REVISTA
DO INSTITUTO DE LATICÍNIOS CÂNDIDO TOSTES
v. 78, n. 2, abr-jun 2023

Artigo DOI: 10.14295/2238-6416.v78i2.924

POTENCIAL PROBIÓTICO DE LEITE FERMENTADO CONTENDO *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* E *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ISOLADOS DE QUEIJOS ARTESANAIS DO NORTE DE MINAS GERAIS

Probiotic potential of fermented milk containing *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus plantarum* isolated from artisanal cheeses from Northern Minas Gerais

Amanda Cristina Mendes Gusmão[1], Lilian Ferreira Neves[1], Fernando Eustáquio de Matos Junior[1], Tawana Silva Cardoso[1], Irene Menegali[1], Sidney Pereira[1], Theles de Oliveira Costa[1], Maximiliano Soares Pinto[1]*

RESUMO

Objetivou-se avaliar o potencial probiótico *in vitro* no leite fermentado contendo *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarum* isolados do queijo Minas artesanal do Norte de Minas Gerais. As cepas isoladas dos *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarem* foram inoculadas ao leite, sendo submetidos ao processo de fermentação. Foram realizadas análises físico-químicas e microbiológicas para investigar os efeitos sobre a bebida após a fermentação. Para as análises de proteína e cinzas, observou-se que estas variáveis não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos (efeito simples) e não houve interação significativa entre os fatores. O leite fermentado elaborado a partir de leite desnatado (teor de gordura <0,5%) apresentou-se dentro dos padrões estabelecidos para a contagem de bactérias láticas (>10^8 UFC/g). As cepas testadas apresentaram sensibilidade a três dos seis antibióticos testados, apresentando sensibilidade moderada a ciprofloxacina, e resistência a gentamicina e estreptomicina. As bactérias láticas foram verificadas no produto final durante todo o período de armazenamento avaliado, podendo observar o potencial probiótico do leite fermentado elaborado.

Palavras-chave: alimento funcional; análise química, produto lácteo; qualidade.

---

1 Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Avenida Universitária, 1000, Universitário, 39.404-547, Montes Claros, MG, Brasil. E-mail: maxonze11@gmail.com

*Autor para correspondência

Recebido / Received: 30/09/2022
Aprovado / Approved: 12/04/2023

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the probiotic potential in vitro in fermented milk containing *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus plantarum* isolated from artisanal Minas cheese from the North of Minas Gerais. The isolated strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus plantarum* were inoculated into milk, which was subjected to fermentation. Physical-chemical and microbiological analyzes were carried out to investigate the effects on the beverage after fermentation. For the analysis of protein and ash it was observed that these variables did not show statistical differences between treatments (single effect) and there was no significant interaction between the factors. Fermented milk made from skimmed milk (Fat content <0.5%) was within the established standards for the count of lactic acid bacteria (>10^8 CFU.g^{-1}). The strains tested showed sensitivity to three of the six antibiotics tested, showing moderate sensitivity to ciprofloxacin, and resistance to gentamicin and streptomycin. The lactic acid bacteria were verified in the final product throughout the evaluated storage period, being able to observe the probiotic potential of the elaborated fermented milk.

Keywords: chemical analysis; dairy product; functional food; quality.

INTRODUÇÃO

O leite é um produto que fornece nutrientes necessários, tais como as proteínas, com uma elevada quantidade de aminoácidos indispensáveis para o organismo humano, além de carboidratos, lipídeos, vitaminas e minerais – sendo que entre os minerais que compõem o leite destaca-se o cálcio – que são nutrientes essenciais para o desenvolvimento de uma vida saudável (COLLARD; McCORMICK, 2021). Nem sempre é fácil unir saudabilidade e sabor agradável em uma bebida. O desenvolvimento de novos produtos alimentícios está cada vez mais desafiador (SILVA; ORLANDELLI, 2019), uma vez que atender as expectativas do consumidor, que desejam produtos saudáveis, porém, sem renunciar a uma experiência sensorial satisfatória, é uma tarefa complexa (D'ANGELIS *et al.,* 2020).

Atualmente, a busca dos consumidores por uma alimentação saudável e balanceada leva à necessidade de adequação da indústria, no sentido da procura de diferentes ingredientes/formulações que acrescentem uma qualidade nutricional ao produto final (MOURA *et al*., 2016; SILVA; ORLANDELLI, 2019). Nesse sentido, existe como alternativa a adição de probióticos ao produto alimentício. A Organização Mundial de Saúde define probióticos como sendo microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2006).

As bactérias láticas (BAL) possuem inúmeros benefícios aos alimentos, podendo citar a conservação das propriedades nutricionais, o incremento no sabor e a inocuidade microbiológica conferida ao produto (DUARTE *et al.,* 2016). Além disso, as BAL possuem propriedades que auxiliam na saúde e bem-estar dos consumidores. Portanto, concentrações adequadas desses microrganismos nos alimentos são importantes para que, após sua ingestão, exista um número suficiente de células viáveis no produto, de forma a possibilitar a colonização do trato gastrointestinal e, consequente, atuação dos microrganismos para a manifestação dos efeitos benéficos desejáveis ao organismo (BRASIL, 2007).

