



**INSTITUTO
FEDERAL**
Rio de Janeiro

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Campus Rio de Janeiro

Programa de Pós-graduação Stricto sensu

Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Thaís Cristina Mendes da Silva

**Processamento de queijo Minas frescal
utilizando *Weizmannia coagulans* GBI-30**

Rio de Janeiro

2023

THAÍS CRISTINA MENDES DA SILVA

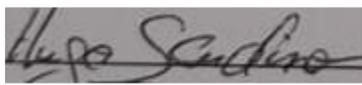
Processamento de queijo Minas frescal utilizando *Weizmannia coagulans* GBI-30

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – Campus Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadores: Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz e Dr^a. Cássia Pereira Barros

Aprovada em 21 de Dezembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Hugo Scudino – UFF (Universidade Federal Fluminense)



Prof. Dr. Ramon Silva – UFF (Universidade Federal Fluminense)

Ficha catalográfica elaborada por
Cristiane Teixeira de Oliveira
CRB7 5591

S586 Silva, Thais Cristina Mendes da.
Processamento de queijo Minas frescal utilizando *Weizmannia coagulans* GBI-30 / Thais Cristina Mendes da Silva. – Rio de Janeiro, 2023.
64 f.: il. ; 31 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, 2023.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Gomes Cruz.
Coorientadora: Dr^a. Cássia Pereira Barros.

Referência: f. 33-40.

1. Queijo Minas fresco. 2. Queijo probiótico. 3. Bactérias probióticas. I. Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro. II. Cruz, Adriano Gomes. III. Título.

IFRJ/CMAR/CoBib

CDU 637.353

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, ao Senhor Jesus, por me agraciar com a força necessária para buscar a realização de mais um sonho, o mestrado. Mesmo com algum tempo afastada do meio acadêmico, conciliando estudo e vida profissional e em um crítico período de pandemia, foi possível chegar até aqui.

À minha família, em especial meus pais João e Tânia Mendes, por todo direcionamento e incentivo para a busca do meu aperfeiçoamento pessoal e profissional, todas as minhas conquistas devo a vocês. Ao meu irmão, Rafael Mendes, por sua amizade, apoio, torcida e companhia em toda minha trajetória acadêmica.

Ao meu marido, Raphael Rodrigues, por ser compreensivo, paciente, cuidadoso e amoroso comigo e por incentivar e acreditar nos meus sonhos.

Ao meu afilhado, João Guilherme S. Guarani, que com a inocência do seu sorriso, me mostra há 9 anos a beleza dos pequenos detalhes da vida.

Ao amigo, Fabrício de Oliveira Silva pelo companheirismo, incentivo e contribuição para a minha chegada ao mestrado. À amiga, Renata da Silva Dias, grande influenciadora e incentivadora no prosseguimento aos estudos.

À minha terapeuta, Cheila Cabral por todo direcionamento, fortalecimento e instruções prestadas. A caminhada para a busca dos meus objetivos, sem dúvidas, é mais fácil com o seu cuidado.

Ao meu orientador, Adriano Gomes da Cruz, por todo direcionamento, ensinamento e acolhimento, mesmo com suas grandes responsabilidades. Ser orientada por um cientista, de grande relevância, foi uma honra.

À minha orientadora Cássia Pereira Barros, por sua dedicação, cuidado pela pesquisa, zelo em me orientar e aconselhar. Pude aprender muito com a sua experiência.

À equipe do laboratório de Microbiologia, do Departamento de Alimentos da IFRJ e do Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal (LCMPOA) da faculdade de veterinária da UFF, por todo acolhimento e contribuição durante a realização dos experimentos.

Aos professores da IFRJ, por todo ensinamento e dedicação, que mesmo com a necessidade de adaptação à modalidade online, não mediram esforços para nos oferecer um curso de qualidade.

Aos amados amigos da turma de 2021, que mesmo de forma online, mostraram que por meio da parceria e da amizade, conseguimos vencer barreiras. Com o lema “Ninguém larga a mão de ninguém”, podemos hoje chegar à etapa de conclusão do mestrado. Uma turma que apesar da ausência física, se fez fortemente presente.

Em especial, à amiga de turma Gisela da Silva Costa, por seu companheirismo, gentileza, amizade e palavras de incentivo em momentos difíceis.

Ao Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), por oferecer a oportunidade de aperfeiçoamento e crescimento profissional.

“Deleite-se no Senhor, e ele atenderá aos desejos do seu coração”

Salmos 37-4

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

Leonardo da Vinci

RESUMO

O queijo Minas frescal é uma matriz alimentar valiosa para a introdução de bactérias probióticas. Os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são os mais utilizados no processamento de alimentos. Entretanto, a manutenção da viabilidade do probiótico até o momento do consumo é um desafio para a indústria de alimentos. Portanto, tem sido buscadas inovações em termos de tecnologia ou formulação que contribuam para reter a funcionalidade dos produtos. Neste sentido, a utilização de bactérias formadoras de esporos pode ser uma opção interessante para elaboração de produtos probióticos. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é investigar o efeito da adição da cultura probiótica formadora de esporo *W. coagulans* GBI-30, em diferentes concentrações, nas características microbiológicas e físico-químicas do queijo Minas frescal durante sua validade comercial. Foram realizados quatro tratamentos com formulações distintas: QC – sem probiótico (controle); QI, QII e QIII com probiótico em concentrações variadas (6, 8 e 10 log UFC/g, respectivamente). Os queijos foram analisados quanto a viabilidade probiótica, composição físico-química (Umidade, gordura e proteína), pH, proteólise, presença de compostos bioativos e orgânicos e atividade antibacteriana. De acordo com os resultados observados, a taxa de sobrevivência dos probióticos manteve-se constante e proporcional a quantidade de *W. coagulans* adicionada nas amostras ($p > 0,05$), que inclusive, conferiu a QI, QII e QIII características de um produto probiótico. Quanto a composição físico-química, todos os tratamentos estiveram em conformidade com a legislação vigente. A produção de ácidos orgânicos (lático e acético) e peptídeos bioativos foi constante e diretamente proporcional a adição da cepa probiótica, assim como o declínio da concentração de lactose ($p < 0,05$). Em relação a atividade antibacteriana dos queijos probióticos (QI, QII e QIII), houve uma inibição baixa contra a proliferação de *S. aureus* e *L. innocua* e média contra *S. enterica* e *E. coli*. Enquanto o queijo sem probiótico (QC) não exerceu atividade inibidora relevante ($p < 0,05$). Portanto conclui-se que a utilização de *W. coagulans* GBI-30 em queijo Minas frescal é uma alternativa eficaz para o desenvolvimento de novos produtos probióticos com a funcionalidade preservada ao longo de sua validade comercial. Considera-se que a atividade antibacteriana, verificada nos queijos probióticos possa contribuir para a indústria de alimentos na elaboração de produtos benéficos à saúde.

Palavras-chave: Produto lácteo funcional; Queijo probiótico; Cultura probiótica formadora de esporo; *Bacillus coagulans*

ABSTRACT

Minas frescal cheese is a valuable food matrix for introducing probiotic bacteria. The genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* are the most commonly used in food processing. However, maintaining the viability of the probiotic until the moment of consumption is a challenge for the food industry. Innovations have therefore been sought in terms of technology or formulation to help retain the functionality of the products. In this sense, the use of spore-forming bacteria could be an interesting option for making probiotic products. The aim of this study was to investigate the effect of adding the probiotic spore-forming culture *W. coagulans* GBI-30, in different concentrations, on the microbiological and physicochemical characteristics of Minas frescal cheese during its commercial shelf life. Four treatments were carried out with different formulations: QC - without probiotic (control); QI, QII and QIII with probiotic in varying concentrations (6, 8 and 10 log CFU/g, respectively). The cheeses were analyzed for probiotic viability, physicochemical composition (moisture, fat and protein), pH, proteolysis, presence of bioactive and organic compounds and antibacterial activity. According to the results observed, the survival rate of the probiotics remained constant and proportional to the amount of *W. coagulans* added to the samples ($p > 0.05$), which even gave QI, QII and QIII the characteristics of a probiotic product. In terms of physico-chemical composition, all the treatments complied with current legislation. The production of organic acids (lactic and acetic) and bioactive peptides was constant and directly proportional to the addition of the probiotic strain, as was the decline in lactose concentration ($p < 0.05$). With regard to the antibacterial activity of the probiotic cheeses (QI, QII and QIII), there was low inhibition against the proliferation of *S. aureus* and *L. innocua* and medium inhibition against *S. enterica* and *E. coli*. The cheese without probiotic (QC) had no significant inhibitory activity ($p < 0.05$). It can therefore be concluded that the use of *W. coagulans* GBI-30 in Minas frescal cheese is an effective alternative for the development of new probiotic products with their functionality preserved throughout their commercial shelf life. It is thought that the antibacterial activity found in probiotic cheeses can contribute to the food industry in the development of products that are beneficial to health.

Keywords: Functional dairy product; Probiotic cheese; Spore-forming probiotic culture; *Bacillus coagulans*.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AGCC	Ácido Graxos de Cadeia Curta
CSIs	Indels de Assinatura Conservados
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EFSA	Autoridade de Segurança Alimentar da União Europeia
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
DVA	Doença veiculada por alimentos
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDF	International Dairy Federation
ISAPP	Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos
<i>L. Inocua</i>	<i>Listeria innocua</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial Hidrogeniônico
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
QC	Queijo sem probiótico - controle
QI	Queijo com probiótico (6 log UFC/g)
QII	Queijo com probiótico (8 log UFC/g)
QIII	Queijo com probiótico (10 log UFC/g)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
SIF	Serviço de Inspeção Federal
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
<i>W. coagulans</i>	<i>Weizmannia coagulans</i>

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- <i>Taxonomia do gênero Weizmannia</i> -----	17
Figura 2- Fluxograma do desenvolvimento do queijo Minas frescal probiótico -----	21
Figura 3- Gráfico A: Viabilidade de <i>W. Coagulans</i> GBI-30. Gráfico B: Sobrevivência ao GIT de <i>W. Coagulans</i> GBI-30 -----	25
Figura 4- Metabólitos microbianos A: ácido láctico. B: ácido acético e C: concentração de lactose D: pH nos queijos controle e probióticos -----	27
Figura 5- Compostos bioativos A: DPPH; B: ACE; C: Alfa-amilase; D: Alfa-glucosidase e E: Proteólise nos queijos controle e probióticos-----	29
Figura 6- Meios de cultura para análise da atividade antibacteriana de <i>W. Coagulans</i> contra cepas patogênicas-----	30

LISTA DE TABELAS

Tabela1- Composição físico-química dos diferentes tratamentos de queijos Minas Frescal ao longo do tempo de armazenamento -----	26
Tabela 2- Atividade antibacteriana dos queijos probióticos -----	30

SUMÁRIO:

1-INTRODUÇÃO -----	11
2.REFERENCIAL TEÓRICO -----	12
2.1- Queijo Minas frescal -----	12
2.1.1- Processamento do queijo Minas frescal -----	13
2.2- Probióticos -----	14
2.2.1– <i>Weizmannia coagulans</i> -----	15
2.2.2.- Queijo probiótico -----	17
3. JUSTIFICATIVA -----	18
4. OBJETIVOS -----	19
4.1- Objetivo geral -----	19
4.2- Objetivos específicos -----	19
5. MATERIAL E MÉTODOS -----	20
5.1- Material -----	20
5.2- Métodos -----	20
5.2.1- Processamento do queijo Minas frescal: -----	20
5.2.2- Análise microbiológica -----	21
5.2.3- Análises físico-químicas -----	22
a) Composição centesimal, análise de pH e atividade proteolítica -----	22
b) Compostos bioativos -----	23
c) Ácidos orgânicos -----	23
5.2.4- Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> -----	23
5.2.5- Análise estatística -----	24
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	25
6.1- Viabilidade e sobrevivência de <i>W. coagulans</i> ao trato gastrointestinal -----	25
6.2- Composição centesimal -----	26
6.3- Ácido lático, ácido acético e lactose -----	27
6.4- Compostos bioativos -----	28
6.5 – Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> -----	29

7. CONCLUSÃO -----	31
8. DESENVOLVIMENTO -----	32
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS -----	33
CAPÍTULO 1 (Artigo técnico- Benefícios conferidos à saúde através do consumo de queijos probióticos) -----	41
CAPÍTULO 2 (Artigo técnico- Bactérias esporuladas probióticas em produtos lácteos: características tecnológicas e benefícios a saúde) -----	53
Capítulo 3: Participação em congressos -----	63

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, os alimentos funcionais têm ganhado importante destaque devido ao crescente interesse da população em saúde e bem-estar. Além disso, o apoio da legislação e os avanços na ciência, no que diz respeito as propriedades benéficas dos alimentos, tem permitido o surgimento de uma grande variedade de produtos no mercado, atendendo ao paladar dos diversos públicos (BRASIL, 2021). No Brasil, o nicho de alimentos funcionais representa cerca de 15% do mercado de alimentos, com um crescimento anual estimado de 20%, enquanto os alimentos probióticos correspondem a cerca de 70% dos produtos disponíveis (CRUZ et al., 2017). Probióticos são definidos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro”, conceito que sofreu revisão da definição da FAO/OMS, 2002. Portanto, a viabilidade dos micro-organismos é uma condição fundamental para que os efeitos benéficos sejam obtidos (HILL et al., 2014).

Os benefícios clínicos adquiridos com o consumo de probióticos, compreendem: (a) contribuição para a saúde intestinal, com a melhora trânsito intestinal, aprimoramento da digestão e absorção de nutrientes pelas células epiteliais do intestino; (b) auxiliam o sistema imune, protegendo da penetração de alergênicos e bactérias patogênicas, fortalecimento da barreira epitelial (produção de mucina) e produção de imunoglobulina A no intestino; (c) exercem efeito anti-inflamatório; (d) atuam no tratamento de dores viscerais, como as da síndrome do intestino irritável, entre outros. No entanto, deve-se destacar que o efeito é transitório, sendo necessário o consumo frequente de alimentos probióticos para a colonização destes na microbiota intestinal (CRUZ et al., 2009).

Os lácteos são as matrizes alimentares mais utilizadas para produção de alimentos funcionais probióticos. Em 2020, de acordo com a International Dairy Federation (IDF), o queijo foi um dos derivados lácteos mais consumidos no mundo. Inclusive, no Brasil, é o laticínio preferido após o leite fluido. Os queijos Minas, prato e muçarela foram os mais escolhidos, segundo dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) do IBGE (SIQUEIRA E SCHETTINO, 2021). Além de ser um alimento de grande importância econômica, sendo responsável por movimentar US\$ 159 bilhões no mercado global em 2022, com previsão de ultrapassar cerca de US\$ 213 bilhões até 2032, conforme relatório de Precedence Research (2023). Associado

ao expressivo consumo, o queijo também possui um excelente valor nutricional, por ser fonte de proteínas de alto valor biológico, gorduras (com destaque para ácidos graxos com perfil anti-inflamatório CLA), carboidratos (lactose, galactose, glicose), minerais (Cálcio, fósforo, potássio, iodo, zinco e selênio) e vitaminas A, D e do complexo B (CORASSIN et al., 2017).

