

UNIVERSIDADE DO OESTE DE SANTA CATARINA - UNOESC
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Biotecnologia

EMYR HIAGO BELLAVER ANDRADE

ANÁLISE DO POTENCIAL PROBIÓTICO E ANTIOXIDANTE DE
LACTOBACILOS PRODUTORES DE β - GALACTOSIDASE

Videira – SC

2017

EMYR HIAGO BELLAVER ANDRADE

**ANÁLISE DO POTENCIAL PROBIÓTICO E ANTIOXIDANTE DE
LACTOBACILOS PRODUTORES DE β - GALACTOSIDASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Biotecnologia da Universidade do Oeste de Santa Catarina- UNOESC campus Videira-SC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. César Milton Baratto, PhD
Co- orientador (a): Prof^a. Dr^a Claudriana Locatelli, PhD

Área de concentração: Biotecnologia aplicada à Agroindústria e Saúde

Videira – SC

2017

A553a Andrade, Emyr Hiago Bellaver

Análise do potencial probiótico e antioxidante de lactobacilos produtores de β – galactosidase / Emyr Hiago Bellaver Andrade – 2017.

72f. : ils. ; tabs.

Orientador: Dr. César Milton Baratto.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação Mestrado Acadêmico em Ciência e Biotecnologia, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus Videira – UNOESC, 2017.

1. Alimentos Funcionais. 2. Atividade Enzimática. 3. Microbiologia Industrial. I. Título. II. Autor. III. Orientador.

CDD: 660.62

EMYR HIAGO BELLAVER ANDRADE

**ANÁLISE DO POTENCIAL PROBIÓTICO E ANTIOXIDANTE DE
LACTOBACILOS PRODUTORES DE β - GALACTOSIDASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Biotecnologia da Universidade do Oeste de Santa Catarina- UNOESC campus Videira-SC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia aplicada à Agroindústria e Saúde

Prof. Dr. César Milton Baratto, PhD (Orientador)

Prof^ª. Dr^ª Claudriana Locatelli, PhD (Co- orientadora)

Prof^ª. Dr^ª Sabrina Pinto Salamoni (Banca Examinadora)

Prof^ª. Dr^ª Sandra Denise Camargo Mendes (Banca Examinadora)

Prof^ª. Dr^ª Fabiana A.S. de M. Soares (Suplente)

Videira, 01 de março de 2017

AGRADECIMENTOS

Ao Mentor que guia este mundo de transição, o meu muito obrigado pela possibilidade de cumprir mais uma etapa de meu aprimoramento pessoal nesta passagem.

Às personificações do amor: obrigado Salete Bellaver e Elisângela Spezia, para elas, tudo.

O ser humano é extremamente sociável encontrando nas amizades o estímulo necessário para crescer moral e espiritualmente, uma amizade solidificada pelo carinho e companheirismo prolonga a existência física, traz ânimo, encoraja e embeleza as emoções; registro o meu mais profundo agradecimento à Vilma Zancanaro por permitir-me usufruir da sua tão doce companhia, por ser meu alento e proteção, pela confiança em mim depositada, pelas palavras de força, coragem e acalanto, obrigado por estar em minha vida e dividir as conquistas e aprendizados comigo.

A amizade caracteriza-se pelo desinteresse pessoal e pela livre iniciativa, fazendo do amigo, na sua sinceridade e solidariedade, estar disposto sempre a trabalhar a nosso favor sem esperar por compensações ou recompensas; obrigado Amanda Coelho, Douglas Zarur, Marlene Quinteiro, Nathaly Müller, Ramayana Bazeggio e Zípora Morgana por compartilharem comigo de momentos saudosos, por sua ajuda, dedicação, esforço e abdições.

Nem sempre transcorrerá a total identidade de propósitos e sentimentos, a finalidade do companheirismo é fugir do desconforto e da solidão, satisfazendo as exigências da convivência e da genuína amizade, trazendo amor, felicidade e aperfeiçoamento moral, assim, agradeço Alexandre Portes pela sua presença nesta caminhada.

À equipe dos Laboratórios de Saúde da Universidade Alto Vale do Rio do Peixe-UNIARP e da Universidade do Oeste de Santa Catarina- UNOESC.

Aos profissionais responsáveis pela formação intelectual dos seres que transitam por este local de passagem: o meu muito obrigado aos professores César Milton Baratto e Claudriana Locatelli pelos ensinamentos e orientações repassados.

RESUMO

BELLAVER, Emyr Hiago. **Análise do potencial probiótico e antioxidante de lactobacilos produtores de β -galactosidase**. 2017. 71f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Ciência e Biotecnologia. Universidade do Oeste de Santa Catarina – UNOESC, Videira - SC, Brasil. 2017.

A utilização de enzimas oriundas do metabolismo bacteriano proporcionou aos produtos lácteos alcançar a terceira parte da dieta humana no grupo dos alimentos funcionais ou nutracêuticos. Na ampla escala destes produtos, encontram-se os probióticos: microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas proporcionam uma série de benefícios ao hospedeiro. Sendo assim, o objetivo do proposto consiste em selecionar bactérias lácticas produtoras de β -galactosidase e determinar suas características probióticas e antioxidantes através de testes *in vitro*. Após reativação de 75 isolados da coleção de lactobacilos da Universidade do Oeste de Santa Catarina- UNOESC, 19 foram selecionados a partir do cromógeno X-gal com a maior capacidade de produção enzimática. Ao determinar a atividade enzimática sobre o substrato ONPG os isolados 14, 8 e 39L foram os que mais expressaram a enzima em 24h com mensurações de $0,044\pm 0,003$ U/mL, $0,066\pm 0,003$ U/mL e $0,037\pm 0,003$ U/mL respectivamente. Em relação a sobrevivência em pH ácido após 2h de incubação, o isolado 8 apresentou viabilidade de $13,5\pm 2,96\%$ em pH2 e, juntamente com os isolados 14, 8.1 e LB, apresentaram-se viáveis em pH3 cerca de 16%, 31%, 50,7% e 53% respectivamente. Todos os isolados mantiveram-se ativos em concentrações baixas de sais biliares variando de 75% para a concentração de 0,25% para 41% na concentração de 0,5% e foram capazes de inibir ao menos três possíveis patógenos intestinais. A análise do ensaio de hidrofobicidade permitiu-nos concluir que o isolado 14 obteve atividade de 27,93% de aderência ao xileno igualando-se estatisticamente ao isolado 25J com 29,95% de atividade. Quando diz respeito as características de segurança, nenhum isolado apresentou atividade hemolítica, porém os isolados 14, 8, 8.1, LB e 39L apresentaram resistência ao antimicrobiano ciprofloxacina, o isolado 25J à ceftazidima, enquanto os isolados 8 e 39L apresentaram subpopulação resistente para este mesmo antimicrobiano e o isolado 39L apresentou a mesma característica para penicilina. Ao observar as características antioxidantes, todos os isolados desempenharam a mesma atividade de inibição do radical DPPH, cerca de $5,39\pm 2,36\%$ enquanto apresentaram satisfatória e variável inibição da auto-oxidação do ascorbato. No presente estudo, de um modo geral, todos os isolados analisados apresentaram benefícios distintos não sendo possível a determinação de apenas uma cultura para aplicações em probiose.

Palavras-chave: Alimentos funcionais. Lactobacilos. Atividade enzimática β -galactosidase. Microbiologia industrial.

ABSTRACT

BELLAVER, Emyr Hiago. **Analysis of probiotic and antioxidant potential of lactobacilli producers of β -galactosidase**. 2017. 71p. Dissertation (Master degree). Master degree program of Science and Biotechnology. Universidade do Oeste de Santa Catarina – UNOESC, Videira - SC, Brasil. 2017.

The use of enzymes from bacterial metabolism allowed dairy products to reach the third part of the human diet in the group of functional nourishment or nutraceutical. In the wide range of this products are the probiotics: living microorganisms which provide several benefits to its host when given in adequate quantity. Therefore, the objective of this research is to select lactic bacteria producers of β -galactosidase and determine their probiotic and antioxidant characteristics through in vitro testing. After reactivating 75 strains collected in the collection of lactobacillus from the University of the West of Santa Catarina – UNOESC, 19 were selected based on the chromogen X-gal with higher capacity of enzymatic production. When determined the enzymatic activity on the substrate ONPG the strains 14, 8 and 39L were the ones with higher activity expressed in 24h with measurements of 0.044 ± 0.003 U/mL, 0.066 ± 0.003 U/mL, and 0.037 ± 0.003 U/mL respectively. Concerning the survival in acid pH after 2h of incubation, the strain 8 presented feasibility of $13.5\pm 2.96\%$ in pH2 and, together with the strains 14, 8.1, and LB, presented viability in pH3 of circa 16%, 31%, 50.7% and 53% respectively. All the strains remained active in low concentrations of bile salts, varying from 75% in the concentration of 0.25% to 41% in the concentration of 0.5% and could inhibit at least three possible intestinal pathogens. The analysis of the test of hydrophobicity allowed us to conclude that the strain 14 had an activity of 27.93% of xylene adherence, on a par with the strain 25J with 29.95% of activity. Regarding the safety characteristics, none of the strain presented hemolytic activity. However, the strains 14, 8, 8.1, LB, and 39L presented resistance to the antimicrobial ciprofloxacin, and the strain 25J to ceftazidime, while the strains 8 and 39L showed a subpopulation resistant to the same antimicrobial and the strain 39L presented the same characteristic to penicillin. Observing the antioxidant characteristics, all strains had the same activity in the inhibition of DPPH radical, around $5.39\pm 2.36\%$ while presented satisfactory and variable inhibition of the auto-oxidation from ascorbate. In the present study, in general, all the isolates analyzed presented distinct benefits and it was not possible to determine only one culture for probiosis applications.

Keywords: Functional foods. Lactobacilli. Enzymatic activity β -galactosidase. Industrial microbiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Análise da expressão enzimática de β - gal frente ao substrato ONPG em 12h, 24h, 36h e 48h de incubação	42
---	----

LISTA TABELAS

Tabela 1 – Análise do potencial antagonista do crescimento de possíveis enteropatógenos humanos pelos isolados lácteos em teste	48
Tabela 2 - Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados selecionados	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Análise da viabilidade celular de lactobacilos cultivados em pH 2 e 3 após 2h de incubação	45
Gráfico 2 - Percentualidade de isolados viáveis após incubação em diversas concentrações de sal biliar sintético	47
Gráfico 3 - Propriedade de adesão bacteriana ao solvente xileno	51
Gráfico 4 – Percentagem do potencial antioxidante dos isolados lactobacilares no processo de inibição da atividade do radical DPPH	55
Gráfico 5 – Propriedade antioxidante de inibição da auto- oxidação do ascorbato	56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.2 OBJETIVOS	14
1.2.1 Objetivo Geral	14
1.2.2 Objetivos Específicos	14
2 TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS	15
2.2.1. Biotecnologia.....	16
2.3. ALIMENTOS FUNCIONAIS	21
2.3.1 Alimentos Nutracêuticos	23
2.3.2 Lactobacilos.....	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA	35
3.1.1 Caracterização dos isolados com X-gal.....	35
3.1.2 Cultivo dos isolados para produção da enzima	35
3.1.3 Determinação da atividade de β -gal	36
3.2 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES PROBIÓTICAS	36
3.2.1 Cultura Ácido Tolerante	36
3.2.2 Teste de tolerância a sais biliares	36
3.2.3 Potencial antimicrobiano	37
3.2.4 Ensaio de hidrofobicidade	37
3.3 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE SEGURANÇA.....	38
3.3.1 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos	38
3.3.2 Avaliação da atividade hemolítica.....	38
3.4 ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i>	39
3.4.1 Atividade antioxidante através do método DPPH 0,1mM	39
3.4.2 Auto oxidação do Ascorbato	39
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	41
4.1 Mensuração da atividade enzimática de β - gal.....	41
4.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO	44
4.2.1 Perfil de viabilidade ao pH ácido e ao sal biliar	44
4.2.2 Avaliação de Propriedades Antagonistas	48
4.2.3 Ensaio de hidrofobicidade	50
4.3 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE SEGURANÇA.....	51
4.3.1 Atividade Hemolítica.....	51
4.3.2 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	52
4.4 ANÁLISE DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES	54
4.1.1 Captura do radical DPPH	54
4.1.2 Ensaio de auto oxidação do ascorbato.....	56
5 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

A população, que atingiu seu primeiro bilhão de habitantes no século XIX d.C chega no século XXI com cerca de 7 bilhões de pessoas e continua a crescer em um ritmo acelerado; devido esta explosão demográfica, houve a necessidade de se adequar pessoas e áreas para a produção de um maior volume de alimentos a fim de satisfazer a dieta alimentar básica da população que se torna cada vez mais exigente em questões de qualidade e segurança alimentar (BOARETTO, 2015; FAO; 2015; ROBERTS; RYAN, 2015; PENHA; LIMA; LINHARES, 2013).

Na indústria de alimentos existem muitas aplicações biotecnológicas que resultam em produtos alimentícios utilizados diariamente pelos consumidores. Na indústria de beneficiamento de leite, as enzimas que são extraídas de bactérias lácticas, por exemplo, são aplicadas na elaboração de queijos, iogurtes e derivados melhorando a textura, valor nutritivo e sabor dos produtos finais, fazendo com que alimentos fermentados, principalmente derivados lácteos, constituíssem hoje a terceira parte da dieta humana enquadrando-se na categoria denominada de alimentos funcionais (BARRETTO et al., 2016; ALMEIDA et al., 2011).

A história da alimentação funcional surgiu em meados de 1980, no Japão através de uma ação governamental, com a função principal de prevenir doenças crônicas- degenerativas na população crescente de idosos reduzindo assim os gastos com a saúde pública (ALISSA; FERNS, 2012). São alimentos e/ou bebidas consumidos nas dietas comuns, que têm a capacidade de regular funções fisiológicas e ainda combater doenças como diabetes, colesterol, câncer, hipertensão, dentre outras (MORAES; COLLA, 2006). Hoje a alimentação tem sido cada vez mais precária em nutrientes e em qualidade. A busca pela ingestão de alimentos saudáveis ricos em fibras, vitaminas e minerais é constante e tem sido um grande desafio, já que na maioria das vezes é mais rápido e prático comer em *fastfoods* ou comprar alimentos industrializados (BAHADORAN; MIRMIRAN; AZIZI, 2015; MISSAGIA; REZENDE, 2011).

Na ampla escala de produtos nutracêuticos encontram-se os probióticos, termo de origem grega, que significa “para a vida”, tem sido empregado das mais diversas maneiras ao longo dos últimos anos (ANDRADE, 2012; STEFE, ALVES e RIBEIRO, 2008). Parker (1974) usou este termo para definir este composto como sendo relativo a organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal. Esses microrganismos

após ingeridos devem atender a algumas características como as de sobreviver ao trato gastrointestinal na presença de sais biliares, suco gástrico, enzimas, devem manter-se viáveis para colonização intestinal para isso devendo ser inócuos, não apresentar potencial hemolítico e nem resistência a antimicrobianos de largo espectro, dentre outros (BADARÓ et al., 2008).

Entre os benefícios dos probióticos estão: a manutenção e balanço da microbiota; equilíbrio da função intestinal; melhor absorção de nutrientes; diminuição dos riscos de alergias e intolerância alimentares como a da lactose, por exemplo; diminuição dos níveis de colesterol e triglicérides; diminuição da pressão sanguínea; anticarcinogênicos e melhora da resposta imunológica (PARK et al., 2016; KARIMI et al., 2015).

Dentre os vários microrganismos constituintes dos probióticos encontram-se o gênero de lactobacilos. que colonizam os mais diferentes ambientes desde a boca, trato gastrointestinal, região vaginal, laticínios, carnes e alimentos em estado de deterioração. Essas bactérias lácticas são gram-positivas, não esporuladas, catalase negativa e desprovida de citocromos, anaeróbios, porém, aerotolerantes e com grande potencial de fermentação (BURITI; SAAD, 2007), ainda são produtores da enzima β -galactosidase (β -gal), popularmente conhecida como lactase, que é responsável pela degradação da lactose em glicose e galactose (SANTIAGO et al. 2004) e possuem grande biodisponibilidade de antioxidantes, sendo esta disposição efetiva nos processos de eliminação de radicais livres e diminuição da lipoperoxidação lipídica (MEIRA, 2011; VIRTANEN et al., 2007).

Há necessidade de exploração científica do potencial do qual as bactérias possuem, seja por modificação gênica, uma vez que são microrganismos maleáveis para tal e que o fato contribui para a variabilidade da espécie, ou ainda, utilizando de seus próprios metabólitos, como é o caso de espécies de lactobacilos, ampliando e aplicando-os em prol da saúde, seja para diversificar as possibilidades de tratamento alternativo para os intolerantes à lactose ou para exercer, atividade antioxidante no organismo limitando, inibindo ou atrasando a oxidação dos substratos de uma maneira eficaz, reduzindo assim as lesões causadas pelos radicais livres nas células evitando futuras patologias. Com a finalidade de obter novos microrganismos lácticos para aplicação em alimentos, uma consulta as duas coleções de lactobacilos isolados de produtos cárnicos e lácteos da Universidade do Oeste de Santa Catarina- UNOESC foi realizado com o intuito de verificar possíveis isolados para aplicação em tecnologia de probiose.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Selecionar bactérias lácticas produtoras de β - galactosidase e determinar suas características probióticas e antioxidantes através de testes *in vitro*.

1.2.2 Objetivos Específicos

Investigar qual(is) isolados de lactobacilo(s) apresenta(m) maior atividade de β -galactosidase;

Determinar as características e seguridades do(s) isolado(s) selecionado pelos testes de produção de hemolisinas e sensibilidade aos antimicrobianos;

Estabelecer a viabilidade dos isolados em ensaios que simulem o sistema gastrintestinal em modelo *in vitro*;

Avaliar o potencial antioxidante dos isolados selecionados com melhor resposta probiótica frente aos testes de inibição da atividade do radical DPPH e auto-oxidação do ascorbato;

Selecionar a(s) cepa(s) com melhor resposta probiótica e antioxidante para possível aplicação como aditivo alimentar.

2 TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS

A alimentação é fator primário na rotina diária da humanidade, seja por questões de necessidade básica ou principalmente por que sua obtenção tornou-se um problema de saúde pública, já que seu excesso, falta ou inadequabilidade pode causar doenças. Condicionado a disponibilidade dos alimentos estão também os hábitos alimentares que consistem na disposição duradoura que se adquire pela repetição frequente de um ato, uso ou costume segundo tradições ou ambientes sociais integrando a cultura e o poder econômico de um povo (ABREU et al, 2001).

Com o aumento populacional que chega no século XXI com cerca de 7 bilhões de pessoas, continuando a crescer, alternativas como a redução no desperdício de alimentos, mudanças na dieta e a expansão consciente na agricultura podem ajudar de forma satisfatória a demanda de alimentos, o aumento da produtividade de diferentes culturas e a redução do déficit de rendimento entre agricultores eficientes e de subsistência se tornaram objetivos primordiais na implantação de técnicas para suprir necessidades alimentares. A segurança alimentar é mais do que a produção de alimentos no nível de exploração, ela recebe influência direta de fatores econômicos, sociais, políticos e administrativos que afetam a estabilidade, o acesso e segurança do abastecimento alimentar pelo mundo (BOARETTO, 2015; ROBERTS; RYAN, 2015).

No intuito de reverter alguns destes impactos gerados pela ampla produção alimentar, há muitos setores como, por exemplo, a tecnologia e engenharia dos alimentos, nutrição, biotecnologia e microbiologia empenhados em trazer soluções que reduzam a fome e a desnutrição, melhorem a saúde e ainda diminuam o impacto ambiental (SOUSA et al., 2013).

Faz alguns anos que o setor de alimentos tem se deparado com um cenário cada vez mais competitivo e globalizado e com uma demanda muito mais rigorosa por parte dos consumidores que se apresentam cada vez mais exigentes e instruídos. Frente a essas situações a indústria de alimentos obrigou-se a inovar e desenvolver novos produtos e processamentos a fim de atender à exigência dos consumidores (VIDIGAL et al., 2014).

A evolução do sistema agroalimentar, com auge no século XXI, faz com que as empresas agroindustriais do Brasil encontrem-se numa posição de extrema necessidade por recursos tecnológicos afim de satisfazer a demanda interna do país no que diz respeito ao consumo e procura de alimentos bem como de inovação para enfrentarem os desafios da competição no mercado de exportação (CRIBB, 2004).

A sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos define tecnologia dos alimentos como aplicação de métodos, técnica de preparo, armazenamento, processamento, controle, embalagem, distribuição e utilização dos alimentos e que atualmente orienta-se para a produção e incremento de mantimentos mais sofisticados, mais nutritivos, atrativos e acessíveis explorando o aproveitamento de subprodutos e materiais descartáveis para que possam ser utilizadas pela parcela da população mundial hoje carente de alimentos (GAVA; SILVA; FRIAS, 2014).

O sucesso da implementação de novas tecnologias e desenvolvimento de novos produtos alimentares depende em grande medida das respostas culturais dos consumidores em relação aos processos de inovação (DE STEUR; ODONGO; GELLYNCK, 2016; CHEN; NDERS; NA, 2013).

Tecnologias alimentares estabelecem vínculos entre a produção e o consumo dos alimentos; no que diz respeito a procura por tecnologias consideradas produtivas e prontas a atender as atuais demandas, a biotecnologia é destaque permitindo o uso de agentes ou sistemas biológicos para produção industrial de realização de serviços utilizando matéria viva com a finalidade de bioconversão e biossíntese tendo por objetivo uma atividade agrônômica ou industrial efetiva e um bom rendimento econômico (ALMEIDA et al., 2011).

2.2.1. Biotecnologia

A biotecnologia acompanha o homem desde os tempos mais remotos da história, conforme mostram os antigos relatos da produção de pães e vinhos e outros fermentados naturais (COSTA; DE OLIVEIRA, 2013). Não nos resta dúvidas que esta ciência iniciada no passado difere da atual onde, por se tratar de uma interdisciplinaridade científica, a biotecnologia é responsável pelo desenvolvimento de plantas resistentes às doenças, embalagens biodegradáveis diversas, detergentes mais eficientes, melhoramento genético alimentar com o objetivo de diminuir o uso de pesticidas, antibióticos, demais fármacos e agrotóxicos, processos de produção industrial que geram um menor impacto ambiental, além de colaborar na pesquisa, desenvolvimento e diagnóstico de novas patologias e medicamentos (CALVETE; CASEIRO; DE SOUZA, 2015; ALMEIDA et al., 2011).

Atualmente o conceito de biotecnologia inclui qualquer técnica que utilize organismos vivos ou suas partes, com o objetivo de produção ou modificação de produtos, aperfeiçoando

plantas ou animais e ainda descobrindo microrganismos para usos específicos (ZUCOLOTO; FREITA, 2013).

Esta ciência é baseada na busca e descoberta de recursos biológicos que tem relevante exploração industrial tendo na sua abordagem prática aspectos que passam desde a coleta do material biológico adequado, seguido da seleção e triagem de materiais com os atributos desejados para exploração tecnológica, resultando em uma seleção final e segura dos microrganismos mais aptos para o desenvolvimento de um produto comercial ou processo industrial (CANHOS; MANFIO, 2010) e portanto, não caracteriza-se pela produção de um bem, um produto intermediário ou um serviço, mas por um conjunto de técnicas de manipulação de organismos vivos podendo resultar em produtos de diferentes setores servindo em um processo intermediário para a produção de outros bens ou mesmo um serviço (FREIRE, 2014).

Através da ciência biotecnológica foi possível modernizar a agricultura com novas descobertas no ramo do melhoramento vegetal. Assim antigas cultivares foram substituídas por espécies melhoradas geneticamente, conhecidas como plantas transgênicas, para aumentar sua produtividade e atender a demanda alimentar, tornando este ramo das ciências agrárias o difusor desta ciência contribuindo para minimizar a fome devido aumentos na produtividade de algumas culturas básicas (PANZARINI et al., 2015; LEITE; MUNHOZ, 2013).

No Brasil, a implantação de culturas modificadas ou Organismos Geneticamente Modificados (OGMs) ocorreu após um longo período de incertezas e o desenvolvimento deste mercado dependeu e ainda depende muito do aprimoramento de diversos fatores adicionais à existência de recursos naturais, políticas públicas de inovação, presença de recursos humanos qualificados e de tecnologias que atuem com instituições de pesquisas (ZUCOLOTO; FREITAS, 2013).

Ainda no país percebeu-se um progresso nos investimentos em políticas de inovação na área tecnológica em meados dos anos 90, onde observou-se a necessidade de agregação de conhecimentos e técnicas de inovação tecnológica oriunda da fundação de esquemas financeiros de investimento em pesquisa, promoção da Lei de Inovação (Lei nº 10.973/2004) e ressaltante importância de empresas incubadoras (MATIAS; VIEIRA; FONTENELE, 2014).

No cenário atual a biotecnologia, enquanto atividade econômica está inserida em uma tríade de esferas: mercado, ciência e Estado. A empresa privada (mercado) depende do conhecimento da academia e de financiamento para inovação tecnológica enquanto o Estado

regula a produção de bens e serviços. Universidades e institutos fazem pesquisa utilizando recursos públicos e privados enquanto o governo, agências e comitês formulam políticas de CT&I (Ciência, Tecnologia e Informação) e respondem pela estrutura de regulação e demais atividades que afinam empresas e instituições de ensino (FREIRE, 2014).

Apesar dos avanços realizados em Ciência e Tecnologia, pilar do setor de biotecnologia, até aqui ainda é necessário superar muitas fraquezas para se alcançar um crescimento econômico baseado em conhecimento e inovação. O dispêndio do país em Pesquisa e Desenvolvimento tecnológico foi de 1,1% do PIB nacional no ano de 2014 e a minoritária participação do setor empresarial nesse tipo de investimento reflete na dinâmica do andamento das pesquisas no país (TORRES-FREIRE; GOLGHER; CALLIL, 2014).

Embora o investimento do país em C&T quando comparado a outros como os que são assistidos por planos governamentais e investimentos empresariais como Portugal, por exemplo, (CORREIA; GARCIA, 2016) seja pequeno, houve no Brasil um grande avanço científico nos últimos trinta anos. Este crescimento contou com iniciativas para construir a competência científica, através do treinamento qualificado de profissionais dentro e fora do país, e no ano de 2007 o país respondeu por 1,3% dos artigos científicos em revistas indexadas internacionalmente. Contudo, a produção científica não gera como consequência imediata a produção tecnológica e isto é comprovado pelo reduzido número de patentes depositadas por universidades e institutos de pesquisa brasileiros no exterior (FELIPE, 2007).

Ao passo que o investimento financeiro é garantido nesta área sofisticando o embasamento técnico possibilita à área tecnológica o desenvolvimento de um leque de produtos e processos, criando novos segmentos industriais no ramo alimentar, farmacêutico, químico, da saúde, energia e informação que se agregam em uma nova perspectiva: a biotecnologia moderna (ZUCOLOTO; FREITAS, 2013).

A biotecnologia moderna, marcada pela implantação de características de espécies diferentes e outra espécie receptora, sem reprodução sexual, ocorre por meio da intervenção humana (LEITE; MUNHOZ, 2013) promovendo inovadoras técnicas para a produção de substâncias químicas em processos mais limpos tendo como princípio o de se trabalhar em harmonia com o mundo natural atendendo a população em suas mais diferentes necessidades, suplantando tecnologias que poluem a biosfera ou que contribuam para a depleção de fontes finitas (SOARES; MONASSA, 2014).

Com o aumento mundial da população, as exigências de produtos alimentares de qualidade também aumentaram e as tecnologias biológicas garantem a segurança de

consumirmos um alimento saudável, com sabor, textura, odor, aparência e nutrientes em perfeitas condições em todos os estágios da produção, nesse sentido o emprego da biotecnologia, no que se refere aos produtos e processos derivados da engenharia genética, é de importância estratégica para a indústria alimentícia (GOMES; BORÉM, 2015).

Na indústria de alimentos muitas das aplicações biotecnológicas resultam em produtos alimentícios utilizados diariamente pelos consumidores. Na indústria de beneficiamento de leite, muitas das enzimas utilizadas são extraídas de bactérias lácticas, por exemplo, e aplicadas na elaboração de queijos, iogurtes e derivados a fim de melhorar a textura, valor nutritivo e sabor dos produtos finais no que chamamos de microbiologia industrial (BARRETTO et al., 2016).

2.2.1.1 Microbiologia Industrial e Enzimas

Segundo Okafor (2016) a microbiologia industrial é descrita como o estudo e produção em larga escala de microrganismos, ou produtos derivados de seu metabolismo como as enzimas, por exemplo, aplicadas diretamente na indústria e caracterizando um ramo da biotecnologia onde são aplicadas técnicas de recombinações gênicas de convencionais à sofisticadas.

Enzimas são proteínas que atuam como catalisadores em reações químicas de pH e temperatura controlados possuindo um papel fundamental no metabolismo humano, na degradação de matéria orgânica, deterioração e conservação dos alimentos. Possuem estrutura complexa agindo em substratos específicos sendo exploradas na biotecnologia através dos produtos secundários do metabolismo de microrganismos que as produzem para potencializar uma série de reações químicas necessárias para a vida (LI et al., 2012; ORLANDELLI et al., 2012).

A partir do século XIX d.C, a natureza das enzimas e a maneira como atuam passaram a ser esclarecidas, e durante o século seguinte o reconhecimento dessas estruturas químicas como proteínas juntamente com o conjunto de técnicas para sua purificação e análise, abriram portas para o desenvolvimento de processos voltados à sua produção e utilização industrial (FERRAZ, 2015).

As propriedades catalíticas eficazes das enzimas promoveram a sua introdução em vários produtos e processos industriais como a fabricação de alimentos, nutrição animal, cosmetologia, medicamentos, bioengenharia, bioenergia e como ferramenta para pesquisa e

desenvolvimento. Avanços recentes em biotecnologia, particularmente em áreas como a engenharia de proteínas, forneceram ferramentas importantes para o desenvolvimento eficiente de novas enzimas com propriedades melhoradas para aplicações em técnicas pré-estabelecidas e na produção de novos catalisadores feitos de forma específica para novas aplicações industriais (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013; LIESE; HILTERHAUS, 2013; FOGARTY; KELLY, 2012; MCCARTY, 2012; KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002).

O mercado global de enzimas industriais é muito competitivo. As empresas competem principalmente com base na qualidade do produto, desempenho, uso de seus direitos de propriedade intelectual e na capacidade de inovação. Dentre os maiores consumidores de enzimas industriais estão a América do Norte e Europa, embora a região da Ásia-Pacífico passe por um aumento na demanda de enzimas, bem como China, Japão e Índia (ADRIO; DEMAIN, 2014).

No ano de 2012 Li (2012) relata que eram conhecidas, até então, cerca de 4 mil enzimas e destes aproximadamente duzentos tipos eram originários de microrganismos utilizados comercialmente. Das enzimas industriais utilizadas cerca de 75% são hidrolíticas sendo aplicadas na degradação de várias substâncias naturais. De forma geral são utilizadas na indústria têxtil (amilase, celulase, pectinase), de detergentes (celulase, lipase, protease), alimentícia (celulase, lactase, lipase, pectinase, protease, oxidorreductase), de papel (xilanas, lipase e oxidorreductase), e de couro (lipase, protease) (COELHO et al., 2008; OLIVEIRA et al, 2006).

As lactases usadas em grande na produção de produtos alimentícios tais como leites fermentados, sorvetes, além de outras bebidas lácticas têm por finalidade reduzir o teor de lactose desses alimentos a fim de que possam ser consumidos por pessoas intolerantes a este açúcar (LI, 2012).

As enzimas de origem microbiana possuem muitas vantagens sobre as homólogas de origem animal e vegetal como, por exemplo, menor custo de produção, possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais oferecendo um amplo espectro de características físico químicas (VIEIRA, 2013).

Na indústria em geral a procura por mecanismos de baixo custo na produção e manutenção enzimática faz com que haja estudos e melhorias nos processos de produção fortalecendo a competitividade e aumentando a diversidade do produto (MENENDEZ; GARCIA-FRAILE; RIVAS, 2015).

Para que a produção enzimática em larga escala industrial baseia-se em microrganismos a partir de técnicas ambientalmente seguras e sua posterior aplicação na área industrial, que irá beneficiar estudos sobre a fisiologia molecular e processos reguladores de produção ajustando-os para o melhor rendimento e menor custo, a biotecnologia verde torna-se cada vez mais importante e difusa (GUPTA, 2014).

Hoje a indústria conta com tecnologias de confinamento físico com retenção de atividades catalíticas, chamadas de imobilização enzimática, fazendo com que estas possam ser utilizadas repetidas e continuamente sendo objetos de considerável interesse devido às vantagens quando comparados a enzimas solúveis. Estas técnicas de imobilização servem como base para a produção de diversos produtos biotecnológicos com aplicação em alimentos, fármacos, diagnósticos, cromatografias de bioafinidade e biossensores (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013).

No enquadramento das aplicações microbianas em biotecnologia tradicional, o valor dos microrganismos é geralmente avaliado pelo potencial de aplicação direta destes nos processos industriais ou de seu valor no mercado. A sistemática microbiana aplicada torna-se uma poderosa ferramenta no desenvolvimento biotecnológico e consiste em uma abordagem tradicional de isolamento e cultivo de microrganismos, ou de bioprospecção molecular independente de cultivo uma vez que, uma dada amostra ou ambiente pode fornecer informações críticas para o delineamento de estratégias de exploração biotecnológica (CANHOS; MANFIO, 2010).

O conhecimento sobre microrganismos possibilitou a partir do século passado o desenvolvimento da indústria de alimentos que, segundo Malajovich (2013), soube se apropriar de todas as ciências afins a área fazendo com que alimentos fermentados, sobretudo derivados lácteos, constituíssem hoje a terceira parte da dieta humana, seja por facilitar a absorção de nutrientes ou por apresentarem menores taxas de substâncias tóxicas. Hoje, boa parte desses alimentos se enquadra na categoria denominada de alimentos funcionais, isto é, alimentos que trazem benefícios extras além dos que seriam esperados em função de seu valor nutritivo (ALMEIDA et al., 2011).

2.3. ALIMENTOS FUNCIONAIS

As mudanças no estilo de vida das populações em decorrência da globalização, muito presente em grandes centros urbanos e que agora se alastra em um movimento centrípeto, são

considerados importantes e influentes para o fenômeno de transição nutricional que hoje é marcado pelo consumo excessivo de produtos processados, em relação a produtos regionais com tradição cultural, principalmente os *fastfoods*, tendo como contrapartida, o movimento *slow food* que conjuga a regionalidade em seus hábitos alimentares (FRANÇA et al., 2012).

A alimentação saudável é encarada nos dias atuais como uma preocupação mundial num momento em que a obesidade e doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) são uma ameaça real, tornando esse tema objetivo de estudos em diversas áreas do conhecimento (MISSAGIA; REZENDE, 2011).

O crescente interesse pelos alimentos funcionais é nutrido pelo aumento de pesquisas a fim de identificar propriedades e potenciais aplicações destes a favor da saúde ao alcance da população. Outra razão para o crescimento da busca por uma alimentação funcional está na ampla divulgação e comprovação dos benefícios do melhoramento alimentar, favorecendo uma educação pública acerca da saúde (WILDMAN; WILDMAN; WALLACE, 2016).

No Japão, em meados de 1980 surge através de uma ação governamental, que tinha como função principal a de prevenir doenças crônicas- degenerativas na população crescente de idosos e assim reduzir gastos com a saúde pública, a alimentação funcional. Inicialmente denominações como alimentos planejados, alimentos saudáveis, protetores, farmacêuticos, dentre outras, foram utilizadas para estes alimentos que oferecem proteção especial à saúde (ALISSA; FERNS, 2012; DO AMARAL; DE CARVALHO; VILELA, 2007; PACHECO; SGARBIERI, 2001).

O termo “alimentos funcionais” vem sendo comumente utilizado no marketing de diversas embalagens de produtos industriais. O alimento contido por trás dessas embalagens fornecem benefícios fisiológicos ou reduzem o risco de doenças crônicas além de suprir necessidades nutricionais básicas. Embora algum bem- estar seja relatado a curto prazo os benefícios de redução dessas patologias são relatados em estudos após longos prazos de adesão a dieta e associação com rotinas mais saudáveis (EL SOHAIMY, 2012).

Não existe uma definição aceita universalmente para alimentos funcionais, o presente conceito varia de acordo com a legislação vigente em cada país e seus hábitos alimentares (PACHECO; SGARBIERI, 2001). No Brasil, a portaria nº 398 de 30 de abril de 1999, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde do Brasil define alimento funcional como: “Todo alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos a saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica” (ANVISA, 1999).

Paralelo ao advento dos alimentos funcionais no Brasil houve a implantação dos alimentos enriquecidos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2016a) ressalta que as alegações de propriedade funcional utilizados nos chamados alimentos funcionais estão relacionadas com o papel metabólico ou fisiológico que um determinado nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções do organismo, ou seja, estes alimentos contêm ingredientes capazes de manter os níveis saudáveis de triglicérides, na proteção das células contra radicais livres, no funcionamento do intestino, entre outros estando seu consumo associados a uma alimentação e hábitos de vida saudáveis.

Os alimentos enriquecidos são aqueles aos quais é adicionado um ou mais nutrientes essenciais, como vitaminas, minerais e ou aminoácidos, por exemplo, definidos por uma portaria pré determinada tendo por objetivo reforçar o seu valor nutritivo em um ou mais nutrientes tendo uma alegação chamada “plenamente reconhecida” para vitaminas ou minerais (ANVISA, 2016a).

O reconhecimento da eficiência dos compostos ativos fisiologicamente nos alimentos funcionais deve ser concluído com estudos clínicos, bioquímicos e modelos de avaliação de risco e benefício, cientificamente conhecidos os quais permitirá o esclarecimento dos efeitos fisiológicos positivos e negativos. No Brasil, a necessidade da comprovação dos benefícios a saúde é imprescindível e de extrema importância devendo estar de acordo com as normas das portarias ANVS/MS nº16, 17, 18 e 19 de 1999 (PACHECO; SGARBIERI, 2001).

Ao adentrar o século atual os consumidores viram aparecer nas gôndolas das prateleiras dos estabelecimentos alimentícios novos produtos alimentares que tem como *slogan* contribuir na busca por uma vida mais saudável, auxiliando na prevenção de doenças como as cardiovasculares, vários tipos de câncer, alergias, problemas intestinais, dentre outros sendo intitulados nutracêuticos, e lançados com êxito em diversos países europeus em meados da década de 1990 (RAUD-MATTEDI, 2008).

2.3.1 Alimentos Nutracêuticos

O termo nutracêutico foi inserido no mercado em 1989 pela fundação dos Estados Unidos para Inovação em Medicina referindo estes como qualquer substância que em um alimento ou parte dele fornece benefícios médicos, incluindo a prevenção e tratamento de doenças (ALISSA; FERNS, 2012; DE OLIVEIRA et al., 2002).

Os nutracêuticos podem ser produzidos através de métodos fermentativos com o uso de microrganismos ou através da ingestão de fibras dietéticas, ácidos graxos poli-insaturados, proteínas, peptídeos, aminoácidos, minerais, vitaminas e outros antioxidantes que se caracterizam por serem componentes alimentares não digeríveis pelo corpo afetando beneficemente a saúde por estimularem a atividade de populações bacterianas no cólon sendo caracterizados em 1995 como prebióticos (RAUD, 2008; MORAES; COLLA, 2006).

As principais diferenças que residem entre os nutracêuticos e alimentos funcionais são citadas nas pesquisas de Wildman, Wildman e Wallace (2016), Goldberg (2012), El Sohaimy (2012), Do Amaral, De Carvalho e Vilela (2007), Moraes e Colla (2006) relatam diferenças significantes: a) o apelo médico é relevante aos nutracêuticos enquanto a redução do risco de doença e o não tratamento desta ficam a cargo dos alimentos funcionais; b) enquanto nutracêuticos incluem suplementos dietéticos em cápsula, tinturas ou comprimidos, os alimentos funcionais devem estar na forma de um alimento comum; c) a alimentação funcional pode ser preparada com ou sem conhecimento científico, isto é, o uso combinado de determinados alimentos ricos em compostos vitamínicos, proteicos ou outros, mesmo que de forma inconsciente, trará benefícios a saúde, enquanto formulações nutracêuticas são produtos isolados ou purificados de alimentos ou microrganismos geralmente vendidos em formas medicinais não associadas a alimentos.

