

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

**SCREENING DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS ISOLADAS DE LEITE E
DERIVADOS COM POTENCIAL PROBIÓTICO**

Julia Neitzel Uecker

Pelotas, 2018.

Julia Neitzel Uecker

**SCREENING DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS ISOLADAS DE LEITE E
DERIVADOS COM POTENCIAL PROBIÓTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos (área de conhecimento Microbiologia de Alimentos)

Orientadora: Prof. Dra. Simone Pieniz

Coorientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

U22s Uecker, Julia Neitzel

Screening de bactérias ácido lácticas isoladas de leite e derivados com potencial probiótico / Julia Neitzel Uecker ; Simone Pieniz, orientadora ; Wladimir Padilha, coorientador. — Pelotas, 2017.

75 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Caracterização. 2. Antimicrobianos. 3. Antioxidante. 4. Virulência. 5. Resistência. I. Pieniz, Simone, orient. II. Padilha, Wladimir, coorient. III. Título.

CDD : 664

Julia Neitzel Uecker

Screening de bactérias ácido lácticas isoladas de leite e derivados com
potencial probiótico

Dissertação aprovada como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade
Federal de Pelotas.

Data da defesa: 27/03/2018

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Simone Pieniz (Orientadora)
Doutora em Microbiologia pela UFRGS.

Prof.^a Dr.^a Ângela Maria Fiorentini
Doutora em Ciência dos Alimentos pela UFSC.

Prof.^a Dr.^a Ângela Nunes Moreira
Doutora em Biotecnologia pela UFPel.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem
foram conquistadas do que parecia impossível”.*

Charles Chaplin

Agradecimentos

À Deus por guiar meus passos e meu caminho ao propósito da realização desse trabalho.

À minha família pelo apoio e incentivo durante todos os momentos. Principalmente, meus pais Simone e Carlos, e meu irmão Eduardo, pela cumplicidade, paciência e por não medir esforço para me auxiliar no que fosse possível durante a elaboração deste trabalho. Ao meu namorado Wagner Barreto pelo amor, companheirismo, compreensão e por acreditar no meu potencial. Amo muito vocês!

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Simone Pieniz pela amizade, oportunidade concedida, incentivo e energia desprendida para superar as adversidades.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Wladimir Padilha pela ajuda no necessário.

As amigas e colegas de pesquisa Charlene Cunha, Itiane Jaskulski, Fernanda Moura, Fernanda Bordini, Michele Dutra e Camila Castencio pelos bons momentos de convivência e ajuda nas dificuldades para concretização deste trabalho, sem vocês não teria conseguido.

Ao programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas (DCTA) pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida.

À todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

Resumo

UECKER, Julia Neitzel. **Screening de bactérias ácido lácticas isoladas de leite e derivados com potencial probiótico**. 2018. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Bactérias ácido lácticas (BAL) são as principais representantes dos probióticos em alimentos, proporcionando efeitos benéficos à saúde do hospedeiro. Devido aos efeitos já relatados na literatura, a procura por novas linhagens com essas características tem sido relevante. Assim, o objetivo deste estudo foi isolar, identificar e caracterizar BAL presentes em alimentos de origem láctea com potencial probiótico, bem como analisar o efeito antimicrobiano, a capacidade antioxidante e a presença de fatores de virulência e de resistência. Para isso, foram isolados 40 micro-organismos de diferentes produtos lácteos (yakult®, san bios®, leite de vaca, Ricota, queijo minas frescal e kefir), escolhidos 17 micro-organismos de forma aleatória para as análises futuras, como: avaliação das propriedades probióticas pelos testes de tolerância ao pH, sais biliares e trato gastrointestinal superior; determinação das propriedades antioxidantes pelos métodos de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e reação ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); atividade antimicrobiana frente à micro-organismos patogênicos pelos métodos difusão em poços e difusão em discos; susceptibilidade a antimicrobianos; aspectos de segurança por diversos métodos e detecção de genes com potencial fator de virulência relacionados à adesão, agregação e resistência à vancomicina, além da identificação molecular do 16S rDNA pelo método de Sanger. Por meio dos resultados obtidos observou-se que todos os micro-organismos apresentaram alguma característica probiótica relacionada; todos apresentaram potencial antioxidante pelo método DPPH, porém pelo método TBARS apenas três micro-organismos apresentaram inibição da peroxidação lipídica. A análise antimicrobiana por difusão em poços demonstrou que os micro-organismos R1, F3 e F4 apresentaram inibição frente a *Escherichia coli*; R1 e R9 frente a *Listeria monocytogenes* e K1, K2, R1, R5, e R9 apresentaram ação antimicrobiana frente ao *Staphylococcus aureus*. A atividade antimicrobiana por difusão em disco demonstrou que os micro-organismos Y1, Y2, SB4, SB6, R1, R5, R9, L1, L2, L4, K1 e K2 apresentaram inibição frente a *E. coli*; SB4, SB6, F1, F2 e L4 frente a *Salmonella* Enteritidis; frente a *L. monocytogenes* SB6 e L4 apresentaram ação inibitória; e em relação a *S. aureus* foi observada atividade antimicrobiana quando analisados os micro-organismos L4 e L5. Os micro-organismos foram classificados como homofermentativos, gelatinase, lipase e DNase negativa; α -hemolíticos, não formadores de biofilme, e não apresentam genes de virulência como *agg*, *asa* e genes de resistência como *vanA*. Assim, conclui-se que os micro-organismos R9 (*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*) e L1 (*Leuconostoc citreum*), destacaram-se como micro-organismos promissores com potencial de uso como probiótico, bem como apresentaram características antimicrobianas e antioxidantes satisfatória. Este resultado torna-se de suma importância, visto o possível uso destes na produção futura de alimentos.

Palavras-chave: caracterização; antimicrobianos; antioxidante; virulência, resistência.

Abstract

UECKER, Julia Neitzel. **Screening of lactic acid bacteria isolated from milk and probiotic potential**. 2018. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Lactic acid bacteria (BAL) are the main representatives of probiotics in foods, providing beneficial effects to host health. Due to the effects already reported in the literature, the search for new lineages with these characteristics has been relevant. Thus, the objective of this study was to isolate, identify and characterize BAL present in dairy foods with probiotic potential, as well as to analyze the antimicrobial effect, the antioxidant capacity and the presence of virulence and resistance factors. To that end, 40 microorganisms from different dairy products (yakult, San Bios, fresh cow's milk, Ricotta, Frescal cheese and Kefir) were selected, and 17 microorganisms were randomly chosen for future analyzes, such as: evaluation of the probiotic properties by pH, bile salts and upper gastrointestinal tolerance tests; determination of the antioxidant properties by the methods of capture of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) and reaction with thiobarbituric acid (TBARS); antimicrobial activity against pathogenic microorganisms by well diffusion and disk diffusion methods; susceptibility to antimicrobials; safety aspects by several methods and detection of genes with potential virulence factor related to adhesion, aggregation and vancomycin resistance, as well as the molecular identification of 16S rDNA by the Sanger method. By means of the obtained results it was observed that all the microorganisms presented some related probiotic characteristic; all presented antioxidant potential by the DPPH method, but by the TBARS method only three microorganisms showed inhibition of lipid peroxidation. Antimicrobial analysis by well diffusion showed that the microorganisms R1, F3 and F4 showed inhibition against *Escherichia coli*; R1 and R9 against *Listeria monocytogenes* and K1, K2, R1, R5, and R9 presented antimicrobial action against *Staphylococcus aureus*. The antimicrobial activity by disk diffusion showed that the microorganisms Y1, Y2, SB4, SB6, R1, R5, R9, L1, L2, L4, K1 and K2 showed inhibition against *E. coli*; SB4, SB6, F1, F2 and L4 against *Salmonella* Enteritidis; against *L. monocytogenes* SB6 and L4 presented inhibitory action; and in relation to *S. aureus*, antimicrobial activity was observed when the L4 and L5 microorganisms were analyzed. The microorganisms were classified as homofermentative, gelatinase, lipase and DNase negative; α -hemolytic, non-biofilm forming, and do not show virulence genes such as *agg*, *wing* and resistance genes such as *vanA*. Thus, it was concluded that the microorganisms R9 (*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*) and L1 (*Leuconostoc citreum*) have been shown to be promising microorganisms with potential for use as probiotics, as well as satisfactory antimicrobial and antioxidant properties. This result becomes of paramount importance, considering the possible use of these in future food production.

Keywords: Description; antimicrobials; antioxidant; virulence, resistance.

Lista de Figuras

Figura 1.	Análise da tolerância dos isolados ás condições ácidas.....	38
Figura 2.	Análise da tolerância dos isolados na presença sais biliares.....	41
Figura 3.	Análise da tolerância dos isolados ao suco gástrico e ao suco intestinal simulado.....	44
Figura 4.	Atividade antioxidante pelo método de TBARS.....	46
Figura 5.	Atividade antioxidante pelo método de DPPH após 1h e 24h.....	48
Figura 6.	Capacidade de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade.....	55

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Oligonucleotídeos e condições de reação de PCR utilizados para identificação dos genes de virulência.....	33
Tabela 2.	Análise da atividade antimicrobiana por meio de difusão em disco.....	51
Tabela 3.	Análise de suscetibilidade dos micro-organismos aos antibióticos e classificação segundo o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI).....	57
Tabela 4.	Identificação dos isolados pelo sequenciamento do 16S rRNA.....	62

Sumário

1.	Introdução.....	11
2.	Objetivos.....	13
2.1	Objetivo geral.....	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3.	Referencial teórico.....	14
3.1	Bactérias Acido lácticas.....	14
3.2	Probióticos.....	15
3.3	Probióticos e seus benefícios.....	17
3.4	Radicais livres x antioxidante.....	20
3.5	Atividade antimicrobiana.....	22
3.6	Aspectos relacionados à segurança do uso de probióticos na alimentação.....	23
4.	Materiais e Métodos.....	26
5.	Resultados e Discussão.....	36
5.1	Isolamento e caracterização.....	36
5.2	Caracterização probiótica	36
5.2.1	Tolerância às condições ácidas.....	36
5.2.2	Tolerância aos sais biliares.....	39
5.2.3	Tolerância ao transito gastrointestinal superior.....	42
5.3	Atividade antioxidante.....	45
5.3.1	Determinação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS).....	45
5.3.2	Capacidade antioxidante pelo método do DPPH.....	46
5.4	Atividade antimicrobiana.....	48
5.4.1	Teste de difusão em poços.....	48
5.4.2	Teste de difusão de disco.....	49
5.5	Fatores de Virulência.....	50
5.5.1	Atividade das enzimas gelatinase, lipase, DNase e hemolisina.....	50
5.5.2	Fermentação da Glicose.....	51
5.5.3	Capacidade de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade.....	52
5.5.4	Susceptibilidade a antimicrobianos.....	55
5.5.5	Avaliação da capacidade de formação de biofilme.....	57
5.5.6	Detecção de genes de virulência e resistência.....	58
5.6	Identificação Molecular.....	60
6.	Conclusão.....	62
7.	Considerações finais.....	63
	Referências.....	64

1 Introdução

A dieta ocidental, caracterizada pelo baixo teor de fibras e elevado consumo de gordura, é um dos principais fatores que contribuem com a maior proliferação de bactérias patogênicas na microbiota intestinal (JUMPERTZ et al., 2011). Devido este fato, uma ampla variedade de produtos lácteos vem sendo estudada, utilizando estes aliados microbianos de uma forma eficiente para suprir as necessidades diárias de alguns micronutrientes e se obter uma alimentação mais natural. Esses produtos lácteos abrangem uma ampla variedade de produtos incluindo bebidas como iogurtes, queijos, kefir e demais produtos fermentados.

A aplicação tecnológica de bactérias ácido lácticas (BAL) em alimentos vêm sendo amplamente explorada, tendo em vista o aumento da demanda de alimentos fermentados funcionais, estimulando o desenvolvimento de novos produtos. Um alimento funcional se caracteriza como um produto que promove a saúde e o bem-estar além de nutrir (MEIRA et al., 2012). As BAL constituem um grande grupo de bactérias benéficas que possuem propriedades semelhantes e que produzem como produto final do processo de fermentação o ácido (MOGENSEN et al., 2003).

São as principais representantes dos probióticos em alimentos. Estas são consideradas bactérias probióticas definidas como suplemento vivo, que melhoram o equilíbrio da microbiota intestinal e possuem efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro. Dentre essas bactérias podemos incluir muitas espécies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus* (CABRÉ & GASSULL, 2007).

As células probióticas depois de ingeridas devem ser capazes de sobreviverem às condições adversas no trato gastrointestinal, como suco gástrico, sais biliares e enzimas digestivas além de manter sua viabilidade e atividade metabólica no intestino para exercerem os efeitos benéficos aos hospedeiros (SAAD, 2006; ARAÚJO, 2007).

Para exercer um impacto benéfico à saúde, a concentração de probióticos no produto deve atingir níveis adequados (DONKOR et al., 2007). Shah (2000) sugere um mínimo de 10^6 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) mL^{-1} , porém recomenda 10^8 UFC. mL^{-1} para compensar a redução que ocorre no número de microorganismos viáveis durante a passagem pelo trato gastrintestinal. De acordo com a legislação brasileira, a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar na faixa de 10^8 a 10^9 UFC. mL^{-1} na porção diária (BRASIL, 2007).

Muitos benefícios vêm sendo associados com culturas probióticas, incluindo atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, melhoria no metabolismo da lactose, propriedades antimutagênicas, propriedades anticarcinogênicas, propriedades antidiarréicas, estimulação do sistema imune, melhoria da síndrome do intestino irritável e supressão de infecções causadas por *Helicobacter pylori* (TUOHY et al. 2003). Quanto aos seus efeitos anticarcinogênicos, estes podem ser atribuídos à inibição de enzimas pró-carcinogênicas ou à estimulação do sistema imune do hospedeiro (ISOLAURI et al., 2004). Alguns dos benefícios relatados estão devidamente documentados, enquanto outros têm demonstrado resultados promissores em estudos com animais.

Deste modo, o presente estudo visa identificar BAL presentes em leite *in natura* e derivados lácteos com potencial probiótico, antioxidante e antimicrobiano e, da mesma forma caracterizá-las quanto à segurança aos fatores de virulência e resistência a antimicrobianos.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Isolar, identificar e caracterizar BAL presentes em leite e derivados lácteos com potencial probiótico, bem como analisar o efeito antimicrobiano, a capacidade antioxidante e a presença de fatores de virulência e de resistência.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e caracterizar BAL de leite e derivados lácteos;
- Avaliar o potencial probiótico dos isolados, por meio da resistência a ácidos e sais biliares e tolerância ao trato gastrointestinal superior;
 - Determinar a atividade antioxidante por meio da inibição da peroxidação lipídica e sequestro de radicais livres;
 - Avaliar a atividade antimicrobiana frente a micro-organismos indicadores;
 - Investigar a atividade das enzimas gelatinase, lipase, DNase, hemolisina e formação de biofilmes *in vitro*, bem como a presença dos genes envolvidos com os fatores de virulência (asa e agg);
 - Analisar a resistência aos antimicrobianos e a presença de genes ligados à vancomicina;
 - Identificar molecularmente os micro-organismos isolados.

3 Revisão da literatura

3.1 Bactérias ácido lácticas

O isolamento e a identificação de micro-organismos a partir de fontes naturais tem sido um instrumento amplamente utilizado para a obtenção de novas linhagens (ADNAN & TAN, 2007). As bactérias ácido lácticas (BAL) além de possuírem funções como a conservação das propriedades nutricionais, aumentar a vida útil de alimentos perecíveis, incrementar o sabor dos alimentos quando comparados à matéria prima original e, aumentar a biodisponibilidade de nutrientes, tem como principal função manter a acidificação dos produtos alimentares em um pH próximo à 4, o que ajuda a impedir a multiplicação de bactérias patogênicas e deteriorantes conservando desta forma os alimentos por mais tempo e conferindo maior segurança alimentar para o produto. (BROMBERG et al., 2006). As BAL veem sido utilizadas na produção de iogurtes, queijos, manteiga, bebidas, leites fermentados, produtos cárneos, entre outros produtos, conferindo aos produtos características sensoriais únicas como aroma, textura e *flavor* (BRUNO & CARVALHO, 2009).