Grande parte das bactérias láticas já são reconhecidas cientificamente como microrganismos com potencial probiótico (ALBUQUERQUE *et al.,* 2018; GARCIA *et al.,* 2016; PINTO *et al*., 2020; RODRIGUES *et al.*, 2021; SORNSENEE *et al*., 2021), sendo que o gênero *Lactobacillus* se destaca por sua larga utilização em diversos produtos alimentícios fermentados (PAPIZADEH, 2016). Essas bactérias possuem a capacidade de colonização do trato gastrointestinal humano, competindo com

microrganismos patogênicos por nutrientes e, com a vantagem de serem resistentes a pH ácido e a sais biliares, podem auxiliar no equilíbrio da flora intestinal, se tornando a microbiota dominante e trazendo benefícios ao hospedeiro (NAMI *et al*., 2014; WANG *et al*., 2018).

Estudos evidenciam diversos benefícios à saúde mediante o consumo regular de alimentos contendo *L. plantarum* e *L. rhamnosus,* tais como: diminuição do colesterol (LDL) (GUO *et al*., 2019; HUANG *et al*., 2013; DING *et al*., 2017), efeito anticancerígeno (DEHGHANI *et al.,* 2021; NAMI *et al.*, 2014), combate/prevenção a doenças gastrointestinais (MARTÍN *et al*., 2019; SEDDIK *et al*., 2017; STEVENSON *et al*., 2014; WESTERIK *et al.* 2018), ação antioxidante (DAS; GOYAL, 2015; RAJOKA *et al*., 2017; YANG *et al.,* 2019), melhora da resposta imunológica (YANG *et al.,* 2019), ação anti-inflamatória (OH *et al*., 2018) e combate a doenças neurodegenerativas (NIMGAMPALLE; KUNA, 2017).

As BALs têm sido isoladas em leites e queijos artesanais visando à seleção de culturas láticas para a obtenção de produtos de qualidade (COSTA *et al.,* 2013). Neste contexto, o leite fermentado com bactérias probióticas tem sido alvo de vários estudos por apresentar efeitos benéficos para a saúde (NITHYA; HALAMI, 2013; RICHARDS *et al.,* 2022) e, além de apresentar uma alta aceitação sensorial, possui um alto valor nutritivo (MAESTRI *et al.,* 2014; RODRIGUES *et al.*, 2020). O consumo de produtos probióticos está em constante crescimento entre a população.

Comercialmente, muitas formulações foram desenvolvidas e estão prontas para serem incorporadas nos produtos alimentares. Os produtos lácteos fermentados, especialmente o leite fermentado, é um desses produtos, contendo *Lactobacillus* spp. que ajudam a manter o trato gastrointestinal saudável (MARKOWIAK; ŚLIŻEWSKA, 2017; O'BRYAN *et al.,* 2013; YOUNIS *et al.,* 2015).

Neste contexto, o objetivo do estudo foi avaliar o potencial probiótico *in vitro* do leite fermentado contendo *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus plantarum* isoladas do queijo Minas artesanal do Norte de Minas Gerais.

MATERIAL E MÉTODOS

A elaboração e as análises físico-químicas do leite fermentado foram realizadas no laboratório de Tecnologia de Alimentos do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais – ICA/UFMG, em Montes Claros – MG.

Elaboração do produto

O processamento do leite fermentado foi realizado baseado na metodologia descrita em GALLINA *et al*., (2011), o qual utilizou-se leite pasteurizado de diferentes lotes, obtidos comercialmente com 4,5% de lactose, 3% de gordura e 3% de proteína que posteriormente foi submetido a tratamento térmico de 90 ºC por 2 minutos e resfriamento a 37 ºC. Posteriormente, o leite foi dividido em três porções iguais para adição de 1% da cultura de *Lactobacillus rhamnosus* (A8), 1% de *Lactobacillus plantarum* (B7) e 1% das duas culturas (0,5% de cada) (A8 + B7).

O processo de fermentação aconteceu em banho-maria ±42 °C e o pH foi acompanhado até atingir 4,6, em três repetições, utilizando lotes diferentes de leite pasteurizado. O leite fermentado foi envasado em embalagens plásticas de 200 mL, devidamente identificadas e armazenadas sob refrigeração a 4 °C ±1 °C. Foi realizado o acompanhamento da vida de prateleira das formulações durante o 1º, 7º, 14º e 21º dias, por meio das análises físico-químicas.

Análises físico-químicas

As determinações do pH e da acidez titulável do leite fermentado, foram realizadas em triplicata, nas amostras devidamente homogeneizadas. O pH foi aferido utilizando o potenciômetro digital (Tecnal modelo Meter-102) e a acidez titulável (% ácido lático) por titulometria, de acordo com a metodologia proposta por FERREIRA, (1981).