As cepas probióticas mais conhecidas e usadas no processamento de alimentos pertencem aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (PIMENTEL et al., 2020). Porém um grande desafio na produção de alimentos probióticos é manter a viabilidade celular durante o processamento, armazenamento e a exposição a condições gastrointestinais, para garantir a chegada e funcionalidade do probiótico no ambiente intestinal. Com o intuito de sustentar a sobrevivências destes micro-organismo, novos recursos têm sido empregados, como adição de promotores de crescimento (prebióticos) ou a microencapsulação de micro-organismos probióticos (ANDRADE et al., 2023; ROLIM et al., 2020). Neste sentido, a utilização de probióticos produtores de esporos por serem micro-organismos naturalmente mais resistentes as diferentes condições adversas, torna-se uma alternativa interessante para o desenvolvimento de produtos probióticos (CAO et al., 2020).

Weizmannia coagulans, denominada anteriormente como *Bacillus coagulans*, é uma espécie bacteriana formadora de esporos, economicamente importante, que tem se tornado cada vez mais notável no campo dos probióticos pela sua maior capacidade de suportar os efeitos do processamento e condições ambientais, garantindo funcionalidade no organismo humano, através do consumo de alimentos suplementados com esta cepa (FIJAN et al., 2023, OZUSAGLAM et al., 2010)

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho é investigar o efeito da adição da cultura probiótica formadora de esporo *W. coagulans* GBI-30, em diferentes concentrações, nas características físico-químicas e microbiológicas do queijo Minas frescal durante o seu período de validade comercial.

2. REFERENCIAL TEÓRICO:

2.1- Queijo Minas frescal

Segundo a portaria MAPA – 352, de 04/09/1997: “Queijo Minas frescal é um queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras

enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. É um queijo classificado como semigordo, de muito alta umidade e deve ser consumido fresco ou conservado e comercializado sob temperatura não superior a 8°C. Possui forma cilíndrica, peso variando entre 300g e 5 kg consistência macia, cor esbranquiçada, sabor suave, odor característico, crosta fina e presença ou não de olhaduras mecânicas” (BRASIL, 1997).

É um alimento que atende aos mais diversos públicos, sejam os interessados por alimentação saudável, por conter uma boa fonte proteica e baixo teor lipídico ou àqueles que buscam refeições palatáveis. Segundo a pesquisa de orçamentos familiares (POF) do IBGE, o brasileiro consome em média, 2,2 quilogramas de queijo por ano. Na distribuição nacional, a região Sudeste se destaca com o maior nível de consumo, com 2,8 kg/habitantes/ano, seguida pela região Sul, com 2,6 kg/habitantes/ano (EMBRAPA, 2023).

2.1.1- Processamento do queijo Minas frescal

De acordo com a legislação brasileira, o leite para a fabricação de queijos precisa sofrer processo de pasteurização e ser padronizado em relação ao teor de gordura (BRASIL, 1996). O processo de fabricação do queijo Minas compreende três etapas: acidificação, coagulação e desidratação (CRUZ et al., 2009).

Na acidificação ocorre a produção de ácido láctico através da fermentação da lactose pelas bactérias lácticas. Na coagulação ocorre a formação da coalhada. Por último, a desidratação compreende as etapas de corte, mexedura, sinérese, prensagem e salga. A última etapa recebe este nome por ter a função de retirar o soro da coalhada até atingir o teor de umidade desejado no queijo (KAPOOR; METZGER, 2008).

Durante as etapas de produção do queijo alguns constituintes do leite são perdidos no soro, como: água, sais minerais, lactose e uma parcela de proteína. Enquanto no produto, ocorre a concentração da gordura e de grande parte da composição proteica do leite. Estes nutrientes irão definir o rendimento do queijo. Ademais, a composição nutricional e microbiológica do leite tem grande interferência na qualidade do queijo. O teor de cálcio presente no leite irá definir a firmeza da coalhada e o pH, a retenção do coagulante na coalhada. Enquanto, a presença de

microbiota inadequada pode afetar a parte sensorial e estrutural do queijo, como por exemplo a formação de olhaduras indesejáveis (FOX et al., 1997).

2.2- Probióticos

O trato gastrointestinal humano, além da função digestiva, desempenha importantes funções fisiológicas que interferem na nossa saúde e bem-estar (SAAD, 2006). A microbiota intestinal adequada produz metabólitos importantes para a homeostase do organismo, como os ácido graxos de cadeia curta (AGCC), através da fermentação de substratos alimentares (fibras dietéticas), e neurotransmissores. Também é responsável por manter intacta a barreira intestinal e atuar em processos imunológicos, sendo os probióticos grandes biomoduladores positivos para a saúde humana. Além disso, a microbiota intestinal é capaz de impedir a proliferação de micro-organismos patogênicos devido a sua capacidade competitiva e inibitória (GIBSON; FULLER , 2000; PUNTILLO et al., 2022).

As atividades dos micro-organismos intestinais comandam a saúde humana, pois é capaz de interferir na função de outros órgãos, como pele, fígado e cérebro, por meio dos eixos pele-intestino, fígado-intestino e cérebro-intestino, respectivamente. A colonização intestinal e a composição da microbiota são moldadas desde o início da vida e alguns fatores são condicionantes, como: tipo de parto, amamentação, uso de medicamentos, exposição ambiental e a alimentação (PUNTILLO et al. 2022).

Na vida moderna, muitos fatores podem alterar o equilíbrio do bioma intestinal, como o estresse psicológico, exposição à radiação, alterações da peristalse intestinal, mudança na dieta e infecções ou intoxicações alimentares. Porém, o uso de antibióticos é uma das mais relevantes causas de desequilíbrio da microbiota intestinal ou disbiose. Esta situação clínica é caracterizada como quebra do equilíbrio e alteração na proporção das espécies de micro-organismos que compõem a microbiota humana e está associada ao desenvolvimento de distúrbios digestivos agudos e/ou crônicos e doenças sistêmicas (GUADARRAMA-ORTÍZ et al., 2018).

Considerando-se o relevante papel metabólico do intestino e sua microbiota na saúde aliado a importância da adequação dietética na restauração deste microecossistema é crescente no meio científico o interesse por alimentos funcionais que permitam o reestabelecimento das funções gastrointestinais. Neste sentido, os

probióticos têm ganhado destaque como um promissor ingrediente alimentar (VALDOVINOS-GARCÍA et al., 2019).

Os probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem algum benefício para a saúde (FAO/WHO, 2002; HILL et al, 2014). No Brasil, o uso de probióticos em alimentos requer prévia avaliação da Anvisa, segundo requisitos da Resolução RDC nº 241, de 27 de julho de 2018. Esta avaliação contempla três elementos principais: comprovação inequívoca da identidade da linhagem do micro-organismo, de sua segurança e de seu efeito benéfico (BRASIL, 2021).

A produção de um alimento probiótico seguro e funcional requer a resistência das células durante a produção e armazenamento, a garantia de células bacterianas viáveis no momento do consumo e a posterior colonização da mucosa intestinal. A quantidade recomendada de probióticos que demonstra efeito sobre a saúde é de 10^8 - 10^9 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por dia, o que corresponde a 1 milhão a 10 milhões de células probióticas por mililitro ou grama do produto ou 10^6 - 10^7 UFC a cada 100 g de produto alimentar (CRUZ et al., 2009).

2.2.1– *Weizmannia coagulans*

A maioria dos micro-organismos probióticos, como cepas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e algumas espécies de *Saccharomyces*, sofrem uma redução significativa ao passar pelo tratamento térmico (KONURAY; ERGINKAYA, 2020). Neste sentido, há um grande interesse no uso de probióticos capazes de formar esporos devido às suas características de resistência a condições ambientais adversas (CAO et al., 2020).

Bactérias formadoras de esporos são um amplo grupo que contém tanto micro-organismos patógenos quanto benéficos à saúde (FIJAN; CONNIL, 2023). Endósporos ou esporos são estruturas metabolicamente inertes e extremamente resilientes e resistentes a estresses ambientais (radiação ultravioleta, desidratação, extremos de temperaturas, soluções desinfetantes e antibióticos). São compostos por núcleo, com um cromossomo condensado e inativo, um córtex rico em peptídeoglicano e uma ou mais camadas de material proteico, como revestimento (CUTTING, 2011). A sua germinação e retorno a forma bacteriana vegetativa ocorre

quando sinais químicos indicam que o esporo está em um ambiente propício a sua sobrevivência e crescimento (BUDDL; FAGAN, 2023).

Weizmannia coagulans é uma espécie bacteriana Gram-positiva, em forma de bastonetes, formadora de endosporos, anaeróbica facultativa a microaerófila, móvel, catalase positiva e oxidase negativa. É considerada termófila moderada e sua temperatura ideal de crescimento varia entre 35° C e 50° C. Os esporos conseguem resistir ao tratamento térmico à 90°C por 30 min. Existem várias cepas conhecidas, como: GBI-30, 6086; Unique IS-2; MTCC 5856; LBSC (DSM 17654); TBC169; SNZ 1969; BC30 e T11). A nomenclatura *Weizmannia* foi escolhida em homenagem ao Dr. Chaim Weizman (1874-1952), um notável bioquímico que foi um dos pioneiros no campo da microbiologia industrial (FIJAN; CONNIL, 2023; ZHANG et al., 2023).

W. coagulans foi classificada primeiro como *Lactobacillus esporogêneses* e posteriormente como *Bacillus coagulans* por apresentar características das duas classes. Mais recentemente, teve a sua taxonomia renomeada por Gupta et al., (2020) após análises filo genômicas e comparativas de mais de 300 genomas de *Bacillus*. Descobriu-se que este gênero se diferenciava pela presença de dois indels de assinatura conservados (CSIs) nas proteínas: acetato quinase e o-metiltransferase (ZHANG et al., 2023).

O consumo de *W. coagulans* é considerado seguro, sendo liberado pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA e a Autoridade de Segurança Alimentar da União Europeia (EFSA). Possui certificação pelas listas: Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS) e Presunção de Segurança Qualificada (QPS) e seu genoma já passou por sequenciamento, não sendo achado nenhum gene patogênico (POLO et al. 2022; SALVETTI et al., 2016). Na indústria de lácteos, *W. coagulans* tem grande importância por promover a coagulação do leite. Também é utilizada na acidificação de cereais enlatados, bem como na produção industrial de ácido láctico. Além de ser encontrada em suco de tomate, gelatina, preparações médicas e silagem (GUPTA et al., 2020).

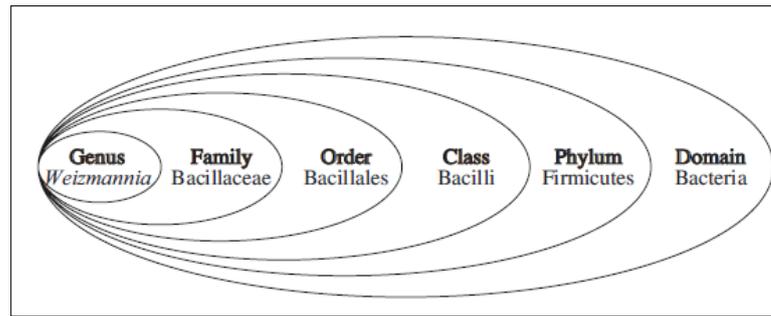


Figura 1: Taxonomia do gênero *Weizmannia*.

Fonte: ZHANG et al., 2023.

As cepas probióticas de *W. coagulans* GBI-30 além de resistirem melhor as condições do processamento e ao trânsito pelo trato gastrointestinal (ZHANG et al., 2023). Possuem vários efeitos benéficos à saúde, tais como: auxílio no tratamento de esteatose hepática (ABHARI et al., 2020), atenuação de sintomas digestivos em indivíduos com ou sem doenças inflamatórias intestinais (YANG et al., 2014) e estimulação do sistema imunológico (NYANGALE et al., 2015). Adicionalmente, exercem atividade efeito antibacteriana ao liberarem bacteriocinas (coagulina e surfactina) e auxiliam a digestão de carboidratos, peptídeos, ácidos graxos de cadeia curta, riboflavina e peróxido de hidrogênio (ALTUN; ERGINKAYA, 2021).

2.2.2- Queijo probiótico

Na última década, os alimentos funcionais enriquecidos com bactérias probióticas atingiram grande reconhecimento científico, sendo notório também o crescente interesse por parte dos consumidores e pela indústria de alimentos (SPERRY ET AL., 2018). Com isso, muitas pesquisas têm se empenhado na elaboração de novos produtos probióticos, principalmente entre as matrizes lácteas (CORDEIRO et al., 2021). Entretanto, um grande desafio no desenvolvimento de alimentos funcionais suplementados com culturas probióticas é a manutenção da viabilidade durante o processamento e a qualidade do produto durante a produção, sendo importante que a adição de probióticos não o diferencie sensorialmente do produto convencional (CRUZ et al., 2009).

Dentre os produtos lácteos, o queijo é um produto de amplo consumo em todo o país, sendo um alimento promissor para a indústria de alimentos funcionais e principalmente para inovações utilizando probióticos, uma vez que já é um alimento

que sofre interferência em todo o seu processo produtivo de bactérias lácteas (GRANATO et al, 2010). O queijo Minas frescal possui uma estrutura que beneficia a sobrevivência dos probióticos no trato gastrointestinal, pois o ambiente anaeróbio e a microencapsulação criados pelo complexo proteína- gordura do queijo protege o micro-organismo durante a passagem pela região ácida do estômago. Ademais, o pH elevado e a baixa acidez tornam o ambiente propício para o desenvolvimento do probiótico no produto (CORDEIRO ET AL., 2021). Sendo uma alternativa valiosa quando comparado a demais veículos, como leite fermentado e iogurte (SPERRY et al., 2018)

O queijo Minas frescal demonstrou ser melhor carreador de bactérias probióticas do que os queijos maturados por ser consumido fresco, ter uma vida útil curta e ser armazenado sob temperatura de refrigeração. Além disso, comprovou-se que queijos frescos produzidos com bactérias potencialmente probióticas obtiveram atributos sensoriais satisfatórios (CRUZ et al., 2009; DANTAS et al., 2016; ROLIM et al., 2020). Adicionalmente, a ingestão de queijo Minas frescal probiótico confere benefícios à saúde, como melhora de parâmetros metabólicos (SPERRY et al., 2018), imunológicos (CORDEIRO et al., 2021) e auxílio no controle da hipertensão (LOLLO et al., 2015). Por fim, estudos com queijos frescos utilizando *W. coagulans* em seu processamento são escassos, sendo relevante para a comunidade científica, a verificação dos efeitos da adição desta cepa em queijo Minas frescal.

3. JUSTIFICATIVA

Na atualidade, a busca por uma vida saudável concomitantemente com o interesse no consumo de alimentos que proporcionem benefícios à saúde tem aumentado consideravelmente na população. Portanto, a produção de gêneros alimentícios funcionais no Brasil é um mercado promissor.

Dentro desta categoria, os alimentos probióticos tem se destacado devido as diversas pesquisas que demonstram as vantagens do consumo destes micro-organismos para a saúde humana. Entretanto, os métodos de processamento e até mesmo o processo digestório podem afetar a viabilidade dessas bactérias. Portanto, a utilização de bactérias formadoras de esporos em produtos alimentícios é considerada inovadora. Além disso, os estudos envolvendo a adição de *W. coagulans*

como ingrediente probiótico em produtos lácteos são escassos e o queijo Minas frescal possui características que permitem diversas inovações.

Portanto, este estudo é pioneiro em avaliar a suplementação com *W. coagulans* em um queijo fresco. Elaborar um produto inovador no mercado e analisar suas características, favorece o crescimento do setor lácteo no país e justifica o desenvolvimento desta pesquisa.

4. OBJETIVOS

4.1- Objetivo geral

Objetivou-se com o presente trabalho investigar o efeito da adição da cultura probiótica formadora de esporo *W. coagulans* GBI-30, em diferentes concentrações, nas características físico-químicas e microbiológicas do queijo Minas frescal durante a validade comercial do produto.

