

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

CYNTHIA COSTA SILVA

**AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA *in vitro* DE *Lactococcus lactis* QMF 11 EM
PRESENÇA DE SAIS BILIARES COMO CRITÉRIO DE ATIVIDADE PROBIÓTICA.**

GOIÂNIA
2020



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE
GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC nº 1204/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG):

Nome completo do autor: Cynthia Costa Silva

Título do trabalho: Avaliação da sobrevivência *in vitro* de *Lactococcus lactis* QMF 11 em presença de sais biliares como critério de atividade probiótica.

2. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF do TCCG.

Cynthia Costa Silva
(Assinatura do autor)²

Ciente e de acordo:

Jurgina Farias Alves
(Assinatura do orientador)²

Data: 21 / 08 / 2020

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento. imagens coladas não serão aceitas.

CYNTHIA COSTA SILVA

**AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA *in vitro* DE *Lactococcus lactis* QMF 11 EM
PRESENÇA DE SAIS BILIARES COMO CRITÉRIO DE ATIVIDADE PROBIÓTICA.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Virgínia Farias Alves

GOIÂNIA

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Costa Silva, Cynthia

Avaliação da sobrevivência in vitro de *Lactococcus lactis* QMF 11 em presença de sais biliares como critério de atividade probiótica [manuscrito] / Cynthia Costa Silva. - 2020.
xxxiii, f.

Orientador: Profa. Dra. Virgínia Farias Alves.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Farmácia, Goiânia, 2020.

Bibliografia.

Inclui gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Bactérias ácido lácticas. 2. *Lactococcus lactis*. 3. probiótico. 4. sais biliares. I. Farias Alves, Virgínia, orient. II. Título.

CDU 615.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

CYNTHIA COSTA SILVA

**AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA *in vitro* DE *Lactococcus lactis* QMF 11 EM
PRESENÇA DE SAIS BILIARES COMO CRITÉRIO DE ATIVIDADE
PROBIÓTICA.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
para a obtenção de grau de Bacharel em
Farmácia à Faculdade de Farmácia da
Universidade Federal de Goiás


Orientadora: Prof.^a Dr.^a Virgínia Farias Alves

Aprovado em: 21 de Agosto de 2020.

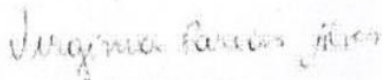
BANCA EXAMINADORA



Dr.^a Marita Cíthenez Pereira
Universidade de São Paulo



Ma. Ana Carolina Cabral Carvalhaes Costa
Ministério da Agricultura



Prof.^a Dr.^a Virgínia Farias Alves
Universidade Federal de Goiás

*Dedico
A Deus
Aos meus pais
Selmy e Valdivin*

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da minha vida, pela oportunidade de finalizar esse projeto, por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo do caminho.

A meus pais, obrigada por tanto amor, por me proporcionarem tudo aquilo que não lhes foram proporcionado. A toda minha família pela compreensão das ausências, e por todas as palavras de incentivo.

À Professora Dra. Virgínia Farias Alves, por ter me recebido em seu laboratório no início da minha caminhada acadêmica e ter me ensinado tanto até aqui. Muito obrigada por ser exigente, pelo seu profissionalismo, respeito e preocupação. Obrigada por ter me aceitado e confiado em mim. Insistiria para a senhora me orientar mil vezes, se preciso fosse. A senhora é inspiração.

À Layena Lindsay, por estar sempre presente mesmo com as suas tarefas e obrigações, agradeço por toda ajuda. Obrigada por me mostrar que o esforço rompe barreiras.

Aos colegas de pesquisa do Laboratório de Microbiologia de Medicamentos e Alimentos da Faculdade de Farmácia, em especial a Rafaella Caroliny, por ter compartilhado tantos momentos comigo, não poderia deixar de agradecer.

Aos professores e colaboradores da Faculdade de Farmácia, em especial a Prof. Joana D'arc e ao Gilvan, por serem tão prestativos e bem humorados.

A Ma. Rayssa Dias, obrigada por toda ajuda oferecida, por cada socorro prestado, sua ajuda foi muito importante para realização desse projeto. Obrigada por toda sua gentileza.

À Professora Dra. Ieda Sapateiro, a orientação e o auxílio prestado quando precisei.

Ao prof. Dr. Eduardo Ramirez Asquieri, por abrir as portas do seu laboratório, pelos materiais e equipamentos emprestados. Obrigada por permitir a realização desse projeto tão desejado.

RESUMO

As bactérias ácido lácticas (BAL) têm sido amplamente estudadas devido ao seu potencial probiótico. Um dos critérios para a seleção de culturas probióticas para uso humano é a resistência às condições hostis encontradas durante o trânsito pelo trato gastrointestinal (TGI). De modo a atingir seu sítio de ação, o intestino grosso, em números adequados para exercer seu efeito benéfico. Uma importante barreira biológica no TGI são os sais biliares presentes na porção inicial do intestino, devido à sua capacidade de desorganizar a estrutura da membrana celular e causar danos ao material genético de micro-organismos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevivência de *Lactococcus lactis* QMF 11, uma cepa bacteriocinogênica proveniente de produto lácteo, frente a sais biliares como indicativo inicial de atividade probiótica. Para tanto, *L. lactis* QMF 11 foi cultivada em caldo MRS, com pH ajustado para 8,0 em presença de 0,3% e 0,5% (p/v) de sais biliares. Determinação das populações microbianas foi feita nos tempos zero, 90 e 180 min. Os resultados obtidos indicaram que *L. lactis* QMF 11 permaneceu viável por todo o ensaio, em números superiores a 7,58 Log UFC/g, com uma taxa de sobrevivência ao final do estudo de 100,6 e 88%, respectivamente, em presença de 0,3 e 0,5% de sais biliares. Esses resultados sugerem que *Lactococcus lactis* QMF 11 possa ser um micro-organismo promissor como cultura probiótica.

Palavras chave: Bactérias ácido lácticas; *Lactococcus lactis*; probiótico; sais biliares.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) have been extensively studied due to their probiotic potential. One important criteria for selecting probiotic cultures for human use is resistance to the harsh environmental conditions encountered during transit through the gastrointestinal tract (GIT). In order to reach their site of action, the large intestine, in adequate numbers to exert the probiotic effect. An important biological barrier in GIT are the bile salts present in the small intestine, as bile salts have the ability of disorganizing the cell membrane structure, thus causing damage to the genetic material of microorganisms. The objective of this work was to evaluate the survival of *Lactococcus lactis* QMF 11, a bacteriocinogenic strain derived from a dairy product, against bile salts as an initial indicator of probiotic activity. For that, *L. lactis* QMF 11 was grown in MRS broth in pH 8,0 in the presence of 0,3% and 0,5% (w/v) of bile salts. Colony counts were performed at times zero, 90 and 180 min. The results indicated that *L. lactis* QMF 11 remained viable throughout the trial, in numbers greater than 7.58 Log CFU/g, with a survival rate at the end of the study of 100 and 88%, respectively, in the presence of 0,3 and 0,5% bile salts. These results suggest that *L. lactis* QMF 11 may be a promising microorganism for use as a probiotic culture.