Dentro dessa nova concepção de alimentos que previne e/reduz riscos de DCNT, promovem manutenção da saúde e modificações benéficas no organismo a suplementação de componentes com atividades reconhecidamente benéficas a saúde, como sais minerais e vitaminas, constituíam os alimentos funcionais de primeira geração. Os últimos anos foram dedicados a adição de componentes que poderiam exercer benefícios sobre a composição da microbiota intestinal proporcionado especialmente por bactérias ou leveduras viáveis, os probióticos (BADARÓ et al., 2008; RAUD, 2008).

2.3.1.1 Probióticos

O termo “probiótico”, de origem grega, significa “para a vida”, e tem sido empregado das mais diversas maneiras ao longo dos últimos anos (ANDRADE, 2012; STEFE, ALVES e RIBEIRO, 2008). Parker (1974) usou este termo para definir este composto como sendo relativo a organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal. Podem ser definidos ainda como suplementos alimentares que contêm microrganismos vivos

ou seus componentes e que quando ingeridos em determinado número, apresentam efeitos positivos sobre a saúde e bem-estar do hospedeiro, sendo essa a definição aceita no Brasil pela legislação vigente (BADARÓ et al., 2008; ANVISA, 2003).

A necessidade do surgimento de novos produtos à base de probióticos tem estimulado o aumento do número de pesquisas. Anteriormente o consumo de probióticos tinha por finalidade a recuperação ou estabilização da microflora intestinal, composta por cerca de 1 bilhão de bactérias e mais de mil espécies. Atualmente as pesquisas em curso sugerem que os probióticos desempenham potencial efeito na prevenção do envelhecimento precoce, através da atividade antioxidante, controle de hipercolesterolemia, redução dos riscos de infarto agudo do miocárdio, dentre outros (LAM et al., 2012; FUNG; YUEN; LIONG, 2011; ROUND; MAZMANIAN, 2009).

Os mecanismos benéficos destes alimentos sobre a microbiota e trato intestinal não são totalmente compreendidos, no entanto, estudos relatam sua ação sobre a inibição do crescimento de floras patogênicas, melhora e reforço da barreira intestinal, atividade antioxidante, modulação do sistema imunológico, uma vez que aproximadamente 80% das células imunológicas encontram-se no intestino, supressão de citocinas pró inflamatórias demonstrando assim atividades anti inflamatórias a nível intestinal e sistêmico, além de limitar a migração de células T em tecido de cólon inflamado. Estes compostos podem ainda modular a percepção da dor induzindo a expressão de receptores em células intestinais mediando funções analgésicas (PARK et al., 2016; KARIMI et al., 2015; JUNGENSEN et al., 2014; MINE, 2014).

Entre as neoplasias, o câncer colorretal é uma das principais causas de morte entre homens e mulheres sendo o aumento da sua incidência relacionado a casos de doenças inflamatórias intestinais crônicas e mudanças de hábitos alimentares. A *American Cancer Society* (2011) relata que a dieta pode ser responsável por cerca de 30% dos casos de câncer em países desenvolvidos. Os probióticos são eficazes na prevenção e tratamento de muitas doenças do intestino como a doença inflamatória intestinal, diarreia, síndrome do intestino irritado, intolerância ao glúten e a lactose, gastroenterite e cancro do cólon (KICH, 2016; BERMUDEZ- BRITO, 2012; RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

Por se tratarem de microrganismos vivos, Floch (2013) e Boyle, Robins- Browne e Tang (2006) consideram alguns estágios e condições patológicas importantes para a não administração de alimentos ou fármacos com propriedades probióticas: a) pacientes imunocomprometidos e prematuros apresentam, mesmo que em raras proporções o

desenvolvimento de sepse por probióticos; b) a presença de cateter venoso central, barreiras intestinais lesadas, administração de probióticos por jejunostomia e administração de antibiótico oral, aos quais os probióticos são resistentes, favorecem a forte aderência e colonização intestinal destes microrganismos; c) pré-disposição a doença valvar cardíaca, ambos são fatores para o aumento da translocação bacteriana e consequente desenvolvimento de um quadro patológico complicado.

Quanto à dose resposta da terapia com probióticos, revisões bibliográficas elaboradas, embasadas em doses de uso regulares, por Ouwehand (2016) e Boyle, Robins- Browne e Tang (2006) concluem que para tratamento de hipertensão arterial doses regulares superiores a 10^{11} UFC/mL são mais eficazes em relação a doses baixas, doses maiores que 5×10^9 UFC/mL mostram-se representativas quando usadas em associação com antibióticos em casos de diarreia. Em casos de síndrome de intestino irritado doses diárias menores que 10^{10} UFC/mL são indicadas.

Para o tratamento de gastroenterite agudas em crianças, doses diárias maiores que 10^{10} UFC/mL de *Lactobacillus rhamnosus* mostraram-se efetivas. Linhagens de *Lactobacillus acidophilus* em combinação com *Lactobacillus bulgaricus*, *L. rhamnosus* estirpe GG e *Enterococcus faecium* mostram-se eficazes na prevenção de diarreia associada a antibióticos reduzindo a duração média da diarreia em mais de 30 horas. Associações contendo 3×10^{11} CFU/mL *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis* e *Streptococcus thermophilus* são efetivas na prevenção de erupções de inflamatórias crônicas em pacientes com doença inflamatória do intestino (OUWEHAND, 2016; BOYLE; ROBINS- BROWNE; TANG, 2006).

Para serem conhecidas como probióticos para consumo humano as bactérias fermentadoras do ácido láctico (BAL), utilizadas como aditivos alimentares, devem ser detentoras do selo de geralmente reconhecido como seguro ou GRAS (*Generally Recognized as Safe*) usado pelo FDA (*Food and Drug Administration*). O reconhecimento como seguro dá-se através de experiências baseadas no uso comum em alimentos, histórico de consumo para o uso alimentar e um considerável número de consumidores. Outra forma de adquirir o selo de reconhecimento é através de estudos científicos que relatem e comprovem a inocuidade e beneficência da amostra em questão (FDA, 2015).

2.3.1.1.1 Breve panorama dos probióticos no Brasil e no mundo

Probióticos industriais geralmente são definidos como microrganismos vivos acrescentados como aditivos alimentares, geralmente em bebidas lácticas, e para a alimentação do homem é preferível que estas cepas sejam isoladas do próprio humano. No ano de 2013 o mercado global de alimentos funcionais foi estimado em 50 bilhões de dólares em ações por ano e destes (CASSELI et al., 2013), enquanto que no ano de 2015 o mercado de probiótico atingiu 33,19 bilhões de dólares e devendo chegar à casa de 46,55 bilhões de dólares, representando um crescimento anual de 7% até o ano de 2020 (PARK et al., 2016).

O estatuto de regulamentação desse tipo de produto não está bem estabelecido a nível internacional. A FDA dos EUA aplica distinção conceitual entre alimentos médico, suplementos dietéticos, drogas e produtos biológicos caracterizando os probióticos como um suplemento dietético que podem ser comercializados sem qualquer pré- aprovação por órgãos de inspeção alimentar, já os destinados ao uso como fármacos precisam do aval da FDA. A comissão Europeia reconhece as bactérias probióticas como nutrientes, a concepção farmacológica de probiótico nesta união depende da concentração ingerida pelo consumidor, dispensando as três etapas da elaboração e lançamento de um novo fármaco (CASSELI et al., 2013; FLOCH, 2013; BOYLE; ROBINS- BROWNE; TANG, 2006).

No Brasil a RDC nº 323/2003 exige a apresentação de estudos clínicos de fase III comprobatórios da segurança e eficácia terapêutica da proposta medicamentosa probiótica a ser lançada no mercado enquanto que, para alimentos, a Portaria nº 15, de 30 de abril de 1999 dispõe das exigências e assessoramento em matéria relacionada a alimentos funcionais e novos alimentos e segurança de consumo (ANVISA, 2003; ANVISA, 1999).

No país atualmente existem dez probióticos registrados na ANVISA, sendo eles: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* variedade *shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium*. Os microrganismos *Lactobacillus delbrueckii* (subespécie *bulgaricus*) e *Streptococcus salivarius* (subespécie *thermophilus*) foram retirados da lista, pois além de serem espécies necessárias para produção de iogurte, não foi comprovado seu efeito probiótico. A quantidade mínima viável para os probióticos devem estar situadas na faixa de 10^8 a 10^9 UFC/mL na recomendação

diária de consumo do produto, sendo quantidades inferiores permitidas dependentes da comprovação de sua eficácia (ANVISA, 2016b).

Existem vários microrganismos, que podem exercer potencial probiótico em determinados momentos e condições, em espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são comumente utilizadas, muitas vezes seu benefício está associado com ingestão de doses regulares e uma dieta balanceada (HEMAISWARYA, 2013; WU; PATTERSON; HAWK, 2011).

2.3.2 Lactobacilos

O gênero lactobacilar, compreende o grupo de bactérias fermentadoras de ácido láctico, as bactérias desse grupo têm características de não formadoras de esporos além de serem produtoras do ácido láctico como principal produto da sua fermentação. Este grupo produz grandes quantidades de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas fazendo com que os alimentos fermentados adquiram características sensoriais e propriedades gerais de consumo agradáveis (MOTTA et al., 2015; FERREIRA, 2012; NOGUEIRA; GONÇALVES, 2011).

Bactérias fermentadoras do ácido láctico são fastidiosas estando presentes em ambientes nutricionalmente ricos como produtos de laticínios, cárnicos e no trato gastrointestinal de humanos e animais. São anaeróbias, anaeróbias facultativas ou microaerofílicas. Podem apresentar pseudo catalase ou catalase negativa. Alguns membros pertencem a habitats específicos, como boca, vagina e intestino, sendo que estas últimas constituem o grupo probiótico utilizado industrialmente (FERREIRA, 2012).

Os lactobacilos são bactérias gram positivas, não formadoras de esporos, morfologicamente caracterizadas como bacilos ou cocobacilos e acumulam ácido láctico no ambiente que crescem como produto do metabolismo. Elas são estritamente fermentativas, aero-tolerantes ou anaeróbica, acidófilas e têm necessidades nutricionais complexas. Tem a glicose como sua fonte de carbono, porém metabolizam citrato, malato, tartarato, quino, nitrato, nitrito, utilizando-os como fonte de energia (COELHO, 2013; BADARÓ, 2008; BURITI; SAAD, 2007).

Com base nas características fenotípicas e bioquímicas do gênero *Lactobacillus* pode-se dividi-los em três grupos de acordo com o tipo de fermentação do açúcar: homofermentativas obrigatórias incluem aqueles que fermentam glicose ácido láctico e não

fermentam pentoses ou gliconato, heterofermentativas facultativas que incluem os lactobacilos que fermentam hexoses em ácido láctico, ácido acético e/ou etanol e dióxido de carbono, sendo que a produção de gás a partir da glicose é uma característica marcante dessas bactérias e heterofermentativas obrigatórias que fermentam glicose fermentadas pela via do fosfogluconato produzindo lactato, ácido acético e CO₂ em quantidades equimolares (COELHO, 2013; ANDRADE, 2012; HAKANSSON, 2011).

Atualmente o gênero conta com 56 espécies reconhecidas sendo que 18 destas encontram-se no intestino humano e são consideradas de interesse probiótico, dentre elas algumas espécies obrigatoriamente homofermentativas e facultativamente heterofermentativas e algumas obrigatoriamente heterofermentativas, esta última, é comumente associada à deterioração de alimentos, como alguns alimentos fermentados, por exemplo (DE ALMADA et al., 2015; STÜRMER et al., 2012).

A seleção de bactérias probióticas segue alguns critérios preferenciais citados por Nogueira e Gonçalves (2011) e Saad (2006) em seus estudos: para administração em humanos as bactérias escolhidas devem ser, preferencialmente, da mesma origem demonstrando segurança de consumo para o uso, deverão conter histórico genético de não patogenicidade e não estarem associadas a outras doenças como, por exemplo, endocardite, além da ausência de genes determinantes da resistência aos antimicrobianos. Um critério definitivo para a seleção de cepas probióticas irá depender da indicação clínica e do seu potencial probiótico que pode dissentir para cepas diferentes de uma determinada espécie.

2.3.2.1 Propriedades tecnológicas e probióticas

Para ser empregada como probiótico, a bactéria precisa portar o selo GRAS, ter efeitos benéficos ao hospedeiro, comprovados *in vivo* e *in vitro* por meio de uma dose conhecida e concentrações pré-determinadas, segurança, possuir a garantia da manutenção da viabilidade até o momento do consumo independente do veículo utilizado como, por exemplo, conter pelo menos 10⁷ células/g de bactérias probióticas viáveis no momento da compra do produto (STÜRMER et al., 2012; SAAD, 2006).

Além destas características a FDA bem com a Organização Mundial da Saúde estabeleceram alguns outros critérios para a utilização de cepas probióticas, embasados no chamado potencial probiótico: a) os probióticos devem ser taxonomicamente classificados e depositados em uma coleção de cultura internacionalmente reconhecida; b) demonstrar

significante sobrevivência ao ácido gástrico, a digestão biliar e pancreática; c) aderir as células da mucosa intestinal; d) não produzir hemolisinas ou potenciais toxinas patogênicas; e) possuir propriedade antagonista frente a patógenos do trato gastrintestinal; f) não causar efeitos colaterais; g) ser metabolicamente ativas assim como resistir a fagócitos e ao oxigênio demonstrando atividade antioxidante e h) possuir segurança em relação aos padrões de resistência aos antimicrobianos não possuindo genes plasmidiais adquiridos de resistência (CASSELI et al., 2013; VYAS; HEMAISWARYA, 2013; VYAS; RANGANATHAN, 2012; ALMEIDA, 2011).

A funcionalidade de culturas com potencial probiótico é dependente da sua habilidade de sobreviver e colonizar o trato gastrintestinal. Sabe-se que o pH estomacal apresenta-se em torno de 2,5 a 3,5 e também que a pepsina apresenta assim atividade antimicrobiana; portanto, torna-se extremamente necessária a resistência das células as barreiras biológicas como a acidez estomacal, sais biliares, que devido sua ação emulsificante age sobre a membrana das células bacterianas, e enzimas proteolíticas. É no intestino que além de produzirem substâncias, como bacteriocinas, outros compostos antimicrobianos como ácidos graxos de cadeia curta, microcinas e de manutenção do pH ácido, competem por nutrientes, sendo esta atividade maior no cólon distal e intestino delgado, controlando assim patógenos intestinais (LUNA et al., 2015; MEIRA et al., 2010; BEGLEY; GAHAN; HILL, 2005; NOGUEIRA; GONÇALVES, 2001).

Por auxiliarem na recomposição da microbiota intestinal, pelo mecanismo de exclusão competitiva, o potencial de adesão e colonização da mucosa intestinal é requerido, a ação de colonização, mesmo que temporária, impede a adesão com subsequente produção de toxinas ou invasão das células epiteliais por patógenos intestinais. A competição com bactérias indesejáveis pelos nutrientes disponíveis no sítio de colonização proporciona uma relação de simbiose com o hospedeiro que impede a produção excessiva de nutrientes que favorecerão o estabelecimento de competidores microbianos com potencial patogênico (SAAD, 2006).

Fatores de patogenicidade são critérios excludentes durante a seleção de cepas probiótica, indo contra o quesito propriedades benéficas ao hospedeiro, devido este ser considerando potencial de virulência. A produção de hemolisina ocorre devido a demanda de íons de ferro presente, principalmente nas hemácias, e que atua como cofator enzimático no desenvolvimento de microrganismos patógenos que podem desencadear processos anêmicos e de edema no hospedeiro (HUSAIN, 2008).

Bactérias probióticas muitas vezes apresentam variada resistência aos antimicrobianos devido suas características intrínsecas ou por aquisição de resistência. Resistência intrínseca baseia-se em características naturais do microrganismo não sendo transferíveis a outros, sendo que estes genes de resistência residem em seu cromossoma. Já a resistência adquirida pode ser transferida horizontalmente entre bactérias resultando em mutação genômica. Logo infere-se que isolados bacterianos que carregam genes de resistência adquirida a antibióticos, não devem ser utilizados em alimentos, a menos que haja comprovação de que tal fenótipo seja resultando de mutação cromossômica (OMURA et al., 2014; KLARE et al., 2007).

Os genes de resistência aos antibióticos de transferência horizontal, em particular aqueles transportados dentro de elementos genéticos móveis, são mais susceptíveis de serem transmitidos merecendo uma atenção ímpar. Um passo importante na diferenciação da resistência intrínseca e a adquirida em bactérias probióticas é a comparação de padrões de susceptibilidade a antibióticos de um número representativos de diferentes isolados de cada espécie. Técnicas moleculares como PCR e análises de microarranjos de DNA são extremamente úteis na determinação da base genética de fenótipos de resistência adquiridos (GUEIMONDE et al., 2013).

Bactérias lactobacilares são passíveis de incorporação de plasmídeos e transposons, elementos de DNA móveis oriundos de outras bactérias, incorporando-os em seu material genético e podendo assim adquirir resistência a determinado antibióticos e disseminá-los no sítio de colonização, levando essa característica para os demais colonizadores. Resistência aos aminoglicosídeos foi relatada e atribuída à genes *aac(6')-aph(2'')*, *ant(6)*, and *aph(3')-III* intrinsecamente resistentes em revisões bibliográficas. Outro fato é que bactérias do gênero *Lactobacillus* portadoras do gene *blaZ* são resistentes intrinsecamente aos β - lactâmicos, em contrapartida não foi ainda encontrado genes intrínsecos que codifiquem resistência a alguns fármacos, como ao ciprofloxacina, por exemplo (WONG et al., 2015).

Mine (2014) faz ressalva quanto a forma de administração do microrganismo que não necessariamente precisa ser vivo para obter resultados benéficos. Segundo o autor proteínas segregadas e DNA de alguns microrganismos inviáveis bloquearam a ativação de citocinas e preveniram apoptoses celulares suprimindo, em estudos in vivo com animais, a colite intestinal. Proteínas secretadas por *Lactobacillus rhamnosus* mostraram efeito inibitório dos sinais pró- inflamatórios e inflamatórios induzido por citocinas em células epiteliais do cólon, enquanto produtos segregados de diversas espécies probióticas inibiram a produção de citocinas inflamatórias.

Uma microbiota intestinal saudável e equilibrada resulta em um desempenho normal das funções fisiológicas do hospedeiro, o que irá segurar a qualidade de vida do indivíduo. As interações complexas e dinâmicas entre o epitélio intestinal e as bactérias do lado luminal relatando ação probiótica são resultados de estudos *in vivo* que dessa maneira reforçam a qualidade e segurança do produto final (BERMUDEZ- BRITO, 2012).

2.3.2.2 Atividade antioxidante

Existem diversos estudos que correlacionam espécies reativas de oxigênio (ROS) com o desenvolvimento de diversas patologias como câncer, diabetes, deleções gênicas por oxidação do DNA, dentre outras. Esses radicais livres cujo ânion desemparelhado encontra-se nos átomos de oxigênio (ERO) ou nitrogênio (ERN), como o ânion superóxido e o radical hidroxila, são inevitáveis no processo de respiração e metabolismo aeróbico ou em processos de disfunção biológica. Estes radicais são extremamente instáveis e reagem com a membrana celular causando peroxidação lipídica, com proteínas dos tecidos e membranas, às enzimas, carboidratos e DNA favorecendo agravantes em quadros patológicos gerais (EJTAHED et al., 2012; PACE; CAMPOS; GRAF, 2006).

O organismo humano sofre, constantemente, com a agressão de ERO e ERN gerados por processos inflamatórios, traumas em geral, respiração células ou provenientes de alimento. As principais ERO distribuem-se em dois grupos, os radicalares: hidroxila (HO^{\bullet}), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila (ROO^{\bullet}) e alcoxila (RO^{\bullet}); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERN estão inseridos o óxido nítrico (NO^{\bullet}), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-). No entanto alguns deles podem ser altamente reativos no organismo atacando lipídios, proteínas e DNA, enquanto outros apenas reagem com lipídios, existindo ainda aqueles pouco reativos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O excesso de radicais livres no organismo, chamado estresse oxidativo, é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo, como o caso do sistema de defesa celular glutathiona reduzida (GSH) e enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSHPx) e catalase (CAT), sendo que a eficiência desse sistema de defesa depende do equilíbrio entre a ingestão e depleção de antioxidantes (REBUGLIO VELOSSA et al., 2013; MEIRA, 2011).