As BAL adicionadas aos alimentos com a finalidade de prolongar a vida útil dos alimentos ou inibir patógenos são denominadas culturas protetoras (BUDDE et al., 2003), podendo interferir na multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas por meio de mecanismos como competição por sítios de ligação e produção de substâncias antagonísticas, competição por nutrientes e oxigênio, especialmente por meio de peptídeos antimicrobianos (HUGAS, 1998). As BAL abrangem um grupo amplo de micro-organismos no qual se destacam como principais gêneros: *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Streptococcus* e *Vagococcus* (MOGENSEN et al., 2003).

BAL são micro-organismos Gram positivos, não formadores de esporos, anaeróbios, anaeróbios facultativos ou microaerófilos que apresentam melhor desenvolvimento em meios com baixas tensões de oxigênio; são ácido tolerantes, aerotolerantes, fastidiosos, com metabolismo estritamente fermentativo, desprovidos de flagelos, na grande maioria catalase negativa, com exceção de algumas espécies de *Pediococcus*, produzem pseudocatalase e apresentam o ácido láctico como produto principal da fermentação dos carboidratos (De MARTINIS et al., 2002). Apresentam-se na forma de bacilos ou cocos, não esporulados, gelatinase negativos, não redutores de nitrato a nitrito, e incapazes de utilizar o lactato. A

temperatura ótima de crescimento situa-se entre 35 e 45°C e o pH entre 6,0 e 7,0 e suas variações (FERNANDES et al., 2013).

3.2 Probióticos

Com o aprimoramento das pesquisas científicas inúmeras definições do termo "probiótico" já foram descritas, mas segundo a Associação Científica Internacional para Probióticos (REID et al., 2003) e a Food and Agriculture Organization of the United Nations - World Health Organization (FAO – WHO, 2001) probióticos são considerados "micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro". Porém, Salminen et al. (2006) sugerem que a segurança e a eficácia dos probióticos têm que ser demonstradas para cada linhagem e produto. Os alimentos probióticos estão cada vez mais inseridos no mercado como alimentos funcionais, ou seja, alimentos que oferecem benefícios à saúde, além de suas funções nutricionais básicas, e estão disponíveis em várias formas, como os produtos lácteos fermentados, produtos de confeitaria, formulações para animais, produtos farmacêuticos (FERREIRA, 2003). Esses micro-organismos trazem melhorias no equilíbrio da microbiota intestinal de indivíduos que os consomem periodicamente, pois possuem a capacidade de se manterem vivos no produto fermentado e sobreviverem à passagem pelo trato gastrointestinal, fixando-se no intestino (BEHRENS et al., 2001). A concentração de micro-organismos varia conforme a porção do intestino, sendo o cólon a região do trato gastrointestinal mais densamente povoada por bactérias (JAGER et al., 2013). É de realçar que as quantidades de micro-organismos na microbiota podem variar bastante entre indivíduos, podendo ocorrer mudanças significativas, tendo por base a idade do organismo hospedeiro, a dieta e estado de saúde. Fatores genéticos também têm um papel importante (BIEN et al., 2013).

Para que os micro-organismos possam exercer suas propriedades probióticas, depois de ingeridos, devem conter algumas características essenciais, como sobreviver, crescer e se fixar ao epitélio intestinal, sobreviver às condições de estresse do trato gastrointestinal, como o suco gástrico, os sais biliares e as enzimas intestinais e estomacais (FRANCO et al., 2006). Não possuem propriedades patogênicas, tóxicas, alérgicas, mutagênicas ou carcinogênicas, ter capacidade antagônica a bactérias patogênicas, produção de substâncias antimicrobianas, incluindo bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos e, não serem

capazes de transmitir genes de resistência a outros micro-organismos (FURLAN et al., 2004). O consumo recomendável de bactérias probióticas, por dia, é variável. Segundo Vinderola & Reinheimer (2000) para se obter o efeito benéfico desejado é necessária a ingestão entre 10^8 e 10^{11} UFC. mL ou g dependendo da linhagem empregada. Conforme Oliveira et al. (2002) para as bactérias manterem-se viáveis e em quantidades desejáveis, a população mínima deve ser de 10^7 UFC.mL ou g no seu local de ação específico, podendo este ser no intestino delgado ou grosso, exercendo efeitos benéficos ao seu hospedeiro. Já Samona & Robinson (1991) preconizam um número mínimo de células viáveis de 10^5 UFC.mL ou g. Possivelmente, essas contagens sejam efetivas quando consumidos produtos lácteos com frequência regular (VINDEROLA & REINHEIMER, 2000).

Os micro-organismos probióticos devem ser preferencialmente aqueles nativos ao consumidor alvo, por não serem reconhecidos como antígenos pelo seu sistema imune (KLAENHAMMER & KULLEN, 1999). Ainda, devem se manter viáveis por longo tempo durante a estocagem e transporte e, em quantidades apropriadas no produto até o final da sua data de validade (SAAD, 2006). Alguns fatores podem afetar sua sobrevivência no produto alimentício como, por exemplo, a concentração do inóculo, cepa utilizada, acidez do meio, interação com as bactérias presente no alimento, presença de conservantes, nível de oxigênio dissolvido, disponibilidade de nutrientes e de fatores de crescimento, tempo de incubação e temperatura de armazenamento, entre outros (PANDEY et al., 2008).

É necessário conhecer a segurança que os probióticos oferecem ao serem ingeridos, pois podem conter culturas bacterianas desconhecidas como também bactérias totalmente conhecidas e quantificadas (SILVA & PINHEIRO, 2008). Algumas das espécies já aprovadas pela ANVISA (2008) como probióticas são: *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus parasacei*, *Lactobacillus casei* variedade *ramnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* e *Enterococcus faecium*. Os principais micro-organismos bacterianos estudados como probióticos são os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, contudo, nem todas as espécies pertencentes a estes gêneros são consideradas probióticas. As bifidobactérias costumam colonizar preferencialmente o cólon, enquanto os lactobacilos colonizam preferencialmente a porção terminal do íleo (SAAD et al., 2011).

O consumo de produtos contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*, segundo Pupin (2002) possuem potencial de aumentar os movimentos peristálticos do intestino auxiliando na absorção de nutrientes, controlando ou até prevenindo infecções intestinais, dificultando os receptores dos patógenos, inativando os efeitos das enterotoxinas e evitando que micro-organismos resistentes a patógenos se desenvolvam. Ao mesmo tempo, possuem a capacidade de melhorar a digestão da lactose em pessoas com resistência a mesma, metabolizar alguns tipos de fármacos, reduzir o nível de colesterol e, da mesma forma, reduzir a incidência de câncer de cólon.

3.3 Probióticos e seus benefícios

A literatura destaca diversos benefícios à saúde humana atribuída à ingestão de culturas probióticas. Alguns destes estão descritos a seguir.

3.3.1 Alívio da constipação

Um estudo clínico realizado por Gotteland et al. (2010) afirmaram que o consumo de bebida láctea simbiótica (produto no qual se combinam prebióticos e probióticos) reduziu de forma significativa a constipação nos indivíduos (homens e mulheres) estudados. Em outro estudo, Matsumoto et al. (2006), comprovou da mesma forma, redução da constipação, em indivíduos submetidos ao consumo diário de leite fermentado contendo *Lactobacillus casei* durante um mês, avaliando a consistência das fezes, frequência de defecação, movimentos intestinais, além do histórico de constipação dos indivíduos. As causas encontradas para a melhora da constipação nos indivíduos estudados foram: aumento na frequência de movimentos intestinais e no número de lactobacilos e bifidobactérias presentes nas fezes, pois à medida que aumentam em número, as bactérias contribuem para a formação do bolo fecal e uma boa formação de bolo fecal está relacionada a um trânsito intestinal mais rápido.

3.3.2 Estimulação do sistema imune

Já é sabido que alguns gêneros de bactérias intestinais, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* estão relacionados com o estímulo da resposta imune por aumento da produção de anticorpos, ativação de macrófagos, proliferação de células T e produção de interferom (LODDI et al., 2002). Jin et al. (1997) relatam que o gênero *Lactobacillus* pode ser importante no desenvolvimento de imunocompetência,

exercendo proteção contra antígenos que causam reações inflamatórias no intestino. Entretanto, o verdadeiro mecanismo pelo qual estes micro-organismos considerados probióticos estimulam o sistema imune, ainda não está completamente elucidado.

3.3.3 Aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas

A desregulação da microbiota leva a diminuição da produção de vitaminas, inativando as enzimas fazendo com que estas não desempenhem com êxito suas funções, com conseguinte produção de toxinas, destruindo a mucosa intestinal, causando assim a redução da absorção dos nutrientes (ALMEIDA et al., 2009). A competição por nutrientes não ocorre entre o hospedeiro e a bactéria e, sim, entre as bactérias intestinais pelos seus nutrientes específicos (PELICANO et al., 2003). As bactérias probióticas se nutrem com as substâncias degradadas de forma parcial pelas enzimas digestivas normais, ou pelas adicionadas a dieta intencionalmente como, por exemplo, os prebióticos (LODDI et al., 2002).

3.3.4 Promoção da resistência gastrointestinal à colonização por patógenos

É de grande relevância a presença de micro-organismos com propriedades probióticas no intestino, considerando que estes por meio de um efeito competitivo pela produção de compostos inibitórios ajudam a impedir a colonização por espécies patogênicas (GRANATO et al., 2012) conferindo efeito protetor contra infecções intestinais. As bactérias probióticas ocupam sítios de ligação na mucosa intestinal, formando uma barreira física contra a colonização das bactérias patogênicas (FURLAN et al., 2004). Loddi et al. (2002), afirmam que o bloqueio dos sítios de ligação na mucosa entérica pelas bactérias intestinais, pode reduzir a área de interação no ceco pelas bactérias patogênicas, sendo necessário aproximadamente 40 bactérias para recobrir a superfície de uma célula intestinal. Desta forma, as bactérias patogênicas seriam excluídas por competição.

3.3.5 Promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose

Pela indução da quebra de proteínas com potencial alergênico no trato gastrointestinal, os micro-organismos probióticos também estão associados à redução de alergias a proteínas alimentares (MORAIS & JACOB, 2006). Os micro-organismos probióticos auxiliam na redução dos efeitos indesejáveis em indivíduos que possuem intolerância à lactose, pois estes digerem a lactose na luz intestinal,

por possuírem a enzima β -D-galactosidase, a qual em indivíduos intolerantes é produzida em pequena quantidade ou totalmente ausente. Desta maneira, às diarreias osmóticas e o desconforto abdominal promovido pelo excesso de lactose não ocorrem com tanta veemência (SAAD, 2006). Fan et al. (2006) relataram em seu estudo que um produto contendo micro-organismos probióticos dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus*, foi ingerido por um ano por pacientes com sintomas da síndrome do intestino irritado, e verificaram uma redução em 73% dos sintomas nos pacientes analisados.

3.3.6 Controle da microbiota intestinal e sua estabilização após o uso de antibióticos

Determinados tratamentos com antibióticos permanecem com seus efeitos por longos períodos no corpo humano, isso gera uma pressão para a seleção de bactérias. Estudos têm mostrado alterações na microbiota após antibioticoterápicos, destacando as bactérias mais sensíveis que são destruídas com a medicação e as que sobrevivem e se destacam como resistentes (JERNBERG et al., 2010). A aderência de alguns micro-organismos na parede do intestino é um importante elemento que controla a composição das comunidades epiteliais e do lúmen. Certos micro-organismos apresentam estruturas de adesão denominadas adesinas, as quais possibilitam o reconhecimento nos eritrócitos da mucosa, sendo possível dessa forma, a adesão do micro-organismo na parede do intestino e auxilia na sua multiplicação (BARBOSA et al., 2010). Conforme Macari & Furlan (2005), os probióticos apresentam-se como alternativa aos antimicrobianos promotores de crescimento, pois os probióticos possuem características que podem reduzir a excreção de nutrientes melhorando o aproveitamento dos alimentos.

3.3.7 Diminuição da população de patógenos por meio da produção de compostos antimicrobianos

Durante a colonização de micro-organismos patogênicos na mucosa do intestino aqueles que são probióticos desfavorecem esse ambiente intestinal devido à produção de substâncias antimicrobianas, como ácidos orgânicos (acético, propiônico, butílico e láctico), bacteriocinas, dióxido de carbono e peróxido de hidrogênio (PELÍCIA, 2004). Além destes efeitos citados acima, outros efeitos têm sido atribuídos a estes micro-organismos, embora ainda haja poucos estudos na

literatura referenciando suas funções, como a redução da concentração plasmática de colesterol, efeitos anti-hipertensivos e antitumorais (TUOHY et al., 2003), além de efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade, prevenção de infecções urogenitais, redução do risco de câncer de cólon e de doença cardiovasculares (SAAD, 2006).

3.4 Atividade antioxidante

O estudo dos antioxidantes tem atraído à atenção de uma grande parcela da comunidade científica, principalmente devido às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo e sua relação em vários processos fisiopatológicos de diversas doenças humanas (SAIDET & GILLILAND, 2005). Antioxidantes são substâncias que podem retardar a velocidade da oxidação, inibir a oxidação, diminuir a concentração dos radicais livres no organismo e/ ou quelar íons metálicos (RODRIGUES et al., 2003) por meio de um ou mais métodos. A maioria destes é de natureza exógena, os quais necessitam ser ingeridos pela dieta ou, podem ser de natureza endógena, quando são produzidos pelo próprio organismo (DUARTE-ALMEIDA, 2006).

Os seres humanos possuem sistemas de defesa antioxidantes próprios, que evoluíram para protegê-los contra os danos oxidativos, porém, infelizmente, não são suficientemente eficazes para impedir totalmente este dano. Apesar disso, alimentos que contenham antioxidantes, suplementos e substâncias antioxidantes, podem servir para ajudar a reduzir o dano oxidativo do organismo (SIES et al., 2005). Além destes, as BAL também vêm sendo investigadas em relação a sua capacidade antioxidante. As propriedades das BAL podem beneficiar o consumidor, pelas bactérias probióticas com potencial produção de antioxidantes durante o trato intestinal (SAIDET & GILLILAND, 2005).

As maiorias das bactérias ácidas lácticas apresentam esse potencial antioxidante através da produção de enzimas superóxido dismutase, que catalisam radicais superóxido a oxigênio e peróxido de hidrogênio e da glutathione peroxidase que elimina peróxido de hidrogênio e os radicais hidroxila (STECCHINI et al., 2001). Algumas bactérias ácido lácticas podem também produzir antioxidantes não enzimáticos, com atividade de redução e capacidade quelante de íons metálicos (LEE et al., 2005). Os *Lactobacillus* podem melhorar a defesa antioxidante do hospedeiro, pois possuem sistemas para manter os radicais livres em níveis que não

são tóxicos para as células. O uso de cepas específicas pode demonstrar diferentes mecanismos de ação.

A atividade antioxidante pode ser analisada por diferentes métodos tais como pelo sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila pelo método DPPH, o qual tem como base a transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante; e pelo método TBARS (reação às substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), utilizado para estimar a peroxidação lipídica.

A determinação da atividade antioxidante dos alimentos e das BAL, além de prognosticar o potencial antioxidante do alimento antes de ser consumido, é importante também para avaliar oxidação e a deterioração do alimento, demonstrando reações que poderiam levar à redução da sua qualidade e valor nutricional. É sugerido ainda que, a capacidade antioxidante das cepas probióticas, que podem reduzir os danos oxidativos ao organismo humano pelas EROS, estão relacionadas com a idade e o aparecimento de doenças crônicas (MEIRA, 2011).

3.5 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das BAL tem sido relatada por diversos autores, pois possuem um potencial elevado de uso como bioconservadores por serem considerados micro-organismos seguros para o consumo (ANVISA, 2002), e por produzirem compostos proteicos denominados bacteriocinas, os quais possuem atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, podendo agir inibindo (efeito bacteriostático) ou destruindo (efeito bactericida) espécies relacionadas (MADIGAN et al., 2004). Durante o tempo de armazenamento, as BAL preservam as características sensoriais do alimento, as qualidades nutritivas da matéria-prima, prolongam a vida útil do alimento e são também capazes de inibir micro-organismos patogênicos indesejáveis (FERNANDES et al., 2014).

Uma grande variedade de linhagens de BAL tem sido utilizada rotineiramente como culturas iniciadoras na fabricação de produtos cárneos, lácteos e vegetais (BROMBERG et al., 2006). Devido à ampla importância econômica das BAL para a indústria de alimentos e bebidas fermentados, estudos sobre a fisiologia, bioquímica, genética e biologia molecular das bacteriocinas tiveram um avanço significativo, permitindo o esclarecimento dos mecanismos de ação e das estruturas de muitos desses compostos. O modo de ação de muitas bacteriocinas parece ocorrer inicialmente em nível da membrana citoplasmática (KLAENHAMMER, 1993).