Key words: Lactic acid bacteria; *Lactococcus lactis*; probiotic; bile salts.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Morfologia de *Lactococcus lactis* QMF 11, exibindo cocos e diplococos Gram-positivos.....20
- Figura 2:** Médias das populações de *Lactococcus lactis* QMF 11 (Log UFC/g) após exposição a sais biliares em caldo de cultura com pH 8.0.....21
- Figura 3:** Valores médios de pH do caldo bacteriano de *Lactococcus lactis* QMF 11 durante ensaio de exposição a sais biliares.....22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Médias das populações e sobrevivência de *Lactococcus lactis* QMF 11 (Log UFC/g) após exposição a sais biliares em caldo de cultura com pH 8,0.....21

Tabela 2: Valores médios de pH do caldo bacteriano de *Lactococcus lactis* QMF 11 durante ensaio de exposição a sais biliares.....22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 PROBIÓTICOS	12
2.2 BÁCTERIAS ÁCIDO LÁTICAS	13
2.2.1 <i>Lactococcus sp</i>	14
2.3 TRATO GASTROINTESTINAL	15
3 OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
4 MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 MICRO-ORGANISMO	19
4.2 RESISTÊNCIA AOS SAIS BILIARES	19
5 RESULTADOS	20
6 DISCUSSÃO	23
7 CONCLUSÕES	26
8 REFERÊNCIAS	27

1. INTRODUÇÃO

As bactérias ácido lácticas (BAL) são micro-organismos capazes de produzir ácido láctico como principal ou único produto resultante da fermentação de carboidratos (JENSEN et al., 2012). São bactérias Gram-positivas, não móveis, não formadoras de esporos, catalase negativas, resistem bem a ambientes ácidos e com concentrações relativamente altas de cloreto de sódio (POFFO & SILVA, 2011). Dentre os principais gêneros de BAL temos: *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* (FIJAN, 2014). Esses micro-organismos fazem parte da microbiota natural de diversos alimentos e possuem *status* GRAS - *Generally Recognized As Safe*/Geralmente Reconhecido Como Seguro, sendo consideradas seguras para consumo humano (GUO et al., 2017). Devido às suas atividades metabólicas, as BAL são muito importantes para a indústria de alimentos, uma vez que são capazes de conferir atributos sensoriais desejáveis em produtos fermentados, além de atuarem como culturas bioprotetoras, protegendo e inibindo de forma natural a deterioração e contaminação nociva dos alimentos (AKBAR et al., 2016). Além disso, as BAL têm sido cada vez mais estudadas devido às suas atividades probióticas (KAUR et al., 2017).

Probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2006). Seus benefícios estão relacionados com a promoção e manutenção da saúde intestinal, além de contribuir para a diminuição de alergias, estímulo da imunidade, além de contribuir na produção de vitaminas e o favorecimento da absorção de minerais (PAMER, 2016; SUEZ et al., 2019; GUARINO et al., 2015; DOMINGO, 2017).

Para alcançar seu sítio de ação em números adequados, os probióticos intestinais devem lidar com desafios específicos de estresse em todo trato gastrointestinal (TGI), como os sistemas de defesa associados a secreções. Dessa forma, para serem bem sucedidos como probióticos, se faz necessário verificar se as culturas candidatas são capazes de suportar a ação dos sais biliares, que podem lesionar membranas celulares e causar danos ao material genético dos micro-organismos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROBIÓTICOS

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (WHO) (FAO/WHO, 2006) definem probióticos como: “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”. Dentre os benefícios atribuídos ao consumo de micro-organismos probióticos, podemos citar: promoção e manutenção da saúde intestinal através da redução da colonização e invasão por patógenos e restabelecimento do equilíbrio da microbiota intestinal após tratamento com antibióticos, prevenção e tratamento de diarreia infecciosa e síndrome do colón irritável, contribuintes para a diminuição de alergias, estímulo da imunidade, produção de vitaminas e o favorecimento da absorção de minerais (OUWEHAND et al., 2016; PAMER, 2016; SUEZ et al., 2019; GUARINO et al., 2015; DOMINGO, 2017). Embora não exista consenso entre a comunidade científica internacional sobre doses probióticas eficazes para obter benefícios, os resultados de pesquisas indicam doses entre 10^6 e 10^7 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama (g) de alimento, podendo atingir 10^8 a 10^9 UFC, por consumo diário de 100 g (JAYAMANNE & ADAMS, 2006; PINTO et al., 2017, GOMES DA CRUZ et al., 2009).

Os benefícios dos probióticos não se limitam apenas ao ambiente intestinal. Pesquisas emergentes sugerem uma gama de aplicações como no tratamento tópico de infecções recorrentes nas vias aéreas superiores, tratamento de distúrbios urogenitais femininos, redução do desenvolvimento de cárie dentária e infecção periodontal, prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares e obesidade em crianças e adolescentes (CERVIN, 2018; LAUE et al., 2018; LIN et al., 2017; JONES et al., 2018).

Apesar do mecanismo de ação dos probióticos não ser totalmente esclarecido, acredita-se que esteja relacionado com a produção de compostos com atividade antimicrobiana, competição por nutrientes e por sítios de adesão, alteração na atividade enzimática e estímulo da imunidade do hospedeiro (SAAD, 2006; BERMUDEZ-BRITO et al., 2012; HALLORAN & UNDERWOOD, 2019).

O mercado global de probióticos tem crescido cada vez mais nos últimos anos motivado pela busca dos consumidores por dietas saudáveis e bem-estar (ESPITIA

et al., 2016). Para serem consideradas probióticos intestinais, além de atribuir benefícios à saúde do hospedeiro, as cepas microbianas devem possuir algumas características tais como: ser de origem humana e não patogênica, ser tolerante às condições adversas do trato gastrointestinal (TGI), principalmente acidez do estômago e presença de sais biliares no intestino e ser capaz de colonizar, ao menos temporariamente, o TGI humano (SINGH et al., 2011; LEE et al., 1999).

As BAL, uma vez que estão naturalmente presentes no TGI humano saudável, têm sido bastante utilizadas como culturas probióticas. Na atualidade, uma diversidade de cepas de BAL já são comercializadas sob forma de cápsulas ou pós e como ingredientes alimentares adicionados a diversos produtos de origem láctea (KAUR et al., 2017; PAVLOVIĆ et al., 2012).