O potencial efeito antioxidante bacteriano já tem sido mensurado por parte das bactérias da microflora (*B. longum* ATCC 15708 e *L. acidophilus* ATCC 4356) que compõem um sistema ecológico extremamente complexo apresentando efeito antioxidante tanto nas células inteiras quanto nos extratos livres de célula, sugerindo que alguns compostos antioxidantes fazem parte do metabolismo secundário destes microrganismos, inibindo a peroxidação do ácido linoleico, apresentando também atividade sobre o radical DPPH e reduzindo a peroxidação lipídica (LIN; CHANG, 2000).

Em estudo conduzido por Kullisaar et al. (2003), utilizando *Lactobacillus fermentum* ME-3 em fermentados com leite de cabra, revelou a capacidade deste isolado em diminuir os níveis da lipoperoxidação proteica aumentando a atividade antioxidante total e a proporção de bactéria fermentadoras do ácido láctico na microflora intestinal dos participantes do estudo.

Virtanen et al. (2007) ao investigarem a produção de atividade antioxidante de probióticos durante processos fermentativos através de ensaios de lipoperoxidação lipídica relataram atividade antioxidante para isolados de *Leuconostoc mesenteroides* subespécie *cremoris*, *Lactobacillus jensenii* (ATCC 25258) e *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) correlacionada diretamente com o crescimento e desenvolvimento bacteriano, ou seja, quando maior o número de colônias viáveis, maior a atividade de inibição da lipoperoxidação lipídica.

Meira (2011) em seu estudo destaca o efeito antimicrobiano, ou capacidade antagonista, de culturas probióticas que podem ser expressas via ROS, uma vez que na presença de oxigênio a ação de flavoproteínas, SOD e NADH oxidases, fazem o consumo de oxigênio causando um aumento do conteúdo de ânions superóxidos, radicais hidroxil e peróxido de hidrogênio, que são altamente tóxicos para vários microrganismos.

Um quesito importante na avaliação de um alimento funcional, enquanto probiótico, para Grajek, Olejnik e Sip (2005) é a biodisponibilidade de antioxidantes, sendo esta disposição um fator chave na atividade biológica no trato alimentar e sua absorção através das paredes intestinais para a circulação sanguínea.

2.3.2.3 Atividade enzimática β - galactosidase

A β - galactosidase (β -gal) é um tetrâmero de quatro cadeias polipeptídicas idênticas, cada uma com 1023 aminoácidos, expresso pelo gene *LacZ* de bactérias lácticas, que catalisa reações β -d- galactopiranosídicas através de uma ligação glicosídica de oxigênio. A enzima

também reage com outras ligações sobre substratos naturais como o caso da lactose e glicosídicos incluindo o azoto, enxofre e flúor, porém, com uma eficiência catalítica reduzida (JUERS; MATTHEWS; HUBER, 2012).

Uma das funções das bactérias lácticas é a produção da enzima β -galactosidase (β -gal), catalisando o resíduo terminal β -galactopiranosil da lactose em glicose e galactose, no intestino. Esta ação é fundamental, sobretudo no caso de indivíduos intolerantes a este açúcar. A importância industrial da β -gal está na sua aplicação em laticínios, que formados por culturas probióticas, são acrescentados em produtos lácteos com a mesma finalidade, degradação do açúcar presente no alimento afim de se obter alimentos com baixo teor de lactose, melhorando a solubilidade e digestibilidade do leite e derivados minimizando assim o grau de desconforto causado pela patologia além de melhorar as características organolépticas destes alimentos como cor e sabor (SAAD, 2006; SANTIAGO et al., 2004; RECH, 2003).

A intolerância a lactose é uma patologia comum em diversas populações e nas mais variadas idades e pode ser dividida em quatro categorias segundo De Paula e Júnior (2015): I) Insuficiência primária da lactase conhecida como hipolactasia adulta sendo decorrente de fatores hereditários; II) Deficiência secundária da lactase, que é provocada por mudanças nas microvilosidades da parede intestinal originárias de uma doença de base; III) Intolerância congênita a lactose mais comum em recém nascidos logo depois da primeira ou segunda ingestão de leite e ocorre devido à falta total ou parcial da atividade da lactase; IV) Intolerância otogenética à lactose caracterizada pela mal absorção do açúcar do leite, aparecendo em torno do segundo ao quinto ano de idade e em alguns casos na vida adulta decorrente de fatores diversos.

A condição genética acomete determinadas etnias humanas, aproximadamente 70% dos descendentes africanos, 95% dos asiáticos e 53% dos hispânicos são diagnosticados com intolerância a este açúcar, enquanto 10% dos americanos brancos possuem a patologia (MATHIÚS et al., 2016). No país, cerca de 40% da população brasileira é portadora desta patologia, sendo de interesse público o desenvolvimento de produtos que possam substituir os disponíveis com lactose, porém sem deixar de oferecer outros nutrientes essenciais à saúde (MAYER; KURTZ, 2014).

A efetividade de culturas de BAL de forma a atender a propriedade funcional de alívio aos sintomas da patologia em evidência no relato depende da concentração celular no produto, da quantidade enzimática produzida, liberação enzimática no trato gastrintestinal e o nível de enzima que permanecerá ativa após a passagem pelo estômago (MEIRA, 2011).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA

A obtenção dos isolados teste deu-se através da coleção de lactobacilos da Universidade do Oeste de Santa Catarina (UNOESC) campus Videira- SC. A coleção consiste em bactérias do gênero *Lactobacillus* isolados de alimentos embutidos, cárnicos e lácteos. Após, foi realizado um “*screening*” destes isolados a fim de conhecer qual teve o maior potencial na expressão da atividade enzimática de β - gal. Para tal, as estirpes foram descongeladas e repicadas, pela técnica de isolamento, utilizando de alça calibrada estéril em ambiente adequado, em caldo MRS (Mann-Rogosa-Sharpe).

3.1.1 Caracterização dos isolados com X-gal

As colônias com suposto potencial enzimático foram testadas conforme a metodologia de Natarajan et al. (2012), na qual usa-se X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside; Sigma) a 20%. O X-gal constitui-se de um substrato cromogênico que tem por objetivo selecionar colônias de isolados fermentadores conforme a capacidade de degradação de lactose.

Nas placas contendo o meio MRS foram então adicionados 50 μ l de X-Gal que após espalhados uniformemente sofreram inoculação de microrganismos pela técnica de agulhamento. As placas foram então incubadas em estufa a 37°C por 24h. As colônias que mais expressaram coloração azul, devido a degradação do substrato, indicaram a presença de microrganismos produtores de β -galactosidase.

3.1.2 Cultivo dos isolados para produção da enzima

Após a triagem proporcionada pelo cromógeno indicador, os isolados passaram a ser cultivados a 37°C em 3mL de caldo MRS lactosado pH 5 por 24h dando origem ao pré-inóculo. Após este tempo 1mL de inóculo a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL foi inoculado em 100mL de caldo MRS lactosado estéril e então encaminhados para um shaker com temperatura de 37°C/ 125rpm/ 24h.

3.1.3 Determinação da atividade de β -gal

Para a atividade de β -galactosidase utilizou-se a metodologia adaptada escrita por Schuber et al. (2012), usando ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo; Sigma) como substrato. A reação prossegue-se com 1,5mL de tampão fosfato 100mM pH 7,0, 150 μ l do sobrenadante do cultivo do microrganismo com potencial produção de β -galactosidase, 150 μ l de substrato a 0,25%. A mistura foi então colocada em banho de água a temperatura de 37°C por 10min, após fora adicionado 150 μ l de Carbonato de Sódio a 10% para a paralisação da reação. Segue-se então, para a leitura por espectrofotometria num comprimento de onda de 420nm contra um branco da reação e um branco de amostra com a enzima inativada, seguindo o mesmo procedimento dos ensaios. Para a determinação da atividade enzimática seguiu-se uma curva padrão de o-nitrofenol (Biotec) ($y = 1,315x - 0,049$). Uma unidade internacional de atividade enzimática de β -gal foi então definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 μ mol de ONPG. $\text{min}^{-1}.\text{mL}^{-1}$ sob as condições de ensaio. As reações foram realizadas em triplicatas.

3.2 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES PROBIÓTICAS

3.2.1 Cultura Ácido Tolerante

As culturas selecionadas foram cultivadas por 24h em caldo MRS, meio para crescimento lactobacilar, a 37 °C, enquanto a obtenção dos isolados para testes deu-se por centrifugação a 9.000rpm durante 5 min. O sedimento bacteriano colhido foi submetido a dupla lavagem em tampão fosfato- salina estéril (PBS), pH 7,3 e ressuspenso em 1mL de PBS estéril. A suspensão de cultura foi diluída 1: 100 em PBS estéril em pH 2, 3 e incubados 37 ° C por 2h e 3h. O crescimento bacteriano foi expresso em percentagem de sobrevivência nos diferentes valores de pH após contagem manual de colônias (AHIRE et al., 2013).

3.2.2 Teste de tolerância a sais biliares

Esta foi determinada segundo a metodologia de Ahire et al. (2013) e Baick e Kim (2015) com algumas modificações através da inoculação de uma suspensão de 200 μ l de solução bacteriana de caldo MRS em 1800 μ l do mesmo caldo suplementado com 0,25%,

0,5%, 1%, 1,5% e 2% de sal biliar (Ox- bile, Sigma); então, os tubos foram incubados a 37°C durante 24h. Após isto, prosseguiu-se leitura em espectrofotômetro (A_{600nm}). A percentagem de sobrevivência deu-se através de uma testemunha de cultura bacteriana mantida sob as mesmas condições aplicando a fórmula: $(A2 \div A1) \times 100$. Onde $A2$ corresponde a absorvância subtraída da testemunha após 24h de incubação e $A1$ a absorvância menos a testemunha no tempo zero, sendo os resultados apresentados em percentagem de sobrevivência aos sais biliares.

3.2.3 Potencial antimicrobiano

A fim de verificar as possíveis atividades antimicrobianas das linhagens em teste contra possíveis patógenos entéricos, foi empregado o teste de formação de halos de inibição ao redor de poços estabelecidos em meio de cultura MRS seguindo as orientações de Corrêa (2011). Cepas de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25933, *Proteus mirabilis* ATCC 25933, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram semeadas de acordo com a escala 0,5 de McFarland então, poços de 0,3mm de diâmetro foram projetados em ágar MRS a fim de que 150 μ L do sobrenadante do caldo de cultivos dos isolados, obtidos *overnight* 37°C, após centrifugação 5.000/rpm/10min, fosse depositado. Após o procedimento as placas mantiveram-se em estufa 37°C por 24h. A interpretação da produção de antibióticos fora realizada e os resultados expressados de acordo com as medidas do diâmetro de halos de inibição (mm) de crescimento deixadas em torno dos poços.

3.2.4 Ensaio de hidrofobicidade

O ensaio foi mensurado de acordo com Canzi et al. (2005). Um isolado bacteriano foi cultivado a 37°C/ 24hr em caldo MRS. Uma porção celular foi sedimentada por rotação de 9.000 rpm durante 15 min a 4°C e lavada por duas vezes em PBS, pH 7,2. Foi ressuspensa no mesmo tampão a uma absorvância de 0,5 (A_{600}) sendo o ponto corte A_0 . Para isso, um volume igual ao ressuspensa, de xileno foi então adicionado. O sistema formou duas fases e estas foram homogeneizadas por vórtex durante 3min. Ocorreu a remoção da fase aquosa após 1h de incubação à temperatura ambiente e sua absorvância foi medida A_{600} que se nomeou como A_1 . Os resultados foram expressos de acordo com a percentagem de aderência que foi calculada usando a fórmula: $(A_0 - A_1 \div A_0) \times 100$.

3.3 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE SEGURANÇA

Após a aplicação dos ensaios preliminares e posterior estatística, obteve-se os isolados testes embasados na melhor produção, bem como, atividade enzimática, sendo assim, estes foram submetidos a testes visando suas características de segurança, propriedades probióticas e antioxidantes.

3.3.1 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

O antibiograma desenvolveu-se de acordo com a técnica de disco difusão preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Os isolados selecionados para prosseguir nos testes foram todos cultivados em ágar MRS para que fosse possível a obtenção de culturas puras. Das colônias crescidas em ágar MRS overnight por 24h foram retiradas alíquotas para realizar uma suspensão em salina estéril até alcançar a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL e em seguida, procedeu-se a inoculação padrão para o antibiograma. A determinação dos discos e concentrações antimicrobianas foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Costa et al. (2013): ceftazidima (30 μ g), clindamicina (2 μ g), eritromicina (15 μ g), estreptomicina (30 μ g), gentamicina (10 μ g), oxacilina (1 μ g), penicilina (10 U), tetraciclina (30 μ g). As placas foram incubadas (37°C, 24h). O controle de qualidade dos discos foi realizado com uma amostra de *Escherichia coli* ATCC 25922, conforme indicado pelo autor. Após a incubação, com auxílio do paquímetro, fez-se as leituras dos diâmetros dos halos de inibição. Os resultados foram relatados como sensíveis, intermediários e resistentes segundo Nithya e Halami (2013) e Ahire et al. (2013).

3.3.2 Avaliação da atividade hemolítica

As cepas testes foram inoculadas em ágar base Mueller Hinton contendo 5% de sangue de carneiro, utilizando de alça calibrada em 10 μ L, após inoculação as placas foram incubadas a 37°C/ 24hr. A interpretação da atividade e apresentação dos resultados deram-se através da visualização de zonas de β , α ou γ -hemólise segundo Jamaly e Bouksaim (2011).

3.4 ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE *in vitro*

3.4.1 Atividade antioxidante através do método DPPH 0,1mM

As culturas bacterianas foram semeadas em ágar MRS, incubadas 24h a 37°C. Após este período colônias foram retiradas e diluídas em salina estéril a fim de chegar a absorvância de 1 em 600nm. Após obtido o inóculo 1mL da suspensão bacteriana foi transferido para eppendorf e centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante desprezou-se e as bactérias foram ressuspensas em 1mL de tampão PBS pH 6,8, o procedimento de lavagem prosseguiu por três vezes. Ao término da última centrifugação diluições de 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 e 10^{10} UFC/mL foram realizadas para determinação dos ensaios. A capacidade antioxidante foi medida pela equação: $([I - A_{517}(\text{amostra})]/A_{517}(\text{branco})) \times 100\%$ seguindo a metodologia proposta por Chu, Chang e Hsu (2000) onde os resultados foram expressos em percentagem de inibição da atividade do radical.

3.3.2 Auto oxidação do Ascorbato

Seguindo a metodologia proposta por Mishra e Kovachich (1984), fez-se a técnica de inibição do auto oxidação do ascorbato onde foram utilizadas soluções de Ácido ascórbico 50mM, tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7 e quercitina 200µg/mL em metanol.

As culturas bacterianas foram plaqueadas em ágar MRS fazendo diluições necessárias em salina para contagem de colônias, após, 1mL da suspensão bacteriana foi transferido para eppendorf e centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante desprezou-se e as bactérias foram ressuspensas em 1mL de tampão PBS pH 6,8, o procedimento de lavagem prosseguiu por três vezes. Ao término da última centrifugação diluições de 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 e 10^{10} UFC/mL foram realizadas para determinação dos ensaios.

O preparo das amostras consistiu em 0,1mL das diluições em 9,8mL de tampão fosfato 0,2M em pH 7, quercitina 0,1mL + 0,1mL de ácido ascórbico em 9,8mL de tampão fosfato 0,2M em pH 7 (o Branco foi realizado sem adição do ácido ascórbico), controle 100% ácido ascórbico 0,1mL em 9,8mL de tampão fosfato 0,2M em pH 7 e o Branco 9,8mL de tampão fosfato 0,2M em pH 7. Em seguida os tubos foram homogeneizados e incubados em banho de água a 37°C durante 10 minutos. Após, foi realizada a leitura das absorvâncias a 265nm. Os testes foram realizados em triplicata. A atividade da auto-oxidação do ascorbato foi

determinada conforme o cálculo: $\% \text{ Inibição} = [1 - (A \div A^I) \times 100]$. Onde A é a absorbância da amostra e A^I é a absorbância do controle 100%, sendo os resultados expressos em percentagem de inibição da atividade de auto oxidação do radical.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento estatístico deu-se através da realização da análise de variância (ANOVA), com $p < 0,05$ para grau de significância, seguida do teste de comparação múltipla de Tukey, e múltipla conta um valor referência Teste Dunnett, desenvolvidos com o Software GraphPad Prism versão 5.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As BAL são as principais representantes dos probióticos em alimentos nutracêuticos e com a finalidade de obter novos microrganismos lácticos para aplicação em alimentos, uma consulta aos dois bancos lactobacilares da Universidade do Oeste de Santa Catarina-UNOESC fora realizado. As linhagens oriundas de alimentos cárneos e lácticos foram reativadas em caldo MRS e após repicadas em meio de cultura contendo o cromógeno X-gal, e dos 75 isolados, 19 foram selecionadas com a maior capacidade de produção de β - gal sendo elas: 14, 8, 8.1, LB, 39L, 31, 42B, 41, 47J, 26, 22J, 49, 82, 29, 15, 44J, 123B, 24J e 25J.

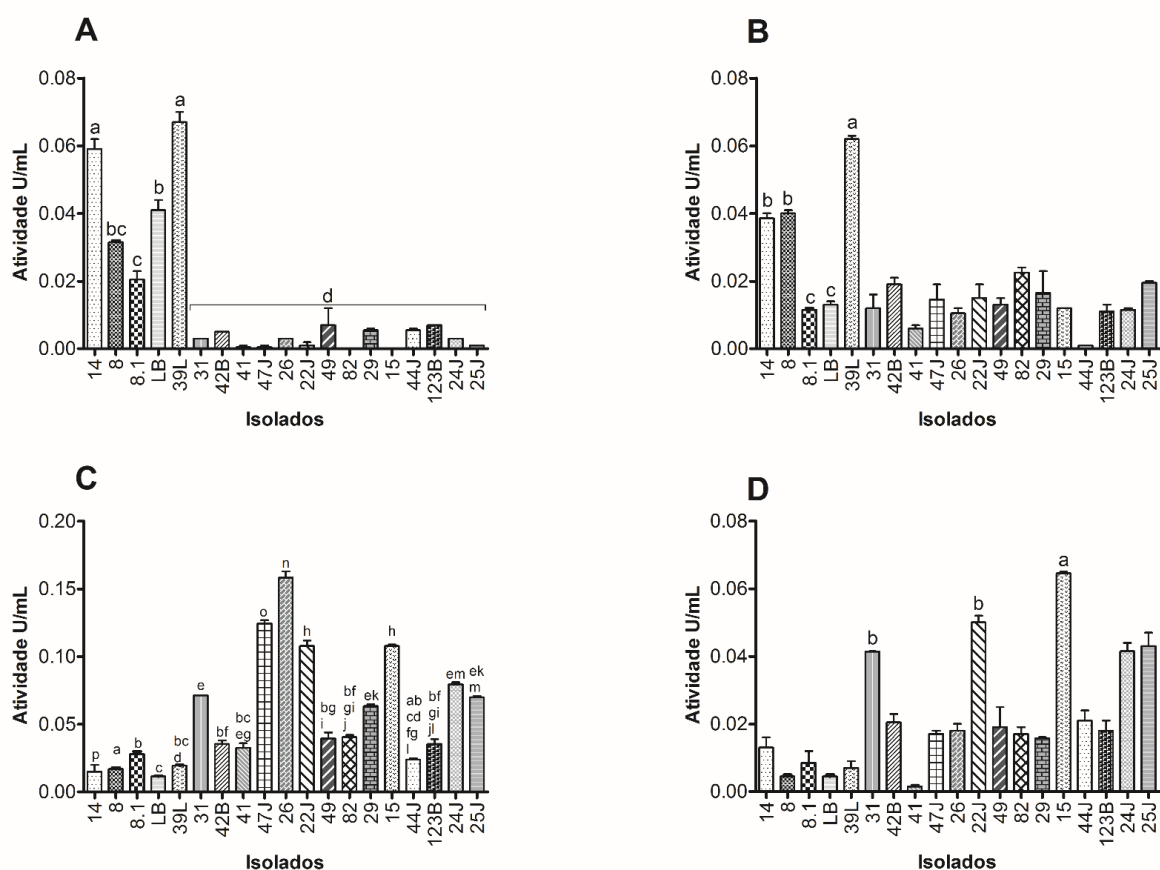
Dentre membros da família *Lactobacillus* sp. temos algumas cepas com características fastidiosas e com exigências nutricionais, que quando atendidas, lhes conferem uma melhor expressão enzimática (MENON et al., 2013). Gheyntanchi et al. (2010) e Iyer, Singhal e Ananthanarayan (2013) observaram que ao adicionar 1% de lactose ao meio MRS obtinham uma melhor expressão de β - gal ficando indutivo que a lactose aumenta a produção enzimática, o mesmo relato foi feito por Carevic et al. (2015) ao testar lactose e outros açúcares para atividade enzimática de *Lactobacillus* sp. Leite et al. (2008) em seu estudo com o propósito de identificar e caracterizar genes de resposta ao estresse oxidativo em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, bactéria com grande potencial para probiose, relataram que a glicose, quando presente em altos níveis no meio, poderia causar repressão catabólica a algumas bactérias fermentadoras do ácido láctico. Neste estudo, assim como nos já citados, a adição de 2% de lactose como fonte de carbono fora utilizada para indução da expressão do gene *LacZ*, aumentando a expressão enzimáticas dos isolados e a possível seleção dos mesmos para continuação dos estudos.