O reconhecimento dos micro-organismos *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus* como principais patógenos em alimentos, despertou o interesse no desenvolvimento de novos métodos para a obtenção de alimentos seguros (FRIEDMAN et al., 2003). As pesquisas relacionadas ao uso de linhagens de BAL produtoras de bacteriocinas visando à inibição de *Listeria monocytogenes* (RODRÍGUEZ et al., 2005) vem aumentando devido o fato de ser um importante patógeno nas doenças transmitidas pelos alimentos (DTA), sendo um micro-organismo que se encontra amplamente disseminado na natureza (SCHWAB & EDELWEISS, 2003). *Listeria monocytogenes* é patogênica tanto para o homem quanto para animais, e sua ampla distribuição ambiental é favorecida pela sua capacidade de se desenvolver entre 1°C e 45°C, embora sua faixa ideal de crescimento seja entre 30°C e 37°C, essa bactéria possui a capacidade de sobreviver em alimentos congelados. Toleram pH extremos de 4 a 9, baixa atividade de água e concentrações de NaCl de 10% ou superiores (JAY, 2005). Este micro-organismo é considerado um patógeno emergente de grande interesse na área da saúde devido às dificuldades de sua eliminação, como também, a possibilidade de causar a listeriose, uma doença em que a gravidade depende das condições imunológicas do hospedeiro e do tipo de infecção (CATÃO & CEBALLOS, 2001).

3. 6 Segurança do uso de probióticos na alimentação

Alguns aspectos de segurança para o uso de uma bactéria considerada probiótica incluem: sua identificação adequada em nível de espécie, origem da estirpe, não carrear genes plasmidiais de resistência a antibióticos, não promover a degradação da mucosa intestinal, não possuir fatores de patogenicidade, não apresentar histórico de associação com doenças ou desordens intestinais (SAARELA et al., 2000).

Os fatores de virulência, também conhecidos como fatores de patogenicidade, referem-se a mecanismos observados em comuns entre vários micro-organismos patogênicos. Segundo Schaechter et al. (1999), fator de patogenicidade é qualquer elemento do micro-organismo que potencializa a sua capacidade em causar ou adquirir doenças. Os fatores de virulência são mecanismos utilizados pelas bactérias por meio dos quais estas colonizam e invadem o intestino, causando danos ao hospedeiro. Os fatores de virulência de um micro-organismo são regulados pela

presença de seus genes codificantes em regiões específicas do genoma, conhecidas como ilhas de patogenicidade (HACKER & KAPER, 2000). Esses genes podem estar presentes em elementos extra-cromossomais como plasmídeos e transposons ou no cromossomo.

A presença das atividades de gelatinase, lipase, DNase e hemólise em BAL com potencial probiótico também não são desejáveis. A gelatinase é uma enzima proteolítica capaz de hidrolisar a gelatina, caseína, colágeno, hemoglobina e outros peptídeos bioativos e está associada a virulências em humanos e a processos inflamatórios (FISHER & PHILLIPS, 2009). Esta tem como função na patogênese o fornecimento nutricional para as bactérias a partir da degradação do tecido hospedeiro. Segundo Franz et al. (2001) há uma elevada incidência de produção de gelatinase em isolados de produtos lácteos como o queijo, por serem ricos em proteínas e as utilizarem como fonte de aminoácidos.

As lipases são enzimas hidrossolúveis que possuem como principal função catalisar a hidrólise total ou parcial de triacilglicerol (TAG), liberando diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), glicerol e ácidos graxos livres (VAZ & CHOUPINA, 2012). De acordo com Barbosa et al. (2010), a DNase é uma enzima capaz de degradar o ácido nucleico (DNA), promovendo uma vantagem competitiva ao micro-organismos, permitindo, assim, a infecção do hospedeiro.

A enzima hemolisina é uma toxina bacteriana, e a sua produção ocorre devido ao requerimento de íons de ferro, micronutriente fundamental que atua como cofator enzimático no desenvolvimento de micro-organismos patogênicos (HUSAIN, 2008). A sua patogênese ocorre devido à inibição dos leucócitos e lise dos eritrócitos, a liberação de ferro e nutrientes (FISHER & PHILLIPS, 2009).

A substância de agregação é uma adesina, que promove a formação de agregados durante a conjugação, auxiliando assim na transferência de plasmídeos, expressa pelos genes *asa* e *agg* (KOCH et al., 2004).

A vancomicina por meio de uma ligação na extremidade terminal D-alanina-D-alanina de unidade precursora da parede celular inibe a sua síntese (CUI et al., 2006). Muitos genes são responsáveis pela resistência à vancomicina, como por exemplo, *VanA*. O gene *VanA* pode ser ativado pela exposição da bactéria à vancomicina, induzindo a produção de proteínas que conferem resistência, classificada como altamente resistente (MURRAY, 1998).

A autoagregação e a coagregação dos probióticos também são considerados mecanismos importantes, pois podem formar empecilhos que previnem a colonização por patógenos, podem envolver um ou mais micro-organismos, sendo um processo necessário para que ocorra à adesão ao epitélio intestinal (DEL RE et al., 2000). A aderência das bactérias que pertencem à mesma estirpe pode ser denominada como autoagregação, e a coagregação ocorre quando duas ou mais bactérias, de espécies diferentes, interatuam formando um aglomerado podendo ser considerado um fator de virulência (KHEMALLELAKUN et al., 2006). Entretanto, vale ressaltar que algumas características físico-químicas celulares podem impedir a adesão, como a hidrofobicidade (DEL RE et al., 2000).

Medeiros (2011) reforça a importância da segurança na utilização desses micro-organismos em alimentos, pois relata que genes de virulência podem ser encontrados em amostras de origem alimentar.

4. Material e Métodos

4.1 Isolamento, seleção e caracterização da amostra

Esta pesquisa foi desenvolvida nos Laboratórios de Microbiologia e Nutrifisiogenômica da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), localizados na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

Conforme normas preconizadas (SILVA et al., 2001), a unidade analítica (leite e produtos lácteos) foi coletada assepticamente e transferida para sacos de *Stomacher* previamente esterilizados e tarados sobre uma balança, após foram homogeneizados. O preparo da primeira diluição constou da adição de 225mL de água peptonada 0,1% e 25g de cada amostra (yakult®, san bios®, leite de vaca, Ricota, queijo minas frescal e kefir). Após, foi transferido para equipamento *Stomacher* durante 2min para a homogeneização da amostra.

Foram realizadas diluições seriadas da amostra homogeneizada até a diluição 10^{-5} . Para isolamento das bactérias ácido lácticas, foi realizada a inoculação de 0,1ml de cada diluição na superfície em placas de Petri estéreis com o Agar *Man Rogosa Sharpe* (MRS), sendo estas incubadas invertidas e incubadas a 37°C por 48-72h.

Foram isolados 40 micro-organismos do leite *in natura* e dos produtos lácteos. Todas os micro-organismos isolados foram submetidos a testes de coloração de Gram de acordo com a metodologia descrita por Bier (1985) e teste de catalase de acordo com Tortora et al. (2012). Apenas os isolados classificados como Gram-positivos e catalase negativos foram submetidos às análises posteriores por serem já aceitas como características de BAL. Após, foram selecionados 13 micro-organismos para continuação no estudo, os quais foram isolados de produtos como kefir e alimentos lácteos como leite de vaca *in natura*, ricota e queijo minas frescal. Quatro micro-organismos foram utilizados como controle, isolados do iogurte-yakult® e do queijo minas frescal - san bios®.

Estes micro-organismos estão mantidos em cultura estoque em ultrafreezer a -80°C no Laboratório de Nutrifisiogenômica da UFPEL.

4.2 Critérios para seleção de isolados com características probióticas

4.2.1 Tolerância a condições ácidas

A resistência do isolado sob diversas condições ácidas foi realizada de acordo com Erkkila & Petaja (2000), com algumas modificações. As BAL foram inoculadas em caldo BHI a 37°C por 24h. A resistência dos isolados sob diferentes condições ácidas foi avaliada em caldo MRS (pH 7) ajustado a pH 2, 3 e 4 com ácido clorídrico (HCL) concentrado, sendo que o pH 7 foi usado como controle. Um mililitro (1mL) da cultura foi adicionado aos tubos contendo 10mL de caldo BHI acidificado. Após a exposição às condições ácidas por 0h, 2h, e 4h, diluições seriadas de cada tempo foram inoculadas em placas contendo Agar *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubadas à 37°C por 24h. Posteriormente, foi realizada a contagem da sobrevivência das células que foi expressa como valores de log de Unidades Formadoras de Colônias por mL ($\log.UFC.mL^{-1}$). A porcentagem de sobrevivência foi calculada com a seguinte equação: % de sobrevivência: contagem final ($UFC.mL^{-1}$) / controle ($UFC.mL^{-1}$) x 100. O experimento foi realizado em triplicata.

4.2.2 Resistência aos sais biliares

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

4.2.3 Tolerância ao trânsito gastrointestinal superior de forma simulada

A avaliação de tolerância ao trânsito gastrointestinal superior foi avaliada de forma simulada conforme Huang & Adams (2004). Após 24h de incubação a 37°C foram separadas por centrifugação (1200 x g por 5min) as células dos micro-organismos isolados, lavadas duas vezes com tampão fosfato salina (0,85%) (PBS, Laborclin®), e ressuspendidas em solução salina a 0,5%. Uma alíquota de 200µl da

suspensão celular foi ministrada a 0,3mL de solução salina e 1mL de suco gástrico ou intestinal simulado e incubados a 37°C. A contagem de células viáveis foi realizada no tempo 0h, 2h e 4h para a tolerância gástrica e para a determinação da tolerância ao trânsito no intestino delgado.

O suco gástrico simulado consistiu em pepsina (3mg.mL⁻¹) e pH 2 com ou sem a adição de leite integral; enquanto o suco intestinal simulado foi composto por pancreatina (1mg.mL⁻¹), pH 8 com ou sem adição de 0,5% de sais biliares. O efeito da presença de um alimento na sobrevivência durante o trânsito gástrico em pH 2 foi avaliado da mesma forma, porém, substituindo a solução salina (0,85%) por 0,3mL de leite integral reconstituído a 10% (m/v). A contagem do número de células viáveis durante a simulação pelo trato gástrico e pelo trato intestinal foi realizada nos tempos 0h, 2h e 4h em placas de Petri contendo Agar MRS. Os dados foram expressos como valores de log.UFC.mL⁻¹. O experimento foi realizado em triplicata.

4.2.4 Capacidade de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade

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

espectrofotometro. A hidrofobicidade foi determinada como o percentual de adesão, conforme $[(A_0-A)/A] \times 100$, onde A_0 e A são as absorvâncias antes e depois da extração com tolueno, respectivamente. O experimento foi realizado em duplicata.

4.3 Capacidade Antioxidante

4.3.1 Preparação do sobrenadante bruto

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

4.3.2 Determinação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

A reação ao Ácido Tiobarbitúrico foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Ohkawa et al. (1979). Primeiramente foram incubados em banho maria a 80°C, tubos de ensaio contendo água Mili Q e Azeite de Oliva Extra Virgem, e os tubos foram submetidos à oxidação por 100µM de sulfato ferroso, por 10min. Posteriormente, foram adicionados em cada tubo a amostra do sobrenadante bruto de cada micro-organismo, Lauril Sulfato de Sódio (SDS) 8,1% sendo a alíquota de 200µL; Tampão de Ácido Acético pH 3,44 (500µL) e Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 0,6% sendo 500 µL. Em seguida, os tubos foram incubados novamente em banho maria a temperatura de 100°C por 1h.

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

4.3.3 Capacidade antioxidante pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

O método DPPH utilizado foi realizado de acordo com Brand-Williams et al. (1995) baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorvância a 515nm. O DPPH foi preparado na concentração de $60\mu\text{mol.L}^{-1}$, dissolvido em álcool metílico (CH_3OH), sendo, posteriormente, a solução homogeneizada e transferida para um frasco de vidro âmbar, devidamente etiquetado. A solução preparada foi usada apenas no dia da análise. Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 0,1mL do sobrenadante bruto (relatado no item 4.3.1) de cada micro-organismo para tubos de ensaio contendo 3,9mL da solução dissolvida do radical DPPH ($60\mu\text{mol.L}^{-1}$) e homogeneizada em vórtex. A solução controle foi realizada utilizando 0,1mL da solução controle (composta por 40mL álcool metílico 50%, 40mL acetona 70% e 20mL de água destilada) com 3,9mL do radical DPPH ($60\mu\text{mol.L}^{-1}$) e, após homogeneizado, foi armazenado no escuro por 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h, 12h e 24h, sendo que para a análise do sequestro de radicais livres foram utilizados o primeiro (1h) e último período (24h). Como branco utilizou-se o álcool metílico. A curva padrão foi realizada em concentrações entre $0-60\mu\text{mol.L}^{-1}$ de DPPH. Os resultados foram expressos em EC_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) que é definida como a concentração mínima do antioxidante necessária para reduzir 50% da concentração do DPPH inicial a partir do momento que o extrato atingir a estabilidade. O experimento foi realizado em triplicata em dois experimentos independentes.

4.4 Atividade Antimicrobiana

4.4.1 Teste de difusão em poços

Os isolados foram avaliados quanto a sua atividade antagonista e bacteriocinogênica, utilizando-se o sobrenadante bruto, conforme descrito anteriormente (item 4.3.1). A atividade bacteriocinogênica dos isolados de BAL foi avaliada por meio do método de difusão em poços descrito por Biscola et al. (2013) com modificações. A atividade antimicrobiana dos isolados foi testada frente aos micro-organismos indicadores *Escherichia coli* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella enteritidis* ATCC 13076.

Alíquotas de 20µL do sobrenadante bruto foram adicionadas sobre placas de Petri contendo Agar BHI com aproximadamente 10^5 UFC.mL⁻¹ de cada micro-organismo. Após a completa absorção da alíquota pelo meio de cultura, as placas foram incubadas a 37°C por 24h. A presença de halo de inibição no meio (≥ 5 mm) foi considerada indicadora da produção de bacteriocina, caracterizando a capacidade bacteriocinogênica dos isolados. O experimento foi realizado em duplicata em dois experimentos independentes.

4.4.2 Teste de difusão de disco

Micro-organismos indicadores (*Escherichia coli* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella enteritidis* ATCC 13076) foram suspensos em solução salina 0,85% e padronizados a 0,150 por OD_{600nm} em espectrofotômetro. Após, alíquotas de 20µL do sobrenadante bruto conforme descrito anteriormente (item 4.3.1) dos micro-organismos isolados de BAL foram aplicados sobre discos estéreis de celulose (5mm) alocados em placas com Agar BHI previamente inoculadas com os micro-organismos indicadores com auxílio de *swab*. As placas foram incubadas a 37°C e as zonas de inibição foram mensuradas após 24h com o auxílio de um paquímetro, considerados inibitórios os halos ≥ 7 mm (BROMBERG et al., 2006). O experimento foi realizado em quadriplicata em dois experimentos independentes.

4.5 Fatores de virulência

4.5.1 Gelatinase

A detecção da produção de gelatinase foi realizada de acordo com Marra et al. (2007). Os micro-organismos em estudo foram inoculados em tubos contendo 4mL de caldo BHI com 12% de gelatina por 48h a 37°C. Após a incubação, os tubos foram alocados em banho de gelo por 30min, sem agitação. Foi utilizado como controle positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. O resultado foi interpretado como negativo: meio sólido ou positivo: meio líquido. O experimento foi realizado em duplicata em dois experimentos independentes.

4.5.2 Produção de lipase

A produção de lipase foi realizada de acordo com Barbosa et al. (2010). Alíquotas de 2µL do sobrenadante bruto de cada cultura foram semeados

pontualmente em placas contendo Agar BHI suplementado com 2g.L^{-1} de Cloreto de cálcio (CaCl_2) e 10g.L^{-1} de Tween 80 e, em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 48h. A atividade lipolítica foi identificada pela formação de halos opacos ao redor das colônias. O experimento foi realizado em duplicata em dois experimentos independentes.