2.2 BÁCTERIAS ÁCIDO LÁTICAS

As bactérias ácido lácticas (BAL) compreendem um grupo de micro-organismos com características morfológicas, metabólicas e fisiológicas semelhantes. Recebem esse nome por serem produtoras de ácido láctico no processo homofermentativo ou heterofermentativo da glicose (BURGAIN et al., 2014). Estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas no solo, água, plantas, animais e principalmente nos alimentos (CARR et al., 2002). Podem apresentar a forma de bacilos ou cocos, estar organizados em cadeia ou individualmente, são Gram-positivas, não móveis, não formadoras de esporos, catalase negativas, resistentes a ambientes ácidos e a concentrações consideradas altas de cloreto de sódio (POFFO & SILVA, 2011). Dentre os gêneros de BAL mais conhecidos temos: *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* (FIJAN, 2014). As BAL apresentam *status* GRAS - *Generally Recognized As Safe*/Geralmente Reconhecido Como Seguro e são importantes para a indústria de alimentos como culturas iniciadoras em produtos fermentados (GIRAFFA, 2012; GUO et al., 2017). Além de se destacarem por serem capazes de conferir atributos sensoriais desejáveis, são também capazes de inibir micro-organismos indesejáveis (deteriorantes e patógenos), atuando como culturas bioprotetoras capazes de aumentar a vida de prateleira e a segurança microbiológica dos produtos (BEGLEY et al., 2006; MARTÍN et al., 2015; BINTSIS, 2018).

Diversas linhagens de BAL têm ganhado destaque para utilização como probióticos devido à sua capacidade de tolerar o stress do TGI além de serem capazes de aderir e colonizar o TGI, o que dificulta a adesão e invasão por patógenos, produzem substâncias antimicrobianas como as bacteriocinas, são capazes de estimular ação imune no hospedeiro e influenciar as atividades metabólicas tais como a produção de vitaminas e degradação de gorduras (SHEKH et al., 2016; TULINI et al., 2013).

As BAL probióticas são adicionadas principalmente em alimentos fermentados de origem láctea, pois os consumidores estão familiarizados com o fato de os alimentos lácteos conterem micro-organismos vivos, e quando usadas como cultura *starter* combinam as ações positivas das culturas de fermentação e probióticas (HELLER, 2001; ŞANLIER et al., 2017). No entanto, a alergia e intolerância à lactose apresentam um contratempo para adesão ao consumo de laticínios probióticos, motivo do crescente número de estudos envolvendo novas matrizes não lácteas transportadoras de probióticos como os sucos de frutas, bebidas à base de cereais como o milho e sorgo; bebidas à base de vegetais e legumes como beterraba e cenoura, sobremesas congeladas; barra de cereais; produtos cárneos enlatados e embutidos (NGUYEN et al., 2020; VIJAYA et al., 2015; PEREIRA et al., 2019; NAZZARO et al., 2008; MATIAS et al., 2016; BLAIOTTA et al., 2017).

2.2.1 *Lactococcus* sp

Lactococcus é um gênero conhecido de BAL, com morfologia de coco ou ovoide, aos pares ou em cadeias curtas, anaeróbicas facultativas, mesofílicas capazes de sobreviver a uma temperatura 10 °C, mas não a 45 °C, capaz de tolerar amplas faixas de pH, tendo 6,5 a 6,9 como pH ideal de crescimento (BUYUKYORUK et al., 2010; SANCHEZ et al., 2007).

Entre as espécies conhecidas de lactococos, *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) se destaca por ter sido a primeira bactéria láctea com genoma completamente sequenciado. Essa espécie é comumente encontrada em queijos frescos que não sofrem cozimento da massa, como é o caso do queijo Minas frescal (BOLOTIN et al., 2001).

Reconhecidas como “GRAS”, cepas de *L. lactis* são utilizadas na indústria de alimentos como culturas *starters*. Seus metabólitos e enzimas contribuem para

realçar aromas e sabores, além de sua atividade bioprotetora frente a deteriorantes e patógenos, relacionada à diminuição de pH devido à produção de ácido láctico, e a produção de bacteriocinas, como a nisina, que possui efeito bactericida/bacteriostático sobre micro-organismos patogênicos de interesse alimentar como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* (SONG et al., 2017; GHANBARI et al., 2013). *L. lactis* também tem sido estudado devido às suas aplicações biotecnológicas, como em engenharia genética para a produção de modelos de vacina para entrega de antígenos ou moléculas bioativas (RAHA et al., 2005; SONG et al., 2019).

Algumas cepas de *L. lactis* apresentam capacidade de tolerar o ambiente gastrointestinal *in vitro*, e seu uso tem sido sugerido para o desenvolvimento de alimentos funcionais probióticos (KONDROTIENE et al., 2020)

2.3 TRATO GASTROINTESTINAL

O trato gastrointestinal (TGI) é colonizado após o nascimento e contém transitoriamente uma coleção de micro-organismos envolvidos em múltiplas interações que afetam a saúde do hospedeiro durante toda sua vida (MILANI et al., 2017). A microbiota intestinal humana é composta por aproximadamente 10^{14} bactérias pertencentes a cerca de 1.000 espécies bacterianas distintas (LANDMAN & QUÉVRAIN, 2016).

Evidências recentes mostram que a microbiota intestinal interage com o hospedeiro de forma simbiótica, através da modulação da permeabilidade intestinal, da resposta imune da mucosa, sintetizando vitaminas, enzimas e proteínas usadas pelo hospedeiro, fermentando substratos energéticos e melhorando a resistência a patógenos (HOMAYOUNI-RAD et al., 2016; WAGNER et al., 2018).

O desequilíbrio da microbiota intestinal é chamado de disbiose intestinal. Nessa situação ocorre predomínio das bactérias patogênicas sobre as bactérias benéficas no TGI (TOMASELLO et al., 2016). A disbiose intestinal pode ser desencadeada por diversos fatores como a idade, dieta, uso de antibióticos, anti-inflamatórios, estresse psicológico e físico, consumo de álcool e uso de laxantes em excesso (HAWRELAK & MYERS, 2004; CHAN et al., 2013). Uma saída para reverter a disbiose intestinal é aumentar o número de micro-organismos promotores da

saúde, através da introdução de probióticos pela alimentação, os quais contribuirão para modificação seletiva da composição da microbiota intestinal (SAAD, 2006).

Após a ingestão oral as bactérias probióticas encontram diversos sistemas de defesa humana associados a secreções, até chegarem ao intestino grosso, onde encontram condições favoráveis para sua proliferação devido à ausência de secreções e abundância de suprimentos nutricionais no seu sítio de ação devem estar presentes em concentração média de 10^7 UFC/g do conteúdo intestinal (SAAD, 2006; STEFE et al., 2008). Entre os sistemas de defesa temos o suco gástrico no estômago e os sais biliares, principais componentes do suco biliar, ou bile, presente na porção superior intestinal (SAAD, 2006; TERPOU et al., 2019). Em condições fisiológicas normais, o ambiente do TGI tende a ser semelhante de um indivíduo para outro. No estado de jejum, o pH no estômago é de aproximadamente 2, durante a ingestão da refeição o pH aumenta dependendo da capacidade tampão da refeição e sofre ação de secreções (LANDMAN & QUÉVRAIN, 2016). O estômago é esvaziado gradualmente, e o quimo segue para o duodeno, onde o conteúdo é neutralizado com bicarbonato e misturado com bile e suco pancreático, com um pH em torno de 6,5, chegando a 8,0 no íleo distal. Esse ciclo digestivo dura em média três horas (MINEKUS et al., 2014; FUCHS & DRESSMAN, 2014).