4.1 MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE β - GAL

A atividade enzimática, expressa pelo gene *LacZ* de bactérias fermentadoras do ácido láctico, foi determinada em 12h, 24h, 36h e 48h no sobrenadante do meio de cultura após a incubação em caldo MRS lactosado 2%. A equivalência desta atividade foi realizada a partir da curva padrão do substrato ONPG (Sigma) após consumo deste substrato. Em estudos pilotos ficou-se determinado que o pH 5 do meio de cultura proporcionaria condições mais adequadas de expressão enzimática para determinação da sua atividade.

Ao analisar os dados obtidos (Figura 1) nota-se que no tempo de 12h (Figura 1A) dos isolados pré cultivados em caráter de cultura *starter*, sobressaíram-se dos demais os isolados 14, 8, 8.1, LB e 39L com expressões enzimáticas que variaram de $0,071\pm 0,009$ U/mL para o isolado 39L a $0,018\pm 0,001$ U/mL para o isolado 8.1. Os isolados 14 e 39L apresentaram-se estatisticamente iguais na atividade enzimática, $p>0,05$. Enquanto os demais isolados desenvolveram pouca ou nenhuma atividade como é o caso dos isolados 31, 42B, 26, 49, 29, 44J, 8, 123B, 24J e 25J que apresentaram atividades entre $0,001\pm 0,001$ U/mL para 25J à $0,016\pm 0,001$ U/mL para o isolado 49, e dos isolados 41, 47J, 22J, 82 e 19B5 que não apresentaram nenhuma atividade doze horas após inoculação sendo estatisticamente iguais $p>0,05$.

Figura 1 - Análise da expressão enzimática de β - gal frente ao substrato ONPG em 12h, 24h, 36h e 48h de incubação



(A) Atividade enzimática com 12h de cultivo. (B) Atividade enzimática com 24h de cultivo. (C) Atividade enzimática com 36h de cultivo. (D) Atividade enzimática com 48h de cultivo. As barras mostram a média \pm desvio padrão das análises realizadas em triplicata. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si $p>0,05$ pelo teste de Tukey. Letra sozinha difere estatisticamente das demais $p<0,05$ pelo teste de Tukey.

Na figura 1B (tempo de 24h) nota-se o auge da atividade enzimática dos isolados 8 e 39L com concentrações variadas de $0,044\pm 0,003$ a $0,066\pm 0,003$ U/mL respectivamente. Os

demais isolados ficaram na faixa de atividade de $0,037\pm 0,003$, $0,013\pm 0,001$ e $0,011\pm 0,001$ U/mL correspondendo aos isolados 14, LB e 8.1 e de $0,002\pm 0,001$ a $0,0020\pm 0,002$ U/mL para os isolados 44J e 82.

Na figura 1C correspondente ao tempo de 36 horas de incubação notou-se uma possível repressão catabólica dos isolados 14, 8, 8.1, LB e 39L em resposta aos níveis de glicose já liberados no meio pela atividade enzimática ocorrida em 24 horas tendo quedas de atividade de até 86%, no caso do isolado 39L, em relação ao tempo 12h. No mesmo gráfico nota-se o pico máximo de atividade de algumas cepas, como é o caso do isolado 26 que sobressai estatisticamente dos demais ($p < 0,05$) com atividade de $0,154\pm 0,01$ U/mL, seguido do isolado 47J apresentando $0,122\pm 0,01$ U/mL de atividade.

Por fim, na figura 1D (tempo de 48h) nota-se redução da atividade enzimática sobre o substrato escolhido por parte de quase todas as cepas, exceto o isolado 15 que apresenta o ponto ótimo de atividade neste período com expressões de $0,064\pm 0,012$ U/mL diferindo significativamente dos demais ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A produção de alimentos lácteos a base de probióticos objetiva-se pela melhor digestibilidade e absorção dos açúcares, além de baixos teores de lactose, promovido pela quebra primária da molécula açucarada do leite. Baick e Kim (2015) em estudos de identificação de bactérias lácticas isoladas do kimchi, um condimento típico da culinária coreana, afim de identificar suas propriedades probióticas para posterior aplicação em produtos lácteos observaram atividades de $390,25 \pm 24,2$ U/mL para *L. plantarum* DK303, $154,25\pm 48,2$ U/mL para *L. paracasei* DK215 e $71,75\pm 61,2$ U/mL para *L. casei* LC-10. Benavente et al. (2015) em seu trabalho com uma nova enzima oriunda de um *L. plantarum* purificada, apresentou uma elevada atividade de hidrólise que chegou a uma atividade de 491 U/mL, segundo os autores, altos valores na expressão enzimática resultam em uma maior resistência aos efeitos inibitórios de diferentes carboidratos além da sua conservação na presença de cátions inibidores.

Com o objetivo de reativação e caracterização enzimática de β -galactosidase a partir de *L. acidophilus* em escala de fermentação laboratorial, atividades em torno de 800 a 1000 U/mL foram encontrados em suspensão celular, no extrato celular atividades de 250 a 300U/mL foram mensuradas e em fragmentos celulares atividades de 1500 a 2000 U/mL foram relatadas por Akolkar, Sajgure e Lele (2006) que confirmam através destes resultados a natureza enzimática aderida a parede intracelular.

A fim de verificar a síntese de galacto-oligossacarídeos em soro de queijo, Song, Kang e Lee (2013) relataram resultados insatisfatórios, em relação a um potente probiótico, ao inferirem a atividade enzimática de β -gal em sobrenadante da cultura celular, com atividades variantes de 102 a 1053 U/mL com a máxima determinada pela cepa de *L. casei*. Devi et al. (2011) ao analisar o ponto ótimo para otimização da atividade enzimática de *Lactobacillus* sp. isolados de coalhada de búfalo chegou a leituras de 86 U/mL a 35°C, 78 U/mL a 40°C e 71 U/mL a 45°C e de 39 U/mL a 50°C utilizando meios com 7% de lactose como fonte primária de carbono, concluindo que o ponto ótimo para produção enzimática pelo isolado estudado deu-se em pH 5 em 45°C.

Embora as atividades obtidas neste estudo não irem ao encontro das demais bibliografias discutidas, as análises de pH, suplementação e temperatura, deste experimento, corroboram com as de Devi et al. (2011) uma vez que o caldo suplementado com lactose 2%, a um pH 5 e temperatura $37\pm 2^\circ\text{C}$ foram capazes de obter a melhor expressão enzimática, resultados semelhantes foram obtidos por Nguyen et al. (2012) ao pesquisarem potencial probiótico de expressão enzimática β -gal em isolados de *L. bulgaricus* onde obtiveram resultados satisfatórios em pH 6,5, em 40°C após incubação de 24°C como fonte de nitrogênio disponível 2% de lactose.

A provável diferença entre os perfis de atividade enzimática reside no fato dos isolados, potencialmente, não serem da mesma linhagem ou possuírem um perfil melhor em diferentes condições daquelas propostas neste ensaio.

4.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO

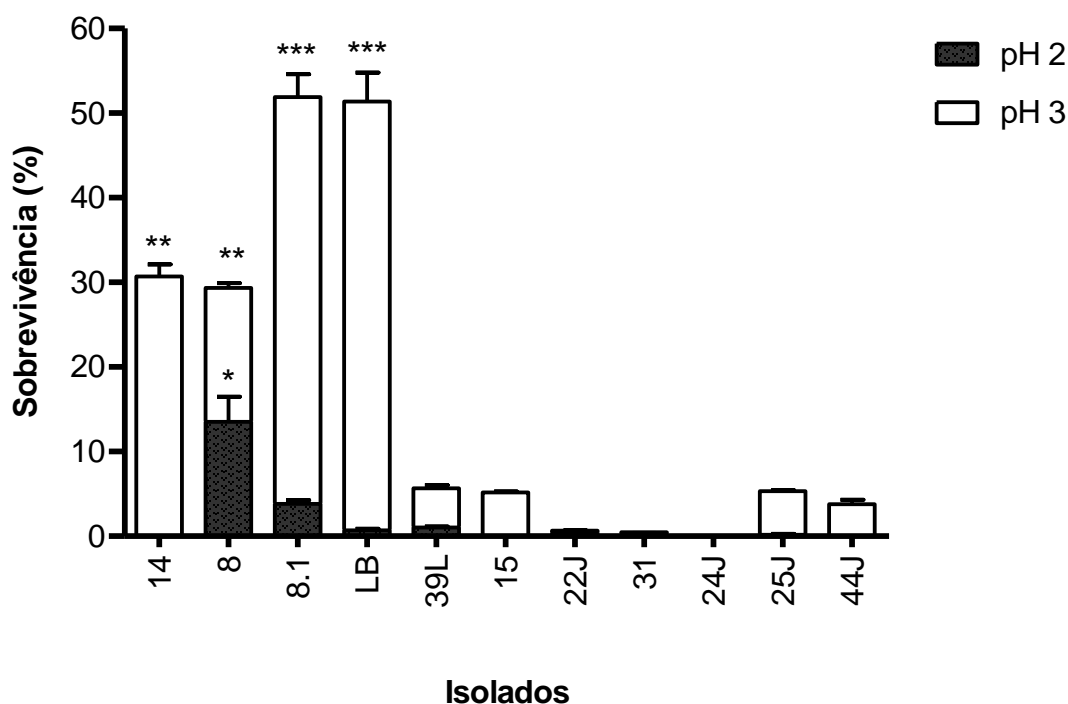
4.2.1 Perfil de viabilidade ao pH ácido e ao sal biliar

Após passarem pela boca e ação das enzimas amilolíticas o alimento segue caminho ao estômago. Lactobacilos constituem-se das mais tolerantes bactérias a condições ácidas em relação a outras bactérias produtoras de ácido láctico. Ao analisarmos o Gráfico 1, infere-se que as cepas 8 e 8.1 foram as que se sobressaíram melhor quanto a tolerância em pH 2 após duas horas de cultivo, sendo que o isolado 8 obteve $13,5\pm 2,96\%$ de sobrevivência diferindo significativamente dos demais ($p < 0,05$). Já em pH 3, oito dos onze isolados que melhor expressaram atividade enzimática destacando-se dos demais foram os isolados 8.1 e LB com

48,10±2,67% e 50,66±3,44% de sobrevivência respectivamente sendo estatisticamente iguais e diferindo estatisticamente dos isolados 14 (30,71±1,4%) e 8 (15,85±0,53%).

A tolerância ácida é um critério de seleção importante, uma vez que um isolado probiótico deve ser capaz de sobreviver às condições ácidas do suco gástrico cita Yadav, Puniya e Shukla (2016) em seu estudo para determinação da capacidade probiótica de *L. pantarum* RYPR1 isolados a partir do Raabadi, uma bebida indiana fermentada; o autor relata o destaque do isolado escolhido para seu estudo quanto o grau de sobrevivência de 9,04±0,48 UFC/mL o que corresponde a cerca de 14,6%. Khoder et al. (2016) relatam em seu estudo a importância de bactérias ácido resistentes no tratamento de úlcera gástrica em modelo animal, os microrganismos que possuem a característica requerida de resistência ao pH ácido tem capacidade de colonizar o estômago promovendo o estímulo de fatores de crescimento celular acelerando o processo de cicatrização das úlceras pépticas.

Gráfico 1 - Análise da viabilidade celular de lactobacilos cultivados em pH 2 e 3 após 2h de incubação



*Difere estatisticamente dos demais $p < 0,05$;

** Estatisticamente iguais entre si $p > 0,01$, diferindo $p < 0,05$ dos demais;

*** Estatisticamente iguais entre si $p > 0,001$, diferindo $p < 0,05$ dos demais pelo teste de Tukey.

Entre as estirpes probióticas do ácido láctico, isolados tais como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* exibem uma grande capacidade de sobreviver ao pH gastrintestinal e, por conseguinte, são amplamente utilizados em muitos produtos

farmacêuticos e produtos probióticos lácteos (KHODER et al., 2016). Nithya e Halami (2013) em seu estudo com o objetivo de avaliação das características para probiose de espécies de *Bacillus* sp. mostraram que a estirpe de *B. coagulans* apresentou 80% de sobrevivência em pH 2,5 após duas horas de incubação. Zhang et al. (2014) diz que o trato gastrintestinal é o maior sítio de colonização capaz de influenciar a viabilidade celular; ao determinar as propriedades probióticas de sete isolados de queijo Hurood, relataram que ao exporem os isolados em caldo MRS em diferentes pHs após 3h de incubação obtiveram uma percentagem de viabilidade variável de sobrevivência em pH 2 de 0% para o isolado C35 até uma diminuição drásticas de cerca de 80% do número viável de colônias por parte dos isolados C42, C51 E C60, já em pH3 todos os isolados foram capazes de se sobreviverem produzindo contagens bacterianas aumentadas até mesmo depois de 3h horas incubação.

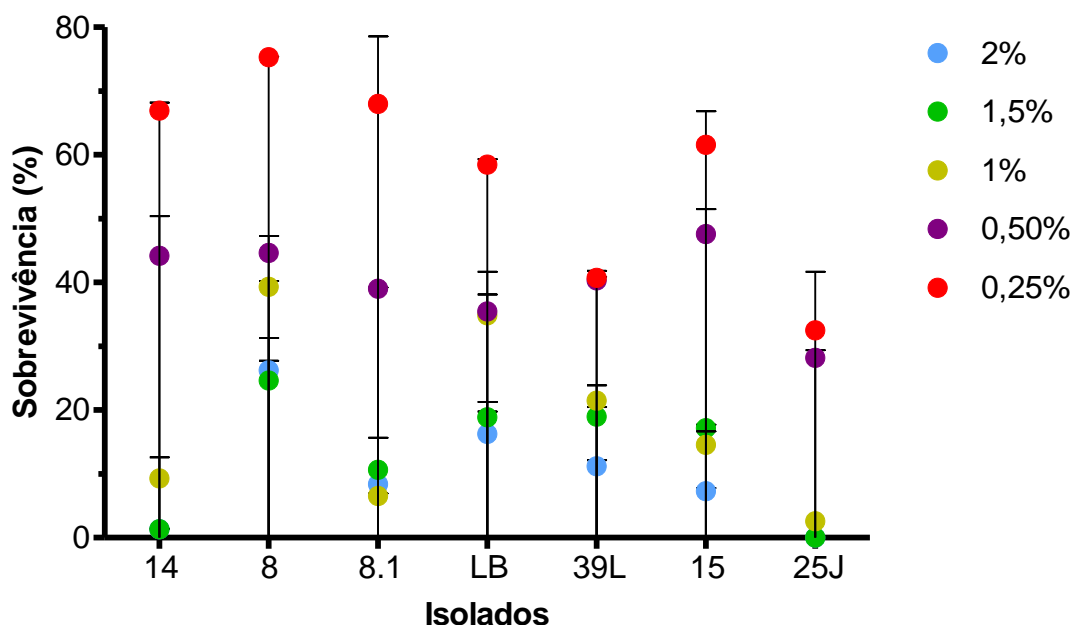
Os índices de sobrevivência ao ácido obtidos neste estudo acabaram por corroborar com as demais bibliografias, enaltecendo assim o potencial probiótico das cepas escolhidas. O período de 2 a 3 horas reflete o tempo médio de permanência de um alimento no estômago, órgão em que o microrganismo fica exposto à acidez (MOHAMMADI; MORTAZAVIAN, 2011). A resistência a ação adversa de pH, especialmente ao ácido clorídrico, é extremamente importante, pois o mesmo difunde-se através da membrana celular e depois, no citoplasma, dissocia-se liberando prótons que poderão interferir no funcionamento da membrana celular, prejudicando processos essenciais para sobrevivência celular (COSTA et al., 2013).

Em relação a viabilidade bacteriana após exposição aos sais biliares, os quais são apresentados no Gráfico 2, nota-se que dos sete isolados, agora selecionados, todos mostraram bom perfil de sobrevivência na concentração 0,25% e 0,5% com perfis de viabilidade que variam de $75,30 \pm 0,09\%$ para o isolado 8 e $37,70 \pm 1,13\%$ para o isolado 25J para a primeira concentração e de $44,64 \pm 2,65\%$ e $44,21 \pm 6,19\%$ para os isolados 8 e 14 à $35,47 \pm 6,20\%$ para o isolado LB a 0,5% de sal biliar. Ao passo que a concentração de sais aumenta o percentual de viabilidade chega a decair 98,02% para o isolado 14 e 65,2% para o isolado 8 não diferindo estatisticamente da concentração 1,5%.

A hidrólise de sais biliares é uma propriedade relevante para as cepas probióticas sobreviverem a toxicidade destes sais conjugados no duodeno (PISANO et al., 2014). Lee et al. (2016) com o objetivo de determinar as características de *Bacillus* MKSK-M1 isolado a partir de um tradicional molho de soja coreano, mostrou taxas de sobrevivência de 96% quando exposto a solução de pepsina pH 2 a 0,1% e 99,3% de sobrevivência em solução de

sal biliar sintético 3% durante três horas, destoando dos nossos estudos de sobrevivência em pH ácido e sal biliar.

Gráfico 2 - Percentualidade de isolados viáveis após incubação em diversas concentrações de sal biliar sintético



Yeo et al. (2016) ao analisarem o perfil de sobrevivência aos sais biliares por parte dos isolados de *Lactobacillus salivarius*, para produção de uma ração probiótica para bovinos, relataram o crescimento de 18,4% para o isolado LS1, 10,8% para o isolado LS8 e 6,6% para o isolado LS3 em meio MRS suplementado com 0,3% de bile bovina, além do mais, todos os isolados testados (n=5) apresentaram altas taxas de atividade da enzima hidrolítica de sais biliares.

Ren et al. (2014) ao avaliar as propriedades probióticas e funcionais de lactobacilos isolados do intestino humano e de alimentos fermentados, obteve significativa viabilidade de sobrevivência de todas as cepas (n= 8) ao pH 2 e ao sal biliar 1% tendo reduções de até 15,3% nesta última concentração em relação ao número inicial de colônias. A capacidade de sobrevivência aos sais biliares determinará o potencial de colonização bacteriana no cólon intestinal (YADAV; PUNIYA; SHUKLA, 2016).

A microbiota intestinal desempenha importantes papéis na defesa contra patógenos, imunidade e absorção de nutrientes, também está envolvida na biotransformação de ácidos biliares através da desconjugação, desidroxilação e reconjugação dos sais de bile. Estes ácidos, após formados, exercem atividade antimicrobiana danificando a membrana celular inibindo o crescimento bacteriano. Os probióticos possuem a capacidade de modificação da

microbiota intestinal aumentando a síntese de ácidos biliares para a excreção fecal, sobrevivendo a ação destes e assim favorecendo o processo digestivo (LI; CHIANG, 2014).

4.2.2 Avaliação de Propriedades Antagonistas

As substâncias antagônicas do crescimento de possíveis patógenos intestinais, produzidas por isolados probióticos, correspondem a metabólitos como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, radicais livres, diacetileno, acetaldeído, isômeros D de aminoácidos e bacteriocinas, esta última por sua vez, constitui-se de proteínas e peptídeos com atividade antibacteriana (CORTEZ et al., 2016).