4.2- Objetivos específicos

- Desenvolver quatro queijos Minas frescal com formulações distintas: QC – sem probiótico (controle); QI, QII e QIII – com probiótico (6, 8 e 10 log UFC/g, respectivamente).
- Avaliar o efeito da adição de *W. coagulans* GBI-30 em diferentes concentrações nas características físico-químicas (composição centesimal – umidade, proteína e gordura; pH; atividade proteolítica e geração de compostos bioativos) dos queijos Minas frescal, durante o período de armazenamento sob refrigeração;
- Analisar a viabilidade de *W. coagulans* GBI-30 durante a estocagem refrigerada no queijo Minas frescal, bem como sua sobrevivência durante a passagem pelo trato gastrointestinal;
- Avaliar a capacidade antimicrobiana da cepa probiótica *W. coagulans* GBI-30 frente a diferentes cepas patogênicas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1- Material

Para o experimento foi utilizado o leite integral pasteurizado, com registro no SIF, adquirido no comércio local e a bactéria probiótica formadora de esporos *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086, proveniente de Geneden Biotech na forma seca por pulverização.

5.2- Métodos

5.2.1- Processamento do Queijo Minas frescal:

O processamento do queijo foi realizado conforme metodologia proposta por Rocha et al., (2020) com modificações, conforme fluxograma ilustrado na figura 2. Foram utilizados 4 litros de leite pasteurizado integral (3% gordura, Itaocara, Rio de Janeiro, Brasil) separados em quatro partes com posterior aquecimento até 35 – 37°C. Na sequência, foram adicionados cloreto de cálcio 40 % (30 mL/100 L, Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), ácido láctico 85% (0,4 mL/L, Macalé) e coalho de quimosina (8 mL/10 L, HA LA, Chr Hansen, Valinhos, São Paulo, Brasil), seguido de mistura lenta. Após 45 minutos, foi realizado o corte da massa em cubos de aproximadamente 2 cm com posterior mexedura lenta por 5 minutos, com dois intervalos de 5 minutos para repouso entre as séries, para facilitar a sinérese (saída do soro da massa). A seguir, foram realizadas as etapas de dessoragem parcial, adição de cloreto de sódio (1 % sobre o volume do leite, Cisne, Rio de Janeiro, Brasil) e adição da cultura probiótica *W. coagulans* GBI-30, 6086 (nos queijos QI, QII e QIII), seguido de repouso por 30 minutos. Decorrido esse período, foram realizadas as etapas de dessoragem total e enformagem (5 °C por 30 minutos) seguida de duas viragens, uma a cada 30 minutos, e armazenamento em sacos plásticos de polietileno sob refrigeração (5 °C), durante 24 horas para realização das análises físico-químicas e microbiológicas.

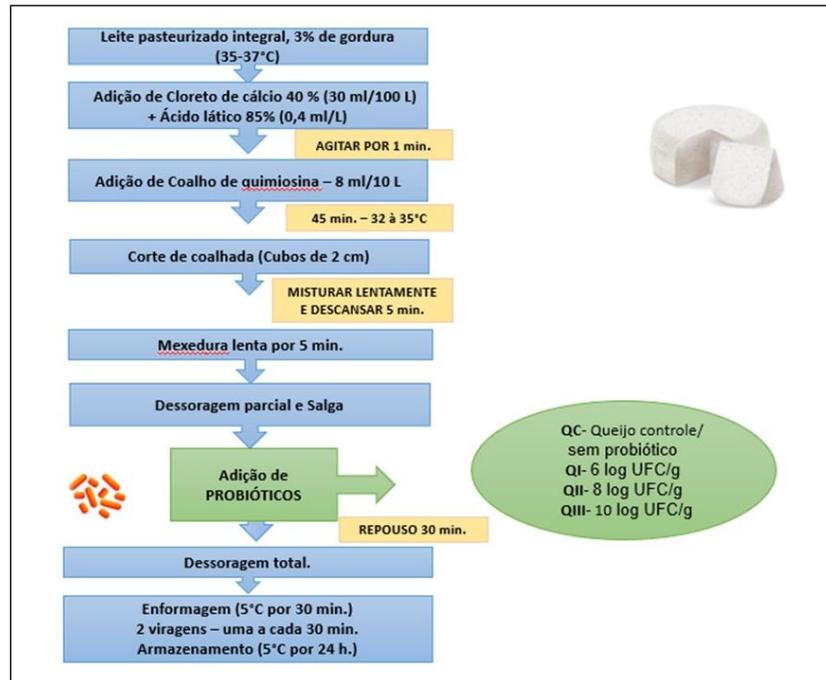


Figura 2 – Fluxograma do desenvolvimento do queijo Minas frescal probiótico.

5.2.2- Análise Microbiológica:

Segundo SOUZA (2008), o queijo Minas frescal deve ser consumido em até 15 dias após a data de sua produção, mesmo sob refrigeração, por ser um produto altamente perecível. Sendo assim, as análises microbiológicas compreenderam a contagem da viabilidade celular probiótica no queijo Minas frescal nos dias 1, 7 e 14 de estocagem refrigerada e a verificação da sobrevivência de *W. coagulans* GBI-30 durante as condições gastrointestinais simuladas. Para verificar a viabilidade da cepa probiótica, as amostras foram preparadas pesando-se 25 g de QI, QII e QIII, posteriormente homogenizados em sacos plásticos tipo *Stomacher* com 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v). Após a homogeneização, as amostras foram submetidas a aplicação de choque térmico (80 °C/10 min) seguido de resfriamento imediato em banho de gelo. Posteriormente, foram realizadas diluições decimais em série utilizando água peptonada 0,1% (p/v). As alíquotas das diluições seriadas foram inoculadas em meio de cultura seletivo apropriado (Glucose yeast extract agar, Himedia, India, Brazil) utilizando a técnica *pour plate* e incubadas a 40 °C em aerobiose por 48 horas (SOARES et al., 2019).

A viabilidade das cepas de *W. coagulans* GBI-30 no trato gastrointestinal em simulação experimental (exposição ao pH ácidos e sais biliares) foi realizada de acordo com protocolo de Silva et al., (2018). Amostras de 1g de queijo homogeneizadas com 9 ml de solução gástrica foram colocadas em tubos de ensaio. Para reproduzir a fase gástrica, o pH foi ajustado para 2,0 -2,3 usando HCL estéril 0,5 mol.L e adicionado pepsina estéril (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. EUA) e lipase (Amano lipase F-AP15; Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI, EUA) à solução gástrica para atingir concentrações de 3 g/L e 0,9 mg/L, respectivamente, seguido de incubação a 37°C por 30 min. Posteriormente, 1 ml transferido para tubos contendo 9 ml de solução intestinal. Na fase entérica, o pH foi ajustado para 7,0–8,0 com uma solução alcalina estéril composta por bile e pancreatina em concentrações de 10 e 1 g/L, respectivamente, e incubadas a 37 °C por 60 min. A contagem microbiana foi feita de acordo com a metodologia anteriormente descrita (item 6.2.2) para análise da viabilidade ao longo do período de armazenamento.

5.2.3- Análises físico-químicas

As diferentes formulações de queijo Minas foram avaliadas quanto a composição centesimal (umidade, proteína e gordura), pH, atividade proteolítica, presença de ácidos orgânicos e aos compostos bioativos. Com exceção da composição centesimal, todas as análises foram realizadas nos dias 1, 7 e 14 dias de estocagem refrigerada.

a) Composição centesimal, análise de pH e atividade proteolítica

Os parâmetros de composição nutricionais avaliados foram umidade, gordura e proteína de acordo com os métodos oficiais (BRASIL, 2006). A umidade foi determinada por gravimetria (secando 5g da amostra a 100-105° C por 24 horas). A gordura foi determinada pelo método de Gerber e a proteína quantificada pelo método Kjeldahl (em duplicata), multiplicando em seguida o teor de nitrogênio pelo fator 6,38 (AOAC International, 2006).

A medição de pH foi realizada utilizando um medidor de pH digital (Digimed, Piracicaba, Brasil), com a inserção do eletrodo diretamente nas amostras. E a proteólise foi determinada por reação com solução reativa (reagente o- ftalaldeído,

OPA) e quantificação dos aminoácidos e peptídeos liberados pelas culturas lácticas após absorção de OPA a 340 nm (DANTAS et al., 2016).

b) Compostos bioativos

A atividade antioxidante das amostras de queijo foi determinada através da metodologia descrita por Ferreira et al. (2019), mediante capacidade redutora do 1,1 – difenil- 2- picrilhidrazil (DPPH). A inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) foi avaliada conforme metodologia proposta por Ayyash et al. (2018) e Cappato et al. (2018). Enquanto a inibição das enzimas α -amilase e α - glucosidase foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Ayyash et al. (2018) e Ferreira et al. (2019).

c) Ácidos orgânicos

A produção de ácidos orgânicos (lático e acético) e concentração de lactase foram verificadas mediante cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando coluna Aminex X-87H (300 mm Rad 7.8 mm.) e coluna de guarda contendo cartuchos H⁺ descartáveis a 65 °C (Laboratórios Bio- Rad, Richmond, CA, EUA). A fase móvel foi ácido sulfúrico (0,009 mol/L), previamente diluído em água ultrapura (Sistema Milli-Q, Millipore Corporation, Billerica, MA) em seguida filtrado e desgaseificado através de um filtro de membrana 0.45 μ m (Millipore, Merck, São Paulo). A vazão será de 0,6 mL/min e a detecção UV-VIS (Laboratórios Bio- Rad, Richmond, CA, EUA) realizada em 220 nm, com injeção de volume de 25 μ L. Preparados padrões de ácidos lático e acético, os picos cromatográficos foram integrados utilizando o software Millenium (Scientific Equipment Source, Oshawa, Canadá) segundo metodologia descrita por Dantas et al. (2016).

5.2.4- Atividade antibacteriana *in vitro*

Para a avaliação da atividade antibacteriana dos queijos probióticos foram utilizadas as seguintes cepas patogênicas como culturas indicadoras: *Escherichia coli* ATCC (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e *Salmonella enterica* (*S. enterica*), todas provenientes de isolados clínicos. Neste estudo, a cepa não patogênica *Listeria innocua* (*L. innocua*) foi utilizada como substituta da *Listeria monocytogenes*. A

metodologia utilizada foi conforme descrita por Larosa et al., (2005), sendo realizada em três etapas.

1- Ativação das bactérias: As cepas foram ativadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Acumedia® 7116A) a 37°C durante 24 horas, sendo posteriormente coradas por Gram, para que fosse avaliada a precisão através da avaliação microscópica. Em seguida, foram transferidas para placas de Petri com diferentes composições de ágar. Para *E.coli* - ágar MacConkey Sorbitol (Acumedia®), *L. innocua* - Oxford Selective Listeria (Merck®), *S. aureus* - Ágar seletivo Baird-Parker (Merck®) e *S. entérica*- ágar Salmonella-Shigella (SS). Sendo realizada em triplicata.

2- Preparo das colônias patogênicas: Utilizando a escala nefalométrica de McFarland (densidade óptica de 0,5), a concentração das bactérias patogênicas foi ajustada para 10⁸ UFC/mL.

3- Ensaio de atividade antibacteriana: Extratos de queijos probióticos foram preparados pesando-se 1 g dos queijos de QC, QI, QII e QIII + 9 ml de água peptonada. Em seguida, as amostras foram centrifugadas em vórtex a 10.000 × g por 20 min. a 4°C, ajustadas quanto ao pH (com NaOH) e filtradas com filtro de poro 0,22mm. Com o auxílio de um swab, as amostras das culturas indicadoras foram semeadas por *spread plate* (espalhamento) em placas de Petri contendo ágar Müeller Hinton, . Em seguida, os extratos dos queijos probióticos (30 µL) foram inoculados em quatro poços equidistantes e, na sequência, as placas foram incubadas a 37° C por 24-48 h para posterior observação da presença de halos de inibição (medidos com halômetro).

5.2.5- Análise estatística:

Todo os processamentos ocorreram em triplicata experimental e no mínimo, duplicata analítica. Os resultados foram avaliados através de Análise de Variância pelo sistema de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade e os dados processados e tabulados pelo Software XLSTAT 2019.2.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1- Viabilidade e sobrevivência de *W. coagulans* ao trato gastrointestinal

A viabilidade bacteriana é uma condição essencial para que os efeitos benéficos, associados ao seu consumo sejam observados (HILL et al., 2014). Na figura 3 é possível verificar as contagens microbianas durante a vida útil do queijo Minas Frescal em temperatura de refrigeração por 14 dias (gráfico A), assim como a sua sobrevivência durante a passagem pelo trato gastrointestinal (gráfico B).

W. coagulans apresentou boa sobrevivência e tolerância às condições gastrointestinais durante todo o tempo de armazenamento. A sobrevivência dos probióticos demonstrou ser constante e proporcional a quantidade de probióticos adicionado nas amostras com variação entre 6,12-6,71; 7,34-7,89; 8,12-8,56 e 8,02-6,12, 7,15-7,77 e 8,10-8,52 log UFC/g para QI, QII e QIII, respectivamente, ($p > 0,05$).

Este resultado confirma que o queijo Minas frescal é uma excelente matriz alimentar para manter a viabilidade probiótica e proteger contra condições adversas do trato gastrointestinal. Adicionalmente, ratifica a resistência de *W. coagulans* à ácidos e sais biliares descrita na literatura (DRAGO E VECCHI, 2009; CAO et al, 2020).

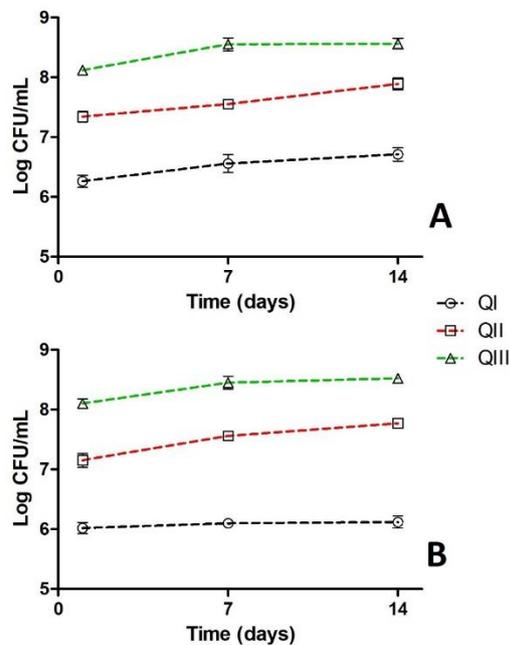


Figura 3 - Gráfico A: Viabilidade de *W. Coagulans* GBI-30. Gráfico B: Sobrevivência ao GIT de *W. Coagulans* GBI-30.

Ademais, os queijos adicionados de *W. coagulans* possuem características de produto probiótico, uma vez que pela legislação, a concentração exigida é de 10^6 a 10^7 UFC/g ou mL no alimento (ANVISA, BRASIL, 2008), durante o seu tempo de armazenamento até a sua ingestão pelo consumidor, sendo a adição de *W. coagulans* uma interessante estratégia para o desenvolvimento de um queijo funcional.

Endres et al., (2009), avaliaram a segurança toxicológica do uso de *W. coagulans* por humanos. Verificou-se que doses de até 11 log UFC/g deste micro-organismo são seguras e bem toleradas em indivíduos de 70 kg, o que reforça que todos os tratamentos dos queijos deste estudo podem ser considerados produtos probióticos confiáveis para o consumidor.