As análises dos teores de proteína foram realizadas pelo método de Kjeldahl, de acordo com PEREIRA, (2001), e a análise de cinzas seguiu os procedimentos do Instituto Adolfo Lutz (Zenebon *et al*., 2008).

Análises microbiológicas

Para a quantificação de *Lactobacillus* utilizou-se o Agar MRS (Difco, Detroit, Michigan, Estados Unidos) por plaqueamento em profundidade. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 horas, e as contagens foram realizadas nos tempos 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento (ANDRADE, 2012).

Inibição do crescimento de bactérias *in vitro*

O teste de antagonismo foi realizado em triplicata, com duas repetições para cada amostra, conforme a técnica adaptada, descrita em Andrade (2012). Para a realização do teste de antagonismo, as duas amostras de *Lactobacillus* spp. selecionadas foram denominadas culturas produtoras, isto é, as que foram testadas quanto à capacidade antagonista contra outros microrganismos, denominados de culturas reveladoras. Foram utilizadas como culturas reveladoras duas bactérias patogênicas de referência, com intuito de examinar atividade inibitória entre bactérias do próprio ambiente onde foram isoladas. As amostras de bactérias patogênicas foram: *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

As amostras de *Lactobacillus* spp. foram ativadas em tubos de ensaio com rosca contendo caldo MRS (Difco, Detroit, Michigan, Estados Unidos), incubados a 37 °C, durante 24 h, sob aerobiose. Após duas ativações, 5 µL de cada amostra foram depositados no centro de uma placa de Petri contendo ágar MRS (Difco, Detroit, Michigan, Estados Unidos), essas foram incubadas sob aerobiose a 37 °C por 48 h. Após esse período, com o objetivo de eliminar os microrganismos e restar somente substâncias inibidoras, foi adicionado clorofórmio às tampas das placas de Petri e aguardou-se 30 minutos sob luz UV. As amostras reveladoras passaram por duas ativações, sendo as bactérias patogênicas crescidas em caldo BHI (Difco, Detroit, Michigan, Estados Unidos) e as bactérias do leite fermentado em caldo MRS (Difco Difco, Detroit, Michigan, Estados Unidos). A partir das amostras reveladoras, 10 µL do cultivo foram adicionados em tubos contendo 3,5 mL de ágar semissólido (0,75% de BactoAgar, Difco, em caldo BHI, Difco ou MRS, Difco). Após a ação do clorofórmio, os tubos com ágar semissólido contendo as bactérias reveladoras foram vertidos nas placas de Petri. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h, sob aerobiose. Por fim, houve a leitura dos halos de inibição com paquímetro digital (Mitutoyo Digimatic Caliper, Mitutoyo Sul Americana Ltda, Suzano, São Paulo, Brasil).

Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos

Para a análise de susceptibilidade aos antimicrobianos *in vitro*, foi utilizado o antibiograma. Este foi realizado em duplicata, com duas repetições para cada amostra, de acordo com o método adaptado de susceptibilidade a antimicrobianos (ANDRADE, 2012). As amostras de BAL foram ativadas em tubos de ensaio com rosca contendo caldo MRS (Difco Difco, Detroit, Michigan, Estados Unidos) incubados a 37 °C, durante 24 h, sob aerobiose. A segunda ativação foi realizada em placas de Petri com ágar MRS (Difco Difco, Detroit, Michigan, Estados Unidos) incubadas sob aerobiose, a 37 °C, durante 24 h. Cada microrganismo ativado foi transferido para um tubo de ensaio com rosca contendo 3,5 mL de solução salina a 0,9%, para se atingir a concentração de 0,5 na escala Mc Farland. Swabs foram mergulhados nos tubos e espalhados em toda extensão de placas de Petri de 14 cm de diâmetro contendo ágar MRS (Difco, Detroit, Michigan, Estados Unidos).

Seis discos contendo antimicrobianos (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) foram distribuídos sobre o ágar MRS (Difco, Detroit, Michigan, Estados Unidos) em cada placa de Petri. Os discos continham os seguintes antibióticos e suas correspondentes concentrações: clindamicina - DA (2 µg), ciprofloxacina - CIP (5 µg), gentamicina - GN (10 µg), penicilina - PEN (10 UI), estreptomicina - EST (30 µg), vancomicina - VA (30 µg). As placas foram incubadas sob aerobiose, durante 24 h, a 37 °C. O controle de qualidade dos discos contendo os antimicrobianos foi realizado utilizando amostra de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella*. Por fim, ocorreu a leitura dos halos de inibição com paquímetro digital (Mitutoyo Digimatic Caliper).