Dado que o fígado secreta até um litro de bile no trato intestinal a cada dia, a exposição à bile representa um sério desafio para os micro-organismos em trânsito pelo TGI (BEGLEY et al., 2005). A bile é um fluido alcalino de pH 8,0, sintetizada no fígado a partir do colesterol e conjugado com os aminoácidos glicina ou taurina. Em sua composição também contém colesterol, fosfolípidios como a fosfatidilcolina e o pigmento biliverdina responsável pela sua coloração verde amarelada (LEBEER et al., 2008; BEGLEY et al., 2005). A bile é armazenada na vesícula biliar, fluindo para o duodeno durante a digestão, facilitando a solubilização e absorção das gorduras alimentares (LI & CHIANG, 2014, RUSSELL, 2003).

Os sais biliares são os componentes majoritários da bile e são substâncias biológicas semelhantes a detergentes, com considerável atividade antimicrobiana, sendo capazes de desorganizar a estrutura da membrana celular e causar danos ao material genético microbiano (LI & CHIANG, 2014). A concentração de sais biliares no intestino humano pode variar de acordo com a dieta, sendo a concentração média de 0,3%, podendo alcançar 0,5% de conteúdo duodenal (BEGLEY et al., 2006; PFEILER & KLAENHAMMER, 2007). Portanto, a capacidade de sobreviver à

bile é reconhecida como característica indispensável para que os micro-organismos alcancem o sítio de ação, o intestino grosso em quantidades adequadas para exercerem seu efeito probiótico.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a sobrevivência *in vitro* de *L. lactis* QMF 11 após exposição a sais biliares como um dos critérios de atividade probiótica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a sobrevivência de *L. lactis* QMF 11 em meio de cultura com pH 8,0.
- Avaliar a sobrevivência de *L. lactis* QMF 11 em presença de diferentes concentrações de sais biliares (0,3 e 0,5% p/v).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRO-ORGANISMO

A cepa *Lactococcus lactis* QMF 11 foi isolada a partir de Queijo Minas Frescal por COSTA et al., (2018) no Laboratório de Microbiologia de Medicamentos e Alimentos (LAMIMA) da Faculdade de Farmácia (FF) da Universidade Federal de Goiás (UFG). Essa cepa apresentou atividade bioprotetora frente aos patógenos alimentares *L. monocytogenes* e *S. aureus* quando co-inoculada em leite pasteurizado, o que despertou interesse em avaliar se apresenta também características probióticas.

L. lactis QMF 11 foi estocada em freezer a -20°C, em caldo De Man Rogosa e Sharpe (MRS, Oxoid) adicionado de 20% (p/v) de glicerol até o início dos experimentos. Foi feito o teste de Gram antes de iniciar os experimentos para avaliar as características microscópicas da cultura.

4.2 RESISTÊNCIA AOS SAIS BILIARES

A avaliação da sobrevivência de *L. lactis* QMF 11 após exposição a sais biliares foi baseada em TULINI et al. (2013), com algumas modificações. Inicialmente, a cepa *L. lactis* QMF 11 foi reativada *overnight* a 30°C em caldo MRS. Em seguida, a cultura foi inoculada a 10% em novo caldo MRS e novamente incubada nas mesmas condições. Após incubação, a cultura foi transferida para tubos de centrífuga previamente esterilizados e foi centrifugada sob refrigeração (4°C) por 15 minutos (min) a 5000 rotações por minutos (rpm) (Centrífuga Sorvall RC Plus- duPont, EUA). O sobrenadante foi dispensado e o sedimento foi suspenso em caldo MRS e em caldo MRS acrescido de 0,3% ou 0,5% (p/v) de sais biliares (Sigma-Aldrich). Em todas as situações o pH dos caldos foi ajustado para 8,0 com solução de NaOH 1 M. Em seguida, as culturas foram armazenadas a 30°C por até 180 min. Foram realizadas contagens das populações microbianas nos tempos zero, 90 e 180 min através de semeadura em profundidade em placas de ágar MRS incubadas a 30 °C, com leitura após 48 horas. O pH foi determinado em cada tempo. Os experimentos foram feitos como triplicatas independentes.

Foi feito o cálculo do percentual de sobrevivência bacteriana com auxílio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ sobrevivência} = \frac{N}{N_0} \times 100$$

Onde

N= inóculo inicial

N₀= número de células viáveis ao final do experimento

5 RESULTADOS

A figura 1 mostra a morfologia *L. lactis* QMF 11, exibindo cocos e diplococos Gram-positivos após subcultivo em caldo MRS.

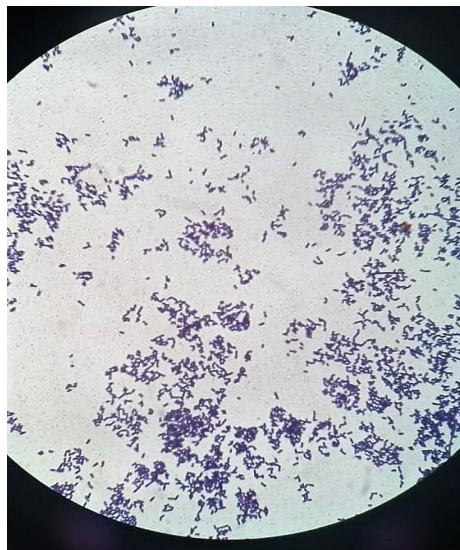


Figura 1: Morfologia de *Lactococcus lactis* QMF 11, exibindo cocos e diplococos Gram-positivos. Fonte: próprio autor.

A Tabela 1 e Figura 2 apresentam os resultados da sobrevivência de *L. lactis* QMF 11 após exposição a diferentes concentrações de sais biliares em pH 8,0. Pôde-se verificar que, em ausência de sais biliares, após 180 minutos foi observado um aumento de 0,82 log na população microbiana (sobrevivência de 109,4%). Em presença de 0,3% de sais biliares, a população microbiana não sofreu diminuição, mantendo-se levemente acima dos níveis de inóculo inicial durante todo o estudo. Entretanto, em presença de 0,5% de sais biliares, após 90 minutos foi observada

uma diminuição de 0,54 log UFC da população de *L. lactis* QMF 11, e de 0,94 log após 180 minutos, com taxa de sobrevivência de 88%.

Tabela 1: Médias das populações de *Lactococcus lactis* QMF 11 (Log UFC/g) após exposição a sais biliares em caldo de cultura com pH 8,0.