6.2- Composição centesimal

Na Tabela 1, constam os valores da composição média físico-química dos queijos. De acordo com os dados obtidos, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos quanto aos teores de umidade, gordura e proteína que estão em conformidade com os valores estabelecidos pela legislação vigente para queijo Minas (BRASIL, 1997).

Tabela 1 – Composição físico-química dos diferentes tratamentos de queijos Minas Frescal ao longo do tempo de armazenamento

Determinação	QC	QI	QII	QIII
Umidade (%)	66,3 ± 1,21 ^a	66,1 ± 1,11 ^a	66,9 ± 1,09 ^a	65,9 ± 1,06 ^a
Gordura (%)	15,7 ± 1,11 ^a	15,6 ± 1,02 ^a	15,8 ± 1,21 ^a	15,3 ± 1,09 ^a
Proteínas (%)	16,3 ± 1,02 ^a	16,2 ± 1,23 ^a	16,1 ± 1,15 ^a	16,5 ± 1,08 ^a

Onde letras iguais na mesma linha indicam que não existe diferença significativa ao nível de 5% de significância ($p > 0,05$). Valores médios resultantes de triplicatas com os respectivos desvio padrão.

Reitera-se que processo de elaboração do queijo foi o mesmo para todos os tratamentos, variando-se apenas a concentração da bactéria *W. coagulans* adicionada. Portanto, tais resultados indicam que o probiótico não exerceu atividade significativa sobre os principais componentes do queijo e, conseqüentemente, não alterou os aspectos nutricionais do produto. Da mesma forma, Dantas et al., (2016), Cordeiro et al., (2021) e Silva et al., (2021) reportaram que o queijo Minas frescal não

teve a sua composição afetada pelas cepas probióticas *Lactobacillus casei* Zhang, *Lactococcus lactis* NCDO 2118 e *Bifidobacterium animalis*, respectivamente.

6.3- Ácido Lático, Ácido Acético e Lactose

W. coagulans é uma bactéria hetero fermentativa capaz de produzir ácidos orgânicos, como lático e acético ao fermentar a lactose (ALTUN; ERGINKAYA,2021). Na figura 4 estão ilustrados os resultados dos ensaios de HPLC. Os resultados apontam que a produção destes ácidos foi constante e diretamente proporcional à adição da cepa probiótica (gráficos A e B). Além disso, observa-se um declínio da concentração de lactose e queda dos valores de pH dos queijos experimentais (gráficos C e D) à medida que a população de micro-organismos na matriz alimentar aumentou, indicando que as bactérias probióticas se apresentavam metabolicamente ativas ($p < 0.05$).

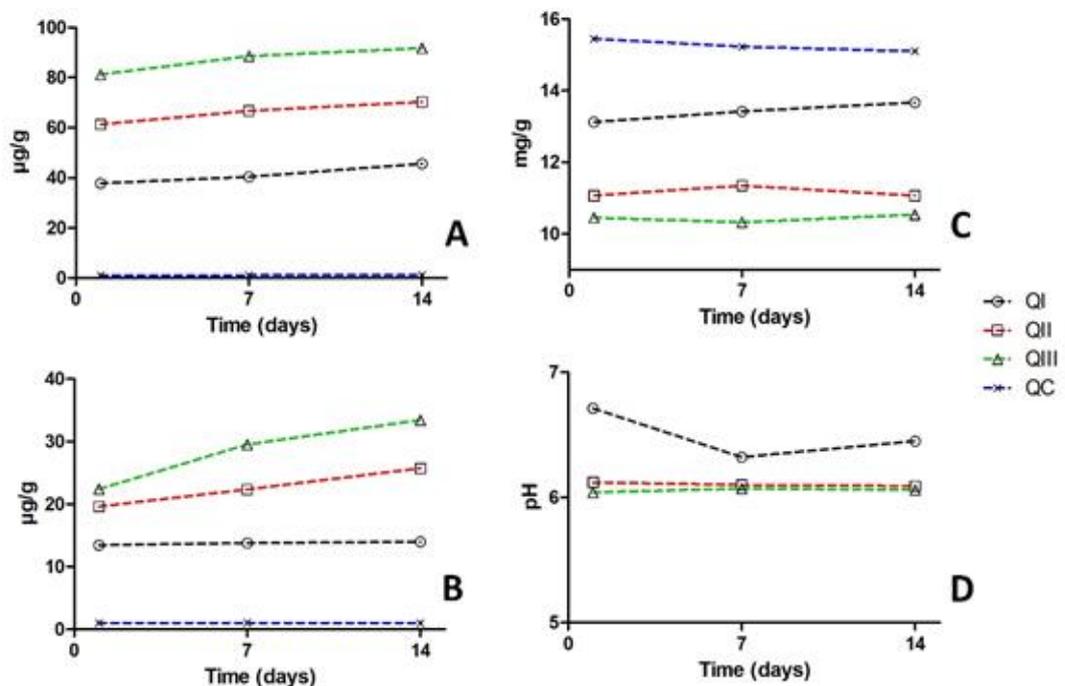


Figura 4- Metabólitos microbianos A: ácido lático. B: ácido acético e C: concentração de lactose D: pH nos queijos controle e probióticos.

Os ácidos orgânicos produzidos por *W. Coagulans* conferem benefícios à saúde humana por transformarem o ambiente intestinal em um meio ácido inapropriado para o desenvolvimento de cepas bacterianas patogênicas (FARAG et al, 2020; FIJAM;CONIL, 2023; ZANG et al, 2023). Além disso, diversos estudos relatam que o ácido lático possui a capacidade de promover reparo de células epiteliais do intestino, sendo o consumo deste produto probiótico de grande proveito para o tratamento de desordens do trato digestório (CAO et al., 2020; MARK et al., 2016; VAN DER POL et a.l, 2016). No entanto, a produção aumentada de ácido acético pode conferir características sensoriais desagradáveis, sendo necessária a realização de pesquisas futuras voltadas para a percepção sensorial desse produto pelo consumidor.

6.4- Compostos bioativos

As proteínas lácteas são consideradas uma das principais fontes de peptídeos bioativos na nossa dieta (KORHONEN; HANNU, 2009). Estas moléculas são liberadas através da hidrólise da caseína do leite por ação enzimática, fermentação e maturação. O uso de culturas adjuntas, ou seja, cepas bacterianas com propriedades proteolíticas, na fabricação de queijos tem sido utilizado devido a sua capacidade de acentuar a produção destas substâncias biologicamente ativas (BAPTISTA et al, 2018).

Segundo KELLER (2019) e ZANG (2023), *W. coagulans* possui enzimas proteolíticas que promovem a quebra de proteínas em moléculas peptídicas menores e aminoácidos livres, podendo favorecer a formação de peptídeos bioativos.

A produção de peptídeos bioativos analisada no estudo está representada na figura 5, compreende: Gráfico A- Atividade antioxidante (DDPH), gráfico B - atividade inibitória da Enzima Conversora de Angiotensina/anti-hipertensiva (ACE) e nos gráficos C e D- efeito antidiabético (enzimas alfa-amilase e alfa glucosidase). Pode-se observar que os queijos probióticos (QI, QII e QIII) apresentaram valores mais elevados de DDPH, ACE e de alfa-amilase/ alfa glucosidase, quando comparados ao queijo convencional (QC), demonstrando significativa atividade proteolítica da cepa probiótica. Além disso, ao longo do período de estocagem refrigerada, houve um aumento na concentração dos peptídeos bioativos proporcionalmente à concentração das bactérias probióticas na matriz alimentar (QIII> QII > QI) e, isto pode ser observado no gráfico pela inclinação das retas. Enquanto no queijo

sem probiótico – controle (QC) a reta se manteve estável ($p < 0.05$) durante os 14 dias. Estes dados também são confirmados pela elevação da reta da proteólise (gráfico E), concluindo que há atividade metabólica de *W. coagulans* ao longo da validade comercial.

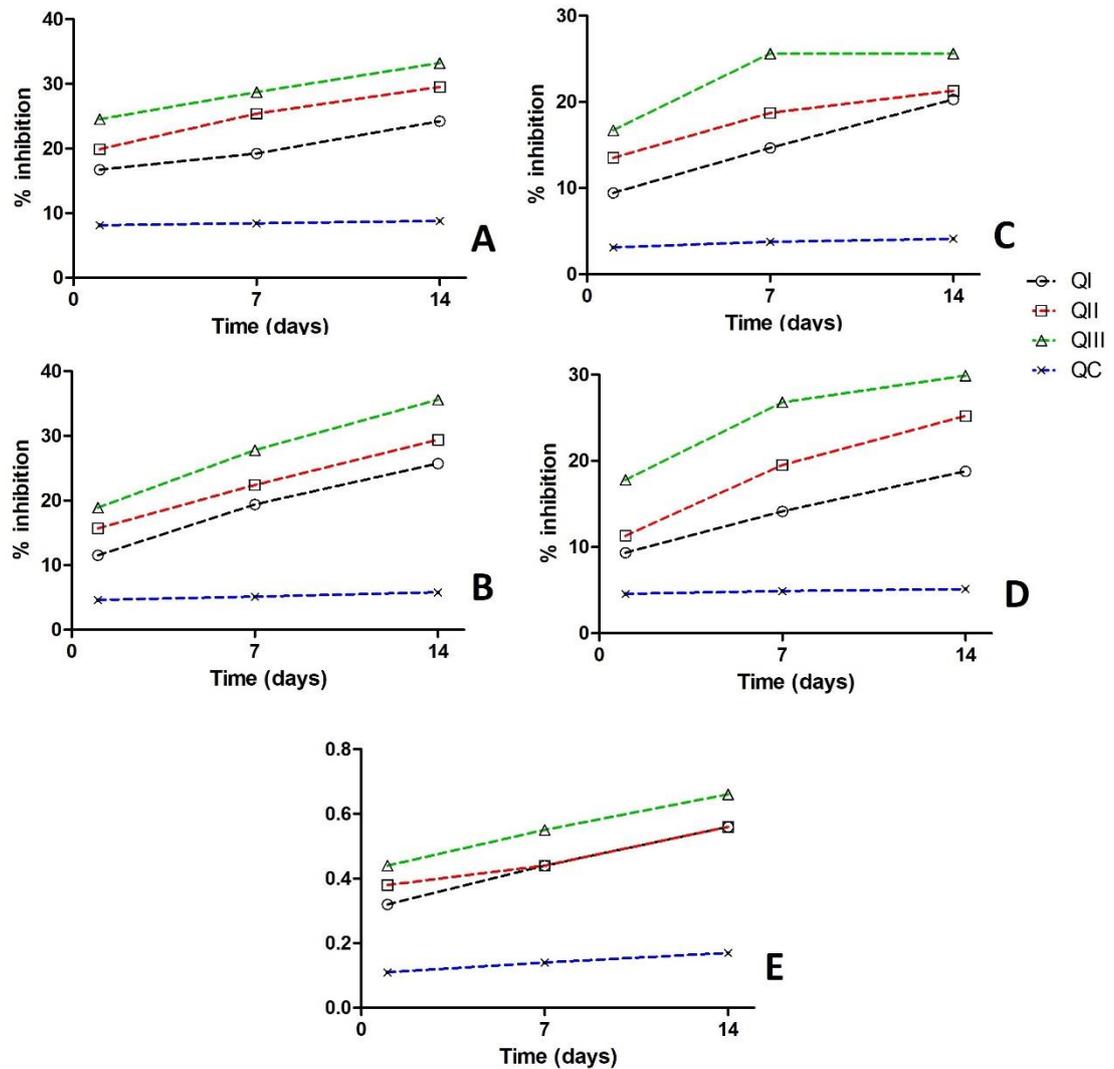


Figura 5 – Compostos bioativos A: DPPH; B: ACE; C: Alfa-amilase; D: Alfa-glucosidase e E: Proteólise nos queijos controle e probióticos.

6.5- Atividade antibacteriana *in vitro*

Os benefícios terapêuticos de *W. coagulans* também estão relacionados a sua capacidade de produzir compostos antimicrobianos, principalmente contra bactérias Gram-positivas patogênicas e com grandes implicações na transmissão de doenças veiculadas por alimentos (DVA), como *S. aureus*, *E. coli*, *S. enterica* e *L. innocua* (ALTUN; ERGINKAYA, 2021; CAO et al., 2020).

Na tabela 2 estão inseridos os dados da atividade antibacteriana de *W. coagulans* contra a proliferação das cepas patogênicas através da aferição do diâmetro das zonas (halos) de inibição em meios de cultura adicionados com os extratos dos queijos experimentais (QC, QI, QII e QIII). Segundo PURUTOĞLU (2020), as zonas de inibição < 2 mm estão associadas a uma atividade inibidora fraca, 2–5 mm a atividade média e > 5 mm para alta inibição de patógenos.

Tabela 2: Atividade antibacteriana dos queijos probióticos.

Halos de inibição (mm)				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enterica</i>	<i>L. innocua</i>
QC	0,1- 0,15	0,1- 0,15	0,1- 0,15	0,1- 0,15
QI	0,6- 1,2	0,6- 2,4	0,6- 1,1	0,6 - 1,2
QII	0,6- 1,8	1,8- 2,4	1,2- 1,8	1,2- 1,8
QIII	1,2- 1,8	2,4- 3	2,4	1,8

Foi possível observar uma atividade antimicrobiana baixa contra as cepas de *S. aureus* e *L. innocua*, enquanto houve uma atividade média contra *S. enterica* e *E. coli* (figura 6). Entretanto, a atividade antibacteriana foi acentuada conforme se aumentou a concentração de *W. coagulans*, enquanto no QC, esta atividade se apresentou irrelevante em ambos os ensaios de antagonismo. É importante destacar que neste estudo foi avaliada a atividade antimicrobiana do queijo e não do micro-organismo isolado.

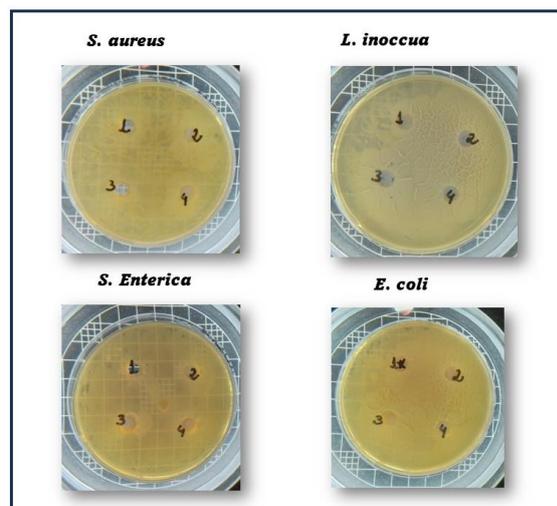


Figura 6: Meios de cultura para análise da atividade antibacteriana de *W. Coagulans* contra cepas patogênicas.

7- CONCLUSÃO

Conforme mencionado anteriormente, o mercado de alimentos funcionais probióticos é uma área de grande interesse pela indústria de alimentos devido a ampla divulgação dos seus benefícios à saúde pela comunidade científica, O uso do queijo como transportador de bactérias probióticas apresenta vantagens, como: Matriz alimentar favorável ao desenvolvimento das bactérias e possibilidade de diversificação da oferta de produtos, que atendam ao interesse dos consumidores, pela indústria leiteira. O uso de espécies de *Bacillus* (com destaque para o gênero reclassificado taxonomicamente como *Weizmannia* em 2020) em alimentos funcionais probióticos está se expandindo rapidamente com o aumento do número de estudos que demonstram seus efeitos como promotores de saúde, estimulação imunológica e atividades antimicrobianas .