Análise estatística

Os resultados foram avaliados estatisticamente por meio da análise fatorial do tipo 2x3. Realizou-se uma análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5% pelo teste F, quando a diferença entre os tratamentos foi significativa, as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5%. Para a análise estatística utilizou-se no programa estatístico R (2011). As BAL foram classificadas qualitativamente como resistentes, moderadamente sensíveis e sensíveis a antibióticos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos com as análises físico-químicas do leite fermentado adicionado com os *L. rhamnosus* e *L. plantarum*, pôde-se observar que para as análises de proteína e cinzas, estas variáveis não apresentaram diferença estatística (ANOVA, ao nível de 5% de probabilidade) entre os tratamentos (efeito simples) e não houve interação significativa entre os fatores (Tabela 1).

Quanto ao parâmetro proteico, o leite fermentado avaliado está em conformidade com a legislação vigente, que determina um teor mínimo de proteínas láticas de 2,9 g/100g, para leites fermentados (BRASIL, 2007). Leites fermentados elaborados com e sem a adição de probióticos e frutooligossacarídeos (FOS) apresentaram teores de proteínas lácteas entre 4,02 e 4,28 g/100g de, respectivamente, conforme estudo feito por Gallina *et al.,* (2011). Foi verificado em outros estudos que após o período de fermentação e estocagem, o teor de proteína do produto final foi de 3,4 g/100g (DUARTE *et al*., 2016).

Tabela 1. Resultados obtidos nas análises físico-químicas do leite fermentado utilizando os *L. rhamnosus* e *L. plantarum*

Proteína (g/100g)	
Primeiro fator*	Níveis de médias**
L1	3,0683
L2	2,9016
Segundo fator***	Níveis de médias
A8	2,920
B7	3,115
A8B7	2,920
Cinzas (g/100g)	
Primeiro fator	Níveis de médias
L1	0,7016
L2	0,6983
Segundo fator	Níveis de médias
A8	0,730
B7	0,672
A8B7	0,697

Legenda: *Primeiro fator: L1: Leite fermentado (Lote 1); L2: Leite fermentado 2 (Lote 2). **Níveis de médias: Médias da triplicata realizada nos leites fermentados (g/100 g). ***Segundo fator: A8: Amostra contendo *L. rhamnosus* (1%); B7: Amostra contendo *L. plantarum* (1%); A8B7: Amostra contendo *L. rhamnosus + L. plantarum* (0,5% + 0,5%).

Para as análises de acidez avaliadas nos 1º, 14º e 21º dias de armazenamento, verificou-se que não houve diferença entre os tratamentos, e no 7º dia não houve interação entre os fatores, no entanto, houve diferença significativa entre os níveis do fator dois. As análises de pH para os dias

1º, 7º e 14º não apresentaram diferença entre os tratamentos, porém, no 21º dia de armazenamento do leite fermentado, houve diferença significativa apenas entre os níveis do segundo fator, não havendo interação entre os fatores (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados obtidos nas análises de acidez e pH do leite fermentado utilizando os *L. rhamnosus* e *L. plantarum*

Acidez (% de ácido lático/mL)			
1º dia de avaliação		**7º dia de avaliação**	
Primeiro fator*	Níveis de médias**	Primeiro fator	Níveis de médias
L1	1,015	L1	1,113
L2	0,996	L2	1,078
Segundo fator***	Níveis de médias	Segundo fator	Níveis de médias
A8	0,947	A8	1,15ª
B7	1,072	B7	0,99^{b}
A8 + B7	0,997	A8 + B7	1,147^{ab}
14º dia de avaliação		**21º dia de avaliação**	
Primeiro fator	Níveis de médias	Primeiro fator	Níveis de médias
L1	1,316	L1	1,316
L2	1,316	L2	1,316
Segundo fator	Níveis de médias	Segundo fator	Níveis de médias
A8	1,325	A8	1,30
B7	1,250	B7	1,20
A8 + B7	1,375	A8 + B7	1,45
pH			
1º dia de avaliação		**7º dia de avaliação**	
Primeiro fator	Níveis de médias	Primeiro fator	Níveis de médias
L1	4,140A^{a}	L1	4,148
L2	3,935B^{b}	L2	4,271
Segundo fator	Níveis de médias	Segundo fator	Níveis de médias
A8	4,190ª	A8	4,157
B7	4,190^{ab}	B7	4,172
A8 + B7	4,190^{b}	A8 + B7	4,300
14º dia de avaliação		**21º dia de avaliação**	
Primeiro fator	Níveis de médias	Primeiro fator	Níveis de médias
L1	4,111	L1	4,031
L2	4,238	L2	4,125
Segundo fator	Níveis de médias	Segundo fator	Níveis de médias
A8	4,280	A8	4,157ª
B7	4,212	B7	3,970^{b}
A8 + B7	4,032	A8 + B7	4,107^{ab}

Legenda: *Primeiro fator: Duplicata do L1: Leite fermentado (Lote 1). L2: Leite fermentado 2 (Lote 2). **Níveis de médias: Médias da triplicata realizada nos leites fermentados. ***Segundo fator: A8: Amostra contendo *L. rhamnosus* (1%); B7: Amostra contendo *L. plantarum* (1%); A8B7: Amostra contendo *L. rhamnosus + L. plantarum* (0,5% + 0,5%). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de significância.