Condição	Tempo (minutos)			% Sobrevida Após 180 min.
	Contagem em Log UFC/g			
	0	90	180	
Caldo MRS	8,70 ± 0,13	8,66 ± 0,06	9,52 ± 0,03	109,4%
Sais biliares 0,3%	8,23 ± 0,10	8,45 ± 0,03	8,28 ± 0,09	100,6%
Sais biliares 0,5%	8,52 ± 0,05	7,98 ± 0,05	7,58 ± 0,4	88%

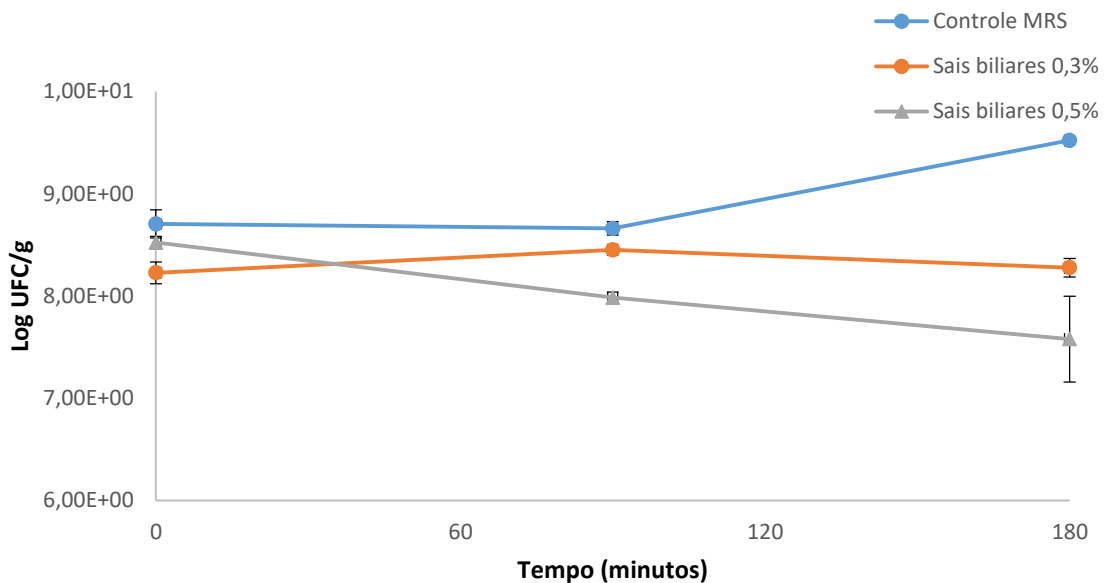


Figura 2: Médias das populações de *Lactococcus lactis* QMF 11 (Log UFC/g) após exposição a sais biliares em caldo de cultura com pH 8,0.

A Figura 3 e Tabela 2 apresentam os valores de pH da cultura de *L. lactis* QMF 11 medidos durante o estudo. Pode-se observar que, após 180 min, em todas as situações estudadas, houve redução de pH.

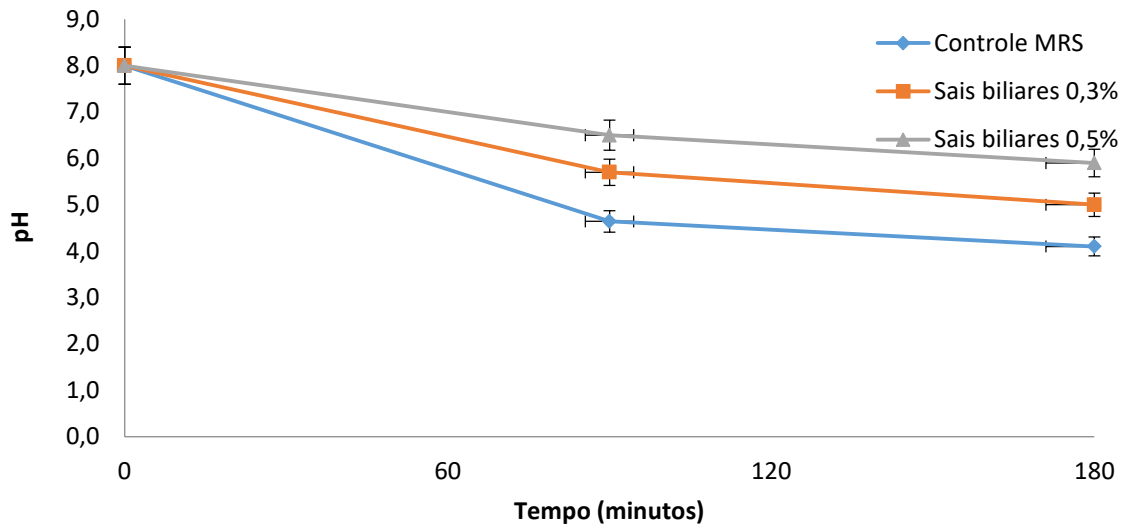


Figura 3: Valores médios de pH do caldo bacteriano de *L. lactis* QMF 11 durante ensaio de exposição a sais biliares.

Tabela 2: Valores médios em unidade (un.) pH do caldo bacteriano de *L. lactis* QMF 11 durante ensaio de exposição a sais biliares

Condição	Tempo (minutos)			Redução em un. Após 180 min
	0	90	180	
Caldo MRS	8,0	4,6	4,1	3,9
Sais biliares 0,3%	8,0	5,7	5,0	3,0
Sais biliares 0,5%	8,0	6,5	5,9	2,1

6 DISCUSSÃO

As secreções do TGI constituem importantes barreiras de defesa do organismo humano contra os micro-organismos ingeridos oralmente. Dessa forma, a tolerância ou resistência às condições hostis encontradas durante a passagem ao pelo TGI, é importante para que micro-organismos probióticos possam persistir e se estabelecer nesse ambiente. Como a realização em estudos em modelos *in vivo* geralmente é cara, exige muitos recursos e é eticamente discutível, sendo a digestão gastrointestinal simulada, amplamente empregada em muitos campos das ciências alimentares e nutricionais (MINEKUS et al., 2014).

Sathyabama et al. (2016) ao compararem a taxa de crescimento de duas diferentes cepas probióticas, *Staphylococcus succinus* (MAbB4) e *Enterococcus fecium* (FIdM3), evidenciaram que a taxa de sobrevivência e tolerância das bactérias ao ambiente gastrointestinal simulado é dependente de cada cepa.

Caldos de cultura acrescidos de sais biliares, apesar de não corresponderem exatamente à composição do suco biliar humano, são utilizados frequentemente para avaliar a viabilidade e sobrevivência de cepas candidatas a probióticos.

Já foi observado que, apesar de sofrerem alguma inibição de multiplicação quando expostas a sais biliares, culturas probióticas possuem uma maior tolerância a esses compostos do que culturas *starters* (VINDEROLA e REINHEIMER 2003). De acordo com Begley et al., (2006) a resistência de BAL probióticas aos sais biliares pode estar relacionada à produção de enzimas do grupo sal biliar hidrolase (BHS), que catalizam a reação de desconjugação do sal biliar.