Neste estudo, percebemos que cepas de *W. coagulans* GBI-30 apresentaram-se como potencial opção para fabricação de queijo Minas Frescal, pois não geraram alterações em seus aspectos nutricionais, além de contribuírem para a formação de peptídeos com atividades biológicas, que são moléculas de grande relevância para a saúde humana, oriundas do consumo de queijos. Também podemos observar que a quantidade adicionada de cepas de *W. coagulans* nos diferentes tratamentos (QI, QII e QIII) foi satisfatória para a produção de produtos classificados como probióticos, segundo a legislação (10^6 a 10^7 UFC/g ou mL no alimento), mesmo durante o tempo de armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal. Confirmando o benefício da utilização de bactérias formadoras de esporos no processamento de queijos.

De forma interessante, *W. coagulans* demonstrou importante atividade antibacteriana quando adicionado em queijo Minas frescal, pois contribuiu para o aumento da produção de ácidos orgânicos (lático e acético) e conseqüente queda do pH, o que dificulta a proliferação de bactérias deterioradoras na matriz alimentar e, no ambiente intestinal, contribui para uma exclusão competitiva de bactérias patogênicas. Ademais, apresentou importante efeito antagonista à proliferação de bactérias causadoras DVAS (principalmente conta *Salmonella* e *E. coli*) .

Portanto, a utilização de *W. coagulans* GBI-30 em queijo Minas frescal possui diversas vantagens, pois é um produto de grande consumo no Brasil, considerado um alimento típico da região sudeste e de valor mais acessível, frente as diversas opções de queijos. Além disso, estudos com *W. coagulans* ainda são escassos em lácteos no

Brasil, sendo assim, esta pesquisa também tem o intuito de incentivar a produção de novos produtos alimentícios empregando como inovação a adição de cepas formadoras de esporos, uma vez que sua resistência e contribuição para a saúde humana são reputadas.

8- DESENVOLVIMENTO:

Durante a primeira etapa do desenvolvimento do trabalho foi realizada a revisão de literatura que resultou na elaboração de dois artigos técnicos. Ambos publicados no periódico técnico-científico que pertence ao Departamento de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), intitulados: Benefícios conferidos à saúde através do consumo de queijos probióticos; Bactérias esporuladas probióticas em produtos lácteos: Características tecnológicas e benefícios à saúde.

Neste momento, após concluída a etapa experimental do trabalho, encontra-se em elaboração o artigo científico experimental com o objetivo de publicação no periódico internacional Food Microbiology, cujo título é: Minas cheese with different concentrations of wezmannia coagulans: Physical, chemical and microbiological aspects.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHARI, Khadijeh et al. Is *Bacillus coagulans* supplementation plus low FODMAP diet superior to low FODMAP diet in irritable bowel syndrome management?. *European journal of nutrition*, v. 59, p. 2111-2117, 2020.

ALTUN, Gözde Konuray; ERGINKAYA, Zerrin. Identification and characterization of *Bacillus coagulans* strains for probiotic activity and safety. *LWT*, v. 151, p. 112233, 2021.

ANDRADE, Dayana Pereira et al. Microencapsulation of presumptive probiotic bacteria *Lactiplantibacillus plantarum* CCMA 0359: Technology and potential application in cream cheese. *International Dairy Journal*, v. 143, p. 105669, 2023

AOAC. Association of Official Analytical Chemists International. Official methods of analysis of AOAC international (18th ed.). Gaithersburg (MD): AOAC International (2006).

AYYASH, M., Al-Nuaimi, A. K., Al-Mahadin, S., & Liu, S. Q. (2018). In vitro investigation of anticancer and ACE-inhibiting activity, α -amylase and α -glucosidase inhibition, and antioxidant activity of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. *Food Chemistry*, 239, 588–597.

BALTHAZAR, C. et al. Sheep milk: physicochemical characteristics and relevance for functional food development. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, Wiley Online Library, v. 16, n. 2, p. 247–262, 2017.

BAPTISTA, Débora Parra et al. *Lactobacillus helveticus* LH-B02 favours the release of bioactive peptide during Prato cheese ripening. *International Dairy Journal*, v. 87, p. 75-83, 2018.

BRASIL. Agência Brasileira de Vigilância Sanitária - Anvisa. Alimentos com reivindicações sanitárias, novos alimentos/ingredientes, compostos bioativos e probióticos. .2008 Disponível em http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm

BRASIL. Agência Brasileira de Vigilância Sanitária – Anvisa. GUIA PARA INSTRUÇÃO PROCESSUAL DE PETIÇÃO DE AVALIAÇÃO DE PROBIÓTICOS PARA USO EM ALIMENTOS. Brasília. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. PORTARIA Nº 352, DE 4 DE SETEMBRO DE 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. Diário Oficial da União, Brasília, DF. 04 Setembro 1997

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 14 dez. 2006.

BUDDLE, Jessica E.; FAGAN, Robert P. Pathogenicity and virulence of *Clostridioides difficile*. *Virulence*, v. 14, n. 1, p. 2150452, 2023.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. PORTARIA Nº 352, DE 4 DE SETEMBRO DE 1997. REGULAMENTO TÉCNICO PARA FIXAÇÃO DE IDENTIDADE E QUALIDADE DO QUEIJO MINAS FRESCAL. Diário Oficial da União, Brasília, 08 de setembro de 1997.

CAO, J. et al. Probiotic characteristics of *Bacillus coagulans* and associated implications for human health and diseases. *Journal of Functional Foods*, Elsevier, v. 64, 2020.

CAPPATO, L. P. et al. Whey acerola-flavoured drink submitted ohmic heating: Bioactive compounds, antioxidant capacity, thermal behavior, water mobility, fatty acid profile and volatile compounds. *Food Chemistry*, Elsevier, v. 263, p. 81–88, 2018.

CORASSIN, C.H; CRUZ, A.G.; ZACARCHENCO, P.B . OLIVEIRA et al. Processamento de produtos lácteos: queijos, leites fermentados, bebidas lácteas, sorvete, manteiga, creme de leite, doce de leite, soro em pó e lácteos funcionais. 2017.

CORDEIRO, Bárbara F. et al. Therapeutic effects of probiotic minas frescal cheese on the attenuation of ulcerative colitis in a murine model. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 623920, 2021.

CRUZ, Adriano Gomes da et al. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science & Technology*, v. 20, n. 8, p. 344-354, 2009.

CUTTING, Simon M. Bacillus probiotics. *Food microbiology*, v.28. n.2, p. 214-22, 2011.

DANTAS, A. B. et al. Manufacture of probiotic minas frescal cheese with lactobacillus casei zhang. *Journal of dairy science*, Elsevier, v. 99, n. 1, p. 18–30, 2016.

DARGÈRE, A. F. et al. Artisanal Minas cheese parameters associated with regions of origin in Minas Gerais, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 75, p. 395-406, 2023.

DRAGO, E., & Vecchi, D. Should Lactobacillus sporogenes and Bacillus coagulans have a future? *Journal of Chemotherapy*, v.21, n.4, p.371–377, 2009.

EMBRAPA. Newsletter do Observatório do consumidor. Centro de inteligência do Leite. Ano 2, nº 19- Setembro 2023. Disponível em: <https://observatoriodoconsumidor.cnpq.embrapa.br/newsletter/22/setembro-2023>. Acesso em: 23 de outubro de 2023.

ENDRES, J. R. et al. Safety assessment of a proprietary preparation of a novel Probiotic, Bacillus coagulans, as a food ingredient. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, n. 6, p. 1231-1238, 2009.

FARAG, Mohamed A. et al. The many faces of kefir fermented dairy products: Quality characteristics, flavour chemistry, nutritional value, health benefits, and safety. *Nutrients*, v. 12, n. 2, p. 346, 2020.

FERREIRA, M. V. S., Cappato, L. P., Silva, R., Rocha, R. S., Guimarães, J. T., Balthazar, C. F., & Neto, R. P. (2019). Ohmic heating for processing of whey-raspberry flavored beverage. *Food Chemistry*, v. 297, p. 125018, 2019.

FIJAM, S; FIJAN, T; CONNIL, N. Overview of Probiotic Strains of *Weizmannia coagulans*, Previously Known as Bacillus coagulans, as Food Supplements and Their Use in Human Health. *Appl. Microbiol.* 2023, v. 3, p. 935-947. 2023

FOOD; ORGANIZATION, A. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. [S.I.], 2002.

FOOD; ORGANIZATION, A. *The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA)*. [S.I.], 2018.

FOX, P.F.; MCSWEENEY, P.L.H. RENNETS: Their role in milk coagulation and cheese ripening. In: LAW, B.A. (Ed.). Londres: Chapman and Hall . Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk. 2. ed., p.1-49, 1997

GAO, J. et al. Probiotics in the dairy industry—advances and opportunities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Wiley Online Library, 2021.

GUADARRAMA-ORTÍZ, Parménides et al. Probióticos¿ coadyuvantes en el tratamiento médico?. *Medicina interna de México*, v. 34, n. 4, p. 574-581, 2018.

GIBSON, Glenn R.; FULLER, Roy. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *The Journal of nutrition*, v. 130, n. 2, p. 391S-395S, 2000.

GUPTA, R.S.; PATEL, S.; SAINI, N.; CHEN, S. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: Description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 70, p. 5753–5798, 2020

HILL, C. et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 2014.

HORWITZ, W. et al. *Official methods of analysis of AOAC International*. [S.l.]: Gaithersburg (Maryland): AOAC International, 1997., 2010. v. 1.

KAPOOR, Rohit; METZGER, Lloyd E. Process cheese: Scientific and technological aspects—A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 7, n. 2, p. 194-214, 2008.

KELLER, D. et al. Spores of *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 show high germination, survival and enzyme activity in a dynamic, computer-controlled in vitro model of the gastrointestinal tract. *Beneficial Microbes*, Wageningen Academic Publishers, v. 10, n. 1, p. 77–87, feb 2019.

KELLER, Mette Kirstine et al. Co-aggregation and growth inhibition of probiotic lactobacilli and clinical isolates of mutans streptococci: an in vitro study. *Acta Odontologica Scandinavica*, v. 69, n. 5, p. 263-268, 2011.

KONURAY, Gözde; Erginkaya, Zerrin. Quality evaluation of probiotic pasta produced with *Bacillus coagulans* GBI-30. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 66, p. 102489, 2020

KORHONEN, HANNU J. Bioactive componentes in bovine milk. In: *Bioactive componentes in milk and Dairy products*, p 15-42, 2009.

LEE, N.-K. et al. Physicochemical and antioxidant properties of cheddar-type cheese fortified with inula britannica extract. *Journal of dairy science*, Elsevier, v. 99, n. 1, p. 83–88, 2016.

LOLLO, Pablo CB et al. Hypertension parameters are attenuated by the continuous consumption of probiotic Minas cheese. *Food Research International*, v. 76, p. 611-617, 2015.

LAROSA, Cristiane P. et al. Can sucrose-substitutes increase the antagonistic activity against foodborne pathogens, and improve the technological and functional properties of sheep milk kefir?. *Food Chemistry*, v. 351, p. 129290, 2021

MARCO, M. L. et al. Should there be a recommended daily intake of microbes? *The Journal of nutrition*, Oxford University Press, v. 150, n. 12, p. 3061–3067, 2020.

MARK, S.OU, et al. Sweet sorghum juice and bagasse as feedstocks for the production of optically pure lactic acid by native and engineered *Bacillus coagulans* strains. *BioEnergy Research*, v. 9, p. 123-131, 2016.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro de Agropecuária. Portaria 2141, de 19 de abril de 2022. Identifica a Região Entre Serras da Piedade ao Caraça como produtora de Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2022.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - ANVISA. *RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 241, DE 26 DE JULHO DE 2018*. 2018. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2018/rdc0241_26_07_2018.pdf> . Acesso em: 12 out. de 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - ANVISA. *Guia Para Instrução Processual De Petição De Avaliação De Probióticos Para Uso Em Alimentos*. 2021. Disponível em:

<<http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5280930/guia+21+v2.pdf/dac5bf5f-ae56-4444b53c-2cf0f7c15301>>. Acesso em: 11 out. de 2021.

NYANGALE, Edna P. et al. Effect of prebiotics on the fecal microbiota of elderly volunteers after dietary supplementation of *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086. *Anaerobe*, v. 30, p. 75-81, 2014.

OLIVEIRA, E. W. et al. Reformulating Minas Frescal cheese using consumers' perceptions: Insights from intensity scales and check-all-that-apply questionnaires. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 8, p. 6111-6124, 2017.

OLIVEIRA, R. B. et al. Processed cheese contamination by spore-forming bacteria: A review of sources, routes, fate during processing and control. *Trends in Food Science & Technology*, Elsevier, v. 57, p. 11–19, 2016.

OZUSAGLAM, M.A. Importance of bacillus coagulans bacterium as probiotic in animal~ nutritio. *Süleyman Demirel University Journal of Agriculture (Turkey)*, v. 5, p. 50 –57, 2010. ISSN 1304-9984.

PIMENTEL, A. G. da Cruz; Adriana Torres Silva e A. E. S. P. E. A. E. L. M. S. M. C. S. M. R. M. P. B. Z. T. C. *Probióticos e Prebióticos - Desafios e Avanços*. 1°. ed. [S.I.]: Setembro editora, 2020.

POLO, Andrea et al. A novel functional herbal tea containing probiotic *Bacillus coagulans* GanedenBC30: An in vitro study using the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME). *Journal of Functional Foods*, v. 88, p. 104873, 2022.

PUNTILLO, Melisa et al. Functional microbes and their incorporation into foods and food supplements: probiotics and postbiotics. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 13, p. 385-407, 2022.

PURUTOĞLU, Kübra et al. Diversity and functional characteristics of lactic acid bacteria from traditional kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*, v. 73, n. 1, p. 57-66, 2020.

RAPACCI, M. Estudo comparativo das características físicas e químicas, reológicas e sensoriais do requeijão cremoso obtido por fermentação láctica e acidificação direta. Campinas, 1997. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, 1997.

ROLIM, Fernanda RL et al. Cheeses as food matrixes for probiotics: In vitro and in vivo tests. *Trends in Food Science & Technology*, v. 100, p. 138-154, 2020.

ROCHA, Ramon S. et al. Possibilities for using ohmic heating in Minas Frescal cheese production. *Food Research International*, v. 131, p. 109027, 2020.

ROMEIRO, R. S. (2005). Constatação da produção de bacteriocinas por isolamentos de bactérias fitopatogênicas. Viçosa, MG Brasil: Departamento de Fitopatologia-UFV.

RUIZ, L. et al. How do bifidobacteria counteract environmental challenges? mechanisms involved and physiological consequences. *Genes & Nutrition*, Springer Science and Business Media LLC, v. 6, n. 3, p. 307–318, jan 2011.

SILVA, Hugo LA et al. Partial substitution of NaCl by KCl and addition of flavor enhancers on probiotic Prato cheese: A study covering manufacturing, ripening and storage time. *Food chemistry*, v. 248, p. 192-200, 2018.

SILVA, S.F. et al. Impact of different modified atmosphere packaging on quality parameters and probiotic survival during storage of Minas Frescal cheese. *Food Bioscience*, v. 43, 101338, 2021.

SALVETTI, Elisa et al. Integrate genome-based assessment of safety for probiotic strains: *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 as a case study. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 100, p. 4595-4605, 2016.