Em relação ao padrão de acidez, conforme informado no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (BRASIL, 2007), verifica-se que os valores são de 0,6 a 2,0 g de ácido lático/100 g. O leite fermentado elaborado apresentou o valor médio de 1,058 g de ácido lático/100 g, e este valor pode ser de no máximo 2% de ácido lático, de acordo com BRASIL, (2007). Verifica-se que esses valores corroboram com a cultura testada, pois mesma apresenta pós-acidificação lenta, característica desejável para garantir viabilidade dos probióticos no produto durante a estocagem (BRASIL, 2001), além de retardar a perda da qualidade sensorial do leite fermentado quando, em decorrência de uma alta acidez, há o desenvolvimento do sabor azedo do produto. Ao analisarem os leites fermentados comercializados no Brasil, autores observaram acidez titulável de 0,88 a 1,17 g/100g (MEDEIROS *et al.,* 2011). Ao avaliarem amostras de leites fermentados comercializados na cidade de Sete Lagoas – MG, foram encontrados valores médios de acidez entre 1,16 e 1,61 g/100g (CARVALHO *et al.,* 2017). Ainda, em outro estudo, resultados da acidez titulável de leites fermentados apontaram teores entre 1,03 e 1,37 g/100g, (MAGALHÃES; TORRE, 2018) valores estes que corroboram os encontrados no presente trabalho.

Todas as formulações de leite fermentado mantiveram-se com pH médio de 4,1, sendo o maior valor 4,23 e o menor 4,03. Esses valores de pH são mais baixos do que os valores de pH encontrados em iogurtes, o que os tornam bebidas mais ácidas. Entretanto, são valores que não apresentam efeitos prejudiciais sobre a viabilidade das bactérias probióticas (LEE; SALMINEN, 1995). Em um estudo realizado por Coutinho *et al.* (2022), foi encontrado o valor de pH 4,7 ao final da fermentação de bebidas lácteas fermentadas funcionais. Outros estudos avaliaram o pH de leites fermentados elaborados e verificaram a ocorrência de variação de pH inicial dos produtos de 4,42 a 4,37 e final de 4,21 a 4,13 (GALLINA *et al.,* 2011).

Medeiros *et al.*, (2011), ao analisarem os leites fermentados comercializados, verificaram valores médios de pH entre 3,72 e 4,23. No entanto, em outro estudo, Oliveira *et al.*, (2018) encontraram resultados de pH iguais a 3,69 e 3,78. Observa-se que para o processo de fermentação do leite, a temperatura de fermentação pode variar de 37-45 °C, e o pH final entre 4,5-4,6, na produção de iogurtes, leites fermentados e bebidas lácteas fermentadas (MOKOONLALL *et al.,* 2016).

Em relação ao antagonismo, as bactérias de *Lactobacillus* apresentaram atividade contra bactérias reveladoras, concomitante a outros estudos (ANDRADE, 2012). A média dos halos das BAL contra as reveladoras foram de 19,87 e 21,34 para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus,* respectivamente. Esses resultados mostram o possível potencial de utilização desses *Lactobacillus* spp. para minimizar ou controlar problemas causados por bactérias patogênicas, visando melhorar a qualidade sanitária do produto (ANDRADE, 2012).

Conforme legislação vigente, a contagem de bactérias láticas presentes no produto pronto para consumo deve ser de, no mínimo, 10^6 UFC/g (BRASIL, 2007). Os leites fermentados elaborados apresentaram-se dentro dos padrões estabelecidos ($1,87x10^9$ UFC/g) para todas as formulações durante toda a vida de prateleira. Em avaliação realizada por Gallina *et al.* (2011), leites fermentados que continham probióticos (sem a adição de FOS) e leites fermentados contendo bifidobactérias (com FOS) mantiveram-se com a contagem probiótica constante (10^6 UFG.g^{-1}) durante os 28 dias de estocagem. Ao trabalharem com leite fermentado de BAL isoladas de queijos artesanais brasileiros, Mendes *et al.* (2014) verificaram contagens adequadas das bactérias láticas, com valores superiores a 10^6 UFC/g durante toda a estocagem.

Em estudos realizados por Barreto *et al*., (2003) e Urnau *et al*., (2012), foi verificada boa viabilidade das bactérias lácticas em leites fermentados no final do prazo de validade de 60 dias. Estes autores observaram a presença de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, com contagens superiores a 10^7 UFC/mL nos leites fermentados comerciais.