A concentração de sais biliares no duodeno humano encontra-se na faixa de 0,3% a 0,5%, sendo essas concentrações utilizadas para rastrear a tolerância e resistência à bile (VINDEROLA & REINHEIMER 2003, TULINI et al., 2013; PRETE et al., 2020). No presente estudo, o comportamento de *L. lactis* QMF 11 foi acompanhado após exposição a 0,3% e 0,5% de sais biliares, por até 180 min a 35 °C, tempo e temperatura comumente utilizados para simular a digestão intestinal (MINEKUS et al., 2014).

Foi possível observar que, ao final do período avaliado, o percentual de recuperação de *L. lactis* QMF 11 foi de 100,6 e 88%, respectivamente, quando exposta a concentrações de 0,3% e 0,5% de sais biliares por 180 min. Resultados semelhantes foram encontrados por Haghshenas et al., (2017), ao analisarem duas

cepas, *L. plantarum* 15HN e *L. lactis* subsp. *Lactis* 44Lac isolados de laticínios. As cepas apresentaram sobrevivência de 88% e 92% respectivamente após serem incubadas por 3 horas a 0,3% de sais biliares. Kondrotiene et al., (2020) ao avaliaram a tolerância *in vitro* ao ambiente gastrointestinal de treze cepas pré-selecionadas de *L. lactis* de origem láctea, a resistência aos sais biliares foi estimada através de concentrações 0,3%, 0,5% e 1% p/v de sais biliares. As treze cepas apresentaram uma sobrevivência acima de 90% a uma concentração de 0,3% e 0,5% de sais biliares e duas cepas apresentaram inibição significativa abaixo de 80% frente à concentração de 1,0% de sais biliares.

Diversos estudos relatam tolerância de diferentes BAL, isoladas de diversas fontes, aos sais biliares. Costa et al., (2013) ao analisar o potencial probiótico *in vitro* de 12 BAL (*Lactobacillus* spp. e *Weissella paramesenteroides*) provenientes de queijo Minas artesanal observaram uma grande variabilidade na susceptibilidade das cepas a 0,3% de sais biliares. Entretanto, os autores relatam que mesmo algumas cepas sendo inibidas pela ação dos sais biliares, todas permaneceram viáveis após 12 horas de exposição.

Andrade et al. (2014) avaliaram o potencial probiótico *in vitro* de diferentes cepas de *Lactobacillus* spp., isolados de queijo Minas artesanal. Os autores observaram que todas as cepas foram tolerantes à concentração de 0,3% de sais biliares, com percentual de inibição inferior a 40% após oito horas de exposição. Prete et al., (2020) avaliaram a sobrevivência de *L. plantarum* em presença de concentrações crescentes de sais biliares (entre 0 a 3,6%) e relatam que a viabilidade microbiana permaneceu inalterada até uma concentração de 1,8% de sais biliares.

Urnau et al., (2012), ao avaliar a sensibilidade de *Lactobacillus* e Bifidobactérias provenientes de leites fermentados comerciais, observaram uma diminuição de um ciclo logaritmo após exposição por 4 horas aos sais biliares na concentração de 0,3%, mas as BAL permaneceram em números adequados para atividade probiótica durante todo o ensaio.

Neste estudo foi observado ainda que, em presença ou não de sais biliares em caldo MRS com pH 8,0, houve uma redução de pH entre 2 e 4 unidades após 180 minutos de ensaio. A redução do pH pode ser explicada devido à produção de ácido láctico pela BAL durante o processo de metabolização dos substratos disponíveis no meio.

A capacidade de acidificação é considerada uma característica importante para culturas *starters* e biopreservadoras, porém não foi possível encontrar na literatura estudos que correlacionassem a redução de pH e tolerância aos sais biliares.

Os resultados desse estudo indicam que *L. lactis* QMF 11, devido à sua capacidade de sobreviver em presença de sais biliares, pode ser um micro-organismo promissor como cultura probiótica. Mais estudos são necessários para confirmar essa afirmação.

7 CONCLUSÕES

- *L. lactis* foi capaz de se multiplicar em caldo de cultura com pH básico;
- *L. lactis* QMF 11 foi capaz de resistir à presença de 0,3 e 0,5% de sais biliares, com um percentual de sobrevivência de 100,6 e 88%, respectivamente, após 180 minutos de exposição.

8 REFERÊNCIAS

- AKBAR, A.; ALI, I.; NAAL, A. K. Industrial Perspectives of Lactic Acid Bacteria for Biopreservation and Food Safety. **Journal of Animal and Plant Sciences**, 26(4):938-948, 2016.
- ANDRADE, C. R. G.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M.; ACURCIO, L. B.; SANT'ANNA, F. M.; CASTRO, R. D.; OLIVEIRA, D. L. S. Propriedades probióticas *in vitro* de *Lactobacillus spp.* isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra - MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 66(5):1592-1600, 2014.
- BEGLEY, M.; GAHAN, C. G. M. & HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, 29:625-651, 2005.
- BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C. C. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. **Applied and environmental microbiology**, 72(3):1729-1738, 2006.
- BERMUDEZ-BRITO M.; PLAZA-DÍAZ J.; MUÑOZ-QUEZADA S.; GÓMEZLLORENTE C.; GIL A. Probiotic mechanisms of action. **Annals of Nutrition and Metabolism**, 61:160-174, 2012.
- BINTSIS, T. Lactic Acid Bacteria: Their Applications in Foods. **Journal of Bacteriology and Mycology**, 5(2):1065, 2018.
- BLAIOTTA, G.; MURRU, N.; DI CERBO, A.; ROMANO, R.; APONTE, M. Production of probiotic bovine salami using *Lactobacillus plantarum* 299v as adjunct. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 98(6):2285-2294, 2017.
- BOLOTIN, A.; WINCKER, P.; MAUGER, E.; JAILLON, O. The Complete Genome Sequence of the Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. **Genome Research**, 11:731-753, 2001.
- BURGAIN, J.; SCHER, J.; FRANCIUS, G.; BORGES, F.; CORGNEAU, M.; REVOL-JUNELLES, A. M.; CAILLIEZ-GRIMAL, C.; GAIANI, C. Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. **Advances in Colloid and Interface Science**, 213:21-35, 2014.
- BUYUKYORUK S.; CIBIK, R.; CETINKAYA, F.; SOYUTEMIZ, G. E.; GOKSOY, E. O.; KIRKAN, S. Isolation, Phenotypic and Molecular Identification of *Lactococcus lactis* Isolates from Traditionally Produced Village Cheeses. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, 9(16):2154-2158, 2010.
- CARR, F. J; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology**, 28(4):281-370, 2002.
- CERVIN, A. U. The Potential for Topical Probiotic Treatment of Chronic Rhinosinusitis, a Personal Perspective. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 7(530), 2018.