Ao analisarmos a Tabela 1, observa-se que nenhum dos isolados testados foi efetivo na inibição de todos os possíveis patógenos testados, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium* e *S. aureus*, porém, todos conseguiram inibir ao menos três possíveis enteropatógenos. Cortez et al. (2016) ao avaliarem as propriedades antagonistas de *L. acidophilus* frente cepas de *E.coli*, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes* relataram halos de inibição variando com média de 12mm para inibição do crescimento de *L. monocytogenes*, 12 e 18mm de diâmetro para *S. aureus* e galos de 6 a 18mm de diâmetro para *E. coli*, indicando a possibilidade de produção de ácidos orgânicos, bacteriocinas ou outras substâncias inibidoras do crescimento.

Tabela 1 - Análise do potencial antagonista do crescimento de possíveis enteropatógenos humanos pelos isolados lácteos em teste

<i>Cepa enteropatogênica</i>	<i>Isolados avaliados*</i>						
	8	8.1	14	39L	LB	15	25J
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	12± 0,23	0	12± 0,1	0	12± 0,1	13± 0,26	0± 0,1
<i>E. coli</i> ATCC 25933	14± 0,25	15± 0,32	20± 0,32	22± 0,13	15± 0,12	13± 0,13	15± 0,12
<i>P. mirabilis</i> ATCC 25933	0± 0,1	0± 0,09	0	19± 0,13	0± 0,1	0	14± 0,18
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	14± 0,32	13± 0,21	17± 0,1	17± 0,2	0± 0,18	0± 0,1	20± 0,1
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	20± 0,13	16± 0,2	0± 0,12	0± 0,1	19± 0,12	17± 0,2	0
<i>S aureus</i> ATCC 25923	0	15± 0,1	19± 0,22	0	0± 0,1	0	0± 0,2

* Os resultados são apresentados em médias ± desvios padrões em mm das análises realizadas em triplicata.

Entre os mecanismos de ação das bacteriocinas, um dos compostos antagonistas do crescimento bacteriano que pode ter sido promovido por estas bactérias, está a formação de poros na membrana citoplasmática das células sensíveis. Montero Castillo, Diaz Caballero e Durán Lengua (2015) analisando o potencial antagonista de bactérias lácticas do gênero

Lactobacillus sp. contra microrganismos patógenos, puderam inferir halos de inibição variados de 20mm à 5mm para *S. aureus*. As análises do potencial de inibição de possíveis patógenos com a produção de substâncias bactericidas vão de encontro com as bibliografias discutidas até aqui uma vez que halos de $19\pm 0,22$ mm foram encontrados por parte do isolado 14 em relação a *S. aureus* enquanto $22\pm 0,13$ mm e $15\pm 0,12$ mm foram formados pelas cepas 39L e LB e 25J, respectivamente, para inibição de *E. coli*.

Cabral et al. (2016) ao avaliarem os aspectos tecnológicos e probióticos de bactérias isoladas a partir de queijo de coalho artesanal para o desenvolvimento de um fermento relataram que as cepas de *Leuconostoc* sp., uma espécie de lactococo, não foi eficaz na inibição de crescimento das cepas *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665 utilizadas no estudo. Dentre as demais bactérias que apresentaram atividade antagonista, 42,2% inibiram as três bactérias testadas e dentre os isolados estudados estavam presentes do gênero lactobacilos.

Bactérias lácticas com propriedades de inibição do crescimento de possíveis patógenos são fundamentais na aplicação em probióticos, uma vez que reduzem a frequência de infecções intestinais e de mucosas, relata Sánchez et al. (2015). Em seu estudo com bactérias do gênero lactobacilos. os autores relatam efetividade na inibição de todos os possíveis patógenos submetidos ao teste, com halos de inibição variáveis de $32,8\pm 0,15$ mm para o isolado M5 frente a cepa de *E. coli* e $15,36\pm 0,1$ para o isolado M2 em relação ao mesmo patógeno, halos de $31\pm 0,03$ mm de inibição para o crescimento de *S. aureus* por parte do isolado M5 que mostra-se também como mais efetivo na inibição de *Salmonella* sp. com a formação de $32,09\pm 0,15$ mm de halo dificultando o desenvolvimento do patógeno, no presente estudo o isolado 8 apresentou $20\pm 0,13$ mm de atividade anti crescimento de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 corroborando com o estudo mencionado.

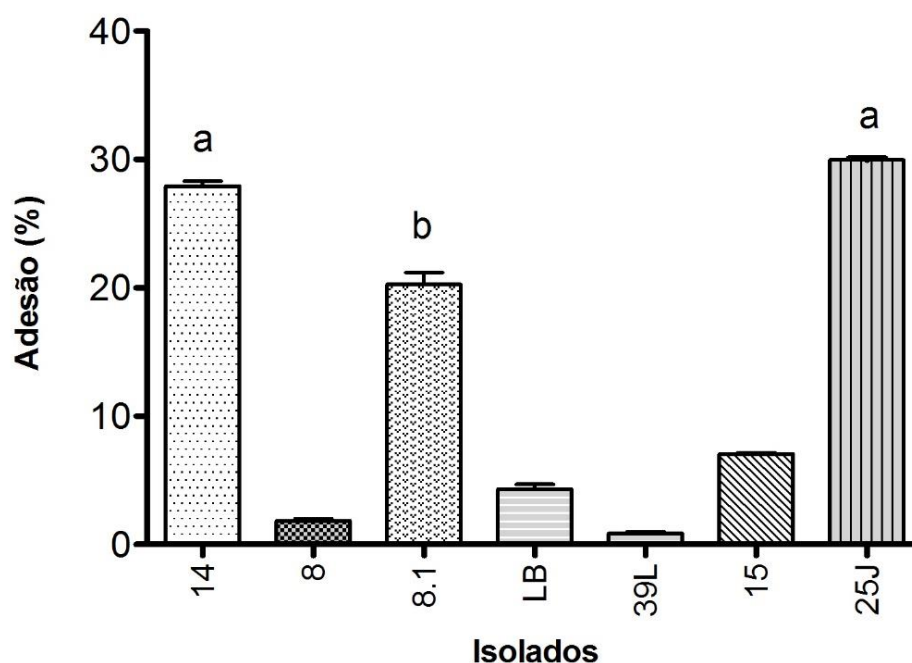
Dallal et al. (2017) relataram importante inibição no crescimento de cepas de *Acinetobacter baumannii*, e *Pseudomonas aruginosa*, onde cepas de *Lactobacillus fermentum* 89-1, *L. plantarum* 34-5 e *L. rhamnosus* GG estirpes teve um efeito antagonista significativo sobre ambos patógenos com halos maiores de 22mm. Com o crescimento da era pós antibióticos, culturas probióticas tornam-se meios alternativos para tratamento de patologias bacterianas do trato intestinal.

4.2.3 Ensaio de hidrofobicidade

A adesão bacteriana ao hidrocarboneto é realizada para prever o potencial de fixação dos microrganismos à superfície intestinal a fim de aumentar sua interação com o hospedeiro contribuindo para garantir uma maior resistência ao fluxo intestinal da digestão, favorecendo o processo de colonização e a inibição competitiva de patógenos. A tolerância a compostos fenólicos também é critério importante na seleção de cepas probióticas, pois bactérias intestinais podem desaminar os aminoácidos provenientes da dieta, levando a formação de compostos fenólicos (LEE et al., 2014).

Ao analisarmos o gráfico a seguir (Gráfico 3) nota-se o destaque de adesão por parte do isolado 14 correspondendo a $27,93 \pm 0,52\%$ de capacidade de agregação igualando-se estatisticamente ao isolado 25J com $29,95 \pm 0,21\%$, em seguida o isolado 8.1 com $20,26 \pm 1,32\%$ diferindo estatisticamente dos dois primeiros e dos isolados LB ($4,32 \pm 0,51\%$), 39L ($0,85 \pm 0,20\%$) e 15 ($7,05 \pm 0,13\%$).

Gráfico 3 - Propriedade de adesão bacteriana ao solvente xiloleno



Letras iguais apresentam-se estatisticamente iguais diferindo em $p > 0,05$ das demais pelo teste de Tukey. Letra sozinha difere estatisticamente das demais $p < 0,05$ pelo teste de Tukey.

Bactérias com potencial para probiose e que são resistentes aos hidrocarbonetos são capazes de inibir outros microrganismos responsáveis por converter substâncias pré-carcinogênicas, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e as nitrosaminas, em

carcinogênicas (DENIPOTE; TRINDADE; BURINI, 2010). Martins et al. (2009) relatam que a adesão microbiana ao xilol reflete a hidrofobicidade da superfície celular, uma vez que as interações eletrostáticas estão ausentes; em seu estudo com o objetivo de avaliar as propriedades probióticas de *Bifidobacterium animalis* var. *lactis* BB-12, *Escherichia coli* EMO, *Lactobacillus casei* e *Saccharomyces boulardii* relatou interações apolares de aderência ao xilol de 84,5% para *B. animalis* e 86,5% para *E.coli*, resultados que se destacam em relação aos do presente trabalho onde $27,93\pm 0,52\%$ foi o maior potencial de adesão encontrado para o isolado 14.

Sánchez et al. (2011) ao isolarem e caracterizarem cepas de *Lactobacillus* sp. com potencial probiótico através de técnicas *in vitro*, relataram adesão bacteriana de $85\pm 0,05\%$ para o isolado L-136, seguido do isolado L-179-1 com $82\pm 0,35\%$, dentre os nove microrganismos testados, o isolado L-197 foi o que menor aderiu ao hidrocarboneto xileno, mostrando atividade de $34\pm 0,09\%$. Sánchez e Tromps (2014) durante a caracterização *in vitro* de bactérias fermentadoras do ácido láctico com potencial probiótico procedente de fontes animais obtiveram índices de $91\pm 0,05\%$ de agregação para o isolado *Lactobacillus* sp., $82\pm 0,06\%$ para o isolado *Leuconostoc* sp. e $78\pm 0,45\%$, $50\pm 0,07\%$ e $11\pm 0,36\%$ de atividade de agregação ao solvente para os isolados de *Streptococcus* sp., *Lactococcus* sp. e *Pediococcus* sp. respectivamente.

Características físico químicas da parede celular bacteriana e a natureza da superfície a que elas aderem influenciam sobre os fenômenos de auto agregação e adesão. Embora os resultados obtidos neste estudo serem inferiores aos comparados, o potencial hidrofóbico encontrado para as cepas 14 e 25J indica uma provável interação com a superfície celular da mucosa intestinal favorecendo suas características probióticas até então avaliadas.

4.3 DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DE SEGURANÇA

4.3.1 Atividade Hemolítica

Nenhuma atividade hemolítica foi relatada neste estudo, assim como nos estudos de Taheuer (2016), Yadav, Puniya e Shukla (2016), Montero Castillo, Bellaver et al. (2015), Diaz Caballero e Durán Lengua (2015), Ji, Jang e Kim (2015), Pisano et al. (2014), Thirabunyanon e Hongwittayakorn (2013). Do contrário, Marroki e Marroki (2014) e Ruiz Moyano et al. (2009) relatam ter encontrado isolados produtores de alfa hemólise em seus estudos, descartando-os da continuidade dos mesmos por apresentar este fator de virulência, a

produção de hemolisinas é considerado decisivo, dentre outros critérios, na escolha de um futuro microrganismo probiótico.

Em relação a hemolisina, ao investigarem a interferência de lactobacilos na expressão de fenótipos de virulência para produção de hemolisinas contra *Streptococcus pyogenes*, Saroj et al. (2016) concluíram que cepas lactobacilares são capazes de inibir a produção de hemolisinas por parte dos isolados *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus reuteri*, neste mesmo estudos os autores relatam um forte potencial de inibição de adesão do patógeno em células epiteliais, uma vez que alguns isolados lactobacilares tem potencial atividade de produção de biosurfactantes.

4.3.2 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Ao analisarmos a Tabela 2, que corresponde ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos pela metodologia de Kirby Bauer, podemos analisar que dos sete isolados submetidos ao teste, cinco (14, 8, 8.1, LB, 39L) apresentaram resistência ao ciprofloxacina 5 µg, a resistência ao β- lactâmico da terceira geração, ceftazidima 30 µg, foi apresentada pelo isolado 25J. Duas cepas apresentaram presença de subpopulação resistente a ceftazidima sendo estas a 8 e a 39L esta última por sua vez, também apresentou subpopulação resistente para penicilina 10 U. Subpopulações resistentes caracterizam uma resistência adquirida aos antimicrobianos uma vez que a exposição inadequada destas cepas a uma concentração requerida da droga leva ao desenvolvimento do mecanismo de resistência como defesa (GUARDABASSI; JENSEN; KRUSE, 2010).

Temmerman et al. (2003) relatam em seus estudos resistência intrínseca de seus isolados a penicilina, no presente estudo tal relato não foi encontrado. Temmerman et al. relatam que ao analisarem o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos por bactérias isoladas de probióticos comerciais, as linhagens lactobacilares estudadas apresentaram 29,5% de resistência a tetraciclina, 12% a eritromicina e mais de 68% apresentaram resistência a dois ou mais antibióticos dos seis antibióticos testados.

Tabela 2 - Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados selecionados

<i>Antibiótico</i>	<i>Halos (mm) frente aos isolados¹</i>						
	<i>14</i>	<i>8</i>	<i>8.1</i>	<i>LB</i>	<i>39L</i>	<i>15</i>	<i>25J</i>
CAZ 30 µg	S	S	I*	S	I*	S	R
CFO 30 µg	S	S	S	S	S	S	S
CIP 5 µg	R	R	R	R	R	S	S
CLI 2 µg	S	S	S	S	S	S	S
ERI 15 µg	S	S	S	S	S	S	S
EST 300 µg	S	S	S	S	S	S	S
GEN 10 µg	S	S	S	S	S	S	S
PEN 10 U	S	S	S	S	I*	S	S
TET 30 µg	S	S	S	S	S	S	S

Referência: Coelho (2013) e Ahire et al. (2013): Resistente: 0-5mm| Intermediário: ≥ 5-9mm| Sensível: ≥10mm.

¹ S = Sensível. I= Intermediário. R= Resistente.

* Presença de subpopulação resistente sendo a sensibilidade ao antimicrobiano reportada como intermediária.

CFO: cefoxitina, CAZ: ceftazidima, CIP: ciprofloxacina, CLI: clindamicina, ERI: eritromicina, EST: estreptomicina, GEN: gentamicina, PEN: penicilina e TET: tetraciclina.

Ao testar o potencial probiótico de bactérias do gênero *Bacillus* sp. Coelho (2013) relatou sensibilidade a todos os antibióticos testados, dentre eles encontravam-se gentamicina 10 µg, estreptomicina 10 µg, tetraciclina µg, ciprofloxacina 5 µg e penicilina 10 U. Apesar de muitas bactérias, principalmente as lactobacilares, possuem algum tipo de resistência a antimicrobianos, eventos de resistência geralmente não mediados por plasmídeos, não sendo transmissível. Cepas que, em análises moleculares, apresentarem plasmídeos de resistência não devem ser empregadas como probióticos pelo fato de serem possivelmente capazes de transmitir fatores de defesa a outros microrganismos (SAARELA et al., 2000).

Ao trabalharem com *L. plantarum*, Yadav, Puniya e Shukla (2016) observaram que o isolado RYPR1 apresentou resistência ao ácido nalidíxico, ciprofloxacina, gentamicina e penicilina, houve sensibilidade intermediária a penicilina por parte dos isolados RYPR9, RYPC7 e 15 e RYPK3, os seis isolados submetidos ao teste apresentaram sensibilidade a ampicilina. Gueimonde et al. (2013) dizem que os lactobacilos geralmente são sensíveis aos β- lactâmicos, aos macrolídeos, lincosamidas e tetraciclina, e resistentes as cefalosporinas e aminoglicosídeos; enquanto o gênero *Bacillus* sp. apresenta forte resistência aos macrolídeos, característica esta mediada por elementos extra-cromossomais, e também a tetraciclina. Eventos de resistência neste estudo, puderam ser observados na presença de subpopulações intermediárias a ceftazidima e a resistência por parte do isolado 25J a este antimicrobiano, a sensibilidade aos β- lactâmicos ficou representada pela penicilina, as lincosamidas por parte da clindamicina onde nenhum dos isolados apresentaram resistência, inclusive para a tetraciclina e para o aminoglicosídeo gentamicina.

Durante o processo de identificação de linhagens isoladas de produtos usados em alimentos e posterior determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos, realizado por Uddin et al. (2015), dos 65 isolados incluindo *Bacillus* sp. (n=60), submetidos a análise de sensibilidade a antibióticos, 20% apresentaram resistência a mais de três antibióticos testados dentre eles a ampicilina, clorafenicol, clindamicina, eritromicina e penicilina. Dados os riscos que a terapia antimicrobiana traz à saúde, incluindo a redução da diversidade de microbiomas além da resistência aos antibióticos, o uso de microrganismos probióticos está se tornando cada vez mais efetivo e aceitável (NAMI et al., 2015).

Ao remetermos a origem dos isolados deste estudo, eventos de resistência e surgimento de subpopulações resistentes podem ter ocorrido devido exposição inadequada do animal ao tratamento antimicrobiano no período de vida livre ou confinamento levando ao desenvolvimento de bombas de efluxo, perda de proteínas de membrana ou seletividade na permeabilidade da mesma frente aos antimicrobianos testados.

Os genes de resistência aos antibióticos transferidos horizontalmente, particularmente aqueles dentro de elementos genéticos móveis, são os mais susceptíveis de serem transferidos merecendo assim, uma atenção particular (GUEIMONDE et al., 2013). Culturas com potencial para probiose que possuem resistência intrínseca, não transferível por plasmídeos, podem ser úteis na reposição da flora intestinal após longos períodos de tratamento com antibióticos específicos. A transmissão de genes de resistência a antimicrobianos, por parte de selecionados probióticos, para bactérias patogênicas ou potencialmente patogênicas faz de estudos moleculares critério para a obtenção do selo GRAS (SHARMA et al., 2014).

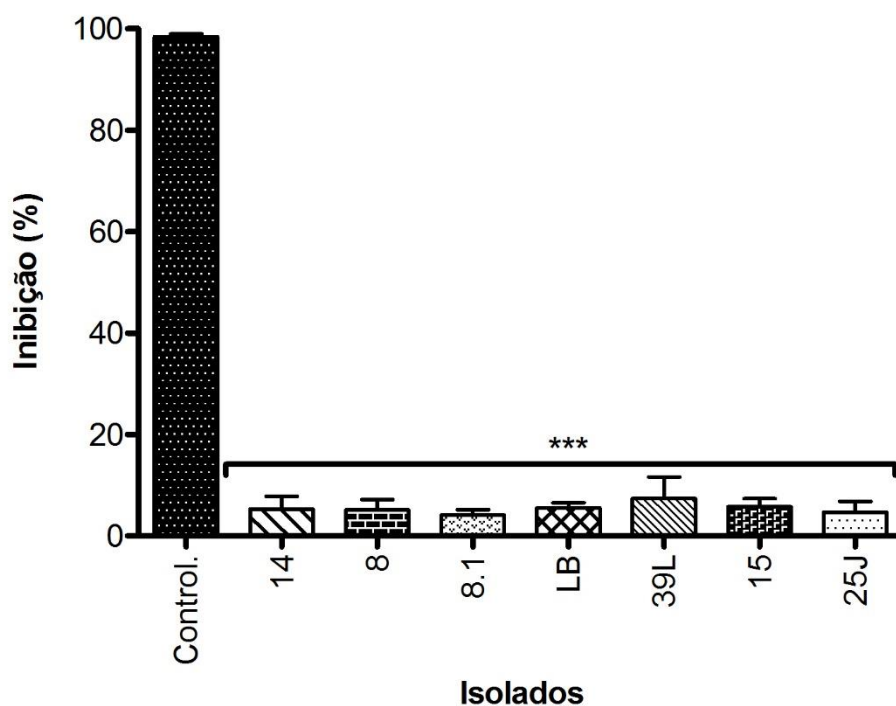
4.4 ANÁLISE DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES

4.1.1 Captura do radical DPPH

A determinação de atividades antioxidantes de forma prática, rápida e sensível é aquela que envolve um radical cromóforo estável e que estimula as espécies reativas de oxigênio, sendo o DPPH um dos mais utilizados. (NASCIMENTO et al., 2011).

