the gut. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 45, p. S115-119, 2011.
- SANTOS, C.L.A. **Caracterização de segurança e tecnológica de bactérias acidoláticas termofílicas autóctones e aplicação em queijo parmesão**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2015.
- SANTOS, M. J. **Kombucha: caracterização da microbiota e desenvolvimento de novos produtos alimentares para uso em restauração**. Dissertação (Mestrado em Ciências Gastronômicas). Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2016.
- SANTOS, F. L. **Kefir: propriedades funcionais**. In: **Kefir: propriedades funcionais e gastronômicas**. Cruz das Almas-BA: UFRB, 2015.
- SENDER, R.; FUCHS, S.; MILO, R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. **Cell**, v. 164, 3, p. 337-340, 2016.
- SETTACHAIMONGKON, S. et al. Influence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 on post-acidification, metabolite formation and survival of starter bacteria in set-yoghurt. **Food Microbiology**, v. 59, p. 14-22, 2016.
- SHARMA, P. et al. Antibiotic Resistance among Commercially Available Probiotics. **Food Research International**, v. 57, p. 176-195, 2014.
- SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análises Microbiológicas de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001.
- SILVA, J. G. **Identificação molecular de bactérias ácido lácticas e propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus* spp. Isolados de queijo Minas artesanal de Araxá, Minas Gerais**. (Dissertação Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016.
- SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 5ªed., São Paulo: Varela, 2017.
- SILVA, H.L.A et al. Partial substitution of NaCl by KCl and addition of off-flavorenhancers on probiotic Prato cheese: a study covering manufacturing, ripening and storage time. **Food Chemistry**, v. 248, p. 192-200, 2018.
- SILVA, L. A. **Potencial probiótico de bactérias ácido lácticas isoladas de leite caprino: aspectos de segurança e funcionalidade**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2019.
- SINDI, A.; BADSHA, M. B.; ÜNLÜ, G. Bacterial populations in international artisanal kefirs. **Microorganisms**, v. 8, n. 1318, 1-15, 2020.
- SINGH, B.; MAL, G.; MAROTTA, F. Designer Probiotics: Paving the Way to Living Therapeutics. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 8, p. 679-682, 2017.
- SOUZA, I. B. et al. Lipid peroxidation in female dogs bearing mammary gland carcinomas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 5, p. 1335-1338, 2017.

- SOUZA, M. F. S. **Avaliação oxidativa de iogurtes tipo “sundae” a base de leite de cabra com adição de geleia de umbu (*Spondias tuberosa* Arr.)**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão-SE, 2019.
- SRIHARI, T. et al. Downregulation of signaling molecules involved in angiogenesis of prostate cancer cell line (PC-3) by kombucha (lyophilized). **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 53-58, 2013.
- STEFANOVIC, E.; FITZGERALD, G.; MCAULIFFE, O. Advances in the genomics and metabolomics of dairy lactobacilli: A review. **Food Microbiology**, v. 61, p. 33-49, 2017.
- SUEZ, J. et al. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. **Nature Medicine**, v. 25, n. 5, p. 716-729, 2019.
- SUHRE, T. **Kombuchas produzidas e comercializadas no Brasil: características físico-químicas e composição microbiana**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2020.
- SURIASIH, K. Microbiological and Chemical Properties of Kefir Made of Bali Cattle Milk. **Food Science and Quality Management**, v. 6, p. 12-22, 2012.
- TEOH, A.L., HEARD, G., COX, J. Yeast ecology of Kombucha fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 119-126, 2004.
- TEUBER, M.; MEILE, L.; SCHWARZ, F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. **Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 76, n. 1-4, p. 115-37, 1999.
- TODOROV S. D. et al. Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. **Journal of Applied Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 971-986, 2011.
- TODOROV S. D. et al. Evaluation of the probiotic potential and effect of encapsulation on survival for *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 973-984, 2012.
- TUO, Y. et al. Study of Probiotic Potential of Four Wild *Lactobacillus rhamnosus* Strain. **Anaerobe**, v. 21, p. 22-27, 2013.
- TURKMEN, N.; AKAL, C.; ÖZER, B. Probiotic dairy-based beverages: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 53, p. 62-75, 2019.
- UECKER, Júlia Neitezal. **Screening of lactic acid bacteria isolated from milk and probiotic potential**. Dissertação. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, 2018.
- VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.
- VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics- From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 14-728, 2008.
- VILLARREAL-SOTO, S.A. et al. Understanding Kombucha tea fermentation: a review. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 3, p. 580-588, 2018.
- VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Lactic Acid Starter and Probiotic Bacteria: A Comparative "In Vitro" Study of Probiotic Characteristics and Biological Barrier Resistance. **Food Research International**, v. 36, n. 9-10, p. 895-904, 2003.
- WANG, H. et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG modulates innate signaling pathway and cytokine responses to rotavirus vaccine in intestinal mononuclear cells of gnotobiotic

- pigs transplanted with human gut microbiota. *BMC microbiology*, v. 16, n. 109, p. 1-14, 2016.
- WEDAJO, B. Lactic acid bacteria: benefits, selection criteria and probiotic potential in fermented food. *Journal of Probiotics & Health*, v. 3, n. 2, p. 1-9, 2015.
- WENDLING, L. K.; WESCHENFELDER, S. Probióticos e alimentos lácteos fermentados - uma revisão. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 68, n. 395, p. 49-57, 2013.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION -WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations –FAO. **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001.
- YAN, F.; POLK, D. B. Probiotics and Probiotic-Derived Functional Factors Mechanistic Insights Into Applications for Intestinal Homeostasis. *Frontiers in Immunology*, v. 11, n. 1428, p. 1-12, 2020.
- YAZGAN, H. et al. The antimicrobial properties and biogenic amine production of lactic acid bacteria isolated from various fermented food products. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 45, n. 1, e15085, 2021.
- ZANJANI, M.A.K.et al. Promoting *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium adolescentis* survival by microencapsulation with different starches and chitosan and poly L-lysine coatings in ice cream. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 42, n. 1, e13318, 2018.
- ZAWISTOWSKA-ROJEK, A.; TYSKI, S. Are probiotic really safe for humans? *Polish Journal of Microbiology*, v. 67, n. 3, p. 251-258, 2018.
- ZHANG, H. et al. The association of biofilm formation with antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented foods. *Journal of Food Safety*, v. 33, n. 2, p. 1-10, 2013.
- ZHANG, M. et al. Interações entre a microbiota intestinal e a resposta imune do hospedeiro na doença inflamatória intestinal. *Frontiers in Immunology*, v. 8, n. 942, p. 1-13, 2017.
- ZHANG, L.; LOU, Y.; SCHUTYSER, M.A.I. 3D printing of cereal-based food structures containing probiotics. *Food Structure*, v. 18, p. 14-22, 2018.