CHAN, Y. K.; ESTAKI, M.; GIBSON, D. L. Clinical Consequences of Diet-Induced Dysbiosis. **Annals of Nutrition and Metabolism**, 63(2):28-40, 2013.

COSTA, A. C. C. C.; PEREIRA, A. N.; DE ANDRADE E SILVA, A. C.; DA SILVA, F. A.; RIBEIRO, K. O.; TORRES, I. M. S.; DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F. Antilisterial and antistaphylococcal activity of a *Lactococcus lactis* strain isolated from Brazilian fresh Minas cheese. **Journal of Food Safety**, 39(1):e12593,2018.

COSTA, H. H. S.; SOUZA, M. R.; ACÚRCIO, L. B.; CUNHA, A. F.; RESENDE, M. F. S. & NUNES, Á. C. 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**, 65:1858-1866, 2013.

DOMINGO, J. J. S. Revisión del papel de los probióticos en la patología gastrointestinal del adulto. **Gastroenterología y Hepatología**, 40(6):417-429, 2017.

ESPITIA, P. J. P.; BATISTA, R. A.; AZEREDO, H. M. C.; OTONI, C. G. Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. **Food Research International**, 90:42-52, 2016.

FAO/WHO. Probiotics in Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. In: **FAO Food and Nutrition Paper 85**, Roma, 2006.

FIJAN, S. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 11(5):4745-4767, 2014.

FUCHS, A., & DRESSMAN, J. B. Composition and Physicochemical Properties of Fasted-State Human Duodenal and Jejunal Fluid: A Critical Evaluation of the Available Data. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, 103(11):3398-3411, 2014.

GHANBARI, M.; JAMI, M.; DOMING, K. J.; KNEIFEL, W. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria – a review. **LWT – Food Science and Technology**, 54:315-324, 2013.

GIRAFFA, G. Selection and design of lactic acid bacteria probiotic cultures. **Engineering in Life Sciences**, 12(4):391-398,2012.

GOMES DA CRUZ, A. G; ALONSO BURITI, F. C.; BATISTA DE SOUZA, C. H.; FONSECA FARIA, J. A.; ISAY SAAD, S. M. Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science & Technology**, 20(8):344-354, 2009.

GUARINO, A.; GUANDALINI, S.; LO VECCHIO, A. Probiotics for Prevention and Treatment of Diarrhea. **Journal of Clinical Gastroenterology**, 49:37-45, 2015.

GUO, H.; PAN, L.; LI, L.; LU, J.; KWOK, L.; MENGHE, B.; ZHANG, H.; ZHANG, W. Characterization of Antibiotic Resistance Genes from *Lactobacillus* Isolated from Traditional Dairy Products. **Journal of Food Science**, 82(3):724-730, 2017.

HAGHSHENAS, B.; ABDULLAH, N.; NAMI, Y.; RADIAH, D.; ROSLI, R.; KHOSROUSHAH, A. Y. Different effects of two newly-isolated probiotic *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Lactococcus lactis subsp. Lactis* 44Lac strains from traditional dairy products on cancer cell lines. **Anaerobe**, 2014.

HALLORAN, K.; & UNDERWOOD, M. A. Probiotic mechanisms of action. **Early Human Development**, 135:58-65, 2019.

HAWRELAK, J. A. & MYERS, S. P. The causes of intestinal dysbiosis: a review. **Alternative Medicine Review**, 9(2):180-197, 2004.

HELLER, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 73(2):374-379, 2001.

HOMAYOUNI-RAD, A.; SOROUSH A-R.; KHALILI, L.; NOROUZI-PANAHI, L.; KASAIE, Z.; EJTAHED, H-S. Diabetes Management by Probiotics: Current Knowledge and Future Perspective. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, 86:215-227, 2016.

JAYAMANNE, V. S. & ADAMS, M. R. Determination of survival, identity, and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. **Letters in Applied Microbiology**, 42(3):189-194, 2006.

JENSEN, H.; GRIMMER, S.; NATERSTAD, K.; AXELSSON, L. *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, 153:216-222, 2012.

JONES, R. B.; ALDERETE, T. L.; MARTIN, A. A.; GEARY, B. A.; HWANG, D. H.; PALMER, S. L.; GORAN, M. I. Probiotic supplementation increases obesity with no detectable effects on liver fat or gut microbiota in obese Hispanic adolescents: a 16-week, randomized, placebo-controlled trial. **Pediatric Obesity**, 2018.

KAUR, M.; SINGH, H.; JANGRA, M.; KAUR, L.; JASWAL, P.; DUREJA, C. et al. Lactic acid bacteria isolated from yak milk show probiotic potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 101(20):7635-7652, 2017.

KONDROTIENE, K.; LAUCIENE, L.; ANDRULEVICIUTE, V.; KASETIENE, N.; SERNIENE, L.; SEKMOKIENE, D.; MALAKAUSKAS, M. Safety Assessment and Preliminary *In Vitro* Evaluation of Probiotic Potential of *Lactococcus lactis* Strains Naturally Present in Raw and Fermented Milk. **Current Microbiology**, 2020.

LANDMAN & QUÉVRAIN, Gut microbiota: Description, role and pathophysiologic implications. **The Journal of Internal Medicine**, 37(6):418-423, 2016.

LAUE, C.; PAPAZOVA, E.; LIESEGANG, A.; PANNENBECKERS, A.; ARENDARSKI, P.; LINNERTH, B.; DOMING, K. J.; KNEIFEL, W.; PETRICEVIC, L.; SCHREZENMEIR, J., Effect of a yoghurt drink containing *Lactobacillus* strains on bacterial vaginosis in women – a double-blind, randomised, controlled clinical pilot trial. **Beneficial Microbes**, 9(1):35-50, 2018.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and Molecules of *Lactobacilli* Supporting Probiotic Action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 72(4):728-764, 2008.

LEE, Y.K.; NOMOTO, K.; SALMINEN, S.; GORBACH, S.L. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, 211, 1999.

LI, T. & CHIANG, J. Y. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. **Pharmacological Reviews**, 66(4):948-983, 2014.

LIN, T.-H.; LIN, C.-H.; PAN, T.-M. The implication of probiotics in the prevention of dental caries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 102(2):577-586, 2017.

MARTÍN, M. J.; VILLOSLADA, F. L.; RUIZ, M. A.; MORALES, M. E. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 27:15-25, 2015.

MATIAS, N. S.; PADILHA, M.; BEDANI, R.; SAAD, S. M. I. *In vitro* gastrointestinal resistance of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 in soy and/or milk-based symbiotic apple ice creams. **International Journal of Food Microbiology**, 234:83-93, 2016.

MILANI, C.; DURANI, S.; BOTTACINI, F.; CASEY, E.; TURRONI, F.; MAHONY, J.; BELZER, C.; PALACIO, S. D.; MONTES, S. A. et al., The First Microbial Colonizers of the Human Gut: Composition, Activities, and Health Implications of the Infant Gut Microbiota. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 81(4), 2017.