Em outro estudo, Castilho *et al*., (2013) observaram que 32% dos lotes de leites fermentados não apresentaram contagens de bactérias láticas superiores a $1x10^6$ UFC/mL, ou seja, as amostras foram classificadas fora dos padrões estabelecidos pela legislação vigente*.,* . Sendo assim, observa-se que os resultados encontrados no presente estudo foram satisfatórios, pois os parâmetros observados durante a estocagem do leite fermentado não foram prejudiciais à viabilidade das bactérias probióticas testadas.

Os resultados referentes aos antibiogramas dos *L. rhamnosus* e *L. plantarum* isolados do queijo minas artesanal estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos da amostra dos *L. rhamnosus* e *L. plantarum* isolados de queijo minas artesanal do Norte de Minas Gerais

Amostra	Antimicrobiano					
	DA	CIP	GN	PEN	EST	VA
L. rhamnosus e *L. plantarum*	S	MS	R	S	R	S

Legenda: DA (clindamicina – 2 µg), CIP (ciprofloxacina – 5 µg), GN (gentamicina – 10 µg), PEN (penicilina - 10UI), EST (estreptomicina – 30 µg), VA (vancomicina – 30 µg). R = resistente; MS = moderadamente sensível; S = sensível.

Os *L. rhamnosus* e *L. plantarum* apresentaram sensibilidade a três dos seis antibióticos testados, apresentando sensibilidade moderada a ciprofloxacina e resistência a gentamicina e estreptomicina de acordo com a metodologia descrita por Charteris *et al*. (1998). Para as 12 amostras de bactérias ácido láticas, estudadas por Costa *et al.* (2013), todas foram sensíveis à clindamicina, eritromicina e tetraciclina; quanto a gentamicina e estreptomicina, 91,66% das amostras foi resistente à estreptomicina, e 41,67% à gentamicina. Com relação ao antimicrobiano ciprofloxacina, observou-se uma taxa elevada de resistência em 75% das amostras, resultados estes que corroboram os encontrados no presente estudo.

A resistência à vancomicina foi verificada em 100% das amostras de *Lactobacillus* e *Weissella*, conforme os estudos realizados por Costa *et al., (*2013); resultados estes que diferem do presente estudo, bem como 33% das amostras de bactérias ácidoláticas foram resistentes à penicilina, porém, no estudo foi constatado sensibilidade dos *L. rhamnosus* e *L. plantarum*.

CONCLUSÃO

A fermentação do leite pelas bactérias *L. rhamnosus* e *L. plantarum* atingiu o pH 4,1 em todas as formulações o que é indicativo de bebida segura para consumo e a composição do produto atendeu à legislação vigente. Tanto *L. rhamnosus* quanto *L. plantarum* apresentaram sensibilidade a três dos seis antibióticos testados, apresentando sensibilidade moderada a ciprofloxacina, e resistência à gentamicina e estreptomicina. A contagem de BAL foi realizada no produto final, sendo constatado o potencial probiótico do leite fermentado elaborado.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, T. M. R. *et al. In vitro* characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing by-products as potential probiotics. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 10, n. 4, p. 704-716, 2018. DOI: 10.1007/s12602-017-9318-2

ANDRADE, H. H. **Genotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* isolados de mastites subclínicas bovinas no Distrito Federal e Entorno**.

2012. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

BARRETO, G. P. M. *et al.* Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 1, p. 119-126, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade de leites fermentados. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 205, p. 4, 24 out. 2007.

BRASIL. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Resolução nº 05, de 13 de novembro de 2000. Oficializar os "Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados". **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, n. 1, p. 19-21, 02 jan. 2001.

CARVALHO, P. T. *et al.* Análises de bactérias ácidos láticas, de pH, e acidez em amostras de leite fermentados comercializados no município de Sete Lagoas – MG. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 8, n. 3, p. 12-21, 2017. DOI: 10.3895/rebrapa.v8n3.3989.

CASTILHO, N. P. A.; CUNHA, A. F.; ARAÚJO, M. M. P. Qualidade de leites fermentados brasileiros e atividade antagonista *in vitro* de suas bactérias ácido-láticas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 207-214, 2013. DOI: 10.5380/cep.v31i2.34843.

CHARTERIS, W. P. *et al*. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **Jounal Food Protection**, v. 61, n. 12, p. 1636-1643, 1998. DOI: 10.4315/0362-028x-61.12.1636

COLLARD, K. M.; McCORMICK, D. P. A nutritional comparison of cow's milk and alternative milk products. **Academic Pediatrics**, v. 21, n. 6, p. 1067-1069, 2021. DOI: 10.1016/j.acap.2020.12.007

COSTA, H. H. S. *et al.* Potencial probiótico *in vitro* de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo de Minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1858-1866, 2013. DOI: 10.1590/S0102-09352013000600038

COUTINHO, G. A. *et al*. Desenvolvimento e caracterização microbiológica e físico-química de bebida láctea probiótica, fonte de proteína. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 76, n. 2, p. 94-106, 2022. DOI: 10.14295/2238-6416.v76i2.847