Ao analisarmos o Gráfico 4, pode-se dizer que estatisticamente todos os isolados submetidos ao teste de captura do radical DPPH expressaram a mesma percentagem em relação a capacidade de transferência de elétrons, independente da concentração utilizada, ficando em torno de $5,39 \pm 2,36\%$ de inibição da atividade do radical em relação ao controle quercitina $200\mu\text{g/mL}$ em metanol.

Gráfico 4 - Percentagem do potencial antioxidante dos isolados lactobacilares no processo de inibição da atividade do radical DPPH



Control.: Controle;

*** Estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$), diferindo significativamente do controle $p < 0,05$ pelo teste de Dunnet.

Ao verificar a capacidade de estabilização do radical DPPH em difenil-picril-hidrazina, resultado final do ensaio, Ji, Jang e Kim (2015) relatam que todos os seus onze isolados mantiveram o mesmo perfil de atividade, próximos dos 50%. Baick e Kim (2015) ao analisarem as propriedades antioxidantes dos isolados de *Lactobacillus* também encontraram níveis de atividade em torno de 50% diferindo significativamente do controle trolox 0,02%. As análises deste estudo diferem significativamente das bibliografias até então citadas.

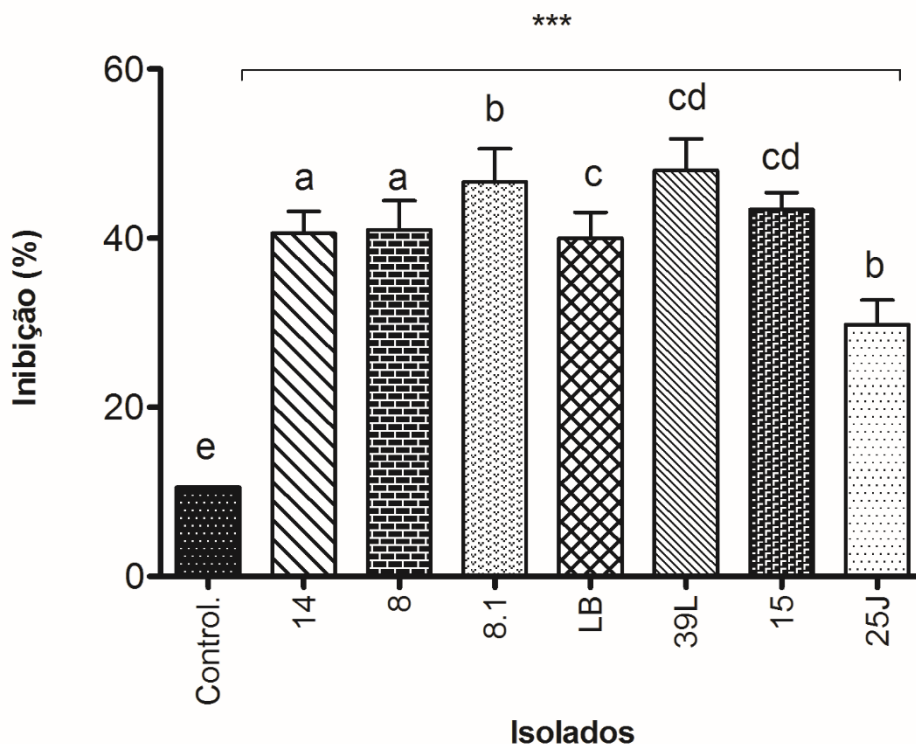
A atividade antioxidante de algumas estirpes bacterianas produtoras de ácido láctico pode ser atribuída a produção de compostos de superfície celular, tais como polissacarídeos extracelular e ácido lipoteicoico. Das e Goyal (2015) ao compararem a atividade de isolados de *L. plantarum* DM5 com a atividade antioxidante desempenhada por isolados de *L. plantarum* NRRL B-4496 e *L. acidophilus* NRRL B-4495 concluíram que a cepa teste apresentou 33% a mais de atividade de eliminação do radical DPPH do que *L. plantarum* (38,4%) e *L. acidophilus* (49,5%). Os autores ainda relatam que o aumento da atividade antioxidante contra este radical está relacionado com a concentração bacteriana empregada ao teste, sendo que a concentração de 10^{10} UFC/mL apresentou maior atividade que a

concentração de 10^6 UFC/mL, tal fato não foi observado neste estudo uma vez que, todas as concentrações empregadas apresentaram o mesmo potencial de inibição.

Evidências científicas crescentes sugerem que o estresse oxidativo está envolvido na patogênese de vários distúrbios e patologias, tais como lesões hepáticas, esteatose, envelhecimento precoce e até mesmo câncer. Os mecanismos de ação de antioxidantes por cepas probióticas não consiste apenas na eliminação de radicais livres, mas também na inibição da produção destes radicais e a promoção da melhora dos níveis de antioxidantes endógenos (BAICK; KIM, 2015).

4.1.2 Ensaio de auto oxidação do ascorbato

Antioxidantes têm a capacidade de regenerar o substrato oxidável ou prevenir significativamente a oxidação do mesmo. Além dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como o β - caroteno, a vitamina C ou ácido ascórbico e alguns compostos fenólicos. As análises obtidas no Gráfico 5 mostram que todos os isolados apresentaram significativa atividade de inibição da auto- oxidação do ascorbato em relação ao controle quercitina 200 μ g/mL em metanol; alguns isolados como é o caso do 8.1 e 39L apresentaram atividade de em torno de $47\pm 8,67\%$ de inibição da auto- oxidação.

Gráfico 5 - Propriedade antioxidante de inibição da auto-oxidação do ascorbato

Control.: Controle;

Letras iguais apresentam-se estatisticamente iguais diferindo em $p < 0,05$ das demais pelo teste de Tukey. Todos os isolados apresentaram significativa diferença ($p < 0,05$) quando comparados ao controle quercitina $200\mu\text{g/mL}$ em metanol pelo teste de Dunnet.

O ácido ascórbico é comumente encontrado no organismo na forma de ascorbato estando localizado nos compartimentos aquosos dos tecidos orgânicos, atuando como agente redutor presente nos sítios ativos das enzimas ou nas formas livres no organismo. Uma bactéria com potencial antioxidante como característica de probiose deve evitar a oxidação desta molécula doando elétron para substâncias desestabilizadas quimicamente, evitando assim a formação da molécula de desidroascorbato (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Os mecanismos antioxidantes dos probióticos podem ser atribuídos à eliminação de ROS, quelação e íons metálicos, inibição enzimática e com a atividade de redução e inibição da auto-oxidação do ascorbato, ressalta Li et al. (2016) e Amaretti et al. (2013); em seu estudo, que teve por objetivo a exploração das propriedades antioxidantes de 34 bactérias fermentadoras do ácido láctico, os últimos autores relatam atividade de inibição variando de 0,2% para isolados de *S. thermophilus* à 82% para *L. acidophilus*, em relação a linhagem de lactobacilos estudados ($n=11$) a menor efetividade de inibição ficou por conta da cepa *L. amylovorus* que apresentou 1% de potencial protetor.

As propriedades antioxidantes de outras cepas probióticas foram relatadas por Harisa (2009) e Yadav, Jain, Shalini (2007) utilizando animais em modelo de hiperglicemia concluíram que cepas de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* atenuam o estresse oxidativo causado pela diabetes e também exercem efeitos de diminuição dos níveis glicêmicos. Em um ensaio laboratorial controlado, o consumo de iogurte probiótico contendo *L. acidophilus* La5 e *Bifidobacterium lactis* Bb12 melhorou a digestão da lactose e o *status* antioxidante dos sujeitos submetidos a pesquisa (LARSEN et al., 2010).

A modificação da microflora intestinal por parte de cepas probióticas pode ser vista como um meio de regular o metabolismo da glicose, oriunda da alimentação e da quebra das moléculas de lactose, dentre outras, além de melhorar o estresse oxidativo (EJTAHED et al., 2012).

A capacidade antioxidante é peça fundamental no sistema de defesa do organismo e está intimamente ligada com a saúde. O interesse em encontrar substâncias antioxidantes alternativas, sobretudo em alimentos, faz com que a biotecnologia cresça em pesquisas e explore agora o potencial probiótico e antioxidante em favor da saúde (WU et al., 2014). Embora os resultados aqui obtidos sejam relativamente inferiores aos consultados em literaturas, não pode-se excluir o potencial antioxidantes dos isolados em questão, uma vez que todos apresentaram, em independentes concentrações, capacidade antioxidante.

5 CONCLUSÃO

Com o advento da biotecnologia, a microbiologia ganhou espaço na área industrial e objetivou-se a explorar o uso de microrganismos ou compostos derivados do seu metabolismo para a produção de alimentos, principalmente aquele de caráter nutracêutico, como é o caso dos probióticos. A suplementação com microrganismos vivos contribui para a melhora do equilíbrio da microbiota intestinal, a absorção de nutrientes, o quadro imunobiológico, o potencial redox do organismo, dentre outros benefícios.

No presente estudo, de um modo geral, todos os isolados analisados apresentaram benefícios distintos. Os isolados 14, 8 e 39L foram os que mais expressaram atividade enzimática β -gal no tempo de 24h. O isolado 8 apresentou maior viabilidade em pH 2 após 2h de incubação e juntamente com o 14, 8.1 e LB mostraram alta viabilidade após 2h de incubação em pH 3. Todos mostraram-se viáveis em baixas concentrações de sal biliar e inibiram ao menos três possíveis patógenos intestinais. Os isolados 14, 8.1 e 25J apresentaram maiores propriedades hidrofóbicas e juntamente com os demais foram resistentes ao menos a um antibiótico, exceto o isolado 15 que mostrou sensibilidade à todos. Em sua totalidade desempenharam a mesma atividade de inibição do radical DPPH enquanto apresentaram satisfatória e variável inibição da auto-oxidação do ascorbato.

Os isolados testados mostram boas perspectivas para aplicabilidade probiótica, porém ensaios moleculares e testes *in vivo* deverão ser conduzidos, para determinação de genes de resistência, identificação dos isolados e comprovação da atividade antioxidante dos microrganismos, para então desenvolvimento de uma cultura múltipla que supra as exigências da legislação no que diz respeito a um produto probiótico.

REFERÊNCIAS

ABREU, Edeli Simioni de et al. Alimentação mundial: uma reflexão sobre a história. **Saúde soc.**, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 3-14, Dec. 2001 .

ADRIO, Jose L.; DEMAIN, Arnold L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117-139, 2014.

AKOLKAR, S. K.; SAJGURE, A. D.; LELE, S. S. -Galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* isolated from fermented ragi (Eleusine coracana). *Indian Journal of Biotechnology*, 5(2), 184-188, 2006.

AHIRE, Jayesh Jagannath et al. Antioxidative potential of folate producing probiotic *Lactobacillus helveticus* CD6. **Journal of food science and technology**, v. 50, n. 1, p. 26-34, 2013.

ALISSA, Eman M.; FERNS, Gordon A. Functional foods and nutraceuticals in the primary prevention of cardiovascular diseases. **Journal of nutrition and metabolism**, v. 2012, 2012.

ALMEIDA, Carolina Paz et al. **Biotecnologia na produção de alimentos**. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. Dossiê Técnico. Universidade de São Paulo- USP. 2011.

AMARETTI, Alberto et al. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: in vitro and in vivo activities. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 809-817, 2013.

American Cancer Society. Global Cancer Facts and Figures. **American Cancer Society**. Atlanta (GA), 2ed. 2011. Disponível em: < <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-027766.pdf>>.

ANDRADE, C.R.G. Propriedades probióticas *in vitro* de *Lactobacillus spp.* Isolados de queijo minas artesanais da Serra da Canastra- MG. [**Dissertação**]. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2012.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 15, de 30 de abril de 1999. Institui junto à Câmara Técnica de Alimentos a Comissão de Assessoramento Tecnocientífico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, com a incumbência de prestar consultoria e assessoramento em matéria relacionada a alimentos funcionais e novos alimentos, segurança de consumo e alegação de função em rótulos, submetidos por lei ao regime de vigilância sanitária. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 03 de Maio de 1999. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/18_99.htm>.

_____ – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico de registro, alteração e revalidação de registro dos medicamentos probióticos. RDC nº 323, de 10 de novembro de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_323_2003_COMP.pdf/4e49fa80-4303-4733-b7a8-8aa2331ca184>.

_____ - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução- RDC nº 323 de 10 de novembro de 2003. Aprova o regulamento técnico de registro, alteração e revalidação de registro dos medicamentos probióticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legi/res_ol/2003/rdc/32303rdc.htm>.

_____ ^a – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos funcionais**. 2016. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13?p_p_id=101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU&p_p_col_id=column-2&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_groupId=219201&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_urlTitle=alimentos-funcionais&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_assetEntryId=2866855&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_type=content>.

_____ ^b – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Probióticos**. 2016. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13?p_p_id=101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU&p_p_col_id=column-2&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_groupId=219201&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_urlTitle=probioticos&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_assetEntryId=2864062&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_type=content>.

BADARÓ, Andréa Cátia Leal et al. Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana, parte 1. **Nutrir Gerais-Revista Digital de Nutrição**, v. 3, n. 5, p. 396-416, 2008.

BAHADORAN, Zahra; MIRMIRAN, Parvin; AZIZI, Fereidoun. Fast Food Pattern and Cardiometabolic Disorders: A Review of Current Studies. **Health Promotion Perspectives**, v. 5, n. 4, p. 231, 2015.

BAICK, Seung-Chun; KIM, Cheol-Hyun. Assessment of Characteristics and Functional Properties of *Lactobacillus* species Isolated from Kimchi for Dairy Use. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 35, n. 3, p. 339, 2015.

BARREIROS, André L. B. S.; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, Fev. 2006.

BARRETTO, Lília Calheiros de Oliveira et al. Tendências biotecnológicas da indústria láctea a partir da prospecção de patentes e artigos. **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 6, n. 4, p. 3583-3590, 2016.

BEGLEY, Máire; GAHAN, Cormac GM; HILL, Colin. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 625-651, 2005.

BELLAVER, Emyr Hiago et al. Seleção de lactobacilos produtores de β -galactosidase com potencial uso como probiótico. In: **Anals electronics do International Symposium on Science and Biotechnology**. p. 87-88. 2015.

BENAVENTE, Rocio et al. Improving Properties of a Novel β -Galactosidase from *Lactobacillus plantarum* by Covalent Immobilization. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 7874-7889, 2015.

BERMUDEZ-BRITO, Miriam et al. Probiotic mechanisms of action. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 61, n. 2, p. 160-174, 2012.

BOARETTO, Antonio Eneidi. A evolução da população mundial, da oferta de alimentos e das ciências agrárias. **Ceres**, v. 56, n. 4, 2015.

BOYLE, Robert J.; ROBINS-BROWNE, Roy M.; TANG, Mimi LK. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 6, p. 1256-1264, 2006.

BRANCO, Crislaine, P; OLIVEIRA; Aristides, R.; SILVA, Mariana, Pina, Alimentos funcionais e nutracêuticos. **Revista Conexão Eletrônica**, Três Lagoas, v. 9, n. 1/2, p. 596-604, 2012.

BRENA, Beatriz; GONZÁLEZ-POMBO, Paula; BATISTA-VIERA, Francisco. Immobilization of enzymes: a literature survey. **Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition**, p. 15-31, 2013.

BURITI, Flávia Carolina Alonso; SAAD, Susana Marta Isay. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 57, n. 4, p. 373, 2007.

CABRAL, Maria Luiza Barros 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.

CALVETE, Crislaine Lambiase; CASEIRO, Marcos Montani; DE SOUZA, Cleide Barbieri. BIOTECNOLOGIA: Transformação bacteriana por método de choque térmico. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 12, n. 26, p. 41-53, 2015.

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P. **Recursos Microbiológicos para Biotecnologia**, v. 27. 2010. Disponível em: <http://www.mct.gov.br/Temas/biotec/estudos_biotec_textos.htm>.

CANZI, Enrica et al. Conditions affecting cell surface properties of human intestinal bifidobacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 88, n. 3-4, p. 207-219, 2005.

CAREVIĆ, Milica et al. Optimization of β -galactosidase production from lactic acid bacteria. **Chemical Industry/Hemijska Industrija**, v. 69, n. 3, 2015.

CASELLI, Michele et al. Actual concept of “probiotics”: is it more functional to science or business. **World J Gastroenterol**, v. 19, n. 10, p. 1527-1540, 2013.

CHEN, Qing; ANDERS, Sven; AN, Henry. Measuring consumer resistance to a new food technology: A choice experiment in meat packaging. **Food Quality and Preference**, v. 28, n. 2, p. 419-428, 2013.

CHU, Yan-Hwa; CHANG, Chao-Lin; HSU, Hsia-Fen. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 5, p. 561-566, 2000.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing- **Twent- fifth Informational Supplement**. 2015; v. 35, n. 3.

COELHO, Julise Gonzalez. **Potencial probiótico de bactérias do gênero *Bacillus***. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de ciência e tecnologia de alimentos. Porto Alegre, p. 1-58. 2013.

COELHO, Maria Alice Zarur et al. **Tecnologia enzimática**. Editora EPUB, 2008.

CORRÊA, Ana Paula F. et al. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 12, p. 2247-2254, 2011.

CORREIA, Rita Gomes; GARCIA, José Luis. A aposta portuguesa na biotecnologia sob o impulso da integração europeia. **Análise Social**, p. 274-309, 2016.

CORTEZ, Neila Mello et al. *Lactobacillus acidophilus* antagonistic action against pathogenic strains inoculated in the fermented milk. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 3, n. 1, 2016.

COSTA, H. H. S. et al. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from minas artisanal cheese from Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1858-1866, 2013.

COSTA, Neuza Maria Brunoro; DE OLIVEIRA, Aluízio Borém. **Biotechnologia em Saúde e Nutrição: como o DNA Pode Enriquecer os Alimentos**. Editora Rubio, 2013.

CRIBB, André Yves. Sistema agroalimentar brasileiro e biotecnologia moderna: oportunidades e perspectivas. **Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília**, v. 21, n. 1, p. 169-195, 2004.

DALLAL, MM Soltan et al. Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lb. fermentum* isolated from the faeces of healthy infants against nonfermentative bacteria causing nosocomial infections. **New Microbes and New Infections**, v. 15, p. 9-13, 2017.

DAS, Deeplina; GOYAL, Arun. Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) producing ability of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5 isolated from Marcha of Sikkim. **LWT-Food Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 263-268, 2015.

DE ALMADA, Carine Nunes et al. Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 10, p. 4175-4199, 2015.

DE OLIVEIRA, Maricê Nogueira et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 1, 2002.

DE PAULA, Karol Willian; JÚNIOR, Zanusso. Análise da prevalência de portadores de intolerância à lactose por exames laboratoriais em Maringá- PR. **ANÁLISE**, v. 45, p. 11-15, 2015.

DE STEUR, Hans; ODONGO, Walter; GELLYNCK, Xavier. Applying the food technology neophobia scale in a developing country context. A case-study on processed matooke (cooking banana) flour in Central Uganda. **Appetite**, v. 96, p. 391-398, 2016.

DEBA, T. E. A pesquisa sobre segurança alimentar e nutricional no Brasil de 2000 a 2005: tendências e desafios. 2010.

DENIPOTE, Fabiana Gouveia; TRINDADE, Erasmo Benício Santos de Moraes; BURINI, Roberto Carlos. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. **Arquivos de Gastroenterologia**, p. 93-98, 2010.

DEVI, M. Charitha et al. Production and optimization of b-galactosidase enzyme from probiotic *Lactobacillus sps*. **BTAIJ**. v.5, n.3. 2011.

DO AMARAL, Henriques; DE CARVALHO, Antônio Fernandes; VILELA, Miriam Aparecida Pinto. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 2, 2007.

EJTAHED, Hanie S. et al. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. **Nutrition**, v. 28, n. 5, p. 539-543, 2012.

EL SOHAIMY, S. A. Functional foods and nutraceuticals-modern approach to food science. **World Applied Sciences Journal**, v. 20, n. 5, p. 691-708, 2012.

FAO, IFAD et al. The state of food insecurity in the world. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2015. Disponível em: < <https://www.fao.org.br/nppfea800mpoe.asp>>.

FDA – Food and Drug Administration. **Generally Recognized as Safe**. 2015. Disponível em: < <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>>.