SILVEIRA, M. R. et al. Guava-flavored whey beverage processed by cold plasma technology: Bioactive compounds, fatty acid profile and volatile compounds. *Food chemistry*, Elsevier, v. 279, p. 120–127, 2019.

SIQUEIRA, K; SCHETTINO, J.P.J. O consumo de queijos pelos brasileiros. Milk point. Abril 2021.

SMI, Saad. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Rev Bras Cienc Farm*, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SOARES, M. B. et al. Behavior of different bacillus strains with claimed probiotic properties throughout processed cheese (“requeijão cremoso”) manufacturing and storage. *International journal of food microbiology*, Elsevier, v. 307, p. 108288, 2019.

SOUZA, Tais B. et al. Microscopic quality indicators of minas frescal cheese. *Food Control*, v. 19, n. 1, p. 71-75, 2008.

SPERRY, Marcella F. et al. Probiotic Minas Frescal cheese added with *L. casei* 01: Physicochemical and bioactivity characterization and effects on hematological/biochemical parameters of hypertensive overweighted women—A randomized double-blind pilot trial. *Journal of Functional Foods*, v. 45, p. 435-443, 2018.

VALDOVINOS-GARCÍA, L. R.; Abreu, A. T.; Valdovinos-díaz, M. A. Probiotic use in clinical practice: Results of a national survey of gastroenterologists and nutritionists. *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*, v. 84, n. 3, p. 303-309, 2019.

VAN DER POL, Edwin C.; EGGINK, Gerrit; WEUSTHUIS, Ruud A. Production of L (+)-lactic acid from acid pretreated sugarcane bagasse using *Bacillus coagulans* DSM2314 in a simultaneous saccharification and fermentation strategy. *Biotechnology for biofuels*, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2016.

ZHANG, Shiqi et al. *Weizmannia coagulans*: an ideal probiotic for gut health. *Food Science and Human Wellness*, v. 13, n. 1, p. 16-26, 2023.

Yang, O.O.; Kelesidis, T.; Cordova, R.; Khanlou, H. Immunomodulation of antiretroviral drug-suppressed chronic HIV-1 infection in an oral probiotic double-blind placebo-controlled trial. *AIDS research and human retroviruses*, v. 30, n. 10, p. 988-995, 2014.

ww.precedenceresearch.com. 2023. Disponível em:

<<https://www.precedenceresearch.com/cheese-market>> Acesso em 10 de dezembro de 2023. Sem autor: Cheese Market (By Cheese Type: Cheese Products, Cheese Powder; By Product: Mozzarella, Cheddar, Feta, Parmesan, Roquefort, Others; By Source: Animal, Plant; By Type: Natural, Processed; By Nature: Conventional, Organic; By Distribution Channel: Retail, Food Service, Food Manufacturers; By Application) - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends, Regional Outlook, and Forecast 2023 - 2032

Capítulo 1:**Artigo técnico-** Publicação: V. 2 N. 12 (2021): Dezembro**BENEFÍCIOS CONFERIDOS À SAÚDE ATRAVÉS DO CONSUMO DE QUEIJOS PROBIÓTICOS**Thaís Cristina Mendes da Silva^a, Márcia Cristina Silva^a, Adriano Gomes da Cruz^a^a Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ),
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos**RESUMO**

O mercado de alimentos funcionais apresenta um intenso crescimento no Brasil, com destaque para os produtos probióticos, que atraem cada vez mais a atenção dos consumidores e do setor alimentício. Os benefícios dos probióticos foram observados desde a década de 1970, porém, atualmente já se sabe que suas vantagens vão além da saúde intestinal, tendo importante papel na melhora do sistema imune, doenças respiratórias, atópicas, urogenitais, assim como atenuação de doenças inflamatórias e metabólicas. O consumo de queijos é um hábito comum entre os brasileiros, sendo também este produto de grande importância econômica e social em regiões do país. Além disso, o queijo apresenta uma matriz alimentar valiosa para a introdução de bactérias probióticas, quando comparado com outros produtos lácteos, pois favorece a sobrevivência destes micro-organismos. Associado a isto, diversos estudos experimentais, descrevem reais efeitos terapêuticos observados com o consumo de diversos queijos probióticos, em modelos animais e humanos. Sendo assim, o presente trabalho, tem como objetivo a revisão de dados da literatura que demonstrem os benefícios conferidos à saúde ao serem consumidos queijos probióticos.

Palavras-chave: Probióticos; Queijo probiótico; Benefícios à saúde.

1. INTRODUÇÃO

O consumo de alimentos fermentados é de grande importância na nossa alimentação. Desde a ancestralidade, se utiliza esta técnica como meio de conservação de alimentos e para a obtenção de texturas e sabores mais agradáveis, por meio da ação de micro-organismos ou de suas enzimas isoladas. Uma outra vantagem, é a modificação das propriedades dos alimentos, facilitando a sua digestão (Antunes & Bogsan, 2021).

Sendo conduzida em ambiente físico-químico adequado (pH, temperatura, disponibilidade ou não de oxigênio), as fermentações resultam em alimentos seguros para o consumo humano. Atualmente, tem se observado uma grande valorização mundial dos alimentos fermentados, pois devido a presença de ecologia microbiana e da produção de metabólitos durante o processamento, o consumo destes, apresentam benefícios à saúde. Uma especial ênfase é dada, pelos consumidores, para os alimentos funcionais com características probióticas (Antunes & Bogsan., 2021).

O mercado brasileiro de alimentos funcionais representa cerca de 15% do setor alimentício, com um crescimento anual estimado de 20%. Tendo destaque os produtos probióticos, pois representam cerca de 70%. O interesse e a familiaridade do consumidor com o termo “probiótico” vêm aumentando, o que gera também um crescente ímpeto pela pesquisa e produção destes itens. Os principais produtos alimentícios que contém probióticos, atualmente, são os lácteos, como leites fermentados e iogurtes (Corassin et al., 2017).

2. PROBIÓTICOS

O trato gastrointestinal é o local mais habitado por micro-organismos no corpo humano. Essa microbiota é um ambiente dinâmico que varia com o decorrer do tempo, podendo ser influenciada por diversos fatores extrínsecos (como estilo de vida, alimentação, uso de medicações e patologias), intrínsecos (idade, fatores genéticos, sistema imunológico, entre outros) e ambientais, sendo o desequilíbrio deste ecossistema chamado de disbiose (Amigo et al., 2022).

O primeiro conceito de probióticos foi dada em 1974 por Parker, onde foram definidos como "organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio

microbiano intestinal" (Parker,1974), contudo o termo substâncias foi refinado mais tarde por Fuller (1989), que reclassificou os probióticos como "um suplemento de alimentação microbiana viva que afeta benéficamente o animal hospedeiro, melhorando seu equilíbrio microbiano intestinal" (Amigo et al., 2022).

Por fim, sendo descoberto também a presença de efeitos benéficos dos probióticos à nível extra intestinal, o conceito foi expandido e atualizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), para " micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício de saúde ao hospedeiro" (FAO/OMS, 2002; correção gramatical em Hill et al., 2014). Neste sentido, a viabilidade das bactérias é o que irá proporcionar as vantagens à saúde.

Pela legislação brasileira, a contagem de bactérias probióticas na ordem de $10^6 - 10^8$ UFC/g no produto final é considerada quantidade terapêutica em alimentos processados, devendo ser consumidos uma dose diária de 100 g ou 100 ml (Pimentel et al., 2020) (ANVISA, 2008). Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os mais utilizados, devido à sua segurança e eficácia, mas o emprego de *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Roseburia*, *Akkermansia*, *Propionibacterium* e *Faecalibacterium* são promissores para o futuro (Amigo et al., 2022 and Soares, et al., 2019).

Estudos recentes demonstram que certas cepas probióticas apresentam efeitos nos locais em que germinam e à distância, através da produção de metabólitos, evidenciando interações entre o intestino, o sistema nervoso entérico e sistema nervoso central (Amigo, Arruda, et al., 2022).

Como proteção ao trato gastrointestinal, as bactérias probióticas influenciam a produção de mucina, que atuam na lubrificação e proteção epitelial, reduzindo então a colonização por patógenos. Regulam também a expressão das junções intercelulares entéricas, o que interfere na permeabilidade celular e a integridade da barreira epitelial (Amigo, Arruda, et al., 2022). No meio científico, já é bem descrito que a importância do intestino vai além da função digestiva, assumindo um relevante e significativo papel imunológico, uma vez que a parede do intestino é responsável pela seleção da entrada de nutrientes e não nutrientes no organismo (Pereira et al., 2020). Outros benefícios à saúde humana, retratados pelo uso de probióticos são contribuições para o tratamento de doenças respiratórias,

atópicas, urogenitais, combate a hipertensão e hipercolesterolemia, controle de doenças inflamatórias intestinais e alergias alimentares, assim como proteção contra o câncer de cólon e bexiga, osteoporose (Ranadheera et al., 2010).

No Brasil, a Resolução RDC 241/2018 da ANVISA regulamenta o uso de probióticos em alimentos. Sendo avaliados três elementos principais: Comprovação inequívoca da identidade da linhagem do micro-organismo, de sua segurança e de seu efeito benéfico. Ademais, são averiguadas informações sobre a existência de *status* GRAS (Generally Recognized as Safe) para a linhagem ou QPS (Qualified Presumption of Safe) para a espécie do micro-organismo (BRASIL, 2018 e Pimentel, et al., 2020).

3. IMPORTÂNCIA DO QUEIJO NO BRASIL

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), queijo é definido como o produto fresco ou maturado obtido por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, que passa por processo de coagulação, através de ácidos orgânicos ou enzimas de bactérias específicas, podendo ser combinados ou não. Podem ser adicionados de substâncias alimentícias, tais como: Especiarias, condimentos, aditivos, substâncias aromatizantes e corantes. São classificados como frescos ou maturados e divididos de acordo com o processo de obtenção da massa, aquecimento da coalhada, teor de gordura no extrato seco e teor de umidade, sendo estes dois últimos parâmetros regulamentados pelo MAPA- Portaria 146/96 (BRASIL,1996).

Historicamente, o hábito de consumir queijo foi trazido pelos portugueses, que ainda no século XVI fundaram diversas queijarias no país para atendimento da própria demanda, sendo posteriormente adotado este consumo pelos nativos. Atualmente no Brasil, existem queijos típicos nacionais e outros inspirados em queijos do exterior. De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ), a produção dos queijos nacionais se adaptou as condições regionais, tais como oferta de bacias leiteiras e preferências da população local (Perry, 2004). O queijo minas é um típico queijo brasileiro, que apresenta grande importância econômica e social principalmente no sudeste do país, além de apresentar prestígio internacional, uma vez que alguns tipos apresentam premiações internacionais de

grandes eventos do ramo (Machado et al., 2004).

O queijo é um alimento com inúmeras formas de obtenção e por isso com uma ampla variedade disponível no mercado. Tem relevante valor nutricional na dieta do brasileiro, por ser ótima fonte de proteína e rico em cálcio, fósforo e vitaminas, além de apresentar valores variados, atendendo os diversos públicos (Corassin et al., 2017). Também é um produto versátil, que atende a abundantes paladares e faixas etárias. Devido a essa flexibilidade, o queijo oferece oportunidades para inúmeras estratégias de marketing, com destaque para a produção de queijos com a inclusão de bactérias probióticas, que vem ganhando espaço na indústria de alimentos (Cruz et al., 2009).

Em relação aos outros produtos lácteos, como iogurtes e leites fermentados, o queijo se apresenta como uma valiosa alternativa devido a sua composição, pois sua matriz alimentar cria um tampão contra o ambiente ácido gástrico, protegendo as bactérias probióticas durante o processo de digestão, associado a isto o teor relativamente alto de gordura do queijo, pode favorecer a sobrevivência das bactérias no ambiente ácido do estômago (Corassin et al., 2017). Ademais, uma vantagem tecnológica conferido ao queijo adicionado de cepas probióticas é a produção de ácidos orgânicos (como acético e lático) através da fermentação da lactose, resultando em um produto com pH mais baixo, que é benéfico para a estabilidade microbiológica do produto e gera aumento do prazo de validade, sendo particularmente interessante para a produção de queijos não maturados. Contudo, devido ao aspecto sensorial, deve ser ter atenção ao conteúdo ácido (Sperry et al. 2018). Naturalmente são utilizadas culturas iniciais de bactérias lácteas para a produção de queijos, porém não possuem a característica de se desenvolverem no trato gastrointestinal, não conferindo propriedades funcionais ao alimento (Elshagabee et al., 2017). Na tabela 1, podemos observar as principais cepas consideradas probióticas na utilizadas na produção de queijos.

4. BENEFÍCIOS CONFERIDOS À SAÚDE DE QUEIJOS PROBIÓTICOS

O maior desafio associado à aplicação de culturas probióticas no desenvolvimento de alimentos funcionais é a manutenção da viabilidade durante o processamento. Contudo, diversos estudos experimentais, puderam observar uma

boa adaptação destes micro-organismos em queijos, não trazendo também prejuízos aos aspectos sensoriais e a textura deste produto (Cruz et al., 2009).

Tabela 1. Principais cepas utilizadas na fabricação de queijos probióticos

LACTOBACILLUS	BIFIDOBACTERIU M	OUTROS
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>E. faecium</i>
<i>L. casei</i> ssp. <i>pseudopantarum</i>	<i>B. breve</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. casei</i> ssp. <i>rhamnosus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>
<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>P. freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>
<i>L. grusseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		

Fonte: Castro et al., 2015

Além do queijo representar uma boa matriz alimentar, já são descritas diversas vantagens à saúde devido ao consumo de cepas probióticas em queijos. Ahola et al. (2002), ao avaliar a oferta de queijo Edam probiótico contendo *Lactobacillus rhamnosus* LC705 e *L. rhamnosus* GG ATCC53103 sobre o prevalência de cárie dental, conclui que com o consumo deste produto poderia reduzir o risco de tal infecção, porém não observou interferência na população microbiana salivar. Ainda sobre a mucosa oral, um estudo de Hatakka et al. (2007) em que se foi verificado o efeito do consumo de queijo Edam probiótico (composto por *L. rhamnosus* GG e LC705, *Propionibacterium freudenreichii* spp. *Shermani* JS) na candidíase oral em idosos, concluiu-se que as estas bactérias influenciaram a composição salivar (especialmente na concentração de mucinas e imunoglobulinas salivares), podendo ser utilizado para o tratamento de hipossalivação e sensação de boca seca, trazendo benefícios para a saúde

bucal.

Lollo et al. (2015), verificou a interferência do consumo de queijo minas frescal probiótico (com cepas de *Lactobacillus acidophilus* LA 14 e *Bifidobacterium longum* BL 05) em parâmetros de hipertensão em ratos, tendo observado que a ingestão contínua de 20g durante 15 dias, foi capaz de atenuar o desenvolvimento de hipertensão, além de melhorar o perfil lipídico sanguíneo, sendo resultados compatíveis com dados obtidos anteriormente utilizando outras matrizes alimentares. Este efeito observado, pode-se associar à ação proteolítica do probiótico em proteínas do leite (caseína e proteínas do soro), gerando peptídeos bioativos que podem diminuir a ocorrência de pressão elevada.