D'ANGELIS, D. F. *et al.* Elaboration, physical-chemical and sensorial characterization of fermented kefir milk flavored with green fruits and added with inulin. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, e246997179, 2020. DOI: 10.33448/rsd-v9i9.7179

DAS, D.; GOYAL, A. Antioxidant activity and γ-aminobutyric acid (GABA) producing ability of probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5 isolated from marcha of sikkim. **Food Science and Technology**, v. 61, n. 1, p. 263-268, 2015. DOI: 10.1016/j.lwt.2014.11.013

DEHGHANI, N.; TAFVIZ, I. F.; JAFARI, P. Cell cycle arrest and anti-cancer potential of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* against HT-29 cancer cells. **Bioimpacts**, v. 11, n. 4, p. 245-252, 2021. DOI: 10.34172/bi.2021.32

DING, W. *et al.* Screening for lactic acid bacteria in traditional fermented Tibetan yak milk and evaluating their probiotic and cholesterol-lowering potentials in rats fed a high-cholesterol diet. **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 324-332, 2017. DOI: 10.1016/j.jff.2017.03.021

DUARTE, M. C. K. H. *et al.* Ação antagonista de *Lactobacillus acidophilus* frente a estirpes patogênicas inoculadas em leite fermentado. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2016. DOI: 10.18067/jbfs.v3i1.79

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations; WHO – World Health Organization. **Probiotics in food:** health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Rome, 2006. 50p.

FERREIRA, C. L. L. F. **Acidez em leite e produtos lácteos**. Viçosa: Editora UFV. 1981. 75p.

GALLINA, D. A. *et al.* Caracterização de leites fermentados com e sem adição de probióticos e prebióticos e avaliação da viabilidade de bactérias láticas e probióticas durante a vida de prateleira. **UNOPAR Científica**. Ciências Biológicas e da Saúde, v. 13, n. 4, p. 239-244, 2011. DOI: 10.17921/2447-8938.2011v13n4p%25p

GARCIA, E. F. e*t al.* Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1371, p. 1-11, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01371

GUO, L. *et al.* Effect of bile salt hydrolase-active *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0344 on cholesterol metabolism in rats fed a high-cholesterol diet. **Journal of Functional Foods**, v. 61, e 103497, 2019. DOI: 10.1016/j.jff.2019.103497

HUANG, Y. *et al. Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotic cultures with cholesterol-lowering activity. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 2746-2753, 2013. DOI: 10.3168/jds.2012-6123

LEE, Y. K.; SALMINEN S. The coming of age of probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 7, p. 241-245, 1995. DOI: 10.1016/S0924-2244(00)89085-8

LIU, Y. *et al*. Effect of bile salt hydrolase-active *Lactobacillus plantarum* Y15 on high cholesterol diet induced hypercholesterolemic mice, CyTA. **Journal of Food**, v. 19, n. 1, p. 408-417, 2021. DOI: 10.1080/19476337.2021.1914176

MAESTRI, B. *et al.* Avaliação do impacto da adição de inulina e de maçã em leite fermentado probiótico concentrado. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 1, p. 58-66, 2014. DOI: 10.1590/bjft.2014.009

MAGALHÃES, A. U.; TORRE, A. C. G. D. Composição química e análise sensorial do iogurte grego comercializado no sul do estado de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 73, n. 1, p. 10-18, 2018. DOI: 10.14295/2238-6416.v73i1.607

MARKOWIAK, P.; ŚLIŻEWSKA, K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 1-30, 2017. DOI: 10.3390/nu9091021

MARTÍN, R. *et al*. The potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 strain protects the intestinal barrier by stimulating both mucus production and cytoprotective response. **Scientific Reports**, v. 9, n. 5398, p. 1-14, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-41738-5

MEDEIROS, E. J. L. *et al.* Leite fermentado de marcas comerciais: Estudo da aceitação e correlação com pH e acidez. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 381, p. 46-51, 2011.

MENDES, D. P. G. *et al.* Quality of fermented milks produced with *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus fermentum* isolated from artisanal cheeses. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 66, n. 4, p. 1291-1295, 2014. DOI: 10.1590/1678-6832

MOKOONLALL, A.; NOBEL, S.; HINRICHS, J. Post-processing of fermented milk to stirred products: Reviewing the effects on gel structure. **Trends in Food Science & Technology**, v. 54, n. 1, p. 26-36, 2016. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.05.012

MOURA, L. C. *et al.* Influence of refrigeration and cassava starch biofilm use on enzymatic browning in mangaba fruit (*Hancornia speciosa*). **Científica**, v. 44, n. 2, p. 131-137, 2016. DOI: 10.15361/1984-5529.2016v44n2p131-137

NAMI, Y. *et al.* Assessment of probiotic potential and anticancer activity of newly isolated vaginal bacterium *Lactobacillus plantarum* 5BL. **Microbiology and Immunology**, v. 58, n. 9, p. 492-502, 2014. DOI: 10.1111/1348-0421.12175