FELIPE, Maria Sueli Soares. Desenvolvimento tecnológico e inovação no Brasil: desafios na área de biotecnologia. **Novos estud. - CEBRAP**, São Paulo, n. 78, p. 11-14, Jul. 2007.

FERRAZ, Lenir Inês Rigoli et al. Application of home-made lipase in the production of geranyl propionate by esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 44-48, 2015.

FERREIRA, Célia Lúcia de Lucas Fortes. **Prebióticos e Probióticos: atualização e prospecção**. Editora Rubio, 2012.

FLOCH, Martin H. Probiotic safety and risk factors. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 47, n. 5, p. 375-376, 2013.

FOGARTY, William M.; KELLY, Catherine T. (Ed.). **Microbial enzymes and biotechnology**. Springer Science & Business Media, 2012.

FRANÇA, F. C. O. et al. Mudanças dos hábitos alimentares provocados pela industrialização e o impacto sobre a saúde do brasileiro. **Anais do I Seminário Alimentação e Cultura na Bahia**, 2012.

FREIRE, Carlos Eduardo Torres. Biotecnologia no Brasil: uma atividade econômica baseada em empresa, academia e Estado. [**Tese de Doutorado**]. Universidade de São Paulo, 2014

FUNG, Wai-Yee; YUEN, Kay-Hay; LIONG, Min-Tze. Agrowaste-based nanofibers as a probiotic encapsulant: fabrication and characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 15, p. 8140-8147, 2011.

GAVA, Altanir Jaime; SILVA, Carlos Alberto Bento da; FRIAS, Jenifer Ribeiro Gava. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2014.

GHEYTANCHI, Elmira 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.

GOLDBERG, Israel. **Functional foods: designer foods, pharmafoods, nutraceuticals**. Springer Science & Business Media, 2012.

GOMES, Wellington Silva; BORÉM, Aluizio. Biotecnologia: novo paradigma do agronegócio brasileiro. **Revista de Economia e Agronegócio-REA**, v. 11, n. 1, 2015.

GRAJEK, Włodzimierz; OLEJNIK, Anna; SIP, Anna. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. **ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION**-, v. 52, n. 3, p. 665, 2005.

GUARDABASSI, Luca; JENSEN, Lars B.; KRUSE, Hilde. **Guia de antimicrobianos em veterinária**. Artmed Editora, 2010.

GUPTA, Vijai G. et al. (Ed.). **Biotechnology and biology of Trichoderma**. Newnes, 2014.

HAKANSSON, Asa; MOLIN, Goran. Gut microbiota and inflammation. **Nutrients**, v. 3, n. 6, p. 637-682, 2011.

HARISA, G. I. et al. Oral administration of *Lactobacillus acidophilus* restores nitric oxide level in diabetic rats. **Aust J Basic Appl Sci**, v. 3, n. 3, p. 2963-2969, 2009.

HEMAISWARYA, S et al. Mechanism of action of probiotics. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, Curitiba, v. 56, n. 1, p. 113-119, Fev. 2013.

HUSAIN, Saleha. Effect of ferric iron on siderophore production and pyrene degradation by *Pseudomonas fluorescens* 29L. **Current microbiology**, v. 57, n. 4, p. 331-334, 2008.

IYER, Bharti K.; SINGHAL, Rekha S.; ANANTHANARAYAN, Laxmi. Characterization and in vitro probiotic evaluation of lactic acid bacteria isolated from idli batter. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 6, p. 1114-1121, 2013.

JAMALY, Naoual; BENJOUAD, Abdelaziz; BOUKSAIM, Mohammed. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from known popular traditional moroccan dairy products. **British Microbiology Research Journal**, v. 1, n. 4, p. 79, 2011.

JEGANNATHAN, Kenthorai Raman; NIELSEN, Per Henning. Environmental assessment of enzyme use in industrial production—a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228-240, 2013.

JI, Keunho; JANG, Na Young; KIM, Young Tae. Isolation of Lactic Acid Bacteria Showing Antioxidative and Probiotic Activities from Kimchi and Infant Feces. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 25, n. 9, p. 1568-1577, 2015.

JUERS, Douglas H.; MATTHEWS, Brian W.; HUBER, Reuben E. LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. **Protein Science**, v. 21, n. 12, p. 1792-1807, 2012.

JUNGERSEN, Mikkel et al. The science behind the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12®. **Microorganisms**, v. 2, n. 2, p. 92-110, 2014.

KARIMI, Reza et al. Application of inulin in cheese as prebiotic, fat replacer and texturizer: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 119, p. 85-100, 2015.

KHODER, Ghalia et al. Potential role of probiotics in the management of gastric ulcer (Review). **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 12, n. 1, p. 3-17, 2016.

KICH, Débora Mara et al. Probiotic: effectiveness nutrition in cancer treatment and prevention. **Nutrición Hospitalaria**, v. 33, n. 6, 2016.

KIRK, Ole; BORCHERT, Torben Vedel; FUGLSANG, Claus Crone. Industrial enzyme applications. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345-351, 2002.

KLARE, Ingo et al. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 900-912, 2007.

KULLISAAR, Tiiu et al. Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. **British Journal of Nutrition**, v. 90, n. 02, p. 449-456, 2003.

LAM, Vy et al. Intestinal microbiota determine severity of myocardial infarction in rats. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 4, p. 1727-1735, 2012.

LARSEN, Nadja et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. **PloS one**, v. 5, n. 2, p. e9085, 2010.

LEE, Na-Kyoung et al. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with anti-allergic effects from kimchi for yogurt starters. **LWT-Food Science and Technology**, v. 58, n. 1, p. 130-134, 2014.

LEE, Sangki et al. Probiotic characteristics of *Bacillus* strains isolated from Korean traditional soy sauce. **LWT-Food Science and Technology**, 2016.

LEITE, Débora Silva; MUNHOZ, Leticia Leite. Biotechnology and Improvement of Plant Varieties: Cultivars and Transgenic. **Veredas do Direito: Direito Ambiental e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 19, p. 23, 2013.

- LEITE, Marta Cristina Teixeira et al. Identificação, caracterização e análise da expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20. [**Tese de Doutorado**]. Universidade Federal de Viçosa- Minas Gerais. 2008.
- LI, Caifeng et al. Effect of probiotics on metabolic profiles in type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis of randomized, controlled trials. **Medicine**, v. 95, n. 26, 2016.
- LI, Shuang et al. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. 1-11, 2012.
- LI, Tiangang; CHIANG, John YL. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 4, p. 948-983, 2014.
- LIESE, Andreas; HILTERHAUS, Lutz. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6236-6249, 2013.
- LIMA, Sônia Centeno et al. Segurança Alimentar e Nutricional na Comunidade dos Países de Língua Portuguesa: Desafios e Perspectivas. **CPLP, Rio de Janeiro**, 2012.
- LIN, Meei-Yn; CHANG, Fen-Juan. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. **Digestive diseases and sciences**, v. 45, n. 8, p. 1617-1622, 2000.
- LUNA, U.V. et al. Mananoligossacarídeo e β -glucano em dietas de leitões desmamados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 67, n. 2, p. 591-599, Abr. 2015.
- MALAJOVICH, Carlos José Saldanha et al. Legislação ambiental e degradação ambiental do solo pela atividade petrolífera no Brasil. 2013.
- MARROKI, Ahmed; BOUSMAHA-MARROKI, Leila. Lactobacilli isolated from Algerian goat's milk as adjunct culture in dairy products. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 3, p. 410-420, 2014.
- MARTINS, Flaviano S. et al. Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. **Archives of microbiology**, v. 191, n. 8, p. 623-630, 2009.
- MATHIÚS, Laís Adrieli et al. Aspectos atuais da intolerância à lactose. **Rev. Odontol. Ara; atuba (Online)**, p. 46-52, 2016.
- MATIAS, Fernanda; VIEIRA, Pablo Igor Lima; FONTENELE, Hugo Almeida. Avaliação do perfil de investimentos em biotecnologia no Brasil. **Cadernos de Prospecção**, v. 7, n. 3, p. 314, 2014.
- MAYER, Karla Luiza; KURTZ, Andréia. Produção e caracterização do extrato hidrossolúvel de grão de bico adicionado de cacau. [**Dissertação**]. Universidade Tecnológica Federal do Paraná- UTFPR. Medianeira- PR. 2014.

MCCARTY, Perry L. **Environmental Biotechnology: principles and applications**. Tata McGraw-Hill Education, 2012.

MEIRA, Stela Maris Meister et al. Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha. **Braz J Food Technol**, v. 3, p. 75-80, 2010.

MEIRA, Stela Maris Meister. Potencial probiótico de bactérias lácticas e atividades biológicas de leite e queijos de ovelha [**Dissertação**]. UNIJUÍ/UERGS; 107p. Porto Alegre- Rio Grande do Sul. 2011.

MENENDEZ, Esther; GARCIA-FRAILE, Paula; RIVAS, Raul. Biotechnological applications of bacterial cellulases. **AIMS Bioengineering**. v. 2, n.3, p. 163-182. 2015.

MENON, R. et al. Development of a carbohydrate-supplemented semidefined medium for the semiselective cultivation of *Lactobacillus* spp. **Letters in applied microbiology**, v. 57, n. 3, p. 249-257, 2013.

MINE, Tetsuya. What is Probiotics? **Journal of Probiotics & Health**, v. 2, p. 108, 2014.

MISHRA, O. P.; KOVACHICH, G. B. Inhibition of the autoxidation of ascorbate and norepinephrine by extracts of *Clostridium butyricum*, *Megasphaera elsdenii* and *Escherichia coli*. **Life sciences**, v. 35, n. 8, p. 849-854, 1984.

MISSAGIA, S. V., & REZENDE, D. C. A Alimentação Saudável Sob a Ótica do Consumidor: Identificando Segmentos de Mercado. **XXXV Encontro da ANPAD**, Rio de Janeiro, p. 17. 2011.

MOHAMMADI, R.; MORTAZAVIAN, A. M. Review article: technological aspects of prebiotics in probiotic fermented milks. **Food Reviews International**, v. 27, n. 2, p. 192-212, 2011.

MONTERO CASTILLO, Piedad M.; DÍAZ CABALLERO, Antonio; DURÁN LENGUA, Marlene. Antagonistic action of *Lactobacillus* spp. against *Staphylococcus aureus* in cheese from Mompox-Colombia. **Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín**, v. 68, n. 2, p. 7721-7727, 2015.

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

MOTTA, A. de S. et al. Technological and functional properties of lactic acid bacteria: the importance of these microorganisms for food. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 3, p. 172-184, 2015.

NAMI, Yousef et al. Probiotics or antibiotics: future challenges in medicine. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 137-146, 2015.

NATARAJAN, Jayashree et al. Isolation and Characterization of Galactosidase Producing *Bacillus* sp. from Dairy Effluent. **World Applied Sciences Journal**, v. 17, n. 11, p. 1466-1474, 2012.

NGUYEN, Tien-Thanh et al. Homodimeric β -galactosidase from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081: expression in *Lactobacillus plantarum* and biochemical characterization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 7, p. 1713-1721, 2012.

NITHYA, Vadakedath; HALAMI, Prakash M. Evaluation of the probiotic characteristics of Bacillus species isolated from different food sources. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 129-137, 2013.

NOGUEIRA, Janaína Cândida Rodrigues; GONÇALVES, Maria da Conceição Rodrigues. Probióticos-Revisão da Literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 4, p. 487-492, 2011.

OKAFOR, Nduka. **Modern Industrial Microbiology and Biotechnology**. CRC Press, 2016.

OMURA, Michele Harumi et al. Características probióticas e de segurança de bactérias do ácido láctico predominantes em leite humano. [Dissertação]. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa- Minas Gerais. 2014.

ORLANDELLI, Ravelly Casarotti et al. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, 2012.

OUWEHAND, A. C. A review of dose-responses of probiotics in human studies. **Beneficial Microbes**, p. 1-10, 2016.

OYAIZU, Makoto. Studies on products of browning reaction-antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **Eiyogaku zasshi Japanese Journal of Nutrition**, 1986.

PACE, D; CAMPOS, A.C; GRAF, R. Efeito de substâncias antioxidantes (vitamina C, vitamina E e Gingko biloba) na viabilidade de retalho cutâneo dorsal em ratos. **Rev Soc Bras Cir Plást**, v. 21, n. 2, p. 77-81, 2006.

PACHECO, Maria Teresa Bertoldo; SGARBIERI, V. C. Alimentos Funcionais: conceituação e importância na saúde humana. **Anais do 1º Simpósio Brasileiro sobre os Benefícios da Soja para a Saúde Humana**, 2001.

PANZARINI, Nathalie Hamine et al. Biotechnology in agriculture: The perception of farmers on the inclusion of Genetically Modified Organisms (GMOs) in agricultural production. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 7, p. 631-636, 2015.

PARK, Yong Ha et al. Application of Probiotics for the Production of Safe and High-quality Poultry Meat. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 36, n. 5, p. 567, 2016.

PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition Health**, n.29, p.4-8, 1974.

PISANO, Maria Barbara et al. Preliminary evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Sardinian dairy products. **BioMed Research International**, v. 2, 2014.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2010.

RAUD-MATTEDI, Cecile. Os alimentos funcionais: a nova fronteira da indústria alimentar análise das estratégias da Danone e da Nestlé no mercado brasileiro de iogurtes. **Revista de Sociologia e Política**, p. 85-100. 2008.

REBUGLIO VELLOSA, José Carlos et al. Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 305-312, 2013.

RECH, Rosane. Estudo da produção de beta-galactosidase por leveduras a partir do soro de queijo. [Tese de Doutorado]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul- UFRGS. Centro de Biotecnologia. Porto Alegre, 2003.

REN, Dayong 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.

ROBERTS, Terry L.; RYAN, John. Solo e Segurança Alimentar. Piracicaba. **International Plant Nutrition Institute**, 2015.

ROUND, June L.; MAZMANIAN, Sarkis K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 5, p. 313-323, 2009.

RUIZ-MOYANO, Santiago et al. Safety and functional aspects of pre-selected *Lactobacilli* for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages. **Meat science**, v. 83, n. 3, p. 460-467, 2009.

SAAD, Susana Marta Isay. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 1-16, Mar. 2006.

SAARELA, Maria et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 197-215, 2000.

SÁNCHEZ, Lilian et al. Aislamiento y caracterización in vitro de cepas de *Lactobacillus spp.* como candidato a probióticas. **Revista de Salud Animal**, v. 33, n. 3, p. 154-160, 2011.

SÁNCHEZ, Lilian et al. Cepas de *Lactobacillus spp.* con capacidades probióticas aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos. **Revista de Salud Animal**, v. 37, n. 2, p. 94-104, 2015.

SÁNCHEZ, Lilian; TROMPS, Jeannette. Caracterización in vitro de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. **Revista de Salud Animal**, v. 36, n. 2, p. 124-129, 2014.

SANTIAGO, Patrícia A. et al. Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Cienc Tecnol Aliment**, v. 24, p. 567-572, 2004.

- SAROJ, Sunil D. et al. Lactobacilli interfere with *Streptococcus pyogenes* hemolytic activity and adherence to host epithelial cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.
- SCHUBER, Lilian Cristina Lopes et al. Isolamento e seleção de fungos produtores de β -galactosidase. **Evidencia: biotecnologia e alimentos**, n. 1, p. 19-40, 2012.
- SHARMA, Poonam et al. Antibiotic resistance among commercially available probiotics. **Food Research International**, v. 57, p. 176-195, 2014.
- SOARES, Adelle; MONASSA, José Michel. O emprego da levedura na indústria food e feed. **REGRAD-Revista Eletrônica de Graduação do UNIVEM-ISSN 1984-7866**, v. 7, n. 1, 2014.
- SONG, Tae Suk; KANG, Seung Bum; LEE, Jong Ik. Articles: Synthesis of Galactooligosaccharides in the Cheese Whey-based Medium by a Lactase from *Lactobacillus paracasei* YSM0308. **Korean J. Food Sci. An**, v. 33, n. 5, p. 565-571, 2013.
- SOUSA, Rita Cássia Pompeu et al. Tecnologia de bioprocesso para produção de alimentos funcionais. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 7, n. 3, p. 366-372, 2013.
- STEFE, C.A., ALVES, M.A.R.A., RIBEIRO, R.L. Probióticos, prebióticos e simbióticos-Artigo de revisão. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v.3, n.1, p. 16-33, Jan/Jun. 2008.
- STÜRMER, Elisandra Saete et al. A importância dos probióticos na microbiota intestinal humana. **Nutrição Clínica**, v. 27, n. 4, p. 264-72, 2012.
- TAHEUR, Fadia Ben et al. Anti-bacterial and anti-biofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 97, p. 213-220, 2016.
- TEMMERMAN, Robin et al. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 1-10, 2003.
- THIRABUNYANON, Mongkol; HONGWITTAYAKORN, Penrat. Potential probiotic lactic acid bacteria of human origin induce antiproliferation of colon cancer cells via synergic actions in adhesion to cancer cells and short-chain fatty acid bioproduction. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 169, n. 2, p. 511-525, 2013.
- TORRES-FREIRE, Carlos; GOLGHER, Denise; CALLIL, Victor. Biotecnologia em saúde humana no Brasil: produção científica e pesquisa e desenvolvimento. **Novos estud. - CEBRAP**, São Paulo, n. 98, p. 69-93, Mar. 2014.
- UDDIN, Gazi Md Noor et al. Identification and antimicrobial resistance of bacteria isolated from probiotic products used in shrimp culture. **PloS One**, v. 10, n. 7, p. e0132338, 2015.
- VAN KLEEF, Ellen; VAN TRIJP, Hans CM; LUNING, Pieter. Functional foods: health claim-food product compatibility and the impact of health claim framing on consumer evaluation. **Appetite**, v. 44, n. 3, p. 299-308, 2005.

VIDIGAL, Márcia Cristina Teixeira Ribeiro et al. Tradução e validação para a língua portuguesa da escala de neofobia em relação à tecnologia de alimentos: food technology neophobia scale. **Ciência Rural**, v. 44, n. 1, p. 174-180, 2014.

VIEIRA, Helena Soraia Fernandes. Caracterização de enzimas proteolíticas produzidas por bactérias de origem marinha. [Tese de Doutorado]. ISA. Universidade de Lisboa. 2013.

VIRTANEN, Tarja et al. Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 1, p. 106-115, 2007.

VYAS, Usha; RANGANATHAN, Natarajan. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: gut and beyond. **Gastroenterology Research and Practice**, v. 2012, 2012.

WILDMAN, Robert EC; WILDMAN, Robert; WALLACE, Taylor C. (Ed.). **Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods**. CRC press, 2016.

WONG, Aloysius et al. Detection of antibiotic resistance in probiotics of dietary supplements. **Nutrition journal**, v. 14, n. 1, p. 95, 2015.

WU, Dachang et al. Antioxidant properties of *Lactobacillus* and its protecting effects to oxidative stress CACO-2 cells. **J. Anim. Plant Sci**, v. 24, p. 1766-1771, 2014.

WU, Xiangwei; PATTERSON, Sherri; HAWK, Ernest. Chemoprevention—history and general principles. **Best practice & research Clinical gastroenterology**, v. 25, n. 4, p. 445-459, 2011.

YADAV, Hariom; JAIN, Shalini; SINHA, P. R. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. **Nutrition**, v. 23, n. 1, p. 62-68, 2007.

YADAV, Ruby; PUNIYA, Anil K.; SHUKLA, Pratyosh. Probiotic Properties of *Lactobacillus plantarum* RYPR1 from an Indigenous Fermented Beverage Raabadi. **Frontiers in microbiology**, v. 7, 2016.

YEO, Soyoung et al. Development of putative probiotics as feed additives: validation in a porcine-specific gastrointestinal tract model. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 23, p. 10043-10054, 2016.

ZHANG, Jian et al. Potential probiotic characterization of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Inner Mongolia “Hurood” cheese. **J. Microbiol. Biotechnol**, v. 24, n. 2, p. 225-235, 2014.

ZISKA, L., A. et al. Ch. 7: **Food Safety, Nutrition, and Distribution**. The Impacts of Climate Change on Human Health in the United States: A Scientific Assessment. U.S. Global Change Research Program, Washington, DC, p. 189–216. 2016.

ZUCOLOTO, Graziela Ferrero; FREITAS, Rogério Edivaldo. **Propriedade Intelectual e Aspectos Regulatórios em Biotecnologia**. Rio de Janeiro: IPEA. p.240. 2013.