4.5.3 DNase

A atividade de DNase foi testada como descrito por Bannerman (2003), com adaptações, utilizando o Agar DNase (Oxoid, São Paulo, Brasil). Os isolados foram estriados diretamente na placa com o Agar DNase e incubados por 24h à 37°C . Após o tempo de incubação a placa foi coberta com ácido clorídrico 1N por 3min. A formação de halo claro em torno das colônias foi considerado indicativo de resultado positivo. Foi utilizado como controle positivo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. O experimento foi realizado em duplicata em dois experimentos independentes.

4.5.4 Atividade Hemolítica

As linhagens foram testadas quanto a atividade hemolítica segundo Foulquié-Moreno et al. (2003), utilizando Agar Sangue (7% v/v de sangue de cavalo) e incubação a 37°C por 48h. A interpretação dos resultados foi realizada da seguinte forma: α -hemólise - linhagens que produziram zonas verdes em torno das colônias; γ -hemólise - não produziram qualquer efeito sobre as placas de Agar Sangue (foram consideradas não hemolíticas). Linhagens, que apresentam zonas de lise de sangue ao redor das colônias foram classificadas como hemolíticas (β -hemólise). O experimento foi realizado em duplicata em dois experimentos independentes.

4.5.5 Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos

A suscetibilidade a antimicrobianos foi avaliada pelo teste de difusão em ágar Müller-Hinton (MH, Oxoid®), realizado de acordo com as normas do documento M100-S22 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017). Após o cultivo em caldo BHI a 37°C por 24h, os micro-organismos isolados foram repicados para solução salina estéril (0,85%) e mensuradas espectrofotometricamente a $0,150 \pm 0,02$ (Densidade Óptica - DO_{600nm}). Em seguida, com o auxílio de swab, a cultura foi semeada em ágar MH e foram adicionados os discos impregnados com diferentes tipos de antimicrobianos. Foram utilizados seis agentes antimicrobianos:

clindamicina-2 μ g (CLI), cloranfenicol-30 μ g (CLO), Meropen-10 μ g (MER), Eritromicina-15 μ g (ERI), vancomicina-30 μ g (VAN) e penicilina-10 μ g (PEN), todos da marca Laborclin (Laborclin®). Após, as placas foram incubadas a 37°C por 24h e os diâmetros das zonas de inibição foram medidos utilizando-se paquímetro Digimess® e expressos em milímetros. O experimento foi realizado em quadruplicata.

4.5.6 Avaliação da capacidade de formação de biofilme

Foi analisado a capacidade de formação de biofilme dos micro-organismos de acordo com Stepanovic et al. (2000). Os micro-organismos foram previamente inoculados em uma micro placa contendo Agar BHI e incubados a 37°C durante 24h. Placas de microtitulação foram preenchidas com 180 μ L de caldo BHI esterilizado. Após crescimento *overnight*, as colônias dos micro-organismos foram ressuspensas em solução salina e ajustadas, espectrofotometricamente a $0,150 \pm 0,02$ (DO_{600nm}). Em seguida, 20 μ L desta solução foram inoculadas em cada poço. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo, e no controle negativo foi utilizado apenas caldo BHI. As placas foram cobertas e incubadas a 37°C durante 24h. Após crescimento, os micro-organismos foram absorvidos com uma pipeta de canais múltiplos e os poços foram lavados três vezes com uma solução de 200 μ L de solução salina (0,85%). A micro-placa foi invertida sobre papel absorvente para secar e as amostras foram fixadas posteriormente com 150 μ L de metanol (CH₃OH) durante 20min. Após este tempo, o metanol foi descartado e as placas foram mantidas invertidas por 12h. As amostras foram coradas com 150 μ L de violeta de cristal (5g.L⁻¹) durante 15min. Posteriormente as placas foram invertidas e o excesso foi removido sob água corrente. Após um curto período de secagem, 150 μ L de etanol (95% v/v) foi adicionado nas placas e após 30min a absorbância foi medida em um leitor de microplacas (Anthos 2010 Tipo 4894 17550) a 450nm. Com base na DO produzida por biofilmes, cepas foram classificadas nas seguintes categorias: não produtor de biofilme (-), fraco (+), moderado (++) ou forte produtor de biofilme (+++). O ponto de corte de DO (DOC) foi definido como três desvios padrão acima da média DO do controle negativo. As cepas foram classificadas como segue: DO \leq DOc = sem produção de biofilme, DOc < DO \leq (2 x DOC) = fraco produtor, (2 x DOC) < DO \leq (4 x DOC) = moderado produtor (4 x DOC) < DO = forte produtor. O experimento foi realizado em duplicata.

4.5.7 Detecção de genes de virulência e resistência

Extração feita conforme o item 4.7.1, os 17 micro-organismos foram analisados quanto à presença de genes de agregação: *agg* e *asa*. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada num volume total de 20µL contendo: 10µL GoTaq- Promega, Madison, WI USA, 1µl de cada oligonucleotídeo iniciador, 1µL de amostra e 7µL de água ultrapura (Milli-q). Os micro-organismos também foram avaliados para o gene de resistência: *vanA*. A reação de PCR foi realizada num volume total de 20µl como descrito acima. As sequências de iniciadores estão descritas na Tabela 1. Tempo de extensão para todos os genes foram desnaturação a 94°C durante 5min, seguidas de 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1min, extensão com temperaturas de anelamento de acordo com a Tabela 1, seguida de extensão final a 72°C durante 10min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% de. A visualização dos fragmentos resultantes foi obtida em um fotodocumentador com transluminação ultravioleta após coloração com Syber Safe (Invitrogen®). Como controle positivo do *agg*, *asa*, *VanA* foi utilizado o micro-organismo *Enterococcus faecalis* ID 2389.

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores e a temperatura de anelamento usado para detectar os genes de virulência.

Oligonucleotídeo	Sequencia (5'-3')	Produto (BP)	TA* (°C)	Referência
<i>vanA</i> f	GGGAAAACGACAATTGC	736	50	Departieu, Perichon, & Courvalin, 2004
<i>vanA</i> r	GTACAATGCGGCCGTTA			
<i>asa</i> f	GATACAAAGCCAATGTGGTTCCT	101	48	Dunny, Craig, Carron, & Clewell, 1979
<i>asa</i> r	TAAAGAGTCGCCACGTTTCACA			
<i>agg</i> f	AAGAAAAAGTAGACCAAC	1553	48	Eaton & Gasson, 2001
<i>agg</i> r	AACGGCAAGACAAGTAAATA			

*TA: Temperatura de anelamento

4. 6 Fermentação de glicose

A capacidade de fermentar glicose com produção de gás (CO₂) foi determinada de acordo com Lima et al. (2009), a partir do cultivo de 24h a 37°C em caldo MRS. Os micro-organismos isolados foram reinoculados (1% v/v) em caldo MRS suplementado com 3% de glicose (Synth®), em tubos de ensaio contendo tubos de Durhan e incubados a 37°C por 48h. *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338 e *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 foram utilizados como controle positivo e

negativo, respectivamente. Nos tubos em que se observou turbidez do meio e produção de gás, os isolados foram classificados como heterofermentativos, enquanto aqueles que apresentarem somente turvação do meio foram classificados como homofermentativos. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.7 Identificação molecular

4.7.1 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de células de todos os micro-organismos isolados, as quais foram incubadas em microtubos de 1,5mL contendo 100µL de EAR Buffer e 5µL de Proteinase K (20mg.mL⁻¹, Invitrogen®) a 55°C durante 4h. Após resfriamento das amostras em temperatura ambiente, foi adicionado 750µL de TE Buffer. Após centrifugação, foi utilizado 1µL do sobrenadante contendo o DNA extraído para a técnica PCR. As técnicas de extração de DNA e PCR foram realizadas de acordo com protocolo padronizado no laboratório.

4.7.2 Amplificação do DNA por reação em cadeia da polimerase

Os genes de rRNA 16S dos micro-organismos foram amplificados utilizando oligonucleotídeos iniciadores universais 27F (5'-AGATTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Foram preparadas reações contendo 17µL de mistura especial para PCR (GoTaq- Promega, Madison, WI USA), 1µL de cada oligonucleotídeo iniciador, 1µL de amostra e 1µL de água ultrapura (Milli-q), totalizando 20µL de volume final. Em um termociclador da marca Amplitherm, os genes de rRNA 16S foram amplificados utilizando o seguinte protocolo térmico: desnaturação inicial, 95°C durante 5min; 35 ciclos de desnaturação à 95°C durante 30segundos, anelamento à 50°C durante 1min e extensão à 72°C durante 1min; e extensão final, a 72°C por 5min. Os produtos amplificados pela PCR foram analisados em gel de agarose a 1% após eletroforese. A visualização dos fragmentos resultantes foi obtida em foto documentador com transluminação ultravioleta após coloração com *Syber Safe* (Invitrogen®). Os produtos da PCR foram recortados do gel e enviados para a Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas, do Centro de Pesquisa Experimental, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre – RS) para purificação e sequenciamento.

4.7.3 Sequenciamento de DNA

Para o ciclo de sequenciamento de DNA foi utilizado o kit BigDye® Terminator Cycle Sequencing de acordo com instruções do fabricante, juntamente com o oligonucleotídeo iniciador 519r (GWATTACCGCGGCKGCTG) em reações independentes. A partir do sequenciamento, se teve conhecimento das espécies de bactérias isoladas, e a similaridade das sequências de nucleotídeos foi avaliada utilizando o Genbank BLAST (N)

4.8 Análise Estatística

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

5. Resultados e Discussão

5.1 Caracterização dos isolados de BAL

Dos 17 isolados selecionados para identificação e caracterização, apresentaram morfologia de bacilos (6) ou cocos (11), coloração Gram-positiva e catalase negativa. A partir desses resultados os isolados de cada produto foram denominados yakult® (Y1 e Y2), san bios® (SB4 e SB6), leite de vaca (L1, L2, L4 e L5), ricota (R1, R5 e R9), kefir (K1 e K2) e queijo minas frescal (F1, F2, F3 e F4). Os dados relativos às diferenças significativas entre os diferentes tratamentos analisados no presente estudo estão descritas nas Figuras 1 e 3.

5.2 Características Probióticas

5.2.1 Tolerância às condições ácidas

De acordo com os resultados obtidos na análise de tolerância às condições ácidas o micro-organismo Y1 apresentou sobrevivência em todos os tempos para os tratamentos pH 3 e pH 4; já os micro-organismos Y2, SB6, R5, L4, e L5 obtiveram sobrevivência em todos os tempos nos tratamentos pH 3 e pH 4 e, no pH 2, apenas no tempo 0h (Figura 1). Ao analisar o isolado R1 constatou-se que houve sobrevivência somente nos tratamentos pH 3 e pH 4 para todos os tempos. Já os micro-organismos R9, L2 e K2 obtiveram sobrevivência em pH 2 no tempo 0h e 2h e, na análise de pH 3 e pH 4, obtiveram sobrevivência em todos os tempos analisados. Ainda, verificou-se que o micro-organismo F4 obteve sobrevivência somente no tempo 0h nos pHs 3 e 4. Ao analisar os micro-organismos F2 e F3 não foi observado sobrevivência em nenhuma condição ácida analisada (Figura 1).

Na análise dos resultados do micro-organismo K1 observou-se sobrevivência no pH 2 no tempo 0h; no pH 3 no tempo 0h e 2h e, no pH 4, sobrevivência em todos os tempos analisados. O micro-organismo L1 obteve sobrevivência somente no tempo 0h para todos os tratamentos (pH 2, pH 3 e pH 4). Já o micro-organismo SB4 apresentou sobrevivência no pH 2 no tempo 0h e, para a análise do pH 4 em todos os tempos analisados. O isolado F1 no tempo 0h apresentou sobrevivência em todos os pHs analisados, e nos demais tempos apenas no pH 4.

Para a escolha de um micro-organismo probiótico é essencial à capacidade de sobreviver no ambiente no qual irá agir (MARAGKOUDAKIS et al., 2006). Para sobreviver no intestino, os micro-organismos devem ser tolerantes ao baixo pH do estômago, que geralmente varia de 2,5 a 3,5, mas pode ser tão baixo quanto 1,5

durante o jejum ou 4,5 após uma refeição. Esta elevada acidez provoca a destruição de muitos micro-organismos ingeridos, porque a maior parte dos micro-organismos é sensível a valores de pH abaixo de 3. A natureza do alimento afeta o tempo de trânsito, mas normalmente o alimento permanece de 2h a 4h (HUANG & ADAMS, 2004).

Em estudo realizado por Meira (2011), as BAL quando expostas a diferentes condições ácidas não obtiveram diferenças significativas entre o controle e o tratamento em pH 4; quando analisadas em pH 3 as linhagens foram resistentes após 4h; já no pH 2 observou-se que a contagem bacteriana esteve abaixo do limite de detecção após este período, o que corrobora com os resultados do presente estudo quando comparado com os micro-organismos isolados Y1 e R1.

Segundo Abdel-Daim et al. (2013), as cepas de *Lactobacillus* mantiveram a viabilidade quando as expuseram a um ambiente ácido nos valores de pH de 2-3, resultados semelhantes foram encontrados no R9, L2 e K2.

Com isso, observa-se que os micro-organismos R9, L2 e K2 obtiveram melhor sobrevivência em relação aos demais, apresentando sobrevivência no pH 2 nos tempos 0h e 2h, e no pH 3 em todos os tempos. Os micro-organismos com letras iguais não diferiram estatisticamente de forma significativa.

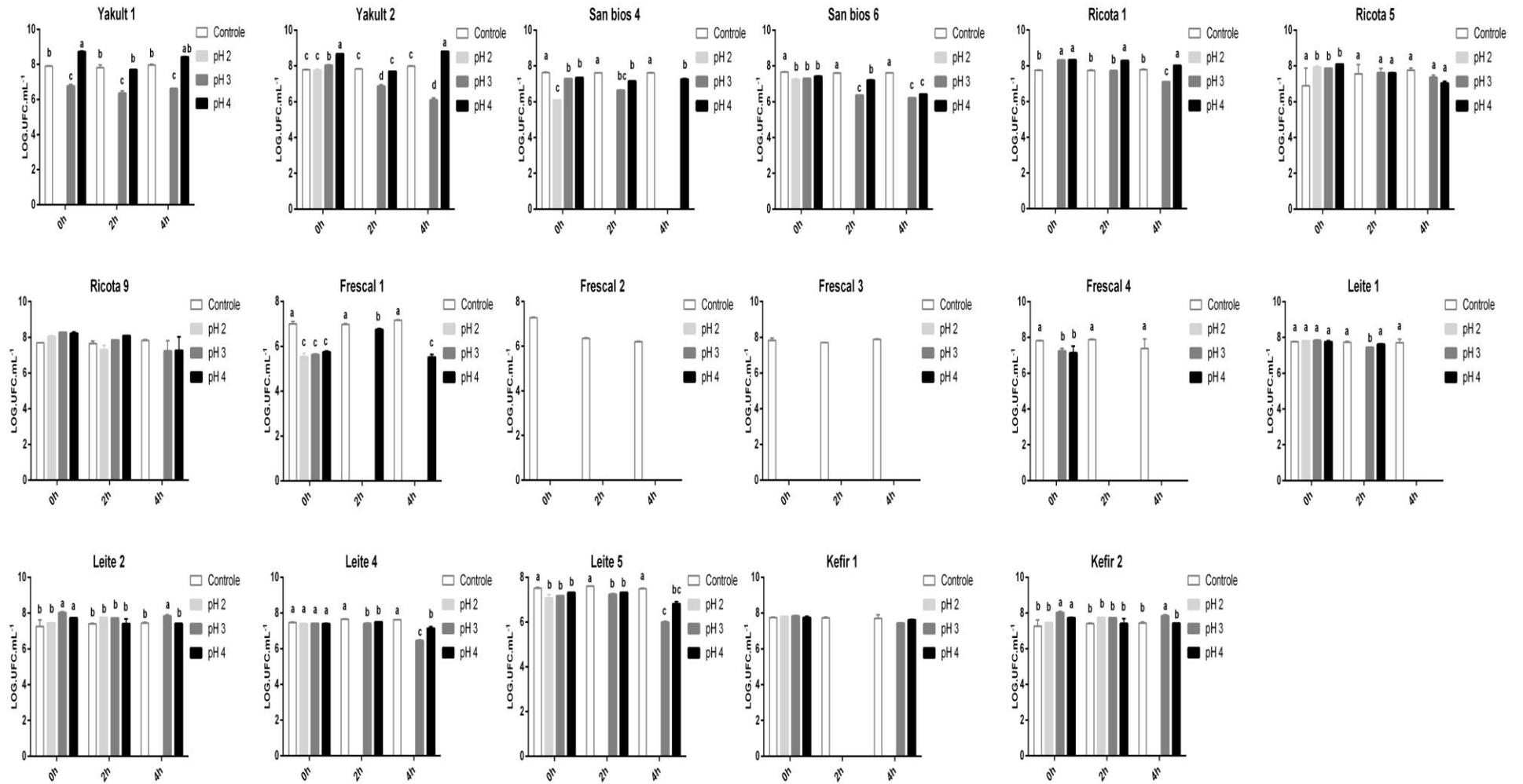


Figura 1 - Análise da tolerância dos micro-organismos às condições ácidas (pH). Os resultados foram expressos em média de Log.UFC.mL⁻¹. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

5.2.2 Tolerância aos sais biliares

A tolerância aos sais biliares está demonstrada na Figura 2. Observou-se na concentração de 0,1% de sais biliares em todos os tempos analisados que os micro-organismos Y1, Y2, SB4, SB6, R1, R5, R9, F1, L1, L2, L4, L5, K1 e K2 mantiveram-se viáveis em relação ao controle. No entanto ao analisar os micro-organismos F3 e F4 foi constatado viabilidade somente no tempo 0h. Na análise do tratamento com 0,3% de sais biliares os micro-organismos, Y1, Y2, SB4, SB6, R9, F1, L5 e K1 apresentaram-se viáveis em todos os tempos analisados.