NIMGAMPALLE, M.; KUNA, Y. Anti-alzheimer properties of probiotic, *Lactobacillus plantarum* MTCC 1325 in alzheimer's disease induced albino rats. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 11, n. 8, p. 1-5, 2017. DOI: 10.7860/JCDR/2017/26106.10428

NITHYA, V.; HALAMI, P. 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. DOI: 10.1007/s13213-012-0453-4

O'BRYAN, C. A. *et al.* The role of prebiotics and probiotics in human health. **Journal of Probiotics & Health**, v. 1, n. 2, p. 1-8, 2013. DOI: 10.4172/2329-8901.1000108

OH, N. S. *et al.,* Probiotic and anti-inflammatory potential of *Lactobacillus rhamnosus* 4B15 and *Lactobacillus gasseri* 4M13 isolated from infant feces. **Plos One**, v. 13, n. 2, p. 1-15, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0192021

OLIVEIRA, C. D. *et al.* Avaliação físico-química de leites fermentados comercializados em Diamantina – MG. **Brazilian Applied Science Review**, v. 3, n. 1, p. 343-348, 2019. DOI: 10.34115/basr.v3i1.771

PAPIZADEH, M. *et al. Lactobacillus rhamnosus* Gorbach-Goldin (GG): A top well-researched probiotic strain. **Journal of Medical Bacteriology**, v. 5, n. 5-6, p. 46-59, 2016.

PEREIRA, D. B. C. *at al.* C. **Físico-química do leite e derivados – Métodos analíticos**. 1. ed. Juiz de Fora: Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda., 2001. 134p.

PINTO, A. *et al.* Triagem de bactérias ácido lácticas bacteriocinógenas e sua caracterização como potenciais probióticos. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 393, 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8030393

RAJOKA, M. S. R. *et al.* Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk. **LWT**, v. 84, p. 271-280, 2017. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.05.055

RICHARDS, N. S. P. S.; KINDLEIN, L.; BRACCINI, V. P. Kefir é um leite fermentado com potencial probiótico?. *In*: VERRUCK, S. **Avanços em ciência e tecnologia de alimentos**. Guarujá: Editora Científica Digital, 2022. p. 275-294

RODRIGUES, N. P. A.; GARCIA, E. F.; SOUZA, E. L. Selection of lactic acid bacteria with promising probiotic aptitudes from fruit and ability to survive in different food matrices. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 2257-2269, 2021. DOI: 10.1007/s42770-021-00543-x

RODRIGUES, T. H. G. *et al*. Elaboração e caracterização de leite de búfala fermentado com abacaxi em calda. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 75, n. 3, p. 142-155, 2020. DOI: 10.14295/2238-6416.v75i3.779

SEDDIK, H. A. *et al*. *Lactobacillus plantarum* and its probiotic and food potentialities. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 9, n. 2, p. 111-122, 2017. DOI: 10.1007/s12602-017-9264-z

SILVA, V. S.; ORLANDELLI, R. C. Desenvolvimento de alimentos funcionais nos últimos anos: Uma revisão. **Revista Uningá**, v. 56, n. 2, p. 182-194, 2019. DOI: 10.46311/2318-0579.56.eUJ1110

SORNSENEE, P. *et al.* Probiotic properties of *Lactobacillus* species isolated from fermented palm sap in Thailand. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 13, n. 4, p. 957-969, 2021. DOI: 10.1007/s12602-021-09754-y

STEVENSON, C. *et al.* Randomized clinical trial: Effect of *Lactobacillus plantarum* 299V on symptoms of irritable bowel syndrome. **Nutrition**, v. 30, n. 10, p. 1151-1157, 2014. DOI: 10.1016/j.nut.2014.02.010

URNAU, D. *et al.* Isolamento, identificação e caracterização quanto à resistência ao pH ácido e presença de sais biliares de cepas probióticas de leites fermentados comerciais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 384, p. 5-10, 2012. DOI: 10.5935/2238-6416.20120002

WANG J. *et al.* Probiotic *Lactobacillus plantarum* promotes intestinal barrier function by strengthening the epithelium and modulating gut microbiota. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1953, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01953

WESTERIK, N. *et al.* The probiotic *Lactobacillus rhamnosus* for alleviation of *Helicobacter pylori* associated gastric pathology in east Africa. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1873, p. 1-13, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01873

YANG, S. J. *et al.* Antioxidant and immune-enhancing effects of probiotic *Lactobacillus plantarum* 200655 isolated from kimchi. **Food Science and Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 491-499, 2019. DOI: 10.1007/s10068-018-0473-3

YOUNIS, K.; AHMAD, S.; JAHAN, K. Health benefits and application of prebiotics in foods. **Journal of Food Processing & Technology**, v. 6, n. 4, p. 1-7, 2015. DOI: 10.4172/2157-7110.1000433

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (coord.). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed., 1. ed. digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020p. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf Acesso em: 26 jul. 2022.