MINEKUS, M.; ALMINGER, M.; ALVITO, P.; BALLANCE, S.; BOHN T, Bourlieu, C.; Carrière, F.; Boutrou, R.; CORREDIG, M.; DUPONT, D.; DUFOUR, C. et., A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. **Food & Function**, 5:1113-1124, 2014.

NAZZARO F.; FRATINNI F.; SADA A.; ORLANDO P. Synbiotic potential of carrot juice supplemented with *Lactobacillus* spp. and inulin or fructo oligosaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 88:2271-2276, 2008.

NGUYEN, B. T.; BUJNA, E.; FEKETE, N.; TRAN, A. T. M.; REZESSY-SZABO, J. M.; PRASAD, R.; NGUYEN, Q. D. Probiotic Beverage From Pineapple Juice Fermented With *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains. *Frontiers in Nutrition*, 6(54):1-7, 2019.

OUWEHAND, A. C.; FORSSTEN, S.; HIBBERD, A. A.; LYRA, A.; STAHL, B. Probiotic approach to prevent antibiotic resistance. **Journal Annals of Medicine**, 48(4),2016.

PAMER, E. G. Resurrecting the Intestinal Microbiota to Combat Antibiotic-Resistant Pathogens. **Science**, 352:535-538, 2016.

PAVLOVIĆ, N.; STANKOV, K.; MIKOV, M. Probiotics—Interactions with Bile Acids and Impact on Cholesterol Metabolism. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 168(7):1880-1895, 2012.

PEREIRA, J. O.; SOARES, J.; MONTEIRO, M. J. P.; AMARO, A.; GOMES, A.; PINTADO, M. Cereal bars functionalized through *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and inulin incorporated in edible coatings of whey protein isolate or alginate. **Food & Function**, 10:6892-6902, 2019.

PFEILER, E. A. & KLAENHAMMER, T. R. The genomics of lactic acid bacteria. **Trends Microbiology**, 15:546-553, 2007.

PINTO, S. S.; CAVALCANTE, B. D.; VERRUCK, S.; ALVES, L. F.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. Effect of the incorporation of *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulated with sweet whey and inulin on the properties of Greek-style yogurt. **Journal of Food Science and Technology**, 54(9):2804-2813, 2017.

POFFO, F. & SILVA, M. A. Taxonomic and physiological characterization of lactic acid bacteria isolated from seafood. **Food Science and Technology**, 31:303-307, 2012.

POWELL, I. B.; BROOME, M. C. & LIMSOWTIN, G. K. Y. Cheese | Starter Cultures: General Aspects. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, 552–558, 2011

PRETE, R.; LONG, S. L.; GALLARDO, A. L.; GAHAN, C. G.; CORSETTI, A.; JOYCE, A. S. Beneficial bile acid metabolism from *Lactobacillus plantarum* of food origin. **Scientific Reports**, 10:1165, 2020.

RAHA A. R.; VARMA N. R.; YUSOFF K.; ROSS E.; FOO H.L. Cell surface display system for *Lactococcus lactis*: a novel development for oral vaccine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 68:75-81, 2005.

RUSSELL, D. W. The Enzymes, Regulation, and Genetics of Bile Acid Synthesis. **Annual Review of Biochemistry**, 72(1):137-174, 2003.

SAAD, S. M. I. Probiotics and prebiotics: the state of the art. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 42(1), 2006.

SANCHEZ, C.; NEVES, A. R.; CAVALHEIRO, J.; DOS SANTOS, M. M.; GARCIA-QUINTANS, N.; LOPEZ, P., SANTOS, H. Contribution of Citrate Metabolism to the Growth of *Lactococcus lactis* CRL264 at Low pH. **Applied and Environmental Microbiology**, 74(4):1136-1144, 2007.

ŞANLIER, N.; GÖKCEN, B. B.; SEZGIN, A. C. Health benefits of fermented foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 1-22, 2017.

SATHYABAMA, S.; RANJITH KUMAR, M.; BRUNTHA DEVI, P.; VIJAYABHARATHI, R.; BRINDHA PRIYADHARISINI, V. Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. **LWT - Food Science and Technology**, 57(1): 419-425, 2014.

SHEKH, S. L.; DAVE, J. M.; VYAS, B. R. M. Characterization of *Lactobacillus plantarum* strains for functionality, safety and g-amino butyric acid production. **LWT - Food Science and Technology**,74: 234-241, 2016.

SINGH K.; KALLALI B.; KUMAR A.; THAKER V. Probiotics: a review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 1(2):287-290, 2011.

SONG, A. A.-L.; IN, L. L. A.; LIM, S. H. E.; RAHIM, R. A. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. **Microbial Cell Factories**, 16(1), 2017.

SONG, S.; LI, P.; ZHANG, R.; CHEN, J.; LAN, J.; LIN, S.; GUANJIE G. A.; ZHIJING X.; JIANG, S. Oral vaccine of recombinant *Lactococcus lactis* expressing the VP1 protein of duck hepatitis A virus type 3 induces mucosal and systemic immune responses. **Vaccine**, 39:4364-4369. 2019.

STEFE, C. A.; ALVES, M. A. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, Prebióticos e Simbióticos – Artigo de Revisão. **Saúde e Ambiente em Revista**, 3(1):16-33, 2008.

SUEZ, J.; ZMORA, N.; SEGAL, E.; ELINAV, E. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. **Nature Medicine**, 25:716-729, 2019.

TERPOU, A.; PAPADAKI, A.; LAPPAS, I. K.; KACHRIMANIDOU, V.; BOSNEA, L. A.; KOPSAHELIS, N. Probiotics in Food Systems: Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. **Nutrients**, 11(1591):1-32, 2019.

TOMASELLO, G.; MAZZOLA, M.; LEONE, A.; SINAGRA, E.; ZUMMO, G.; FARINA, F.; DAMIANI, P. et al. Nutrition, oxidative stress and intestinal dysbiosis: Influence of diet on gut microbiota in inflammatory bowel diseases. **Biomedical papers of the medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic**. 160(4):461-466, 2016.

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

URNAU, D.; CIROLINI, A.; TERRA, N. N.; CAVALHEIRO, C. P.; MILANI, L. I. G.; FRIES, L. L. M. 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**, 67(384):5-10, 2012.

VIJAYA K. B.; VIJAYENDRA, S. V. N.; REDDY, O. V. S. Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. **Journal of Food Science and Technology**, 52(10):6112-6124, 2015.

VINDEROLA C. G. & REINHEIMER J. A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “*in vitro*” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**,36(9-10):895-904,2003.

WAGNER N. R. F.; ZAPAROLLI M. R.; CRUZ M. R. R.; SCHIEFERDECKER M. E. M.; CAMPOS A. C. L. Mudanças na microbiota intestinal e uso de probióticos no pós-operatório de bypass gástrico em Y-de-Roux e gastrectomia vertical sleeve: uma revisão integrativa. **ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, 31(4):1400, 2018.