Já ao analisar o tratamento com 0,5% de sais biliares os micro-organismos K1 e L5 apresentaram viabilidade somente no tempo 0h, e o micro-organismo K2 obteve viabilidade menor em relação ao controle somente no tratamento 0,3% de sais biliares no tempo 0h. Quando analisado os micro-organismos Y1, Y2, SB4, SB6, R9 e F1 ambos foram viáveis em todos os tempos analisados (0h, 2h e 4h).

Por meio da análise com tratamento de 1% de sais biliares verificou-se que os isolados Y1, Y2, SB6, R9 e F1 permaneceram viáveis para todos os tempos analisados (Figura 2). O micro-organismo K1 obteve viabilidade apenas no tempo 0h. Entretanto, não foi observada sobrevivência dos micro-organismos isolados (SB4, R1, R5, F2, F3, F4, L2, L4, L5 e K2) a concentração de 1% de sais biliares em nenhum dos tempos analisados.

Os sais biliares possuem um papel essencial na eliminação de bactérias patogênicas presentes no trato gastrointestinal, pois são capazes de solubilizar a membrana plasmática dos agentes patogênicos pela sua ação detergente. Essa ação, porém, não afeta exclusivamente as bactérias patogênicas e os micro-organismos probióticos necessitam, portanto, serem tolerantes a esses sais biliares para que possam exercer efeitos benéficos aos seus consumidores (BALLUS et al., 2010).

A concentração de ácidos biliares varia conforme o estado de alimentação da pessoa, podendo estar em baixa nos períodos de jejum e uma concentração mais alta após uma refeição. Após uma refeição, como uma carga maior de ácidos biliares é liberada para o intestino e, conseqüentemente, para a circulação portal para a reciclagem, os valores pós-prandiais em pessoas saudáveis podem aumentar de três a quatro vezes (NELSON & COUTO, 2006). No intestino, após a liberação da bile, uma parte dos ácidos biliares primários que não é absorvida pelo intestino sofre

ação de bactérias da microbiota intestinal e são convertidos nos ácidos biliares secundários, que são absorvidos no intestino (LIEBERMAN & MARKS, 2013).

De acordo com estudo realizado por Tavakoli et al. (2017), os isolados a partir de um queijo tradicional iraniano "Koozeh Paneer" analisados apresentaram tolerância aos sais biliares sendo que oito isolados mantiveram-se viáveis nas concentrações de 0,3 e 0,5%, seis isolados na concentração de 1,0% e três isolados apresentaram resistência quando adicionado 2,0% de sais biliares. Meira (2010), ao avaliar o potencial probiótico de BAL provenientes de leite e queijo de ovelha observou que os micro-organismos foram capazes de tolerar apenas baixas concentrações de sais biliares (0,1% e 0,3%) e somente um dos micro-organismos apresentou contagem celular após exposição a 0,5% de sais biliares.

A variabilidade de susceptibilidade a sais biliares de BAL isoladas de diferentes origens foi também observada por Chateau et al. (1994) e Vinderola & Reinheimer (2003), os quais observaram que amostras probióticas possuem uma maior resistência a sais biliares que BAL "starters", porém, mesmo sendo probióticos, os micro-organismos sofrem inibição no seu crescimento pelos sais biliares.

De acordo com os dados obtidos verificou-se que os micro-organismos Y1, Y2, SB6, R9 e F1 sobreviveram a maior concentração avaliada (1%). Segundo Huang & Adams (2004) a concentração de sais biliares entre 0,1 e 0,3% para a avaliação *in vitro* da passagem pelo intestino delgado já tem sido reconhecido como potencial probiótico, sendo estes resultados promissores e demonstram que os demais micro-organismos avaliados que sobreviveram a menor concentração (0,1%) possuem da mesma forma, potencial para serem utilizados como probióticos.

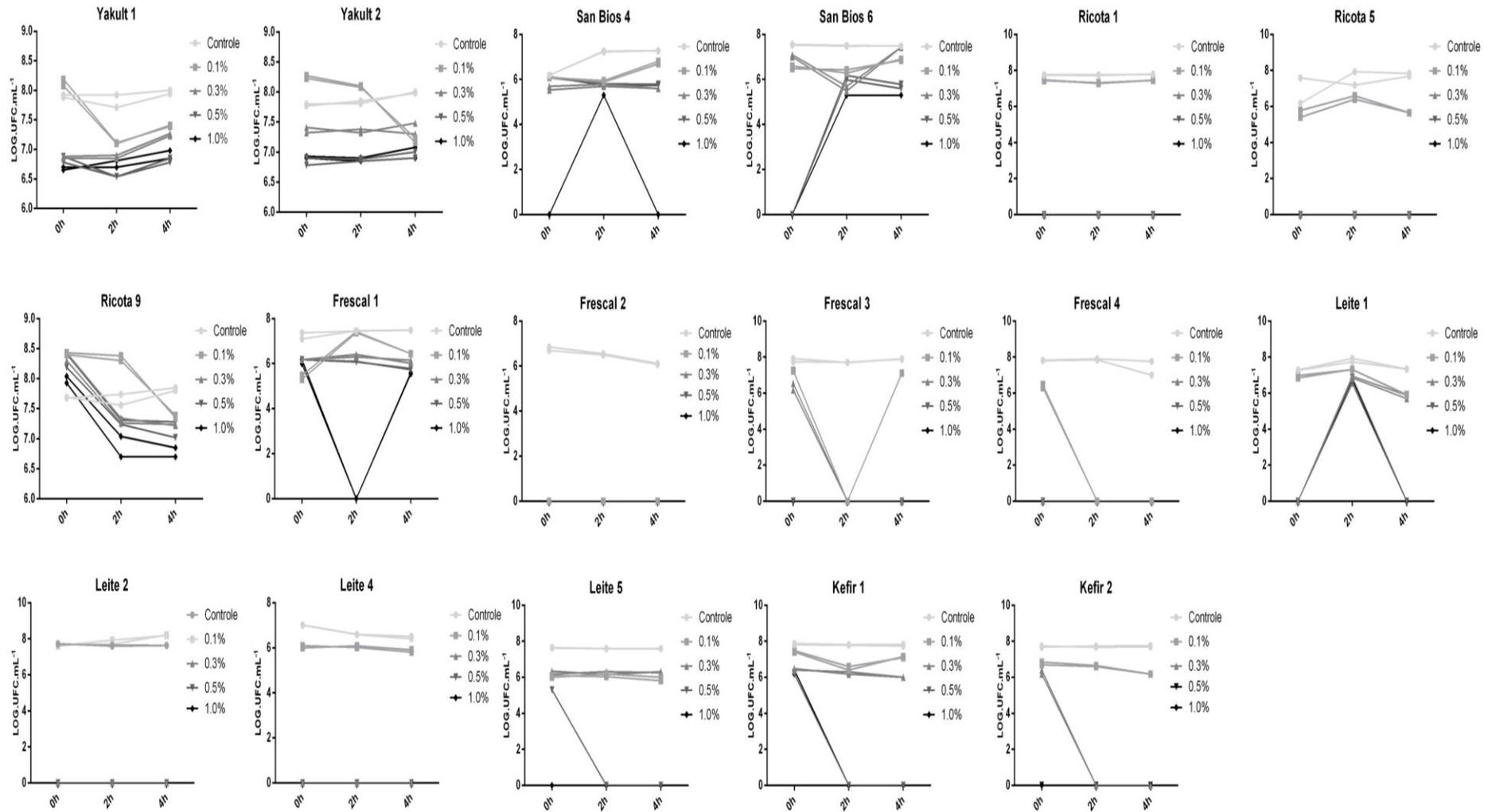


Figura 2 - Análise da tolerância dos micro-organismos na presença de diferentes concentrações de sais biliares. Os resultados foram expressos em média de Log.UFC.mL⁻¹.

5.2.3 Tolerância ao trânsito gastrointestinal

Os resultados da análise de tolerância ao suco gástrico simulado estão demonstrados na Figura 3. Para os tratamentos com pepsina pH 2 e pepsina pH 2 + leite nos tempos 0h, 2h e 4h, os micro-organismos R1, R5, R9, K1 e K2 apresentaram viabilidade semelhante ou maior em relação ao controle. Porém, constatou-se que os micro-organismos Y1, Y2, SB4, SB6, F1, L4 e L5 apresentaram 1 ciclo logarítmico maior que o controle no tratamento pepsina pH 2 (Figura 3). Já os isolados F4 e L2 apresentaram sobrevivência apenas em pepsina pH 2 nos tempos 0h e 2h.

Referente à análise de tolerância ao suco intestinal simulado (Figura 3), observa-se que os micro-organismos controle, SB4 e SB6, apresentaram sobrevivência em ambos tratamentos (pancreatina pH 8 e pancreatina pH 8 + 0,5% de sais biliares) e em todos tempos analisados. Já quando analisado os demais micro-organismos controles, Y1 apresentou sobrevivência semelhante ou maior em todos os tempos analisados no tratamento pancreatina pH 8. Já o micro-organismo controle Y2 apresentou sobrevivência somente no tempo 0h em ambos os tratamentos analisados, pancreatina pH 8 e pancreatina pH 8 + 0,5% de sais biliares.

Quando analisado os micro-organismos tratamento em todos os tempos analisados foi constatado que R1, R9, F2, F3, L1, L2, L5, K1 e K2 apresentaram-se viáveis no tratamento pancreatina pH 8. Quando analisados os micro-organismos R5 e F4 no mesmo tratamento, observou-se viabilidade somente no tempo 0h. Já o micro-organismo F1 apresentou-se viável no tempo 0h e 2h.

Ao analisar pancreatina pH 8 + 0,5% de sais biliares os micro-organismos F1, F2, L4 e L5 obtiveram sobrevivência em ambos os tempos analisados (0h, 2h e 4h). No tempo 0h e 2h foi observado que os L1 e K2 apresentaram sobrevivência. E que os micro-organismos R1, R9, F4 e L2 apenas obtiveram-se viáveis no tempo 0h.

De acordo com estudo realizado por Sehn (2015) a qual analisou o potencial probiótico no suco gástrico simulado utilizando o isolado inoculado em leite integral, o micro-organismo manteve-se viável entre 1 e 2h, demonstrando efeito protetor do alimento sobre a sobrevivência do isolado LC254 (*Lactobacillus curvatus*) durante a passagem no estômago do hospedeiro. Porém, este mesmo micro-organismo não foi capaz de sobreviver ao suco gástrico simulado (pH 2,5 + 3 mg.mL⁻¹ de pepsina), não sendo observada contagem celular já nos primeiros 15min de ensaio, quando

inoculado em solução salina. Observou-se ainda neste estudo que o isolado LC254 foi capaz de resistir às condições do trato intestinal simulado (pancreatina 1 mg.mL^{-1} e pH 8), sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre a contagem no tempo inicial e após 4h, na maioria das condições avaliadas.

Em estudo realizado por Meira (2011) sobre tolerância ao trânsito intestinal, a contagem de células viáveis não diferiu significativamente do tempo inicial após 4h em pancreatina pH 8 e houve redução de aproximadamente 1 ciclo logarítmico na presença de pancreatina pH 8 + 0,5% de sais biliares.

A presença de alimentos e ingredientes alimentares tem sido relatada como um viabilizador de micro-organismos durante o trânsito gastrointestinal, particularmente por seu efeito tamponante e protetor (HUANG & ADAMS, 2004).

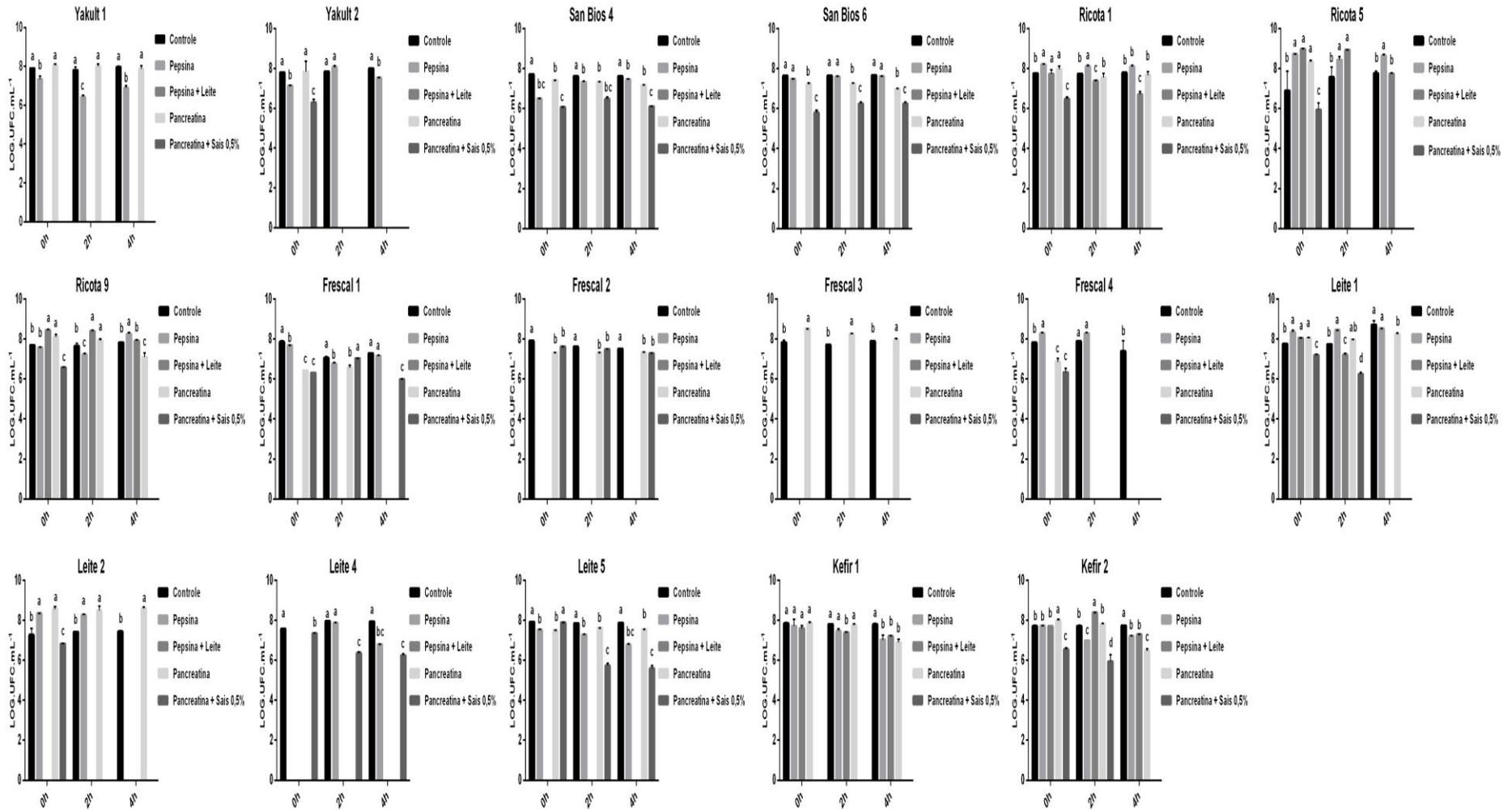


Figura 3 - Análise da tolerância dos micro-organismos ao suco gástrico e ao suco intestinal simulado. Os resultados foram expressos em Log.UFC.mL⁻¹. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

5.3 Atividade antioxidante

5.3.1 Método TBARS

Para analisar a atividade antioxidante pelo método de TBARS se utilizou o azeite de oliva (ácido graxo monoinsaturado) como substrato e o sulfato ferroso como um pró-oxidante, uma vez que pode-se dividir os hidroperóxidos lipídicos (SOUZA et al., 2017). A oxidação do ácido graxo monoinsaturado foi inibida pela adição do sobrenadante bruto das amostras F1, F3 e F4, onde pode-se perceber que estas apresentaram capacidade de inibição da peroxidação lipídica, sugerindo potencial antioxidante (Figura 4). Observou-se ainda que, os micro-organismos Y2, L1, L2 e K2 apresentaram efeito pro-oxidante. É importante ressaltar que os micro-organismos controle utilizados neste estudo (Y1, SB4 e SB6) não apresentaram capacidade antioxidante por este método.