Sperry et al. (2018), em seu estudo duplo-cego randomizado com mulheres adultas e idosas, hipertensas e com excesso de peso, verificou os efeitos da oferta de queijo minas frescal probiótico, com *Lactobacillus casei-01*, sobre os índices hematológicos e metabólicos. Tendo como resultados que a oferta de 50 g por 28 dias consecutivos, foi capaz de melhorar o perfil lipídico das participantes (diminuição do Colesterol total, LDL e triglicerídeos e aumento de HDL), sendo atribuído este efeito à ligação do colesterol a superfície probiótica e incorporação em sua membrana celular, assim como a produção de ácidos graxos de cadeia curta pela microflora intestinal. Corroborando com o achado de Lollo et al. (2015) em animais, neste estudo, também foi possível verificar benefícios do consumo de queijo probiótico na atenuação da pressão arterial sistólica e diastólica em humanos.

Outro achado relevante em estudo animal de Martins et al. (2018), foi a relação do consumo frequente de queijo prato probiótico, contendo *Lactobacillus casei-01*, ter desempenhado importante papel na inibição do crescimento de cálculo em modelo experimental de ureterolitíase, uma vez que diminui o peso e o tamanho do cálculo. Sendo justificado pela presença de probióticos no lúmen intestinal aumentar a degradação de oxalato de cálcio pela microbiota, diminuindo a passagem pelos rins e sua precipitação de cristais.

Vasconcelos et al. (2019), com o objetivo de avaliar a capacidade anti- inflamatória de probióticos investigou as vantagens conferidas do consumo frequente de queijo prato probiótico (*Lactobacillus casei-01*), para a proteção dos danos gerados pela exposição frequente à fumaça de cigarro em modelo animal (ratos). Tendo como conclusão, que a ingestão deste alimento funcional foi capaz de reduzir o estresse oxidativo nos pulmões, intestino e fígado, assim promover um menor aspecto inflamatório nos pulmões.

Já Cordeiro, et al. (2021), recentemente utilizou para a produção de queijo Minas

Frescal, *Lactobacillus lactis*, bactéria gram-negativa conhecido por seu crescimento rápido e metabolismo simples, especificamente a cepa *NCDO 2118*, que em estudo com ervilhas congeladas demonstrou anteriormente, atividade anti- inflamatória e imunomoduladora especificamente em doenças inflamatórias intestinais. Em seu experimento com ratos portadores de Colite ulcerativa, foi possível comprovar estes benefícios também com a oferta de queijos, uma vez que o consumo foi capaz de aliviar o aspecto inflamatório da doença, tanto em nível estrutural quanto intracelular.

Na figura 1, pode ser observado resumidamente as vantagens conferidas à saúde do consumo diversos queijos probióticos e os seus respectivos achados na literatura.

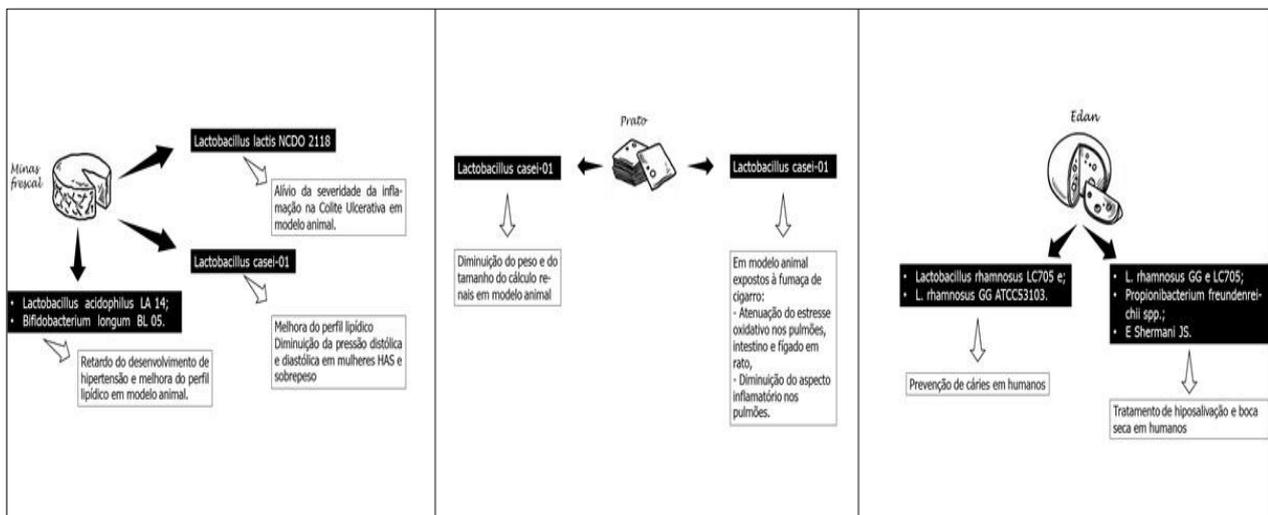


Figura 1 .Queijos Probióticos e Benefícios do seu consumo

5. PERSPECTIVAS

A utilização de queijos probióticos tem se mostrando uma opção valiosa para a indústria de lácteos funcionais, pois diversifica o mercado e atende um maior grupo de consumidores, visto que apesar de já serem conhecidos uma gama de vantagens à saúde, ainda são poucas as opções de alimentos com características probióticas disponíveis atualmente.

No entanto, pela ampla variedade de queijos disponíveis e pela diversidade de métodos produtivos, muitos estudos são necessários, principalmente para se entender o comportamento das culturas de bactérias nos diversos tipos de queijos disponíveis, assim como intensas análises sensoriais para se verificar o que melhor atende as expectativas do público, que é cada vez mais exigente.

Por fim, neste levantamento bibliográfico pode ser percebido que ainda são escassos os estudos experimentais em humanos, sendo uma área promissora para cientistas de alimentos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIANE Antunes, Cristina Bogsan. (2021). Alimentos fermentados [livro eletrônico]. São Paulo: International life Sciences Institute do Brasil- ILSI BRASIL. 1ª Ed. 19 p.

AMIGO, L. Et al. (2022). List of contributors. In: CAZARIN, C.B.B., et al. Bioactive Food Components Activity in Mechanist Approach. [S.I.]: Academic Press. (pp. 55-103). ISBN: 978-0-12-823569-0.

AHOLA, Aila J. et al. (2002). Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. **Archives of oral biology**, 47, n. 11: 799-804.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. (1996). Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial da União, Brasília, 11 mar.

BRASIL (2008). Agência Brasileira de Vigilância Sanitária - Anvisa. Alimentos com reivindicações sanitárias, novos alimentos/ingredientes, compostos bioativos e probióticos. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica (2013). Política Nacional de Alimentação e Nutrição / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica – 1. ed., 1. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAUDE - ANVISA. RESOLUCAO DA DIRETORIA COLEGIADA (2021). Resolução RDC No 241, DE 26 DE JULHO DE 2018. 2018. Disponível em: <https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2018/rdc0241_26_07_2018.pdf>

- CAO, J. et al. (2020). Probiotic characteristics of bacillus coagulans and associated implications for human health and diseases. *Journal of Functional Foods*, Elsevier, 64: 1-11
- CASTRO, J. M., TORNADIJO, M. E., FRESNO, J. M. et al. (2015). “Biocheese: A Food Probiotic Carrier,” **BioMed Research International**, Article ID 7230, 11 pages.
- COLOMBO, Monique et al. (2018). The potential use of probiotic and beneficial bacteria in the Brazilian dairy industry. **Journal of Dairy Research**, 85, n. 4: 487-496.
- CORASSIN, A. G. C.; Patricia B. Z.; Carlos, A.F. (2017). *Processamento de produtos lácteos: queijos, leites fermentados, bebidas lácteas, sorvete, manteiga, creme de leite, doce de leite, soro em pó e lácteos funcionais*. 1a. ed. [S.l.]: Elsevier: Rio de Janeiro. 343 p., v. 3.
- CORDEIRO, Bárbara F. et al. (2021). Therapeutic effects of probiotic Minas Frescal cheese on the attenuation of ulcerative colitis in a murine model. **Frontiers in Microbiology**, 12: 159.
- DA CRUZ, Adriano Gomes et al. (2009). Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science & Technology**, 20, n. 8: 344-354.
- ELSHAGHABEE, Fouad MF et al. (2017). Bacillus as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. **Frontiers in microbiology**, 8: 1490
- FULLER, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5): 365-378.
- GAO, J. et al. (2021). Probiotics in the dairy industry—advances and opportunities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 20, n. 4: 3937 - 3982
- HATAKKA, K., Ahola, A. J., Yli-Knuutila, H., Richardson, M., Poussa, T., Meurman, J.H., et al. (2007). Probiotics reduce the prevalence of oral Candida in the elderly e a randomized controlled trial. *Journal of Dental Research*, 86, n 2: 125- 130.
- LOLLO, Pablo CB et al. (2015). Hypertension parameters are attenuated by the continuous consumption of probiotic Minas cheese. **Food Research International**, v. 76: 611-617.

MACHADO, Eduardo C. et al. (2004). Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Food Science and Technology**, 24: 516-521.

MARTINS, Aline A. et al. (2018). Probiotic Prato cheese consumption attenuates development of renal calculi in animal model of urolithiasis. **Journal of Functional Foods**, 49: 378-383.

PEREIRA, Wander Lopes et al. (2020). O EFEITO DOS ALIMENTOS FUNCIONAIS NA MICROBIOTA INTESTINAL: O USO DO KEFIR E DA KOMBUCHA NA DIETA ALIMENTAR SAUDÁVEL. **Revista de Trabalhos Acadêmicos-Universo Campos dos Goytacazes**, 1, n. 13

PARKER, R. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health*, 29: 4-8.

PERRY, K.S.P. (2004). Queijos: Aspectos Químicos, Bioquímicos e Microbiológicos. *Química Nova*, 27, n. 2: 293-300

PIMENTEL, T.C. et al. (2020). Probióticos e Prebióticos - Desafios e Avanços. 1º. ed. [S.l.]: Setembro editora: São Paulo. 372 p.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. (2010). **Food research international**, 43, n. 1: 1-7.

SOARES, M. B. et al. (2019). Behavior of different bacillus strains with claimed probiotic properties throughout processed cheese (“requeijão cremoso”) manufacturing and storage. *International journal of food microbiology*, Elsevier, v. 307: 108288.

SPERRY, Marcella F. et al. (2018). Probiotic Minas Frescal cheese added with *L. casei* 01: Physicochemical and bioactivity characterization and effects on hematological/biochemical parameters of hypertensive overweighted women—A randomized double-blind pilot trial. **Journal of Functional Foods**, 45: 435-443.

VASCONCELOS, Felipe M. et al. (2019). Probiotic Prato cheese attenuates cigarette smoke-induced injuries in mice. **Food Research International**, 123: 697-703. 123, 697-703.

Capítulo 2:**Artigo técnico-** Publicação: V. 2 N. 12 (2021): Dezembro**BACTÉRIAS ESPORULADAS PROBIÓTICAS EM PRODUTOS LÁCTEOS:
CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS E BENEFÍCIOS A SAÚDE**Thaís Cristina Mendes da Silva^a, Maria Cristina da Silva^a, Adriano Gomes da Cruz^a^aInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Departamento de Alimentos**RESUMO:**

O crescimento da produção de alimentos com características funcionais é notório no Brasil, tendo um importante destaque para os produtos probióticos (cerca de 70% dos produtos disponíveis). A grande ênfase da utilização destes micro-organismos entre os alimentos funcionais deve-se a sua capacidade de manter a integridade intestinal e reestabelecer o equilíbrio da microbiota natural dos indivíduos. No contexto atual, há uma lista limitada de gêneros utilizados no desenvolvimento de produtos, sendo os *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* a maior parte das cepas manuseadas, que apesar de possuírem eficácia comprovada, são pouco tolerantes aos processos produtivos de lácteos. Neste sentido, um tema relevante em tecnologia de alimentos é a utilização de cepas de *Bacillus* com propriedades probióticas reivindicadas (PB) na indústria de lácteos. Os endósporos são capazes de sobreviver em situações extremas e em ambientes considerados letais às bactérias probióticas tradicionais, sendo resistentes tanto as etapas de produção quanto as condições do trato gastrointestinal. Além de conferirem benefícios à saúde, tais como atividade antioxidante, antimicrobiana, apoio à digestão e a imunidade do organismo humano.

Palavras-chave: Probióticos; *Bacillus* com propriedades probióticas reivindicadas; aspectos tecnológicos de probióticos esporulados.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o Brasil vem apresentando grandes transformações sociais, entre elas a diminuição da pobreza e exclusão social, afetando diretamente a saúde e a alimentação da população. Com a melhoria do acesso aos alimentos, a implementação de órgãos voltados para assistência alimentar e nutricional e a instalação de políticas públicas, podemos observar uma diminuição da fome e uma maior preocupação das instituições públicas no atendimento das necessidades nutricionais dos brasileiros. Um grande avanço observado foi a inclusão da alimentação como sendo um direito social, através da Emenda Constitucional nº 64, aprovada em 2010, que introduziu no artigo 6º da Constituição Federal (Brasil, 2013).

No entanto, a sociedade brasileira pode vivenciar uma peculiar e rápida transição nutricional: passando de elevadas taxas de desnutrição, na década de 1970 a uma grande prevalência de excesso de peso e obesidade no início dos anos 2000 (Brasil, 2013).

Atualmente, com a pandemia de covid 19, a segurança alimentar e a adequada oferta de nutrientes tem sido o foco de muitos estudos pelo mundo, devido ao interesse em evitar o crescimento ou agravamento da obesidade e o avanço das doenças crônicas não transmissíveis, além de uma adequada alimentação ser um fator determinante de uma boa imunidade (Ribeiro Silva et al., 2020).

2. ALIMENTOS FUNCIONAIS:

Diante da preocupação com os problemas de saúde, associado ao aumento da expectativa de vida da população e um crescente interesse pelos consumidores, de alimentos produzidos e processados de forma sustentável, seguros, naturais, frescos e de elevado valor nutricional, os alimentos considerados promotores de saúde ganharam notoriedade, surgindo então o conceito de alimentos funcionais. Este termo foi inicialmente utilizado no Japão, na década de 1980, ganhando espaço no mundo, conforme ocorriam mudanças na regulamentação dos alimentos e avanços nos estudos científicos, comprovando a relação da composição da dieta com a saúde (Corassin et al., 2017).

Segundo Granato et al. (2017), alimentos com alegação funcional são definidos como sendo os alimentos industrialmente processados ou naturais que, quando consumidos regularmente, dentro de uma dieta variada, apresenta efeitos positivos na saúde, além dos benefícios conferidos da nutrição básica. Para o estabelecimento desta propriedade, é necessária

a comprovação da sua eficácia, por meio de ensaios clínicos controlados e provas experimentais de segurança (Assmann et al. 2014 e Granato, et al, 2020).

No Brasil, os alimentos funcionais representam cerca de 15% do mercado de alimentos, com um crescimento anual estimado de 20%. Tendo os produtos com características probióticas um grande destaque, representando cerca de 70% dos produtos disponíveis (Corassin et al., 2017). Ademais, os alimentos com potencial probiótico estão na lista dos mais estudados e buscados na literatura, desde a década de 1990, junto aos produtos com característica prebiótica e poder antioxidante (Yeung et al, 2018).

3. PROBIÓTICOS:

Historicamente, a associação da presença de bactérias e benefícios à saúde se deu em 1905, sendo descoberta pelo Biólogo Nobel Russo Elie Metchnikoff. Atualmente, a indústria leiteira é o setor alimentício que mais utiliza probióticos em sua produção. O leite fermentado e o iogurte são os principais produtos onde os encontramos como ingredientes funcionais (Gao, J. et al., 2021).