A oxidação lipídica é uma reação importante que limita a vida útil de vários alimentos, sendo um dos mecanismos primários da deterioração da qualidade em produtos alimentícios (ACHKAR et al., 2013). As reações de oxidação podem ser evitadas dependendo das condições ambientais ou por meio da utilização de compostos antioxidantes. Os antioxidantes são substâncias que impedem a formação de radicais livres ou impedem a etapa de propagação dessas reações doando hidrogênio de forma que a molécula alvo permaneça estável e, assim, possa agir no retardo ou na prevenção da oxidação (WANG et al., 2013). Devido o fato de alguns antioxidantes e antimicrobianos sintéticos serem alvos de questionamentos quanto à inocuidade, demonstrando a possibilidade de desencadear alguma complicação à saúde do consumidor existem buscas crescentes por compostos antimicrobianos e antioxidantes de fontes naturais (SOUSA et al., 2007) para que deste modo se evite DTA e a deterioração dos produtos, aumentando a vida útil dos mesmos, mantendo assim seu valor nutricional (BROINIZI et al., 2007).

Lin & Chang (2000) investigaram o efeito antioxidante pelo método TBARS do extrato intracelular do *Bifidobacterium longum* (ATCC 15708) e *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356), e verificaram atividade antioxidante pela inibição da peroxidação do ácido linoleico (28-48%) nas duas linhagens em estudo. Zanoni et al. (2008), demonstraram em seu estudo que todas as linhagens (*Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus plantarum* e *Streptococcus thermophilus*), apresentaram atividade antioxidante pelo método de inibição da peroxidação lipídica.

O consumo de alimentos contendo BAL pode contribuir para uma alimentação saudável, associada aos efeitos benéficos exercidos por estas bactérias, como culturas

probióticas, agregando ainda, os benefícios atribuídos ao consumo de fontes antioxidantes, como a inibição dos danos oxidativos provocados pela produção de radicais livres (PIENIZ et al., 2015).

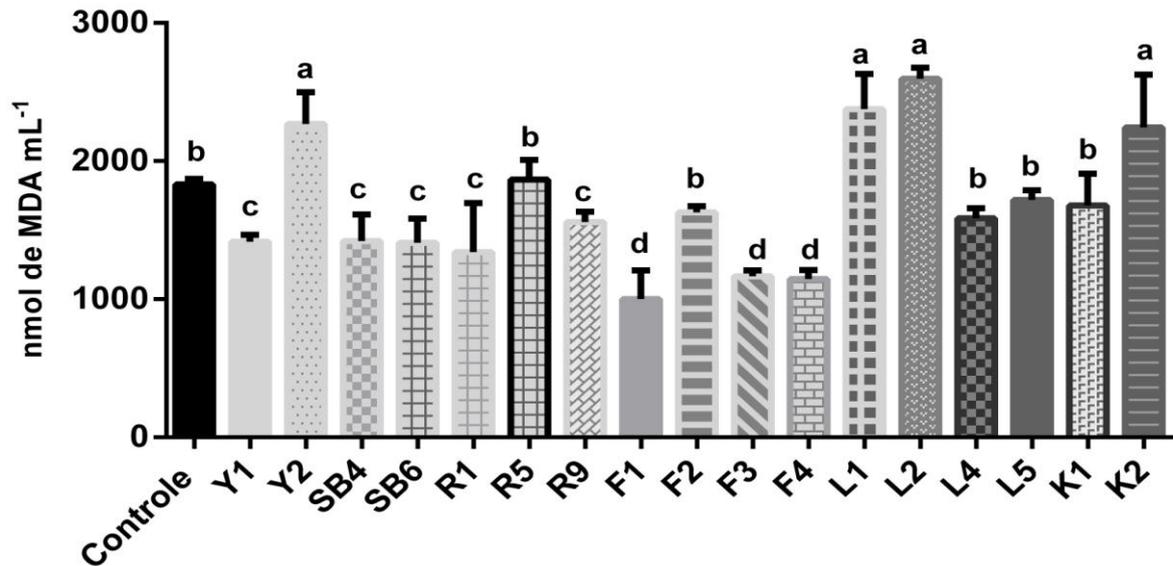


Figura 4 - Atividade antioxidante de BAL isoladas de leite e derivados analisada pelo método de TBARS após 1h. Os resultados foram expressos em nmol de MDA mL⁻¹. *Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Y1: Yakult 1; Y2: Yakult 2; SB4: San Bios 4; SB6: San Bios 6; R1: Ricota 1; R5: Ricota 5; R7: Ricota 7; R9: Ricota 9; F1: Queijo minas frescal 1; F2: Queijo minas frescal 2; F3: Queijo minas frescal 3; F4: Queijo minas frescal 4; L1: Leite 1; L2: Leite 2; L4: Leite 4; L5: Leite 5; K1: Kefir 1; K2: Kefir 2.

5.3.2 Método DPPH

A análise da atividade antioxidante pelo método de DPPH utilizando o sobrenadante bruto das BAL revelou que todos os micro-organismos Y1, Y2, SB4, SB6, R1, R5, R9, F1, F2, F3, F4, L1, L2, L4, L5, K1 e K2 apresentaram atividade antioxidante (Figura 5) quando avaliados após 1h, e quando analisados após 24h o resultado foi o mesmo revelando que todos os micro-organismos analisados apresentaram atividade antioxidante quando comparados com o controle (Figura 5), confirmando assim sua ação antioxidante perante a capacidade destas bactérias em sequestrar o radical DPPH, pela mudança significativa na sua coloração que passa da cor violeta para coloração amarela quando entra em contato com a substância antioxidante. Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

Estudo semelhante realizado por Moura (2016) apresentou resultados semelhantes aos do presente estudo referentes ao método DPPH, onde todas as

amostras de queijo analisadas apresentaram capacidade antioxidante. Outro estudo realizado por Schlabit (2014) com amostras de bebidas lácteas com diferentes formulações (bebidas lácteas adicionadas de vitamina C e E, resveratrol e com polpa de frutas), relatou que todas as amostras analisadas apresentaram atividade antioxidante pelo método DPPH.

O método DPPH é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazina) é um radical livre estável que aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula estável e, desta forma, é reduzido na presença de um antioxidante. O radical DPPH tem sido muito usado para avaliar a capacidade sequestrante de radicais livres em produtos naturais (ALVES et al., 2010). A atividade antioxidante do radical DPPH baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para uma espécie radicalar que, ao se reduzir perde sua coloração púrpura. A atividade do antiradical é expressa pelo parâmetro EC_{50} é definida como a quantidade do antioxidante necessário para diminuir 50% da concentração do DPPH inicial (PIENIZ et al., 2015).

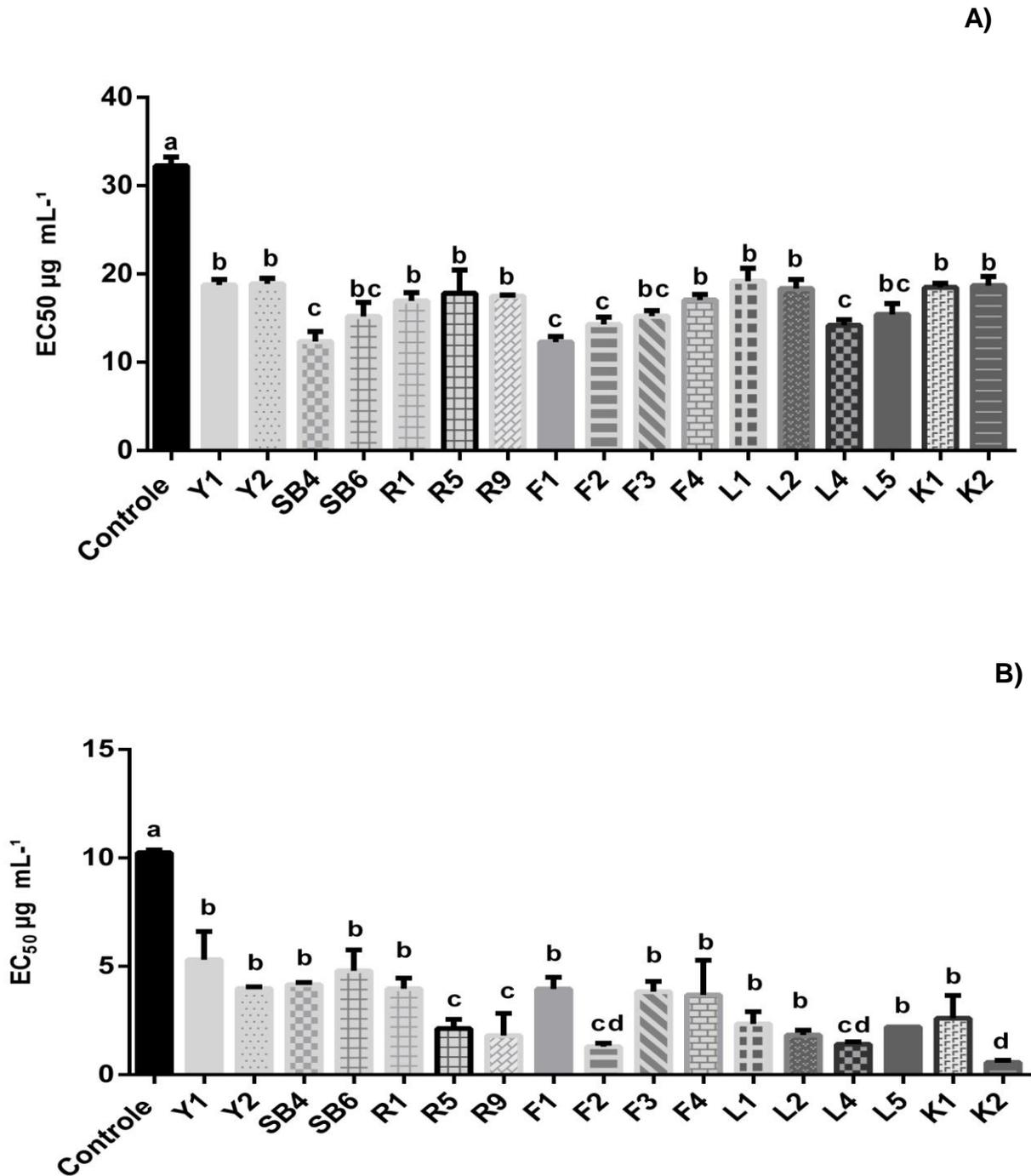


Figura 5- Atividade antioxidante de BAL isoladas de leite e derivados lácteos analisada pelo método de DPPH. A) DPPH após 1h; B) DPPH após 24h. Os resultados foram expressos em EC₅₀ µg mL⁻¹. Médias seguidas por letras iguais, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p>0,05). Y1: Yakult 1; Y2: Yakult 2; SB4: San Bios 4; SB6: San Bios 6; R1: Ricota 1; R5: Ricota 5; R7: Ricota 7; R9: Ricota 9; F1: Queijo minas frescal 1; F2: Queijo minas frescal 2; F3: Queijo minas frescal 3; F4: Queijo minas frescal 4; L1: Leite 1; L2: Leite 2; L4: Leite 4; L5: Leite 5; K1: Kefir 1; K2: Kefir 2.

5.4 Atividade Antimicrobiana

5.4.1 Difusão em Poços

A atividade antimicrobiana dos isolados foi testada frente aos micro-organismos indicadores *Escherichia coli* ATCC 8739, *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076.

Quanto à atividade antimicrobiana por difusão em poços observou-se que os micro-organismos R1, F3 e F4 apresentaram inibição frente ao micro-organismo indicador *Escherichia coli* (16,8mm \pm 0,08; 16,0mm \pm 0,06; 16,8mm \pm 0,08; respectivamente). Ao analisar a atividade antimicrobiana frente ao micro-organismo *Listeria monocytogenes* observou-se que os isolados R1 e R9 apresentaram halos de inibição (12,3mm \pm 0,05; 13,8mm \pm 0,08; respectivamente). Quanto à ação antimicrobiana dos isolados frente ao *Staphylococcus aureus* observou-se que os isolados K1, K2, R1, R5 e R9 (13,5mm \pm 0,05; 12,0mm \pm 0,06; 7,7mm \pm 0,08; 7,7mm \pm 0,08; 13,7mm \pm 0,14; respectivamente) apresentaram atividade antimicrobiana. Ao analisar a ação inibitória dos isolados frente ao crescimento do micro-organismo indicador *Salmonella* Enteritidis, não foi observada atividade antimicrobiana.

Em estudo semelhante Guedes Neto et al. (2005) relataram inibição das BAL isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente ao *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, as quais apresentaram ação antagonista frente a estes micro-organismos indicadores. Os possíveis mecanismos de ação inibitórios das BAL podem ser devido a produção de ácidos orgânicos, produção de peróxido de hidrogênio, produção de substâncias com ações bactericida ou bacteriostática. Por esse motivo, há grande interesse na utilização dessas bactérias em alimentos como integrantes da microbiota humana e animal (PAN et al., 2009).

5.4.2 Difusão em Discos

Por meio da análise da atividade antimicrobiana por difusão em disco observou-se que o sobrenadante dos micro-organismos Y1, Y2, SB4, SB6, R1, R5, R9, F1, F2, L1, L2, L4, K1 e K2 apresentaram inibição frente à *Escherichia coli* (Tabela 2). Ao analisar o efeito inibitório dos isolados frente à *Salmonella* Enteritidis os micro-organismos SB4, SB6, F1, F2 e L4 apresentaram atividade antimicrobiana. Ao analisar a atividade dos isolados frente ao micro-organismo *Listeria monocytogenes* observou-se que SB6 e L4 apresentaram ação inibitória. Quanto ao micro-organismo indicador *Staphylococcus*

aureus foi observado atividade antimicrobiana pelos micro-organismos L4 e L5, conforme apresentado na Tabela 2.

A constante procura por BAL que produzam substâncias com potencial antimicrobiano torna-se importante para uma aplicação futura em alimentos. Por meio do seu metabolismo, as BAL transformam carboidratos em ácido láctico. Entretanto, outros metabólitos como peptídeos antimicrobianos, por exemplo, podem inibir diversos micro-organismos patogênicos e deteriorantes (CASTELLANO et al., 2017).

Tabela 2 - Análise da atividade antimicrobiana das BAL isoladas de leite e produtos lácteos por meio de difusão em disco. Os resultados foram expressos em média (cm) \pm desvio padrão.

Amostras	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19114	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Salmonella Enteritidis</i> ATCC 13076
Y1	1,45 \pm 0,05	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Y2	1,42 \pm 0,08	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
SB4	1,05 \pm 0,08	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	1,30 \pm 0,06
SB6	1,18 \pm 0,08	1,42 \pm 0,25	0,00 \pm 0,00	1,15 \pm 0,10
R1	1,28 \pm 0,08	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
R5	1,25 \pm 0,14	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
R9	1,38 \pm 0,08	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
F1	1,65 \pm 0,24	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	1,52 \pm 0,40
F2	1,57 \pm 0,20	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	1,28 \pm 0,23
F3	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
F4	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
L1	1,43 \pm 0,08	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
L2	1,38 \pm 0,12	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
L4	1,22 \pm 0,10	1,73 \pm 0,23	1,65 \pm 0,21	1,07 \pm 0,05
L5	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	1,32 \pm 0,15	1,20 \pm 0,19
K1	1,50 \pm 0,09	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
K2	1,32 \pm 0,08	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00

*Y1: Yakult 1; Y2: Yakult 2; SB4: San Bios 4; SB6: San Bios 6; R1: Ricota 1; R5: Ricota 5; R7: Ricota 7; R9: Ricota 9; F1: Queijo minas frescal 1; F2: Queijo minas frescal 2; F3: Queijo minas frescal 3; F4: Queijo minas frescal 4; L1: Leite 1; L2: Leite 2; L4: Leite 4; L5: Leite 5; K1: Kefir 1; K2: Kefir 2. D.P.: Desvio Padrão.

5.5 Avaliação dos fatores de virulência

5.5.1 Atividade das enzimas gelatinase, lipase, DNase e hemolisina

A determinação do potencial de virulência dos micro-organismos é necessária para garantir a segurança, até mesmo para aqueles grupos de bactérias que geralmente são reconhecidos como seguros (GRAS) (FAO / WHO, 2002). Os resultados referentes às análises de virulência revelaram que todos os isolados apresentaram atividade enzimática negativa para gelatinase, lipase, DNase e hemólisina.

A gelatinase hidrolisa caseína, gelatina, colágeno, hemoglobina e outros peptídeos bioativos (WANG et al., 2011). Franco (2016) avaliou oito BAL isoladas de

alimentos brasileiros que não apresentaram atividade da enzima gelatinase. Mahasneh et al. (2015) analisaram 17 isolados de *Lactobacillus* spp. com potencial probiótico provenientes de produtos fermentados e observaram que estes não apresentaram atividade da gelatinase. Resultados esses que corroboram com os resultados obtidos no presente estudo.

Lipases são enzimas que hidrolisam lipídeos de cadeia longa, sendo que, as lipases microbianas são de grande relevância no metabolismo lipídico bacteriano, no envolvimento em processos patogênicos e hidrolisam a gordura do leite com liberação de ácidos graxos no soro no caso de lácteos (XIE et al., 2012). De acordo com Semedo et al. (2003) essa capacidade de degradar os lipídeos é relatada como um fator de virulência, descrita como vantagem adaptativa e competitiva de cepas patogênicas. Moraes et al. (2010) avaliaram BAL isoladas de queijo e leite cru, e também verificaram que nenhum dos isolados apresentou atividade lipolítica positiva.

A DNase é uma enzima que permite a infecção do hospedeiro por ser capaz de degradar o ácido nucleico (DNA). Geralmente esse fator de virulência não é observado com muita frequência em amostras oriundas de alimentos quando comparados com amostras clínicas (BARBOSA et al., 2010). Almeida Júnior et al. (2015) e Luiz et al. (2015) isolaram BAL a partir de amostras de leite de cabra e observaram que nenhum dos isolados apresentou atividade da enzima DNase, o que corrobora com os resultados do presente estudo.

Na análise da atividade hemolítica observou-se hemólise incompleta (α -hemólise) que são enzimas capazes de lisar os eritrócitos no sangue humano, produzindo zonas verde-coloridas em torno das colônias em Agar Sangue, sendo consideradas não hemolíticas, pois somente são considerados hemolíticos os micro-organismos que apresentarem zonas de lise ao redor das colônias (β -hemólise) (BARBOSA et al., 2010).

Mesmo já sendo citado na literatura que muitas BAL isoladas de diferentes alimentos não apresentam os fatores de virulência citados acima, recomenda-se que sejam submetidos a esses testes para excluir a possibilidade de indicativo de patogenicidade e que possam, desta forma, futuramente, serem aplicados em alimentos.

5.5.2 Fermentação da Glicose

Os micro-organismos foram analisados quanto ao teste de fermentação de glicose que é um teste importante para que esses micro-organismos possam ser utilizados em alimentos. Quanto ao perfil fermentativo, todas as BAL analisadas foram consideradas

como homofermentativos apresentando turvação do meio, porém sem produção de gás. Este resultado é promissor devido ao fato das bactérias homofermentativas produzirem o ácido láctico evitando problemas de *flavor* decorrentes da formação de ácido acético e características indesejáveis causadas pela produção de CO₂ (KOSTINEK et al., 2007).

Carr et al. (2002) e Hermanns (2013) relataram que as bactérias homofermentativas produzem ácido láctico como o principal produto de fermentação da glicose, enquanto que as heterofermentativas produzem, além de ácido láctico, substâncias como dióxido de carbono, ácido acético, etanol, aldeído e diacetileno. Hermanns (2013) ao analisar amostras de BAL isoladas de leite e queijos artesanais encontrou os mesmos resultados que o presente estudo, onde nenhum dos 21 isolados analisados produziu gás a partir da glicose, classificando-os como homofermentativos.

5.5.3 Capacidade de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade

Sabe-se que a autoagregação e coagregação entre bactérias desempenham um papel importante na prevenção da colonização de superfícies por agentes patogênicos (GARCÍA-CAYUELA et al., 2014), já é elucidado na literatura que as habilidades de coagregação de cepas de BAL pode interferir na capacidade das espécies patogênicas em infectar o hospedeiro e ainda podem prevenir a colonização de patógenos transmitidos por alimentos (GARCÍA-CAYUELA et al., 2014).

Na Figura 6 podem-se observar os resultados obtidos na avaliação da capacidade de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade dos 17 micro-organismos isolados.

A capacidade de autoagregação dos micro-organismos avaliados aumentou exponencialmente no decorrer do período avaliado, atingindo valor máximo em 4h (47,8% (R1); 43,4% (F3); 42,8% (F1)). Posterior a este período (24h) observou-se um decréscimo em todos os micro-organismos avaliados. Em relação à capacidade de coagregação dos micro-organismos, foi observada pouca variância na porcentagem entre os tempos avaliados (2h; 4h e 24h).

Neste estudo, os micro-organismos mostraram porcentagens de hidrofobicidade as quais variaram de 0,4% (L5), apresentando menor capacidade de adesão a 48% (SB4); 36,8% (F4) as quais apresentaram maior capacidade de adesão (Figura 6).

Vinderola et al. (2003) descrevem que a capacidade de autoagregação e hidrofobicidade estão inteiramente ligadas à habilidade de adesão a superfície epitelial, sendo o passo inicial para que micro-organismos probióticos colonizem o intestino. Marthara et al. (2008) descrevem a hidrofobicidade como habilidade de aderência a

hidrocarbonetos, onde, quanto maior o valor, maior a capacidade de adesão. De acordo com Meira et al. (2010) os micro-organismos isolados de queijo de ovelha, apresentaram percentuais de autoagregação superior a 50%, após 24h de incubação.

Dos Santos et al. (2014) analisaram amostras de queijo coalho produzido na região Nordeste do Brasil e verificaram que oito isolados de *Lactobacillus* apresentaram baixos índices de hidrofobicidade, em especial *Lactobacillus plantarum* (5,4%). Fernandes (2017) avaliou isolados de *Pediococcus pentosaceus* oriundos de leite de ovelha e verificou que todos os micro-organismos apresentaram valores de hidrofobicidade inferior a 10%.

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, os micro-organismos possuem potencial para serem utilizado como probióticos, uma vez que apresentam capacidade de autoagregação e coagregação com *Listeria monocytogenes*.

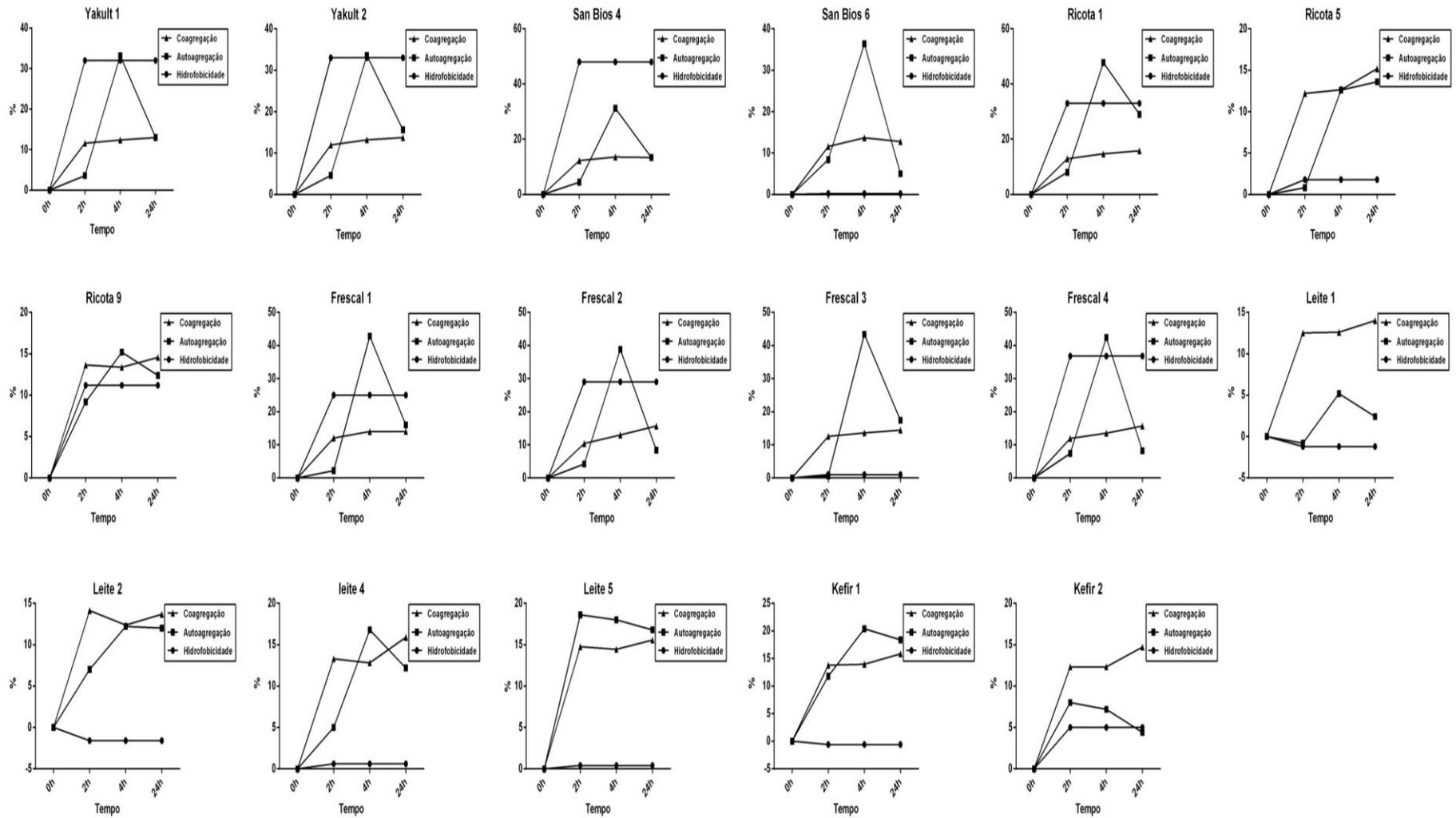


Figura 6- Capacidade de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade de BAL isoladas de leite e derivados lácteos em diferentes tempos de avaliação.

5.5.4 Susceptibilidade a antimicrobianos

Na Tabela 3 podem ser observados os resultados de susceptibilidade dos micro-organismos isolados aos antimicrobianos testados nos isolados de acordo com os padrões da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para BAL (CLSI, 2017). Os 17 micro-organismos isolados foram avaliados quanto à resistência ou susceptibilidade aos antimicrobianos: penicilina, vancomicina, meropenem, eritromicina, clindamicina e cloranfenicol. Quando avaliados os antimicrobianos penicilina e vancomicina, os micro-organismos se mostraram susceptíveis (≥ 15 e ≥ 17 mm, respectivamente) com exceção do micro-organismo L5. Apenas o micro-organismo L4 apresentou resistência ao antimicrobiano meropenem (≥ 16 mm), os demais foram susceptíveis. Quando avaliada a susceptibilidade a eritromicina (≥ 23 mm) os micro-organismos F1, F2 e L4 apresentaram resistência ao antimicrobiano; F3 e L5 apresentaram sensibilidade intermediária quando expostos a eritromicina (< 23 mm). Observou-se resistência a clindamicina (≥ 21 mm) pelos micro-organismos L2 e L4; e ainda, todos os micro-organismos avaliados foram classificados como susceptíveis (≥ 18 mm) ao antimicrobiano cloranfenicol.

A resistência antimicrobiana apresentada por micro-organismos é um fator diretamente ligado à segurança dos alimentos e deve ser sempre investigado quando se pretende utilizar novas linhagens em produtos alimentares (FAO/WHO, 2006). Estas novas linhagens de BAL podem carrear genes de resistência, os quais podem ser transferidos para outras bactérias, conseqüentemente, aumentar o potencial de virulência e, apresentar resistência a diferentes antimicrobianos. Uma vez no alimento ou no intestino humano, essas bactérias podem disseminar estes genes de resistência tornando-os um fator de risco para a saúde pública.

Segundo Giraffa (2002), a resistência aos antimicrobianos pode ser acentuada por meio da capacidade de formação de biofilme, estando relacionada com o uso destas drogas na terapêutica humana e veterinária. Diminuir os riscos da resistência antimicrobiana à saúde humana requer estratégias para o uso de antimicrobianos em animais. Deve-se primeiramente, reduzir o uso de antimicrobianos na produção animal, que serão futuramente consumidos pela população em geral, e ainda, reduzir o uso abusivo de antimicrobianos na medicina humana. Desta forma, pode-se conseqüentemente, reduzir o desenvolvimento e a propagação de bactérias resistentes aos antimicrobianos nos alimentos (COLLIGNON et al., 2009).

Tabela 3 - Análise da susceptibilidade dos micro-organismos a antimicrobianos e classificação segundo a CLSI (2017). Os resultados foram expressos em milímetros (mm).

---- Halo de inibição (mm) ----																	
	Y1	Y2	SB4	SB6	R1	R5	R9	F1	F2	F3	F4	L1	L2	L4	L5	K1	K2
Penicilina (susceptibilidade ≥ 15)	23	26	28	25	27	29	28	21	19	16	35	27	28	35	0	31	29
Classificação CLSI	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
Vancomicina (susceptibilidade ≥ 17)	21	22	24	25	22	24	23	26	25	18	37	24	27	37	0	25	27
Classificação CLSI	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
Meropenem (susceptibilidade ≥ 16)	20	22	29	29	31	32	34	33	31	18	20	28	30	0	25	18	20
Classificação CLSI	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
Eritromicina (susceptibilidade ≥ 23)	23	23	25	26	25	26	26	0	0	21	23	25	27	0	21	24	23
Classificação CLSI	S	S	S	S	S	S	S	R	R	I	S	S	S	R	I	S	S
Clindamicina (susceptibilidade ≥ 21)	23	24	25	25	24	24	25	32	30	23	25	27	0	0	22	24	22
Classificação CLSI	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
Cloranfenicol (susceptibilidade ≥ 18)	26	26	27	28	26	28	27	31	37	19	22	28	21	25	21	25	22
Classificação CLSI	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

* Y1: Yacult 1; Y2: Yacult 2; SB4: San Bios 4; SB6: San Bios 6; R1: Ricota 1; R5: Ricota 5; R9: Ricota 9; F1: Queijo Minas Frescal 1; F2: Queijo Minas Frescal 2; F3: Queijo Minas Frescal; F4: Queijo Minas Frescal; L1: Leite 1; L2: Leite 2; L4: Leite 4; L5: Leite 5; K1: Kefir 1; K2: Kefir 2; S- suscetível; I- intermediário; R- resistente.

5.5.5 Formação de Biofilme

Os micro-organismos analisados não demonstraram capacidade de formação de biofilme *in vitro*, sendo classificados como não formadores de biofilme, de acordo com o padrão estabelecido por Stepanovic et al. (2000). Este resultado é considerado promissor, devido ao fato do desenvolvimento de biofilmes em locais de processamento de alimentos tornarem estes ambientes potenciais fontes de contaminação e possíveis infecções alimentares (COUTINHO et al., 2007).

Biofilme é considerado um agregado de micro-organismos aderidos sobre uma superfície, disposta em multicamadas finas e envolta por uma matriz polimérica amorfa e hidratada, produzida pelos próprios micro-organismos (FEY & OLSON, 2010). A formação de biofilme gera grandes problemas na indústria de alimentos, pois pode representar uma importante fonte de transmissão de doenças bacterianas e de contaminação (ROMEO, 2008). Podendo as células se transferir do biofilme e colonizar linhas de processamento de alimentos e o próprio alimento e outras superfícies de contato, afetando deste modo a qualidade e a segurança do produto final, colocando em risco a saúde dos consumidores (VERMELHO et al., 2008).