A grande ênfase dos probióticos entre os alimentos funcionais deve-se a sua capacidade de manter a integridade intestinal e reestabelecer o equilíbrio da microbiota natural dos indivíduos, destacando-se seu papel de impedimento da colonização da mucosa intestinal por microrganismos considerados potencialmente patogênicos. No meio científico, já é bem descrito que a importância do intestino vai além da função digestiva, assumindo um relevante e significativo papel imunológico, uma vez que a parede do intestino é responsável pela seleção da entrada de nutrientes e não nutrientes no organismo (Pereira et al., 2020). Na Figura 1, podemos observar os mecanismos de ação dos probióticos no organismo humano.

A Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP), em revisão à definição da FAO/OMS, 2002, caracteriza probióticos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Sendo assim, a viabilidade das bactérias é uma condição fundamental para proporcionar tais vantagens. Sendo descrito como a contagem de células em que se observa efeito na saúde na ordem de $10^6 - 10^8$ UFC/g (Pimentel et al., 2020).

No Brasil, a ANVISA regulamenta o uso de probióticos em alimentos, através da Resolução RDC 241/2018. A avaliação ocorre através de três elementos principais: Comprovação inequívoca da identidade da linhagem do micro-organismo, de sua segurança e de seu efeito benéfico. Ademais, são averiguadas informações sobre a existência de *status*

GRAS (Generally Recognized as Safe) para a linhagem ou QPS (Qualified Presumption of Safe) para a espécie do micro-organismo (BRASIL, 2018 e Pimentel, et al., 2020).

No contexto atual, há uma lista limitada de gêneros sendo utilizados tanto na pesquisa quanto no desenvolvimento de produtos, sendo os *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* a maior parte das cepas probióticas manuseadas. Contudo, há uma grande preocupação em relação à utilização destas no setor de alimentos: Apesar da eficácia dessas cepas serem mundialmente conhecidas, a funcionalidade de um probiótico está relacionada a capacidade de sobrevivência durante o processo de produção do alimento e a resistência as condições do trato gastrointestinal, sendo então questionada essa tolerância pelos probióticos tradicionais. Por outro lado, pensar na adição desses micro-organismos em etapas que não os inviabilize, pode levar à recontaminação e deterioração do alimento e consequentemente prejuízos econômicos e à saúde (Soares, M. B. et al., 2019).

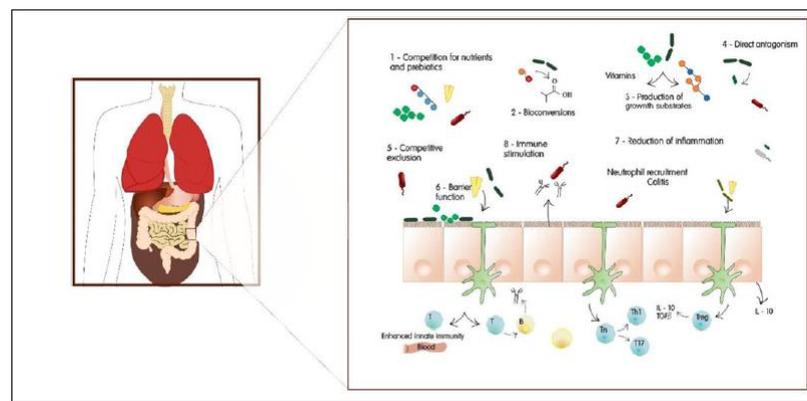


Fig. 1: Mecanismos de ação das bactérias probióticas

Fonte: Colombo, et al., 2018

4. PROBIÓTICOS PRODUTORES DE ESPOROS:

Para garantir a sobrevivência em condições não favoráveis ao seu desenvolvimento, algumas espécies de bactérias possuem a capacidade de produzir uma estrutura classificada como endósporo bacteriano, o que lhes permite manter sua sobrevivência em longo prazo, em condições consideradas letais a estes micro-organismos na sua forma vegetativa. Condições como escassez de nutrientes, extremos de temperatura, falta de água são algumas situações que causam a esporulação (Cutting et al., 2011).

O endósporo é uma estrutura formada por um núcleo com um cromossomo condensado e inativo, camadas de peptidoglicanos (córtex) e material proteico de revestimento, que conferem também proteção da radiação UV, extremos de pH, solventes, peróxido de hidrogênio

e enzimas como a lisozima. Com o retorno das condições ambientais propícias, o esporo é capaz de germinar em minutos, sendo quebrada a camada de revestimento e retomado o crescimento celular vegetativo (Cutting et al., 2011).

Neste sentido, um tema relevante em tecnologia de alimentos é a utilização de probióticos produtores de esporos na produção de insumos alimentares. As culturas tradicionais possuem atividades notáveis, mas a resistência é limitada, não sobrevivendo também as condições do trato gastrointestinal (cerca de 1-15% conseguem suportar acidez gástrica e as enzimas digestivas). Portanto, micro-organismos esporulados apesar de serem inicialmente associados à patógenos transmitidos por alimentos, algumas cepas já possuem a reivindicação de probióticos, como o caso do gênero *Bacillus*. O fato de os esporos serem mais resistentes ao processamento dos produtos e as etapas da digestão, tornam-se reais as chances de colonização do intestino através do consumo de produtos que utilizem essas cepas, gerando um maior interesse de pesquisadores (Cao et al., 2020).

As bactérias formadoras de esporos comumente se enquadram em dois gêneros, *Bacillus* e o estritamente anaeróbico *Clostridium* (Cutting et al., 2011). Elshaghabee, 2017, em seu estudo de revisão sobre a espécie *Bacillus*, descreve que *Bacillus* são bactérias Gram-positivas, em forma de bastonete, aeróbia ou anaeróbia facultativa. O gênero *Bacillus* é da classe *Bacilli* sob o filo *Firmicutes*, estando fortemente relacionado com os *Lactobacillus spp.* A colonização do intestino humano se dá pelo consumo de vegetais ou alimentos crus contaminados com a microflora do solo ou através de alimentos fermentados por esses micro-organismos. No mundo já se encontram diversos insumos alimentares fermentados com as espécies de *Bacillus*, como grãos de soja, alfarroba e cereais com milho e arroz, assim com produtos farmacêuticos e nutracêuticos (Elshaghabee et al., 2017).

5. BENEFÍCIOS À SAÚDE DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS ESPORULADAS:

Na literatura, diversos benefícios à saúde são atribuídos aos portadores de endósporos, como destaque encontra-se relatos de que algumas cepas de *Bacillus* exibem atividade antioxidante e imunomoduladora no organismo humano, salientando-se também a capacidade de síntese de enzimas extracelulares, vitaminas, peptídeos e diferentes substâncias antimicrobianas (bacteriocinas como: Subtilina e Coagulina), além de atividade anti- *H. pylori* (conferida à cepa *B. subtilis*), o que influi no crescimento e composição de espécies comensais e benéficas no intestino, contribuindo para a saúde do hospedeiro (Elshaghabee et al., 2017).

Cao e colaboradores, 2020, ao avaliarem especificamente as características da cepa *Bacillus Coagulans* no organismo humano, observaram que elas dificultam o crescimento de

bactérias patogênicas no intestino e promovem o desenvolvimento de *Lactobacillus* e *Bifidum* bactérias, por transformarem o ambiente em um meio anaeróbico e ácido. Ademais, podem germinar na parte superior do intestino delgado, atuando em cooperação com a microbiota local e auxiliando a digestão e absorção de nutrientes. Outro fato relevante é a capacidade dos *B. Coagulans* segregarem β -galactosidase durante o seu crescimento, o que auxilia na quebra da lactose em glicose e galactose, melhorando sintomas de intolerância à lactose (Cao et al., 2020).

A terapia probiótica é oportuna para o tratamento de várias doenças gastrointestinais, desde desconfortos, como diarreia e má digestão até disbiose e doenças inflamatórias intestinais (DIIs). Diversos ensaios clínicos mostraram melhora na qualidade de vida com o uso de algumas cepas de *Bacillus Coagullans*, porém os mecanismos ainda não são claros (Cao et al., 2020).

Quanto ao sistema imune, os *B. Coagulans* podem interferir tanto nos parâmetros quantitativos (número de linfócitos esplênicos, macrófagos e linfócitos T), quanto melhorar a imunidade celular do hospedeiro (Cao et al., 2020).

6. CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS ESPORULADAS:

É inegável que existe no setor alimentício uma tendência global de incorporar probióticos na matriz alimentar, a fim de agregar alguns componentes de promoção da saúde além de seus nutrientes tradicionais (Elshagabee et al., 2017).

No entanto, para a segurança alimentar, se faz necessário o emprego de diversas operações visando a preservação dos alimentos, a saber: Pasteurização, congelamento, cozimento, extrusão, fermentação, aumento da pressão osmótica, aplicação de radiação UV e por fim, uma tecnologia emergente, a aplicação de alta pressão de dióxido de carbono (CO₂), que podem levar à inativação de microrganismos probióticos (Almada-érix et al., 2021).

De forma promissora, a utilização de cepas de *Bacillus* com propriedades probióticas reivindicadas (PB) traz novas possibilidades para a indústria de alimentos, pois essas bactérias além de possuírem características benéficas à saúde humana, apresentam maior resistência ao processamento de alimentos em comparação com as cepas probióticas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, devido a sua característica de formação de esporos (Almada-érix et al., 2021).

A utilização desses micro-organismos esporuladas na produção de lácteos apresenta uma série de vantagens, pois além das PBs serem mais estáveis ao processamento e armazenamento, a qualidade do produto não é afetada, pois não ocorrendo germinação, o

metabolismo microbiano se mantem inativo, conferindo maior tempo de prateleira do insumo. Outra característica de extrema relevância das PBs é a maior resistência aos processos digestivos (pH gástrico e suco biliar), em comparação aos probióticos tradicionais, sendo assegurada a chegada ao intestino delgado de forma intacta (Elshagabee et al., 2017).

Por fim, tem se observado que os produtos fermentados com *Bacillus* possuem atributos sensoriais únicos, provavelmente devido a atividade enzimática destas bactérias. A palatabilidade vem atraindo a atenção do mercado global de alimentos. As cepas de *Bacillus* mais utilizadas atualmente encontram-se descritas na tabela 1 (Elshagabee et al., 2017).

Tabela 1- Cepas de bacillus com propriedades probióticas reivindicadas (PB) estudadas.

Cepa	Origem da cepa
<i>B. flexus</i> Hk1 <i>B. subtilis</i> Bn1 <i>B. licheniformis</i> Me1	CSIR-Central Food Technological Research Institute, Índia
<i>B. mojavensis</i> KJS3	Departamento de Farmácia, Universidade Kyung-sung, Coreia
<i>B. subtilis</i> PB6	Kemin, São Paulo, Brasil ~
<i>B. subtilis</i> PXN 21	Probiotics International Ltd. Lopen Head, Reino Unido
<i>B. coagulans</i> lactosporo	Ganeden Biotech Inc, Mayfield Heights, Ohio, USA

Fonte: Almada-érix et al., 2021

7. PERSPECTIVAS:

O consumo de probióticos já é popularmente conhecido como benéfico a saúde, contudo, avanços científicos já apresentam a tendência de utilização de bactérias esporuladas probióticas na produção de alimentos, porém, ainda há um grande debate entre os pesquisadores e produtores sobre a atividade probiótica versus patológica do *Bacillus spp.* A segurança de um produto alimentar significa a ausência de quaisquer efeitos adversos notáveis à saúde, após o

consumo, sob condições definidas. Neste sentido, diversas cepas de probióticos de *Bacillus* possuem comprovação no status GRAS e são populares, tanto para indústrias farmacêuticas, quanto na de alimentos com propriedades funcionais (Elshagabee et al., 2017).

Em síntese, podemos observar que a utilização de cepas produtoras de esporos além de ser algo inovador e promissor para a produção derivados do leite, estudos ainda são escassos e devem avançar para que haja uma segura aplicação dos micro-organismos esporulados, sem riscos à saúde pública.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALMADA-ÉRIX, Carine N. et al. (2021). Quantifying the impact of eight unit operations on the survival of eight *Bacillus* strains with claimed probiotic properties. **Food Research International**, 142, 110191

Assmann, G., Buono, P., Daniele, A. et al. (2014). Functional foods and cardiometabolic diseases: International task force for prevention of cardiometabolic diseases. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, 24(12), 1272-1300.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica (2013). Política Nacional de Alimentação e Nutrição / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica – 1. ed., 1. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde.

Brasil. Ministério da Saúde - Anvisa. Resolução da diretoria colegiada (2021). Resolução RDC no 241, de 26 de julho de 2018. 2018. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2018/rdc0241_26_07_2018.pdf> Acesso em: 12 out. de 2021.

CAO, J. et al. (2020). Probiotic characteristics of *Bacillus coagulans* and associated implications for human health and diseases. *Journal of Functional Foods*, Elsevier, 64, 1-11

COLOMBO, Monique et al. (2018). The potential use of probiotic and beneficial bacteria in the Brazilian dairy industry. **Journal of Dairy Research**, 85 (4), 487-496.

CORASSIN, A. G. C.; Patricia B. Z.; Carlos, A.F. (2017). Processamento de produtos lácteos: queijos, leites fermentados, bebidas lácteas, sorvete, manteiga, creme de leite, doce de leite, soro em pó e lácteos funcionais. 1a. ed. [S.l.]: Elsevier: Rio de Janeiro. 343 p., v. 3.

CUTTING, Simon M. (2011). Bacillus probiotics. **Food microbiology**, 28 (2), 214-220.

ELSHAGHABEE, Fouad M.F. et al. (2017). Bacillus as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. **Frontiers in microbiology**, 8, 1490.

FOOD; ORGANIZATION, A. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. [S.l.].

GAO, J. et al. (2021). Probiotics in the dairy industry—advances and opportunities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. 20 (4), 3937 – 3982.

GRANATO, D., Nunes, D. S., & Barba, F. J. (2017). An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. **Trends in Food Science & Technology**. 62, 13-22.

GRANATO, D., Barba, F. J., Bursać Kovačević, D., Lorenzo, J. M., Cruz, A. G., & Putnik, P. (2020). Functional foods: Product development, technological trends, efficacy testing, and safety. **Annual review of food science and technology**, 11, 93-118

PEREIRA, Wander Lopes et al. (2020). o efeito dos alimentos funcionais na microbiota intestinal: o uso do kefir e da kombucha na dieta alimentar saudável. **Revista de trabalhos acadêmicos-universo campos dos goytacazes**, 1, 13.

PIMENTEL, T.C. et al. (2020). Probióticos e Prebióticos - Desafios e Avanços. 1º. ed. [S.l.]: Setembro. Editora São Paulo. 372 p.

RIBEIRO SILVA, R.C., et al. (2020). Implicações da pandemia COVID-19 para a segurança alimentar e nutricional no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, 25, 3421-3430

SOARES, M. B. et al. (2019). Behavior of different bacillus strains with claimed probiotic properties throughout processed cheese manufacturing and storage. **International journal of food microbiology**, Elsevier, 307, 108288.

YEUNG, A. W. K., Mocan, A., & Atanasov, A. G. (2018). Let food be thy medicine and medicine be thy food: a bibliometric analysis of the most cited papers focusing on nutraceuticals and functional foods. **Food Chemistry**, 269, 455-465.

Capítulo 3: Participação em congressos

3.1- Envio de trabalho para o Simpósio integrado de inovação em tecnologia dos alimentos (2022)



3.2- Envío de resumo para o II Congresso Euroamericano de processos y produtos alimentários (2023)