Diversas bactérias patogênicas e comensais são capazes de transitar entre ambiente e hospedeiros humanos e todas podem ser capazes de se adaptar a mudanças repentinas (TREVORS, 2011). Acredita-se que a formação de biofilmes esteja associada à proteção contra o ambiente, graças à presença da matriz exopolissacarídica, que pode impedir fisicamente a penetração de agentes antimicrobianos no biofilme, sendo mais propícias as trocas genéticas, a proteção contra células do sistema imune, nutrientes, suportando as variações de pH e concentrações mais altas de antimicrobianos, pois podem apresentar de 10 a 100 vezes mais resistência aos antibióticos do que células planctônicas (MOHAMED & HUANG, 2007).

Segundo Jefferson, (2004) bacteriocinas, peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias, tem potencial para redução de biofilmes. Nisina, uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, tem o uso autorizado em alimentos em diversos países e é eficaz contra muitas bactérias, especialmente as gram-positivas. Além de usada como aditivo alimentar para controlar o crescimento de micro-organismos indesejáveis, nos últimos anos pesquisas exploram o efeito de nisina e de outras bacteriocinas sobre os biofilmes.

Cunha (2017) ao analisar um micro-organismo identificado como *Lactococcus lactis* supsp. *Lactis* isolado de Ricota corroborou com os resultados do presente estudo onde não houve formação de biofilme.

5.5.6 Detecção de genes de virulência e resistência

A presença de genes de virulência foi investigada por genotipagem. Os genes para as substâncias de agregação (*agg* e *asa*) não foram detectados nas BAL isoladas, do mesmo modo, as BAL foram avaliadas quanto ao gene de resistência *vanA* e, da mesma forma, não demonstraram a presença deste fator de resistência. Para o estabelecimento da infecção, a aderência da bactéria é a primeira etapa desse processo. No caso das BAL que são comensais do trato gastrointestinal, as mesmas precisam se ligar aos receptores das células eucarióticas na superfície da mucosa, e para isso secretam adesinas facilitando esta fixação, caso contrário, as mesmas provavelmente seriam eliminadas por meio do fluxo intestinal (JETT et al., 1994). Desta forma, a substância de agregação é um fator de virulência que parece mediar à ligação específica ao epitélio intestinal (SUSSMUTH et al., 2000).

Estudo feito por Pieniz et al. (2015) os quais isolaram o micro-organismo *Enterococcus durans* LAB18s de queijo “Minas Frescal” corroboraram com os resultados do presente estudo, onde o micro-organismo isolado não apresentou presença dos fatores de virulência avaliados (*agg* e *asa*) e genes de resistência a *vanA*.

Abreu (2015) isolou 30 micro-organismos de leite e queijo caprino e avaliou quanto à presença dos genes relacionados aos fatores de virulência (*asa1* e *ace*) e a resistência à vancomicina (*vanA*). O gene de substância de agregação (*asa1*) foi identificado em duas amostras (6,45%), o gene relacionado à adesão ao colágeno (*ace*) foi encontrado em quatro das cepas estudadas (12,9%) e foi verificada a presença do gene *vanA* em uma única amostra (3,2%), sendo todos os micro-organismos identificados como *Lactobacillus plantarum*.

5.6 Identificação molecular

Foram submetidos à amplificação do gene *16S rRNA* e apresentaram fragmentos com tamanho aproximado de 1500pb os quais foram submetidos ao sequenciamento. O resultado do sequenciamento do gene *16S rRNA*, as similaridades e o número de acesso dos respectivos micro-organismos no GenBank estão descritos na Tabela 4.

Os micro-organismos isolados do grupo controle Y1 e Y2 foram identificados como *Lactobacillus casei*, confirmando o resultado esperado, visto que o micro-organismo comercial utilizado para este produto é *Lactobacillus casei* Shirota.

Os micro-organismos oriundos do leite bovino *in natura* mostraram-se diferentes em gêneros, tendo a amostra L1 apresentado 76% de similaridade com *Leuconostoc citreum*, e o isolado L2 apresentou 96,5% de similaridade com *Aurantimonas altamirensis*. Meira et al. (2010) analisando amostras de leite ovino identificou *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus paracasei*. Estes resultados sugerem que, embora seja o mesmo produto, o gênero de micro-organismo predominante em leites varia conforme a espécie produtora.

Os isolados oriundos de ricota apresentaram o gênero predominante *Lactococcus lactis*, porém com subespécies distintas. Os isolados R1 e R9 foram identificados com similaridade de 95% a 95,7% com a subespécie *lactis*, enquanto a amostra R5 apresentou 92% de similaridade com a subespécie *cremoris*. Segundo Nomura et al. (2006) as subespécies *lactis* e *cremoris* são as mais empregadas na indústria de produtos lácteos, principalmente na produção de queijos, justificando nossos resultados.

As amostras de queijo tipo “Minas Frescal” apresentaram distinção nas espécies identificadas: o isolado F3 apresentou 98,2% de similaridade com *Lactococcus lactis* e o isolado F4 98,1% de similaridade com *Streptococcus parauberis*. Andrade (2014) ao analisar amostras de queijo Minas artesanal identificou uma frequência de 74% de isolados do gênero *Lactobacillus*, além dos gêneros *Enterococcus* e *Bacillus*. Já Meira et al. (2010) identificaram *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus plantarum* na sua composição de queijos ovinos.

Nas amostras de kefir identificou-se com 94% de similaridade a espécie *Lactococcus lactis* com variação na subespécie *lactis* e *cremoris*, respectivamente para K1 e K2. Com o mesmo propósito, Carneiro (2010) identificou oito micro-organismos distintos em 22 amostras de kefir, entre eles três foram identificados

como *Lactococcus lactis* subespécie *lactis*; um como *Lactococcus lactis* subespécie *cremoris*; dois *Lactobacillus casei* e dois isolados como *Leuconostoc mesenteroides* subespécie *mesenteroides*.

Tabela 4 - Identificação dos micro-organismos isolados de BAL pelo sequenciamento do 16S rRNA.

Isolados	Fonte	Espécie	Similaridade	GenBank número de acesso
*Y1	Yakult	<i>Lactobacillus casei</i>	96,6%	LC188883
Y2	Yakult	<i>Lactobacillus casei</i>	98,0%	LC188883
SB4	San Bios	Não identificado		-----
SB6	San Bios	Não identificado		-----
R1	Ricota	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	95,0%	KF879126
R5	Ricota	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	92,0%	JQ953682
R9	Ricota	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	95,7%	KF879126
F1	Queijo Minas Frescal	Não identificado		-----
F2	Queijo Minas Frescal	Não identificado		-----
F3	Queijo Minas Frescal	<i>Lactococcus lactis</i>	98,2%	KF879126
F4	Queijo Minas Frescal	<i>Streptococcus parauberis</i>	98,1%	NR_043001
L1	Leite de vaca	<i>Leuconostoc citreum</i>	76,0%	HM803934.1
L2	Leite de vaca	<i>Aurantimonas altamirensis</i>	96,5%	GQ994985
L4	Leite de vaca	Não identificado		-----
L5	Leite de vaca	Não identificado		-----
K1	Kefir	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	94,1%	KF879126
K2	Kefir	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	94,3%	KJ531392

* Y1: Yacult 1; Y2: Yacult 2; SB4: San Bios 4; SB6: San Bios 6; R1: Ricota 1; R5: Ricota 5; R9: Ricota 9; F1: Queijo Minas Frescal 1; F2: Queijo Minas Frescal 2; F3: Queijo Minas Frescal; F4: Queijo Minas Frescal; L1: Leite 1; L2: Leite 2; L4: Leite 4; L5: Leite 5; K1:Kefir 1; K2: Kefir 2.

6. Conclusão

Os micro-organismos isolados apresentaram pelo menos uma característica probiótica, antioxidante, antimicrobiana e ainda, aspectos de segurança viáveis para serem futuramente aplicado em alimentos como culturas iniciadoras. Ressalta-se que os micro-organismos R9 (*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*) e L1 (*Leuconostoc citreum*), merecem destaque na pesquisa, visto que, estes foram os dois micro-organismos que apresentaram aspectos positivos em todos os quesitos avaliados neste estudo.

7. Considerações finais

A presente pesquisa faz parte de um estudo maior em que o isolamento, identificação e caracterização de micro-organismos isolados do grupo de BAL estão sendo investigados com o objetivo de usá-los como composto probiótico *in vivo* no tratamento e profilaxia de doenças, como por exemplo, o câncer de colón. Ainda, está sendo analisado quanto à capacidade de produção de ácido linoleico conjugado e folato para uso futuro em matrizes alimentares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-DAIM, A.; HASSOUNA, N.; HAFEZ, M.; ASHOR, M. S. A.; ABOULWAFI, M. M. Antagonistic activity of *Lactobacillus* isolates against salmonella typhi in vitro. **BioMed Research International**, p. 1-12, 2013.

ABREU, Louricélia Rodrigues de. **Identificação e caracterização do potencial probiótico de bactérias isoladas do leite e queijo caprino**. 2015. 102f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2015.

ACHKAR, M. T.; NOVAES, G. M.; SILVA, M. J. D.; VILEGAS, W. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: importância na dieta e na conservação de alimentos. **Revista da Universidade Vale Rio Verde**, v. 11, n. 2, p. 398-406, 2013.

ADNAN, A.F.M.; TAN, I.K.P. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1380-1385, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). 2002. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. Brasil. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 05 de jan. 2017

ALMEIDA, J. W. L. G.; FERRARI, I. S.; SOUZA, J. V.; SILVA, C. D. A.; COSTA, M. M.; DIAS, F. S. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. **Food Control**, v. 53, p. 96–103, 2015.

ALMEIDA, L. B.; MARINHO, C. B.; SOUZA, C. S.; CHEIB, V. B. P. Disbiose intestinal. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 24, n. 1, p. 58-65, 2009.

ANDRADE, C. R. G.; SOUZA, M. R.; PENNA, C. F. A. M.; ACURCIO, L. B.; SANT'ANNA, F. M.; CASTRO, R. D.; OLIVEIRA, D. L. S. Propriedades probióticas *in vitro* de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra - MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 5, p.1592-1600, 2014.

ANVISA. **Lista de alegações de propriedade funcional**. Aprovadas julho/2008. (item 8 e 9). Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em 20 de julho de 2017.

ARAÚJO, Emiliane Andrade. **Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de *Lactobacillus delbreuckii* UFV H2b20 e de inulina**. 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

BALLUS, C. A.; KLAJN, V. M.; CUNHA, M. F.; OLIVEIRA, M. L.; FIORENTINI, A. M. Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na

elaboração de produtos lácteos fermentados: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.28, n.1, p. 85-96, 2010.

BANNERMAN, T. M. Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In P. R. Murray (Ed.), **Manual of clinical microbiology** (8th ed.). (pp. 384e404). Washington, DC: ASM Press. 2003.

BARBOSA, J.; GIBBS, P.A.; TEIXEIRA, P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in North of Portugal. **Food Control**, v. 21, p. 651-656, 2010.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.N.; SHERRIS, J.C. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493- 496, 1966.

BEHRENS, J. H.; ROIG, S. M.; DA SILVA, M. A. A. P. Aspectos de Funcionalidade, de Rotulagem e de Aceitação de Extrato Hidrossolúvel de Soja Fermentado e Culturas Lácteas Probióticas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 34, n. 2, p. 99-106, 2001.

BIEN, J., V. PALAGANI, P. BOZKO. The intestinal microbiota dysbiosis and Clostridium difficile infection: is there a relationship with inflammatory bowel disease? **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 6, n. 1, p. 53-68, 2013.

BIER, O. G. **Microbiologia e imunologia**. 24 ed., p.1234, São Paulo: Melhoramentos, 1985.

BISCOLA, V.; TODOROV, S.D.; CAPUANO, V.S.C.; ABRIOUEL, H.; GÁLVEZ, A.; FRANCO, B.D.G.M. Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. **Meat Science**, v. 93, n. 3, p.607-613, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Atualizado em agosto de 2007. IX – Lista das alegações de propriedades funcionais aprovadas. Disponível em: <http://anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 01, junho de 2017.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTH, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da Atividade Antioxidante dos Compostos Fenólicos Naturalmente Presentes em Subprodutos do Pseudofruto de Caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 27, v. 4, p. 902-908, 2007.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. Microbiota Láctica de Queijos Artesanais. **Embrapa Agroindústria Tropical**, v. 124, n. 1, 2009.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R. R.; CINTRA, H. C. Characteristics of the bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 and its effect on *Listeria monocytogenes* in bovine meat. **Food Science and Technology**, v. 26, p. 135-144, 2006.

BUDDE, B. B.; HORNBAEK, T.; JACOBSEN, T.; BARKHOLT, V.; KOCH, A. G. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meat application experiments. **International Journal of Food Microbiology**, Cambridge, v. 83, p. 171-184, 2003.

CABRÉ, E.; GASSULL, M. A. Probiotics for preventing relapse or recurrence in Crohn's disease involving the ileum: Are there reasons for failure. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 1, p. 47-52, 2007.

CARNEIRO, Raphaella Puccetti. **Desenvolvimento de uma cultura iniciadora para produção de kefir**. 2010. Tese (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2010.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CASTELLANO, P., IBARRECHE, M. P., MASSANI, M. B., FONTANA, C., & VIGNOLO, G. M. Strategies for pathogen biocontrol using lactic acid bacteria and their metabolites: a focus on meat ecosystems and industrial environments. **Microorganisms**, 5, 38. 2017.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *Escherichia coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v, 21, n. 3, p. 281-287, 2001.

CHATEAU A.N.; DESCHAMPS, M.; HADJ SASSI, A. Heterogeneity of bile salts resistance in the *Lactobacillus* isolates of a probiotic consortium. **Letters in Applied Microbiology**, v.18, p.42-44, 1994.

CLSI. (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. M100-S26, Wayne, PA, 2017.

COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **European Food Research and Technology**, v. 226, p. 1065–1073, 2008.

COLLIGNON, P.; POWERS, J. H.; CHILLER, T. M.; AIDARA-KANE, A.; AARESTRUP, F. M. World Health Organization Ranking of Antimicrobials According to Their Importance in Human Medicine: A Critical Step for Developing Risk

Management Strategies for the Use of Antimicrobials in Food Production Animals. **Food Safety**, v, 4, p. 132-141, 2009.

COUTINHO, E. P; OLIVEIRA, A. T; FRANCISCO, M. S; SILVA. M. J. da; SILVA, J. M. S. S. da; AZEREDO, L. P. M. Avaliação das Condições Higiênico Sanitárias da Manipulação e Comercialização de Carnes Vermelhas e Aves nas Feiras Livres dos Municípios de Bananeiras e Solânea, PB.II Jornada Nacional da Agroindústria, 2007.

CUI, L.; JEONG, H.; BOROVECKI, F.; PARKHURST, C.N.; TANESE, N.; KRAINIC, D. Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. **Cell**, v. 127, n. 1, p. 59-69, 2006.

DE MARTINIS, E. C. P; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International**, Amsterdam, v. 18, p. 191-208, 2002.

DEL RE, B.; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M.; PALENZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Lett. Journal of Applied Microbiology**, v. 31, p.438–442, 2000.

DONKOR, O. N. et al. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 6, p. 657-665, 2007.

DONKOR, O.N.; HENRIKSSON, A.; SINGH, T.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. ACEinhibitory activity of probiotic yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1321–1331, 2007.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema b-caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446- 452, 2006.

ERKKILA, S.; PETAJA, E. Screening of commercial meat starter cultures at low ph and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Science**, v. 55, p. 297-300, 2000.

FAN, Y. J.; CHEN, S.; YING-CONG, Y.; JIAN-MIN, S.; LIU, B. A probiotic treatment containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *Enterococcus* improves IBS symptoms in an open label trial. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 7, n.12, p. 987–991, 2006.

FAO / WHO. Orientações para a avaliação de probióticos na alimentação. London, 2002. 11 p.

FAO/WHO. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. **FAO Food and Nutrition Paper 85**. FAO, Rome, Italy, 2006.

FERNANDES, E. N.; ABREU, C. C.; OLIVEIRA, I. C.; RASMINI, J. P. A.; CUNHA, A. F. Qualidade físico química de iogurtes comercializados em Viçosa (MG). *Anais. V SIMPAC*, v. 5, n. 1, p. 519-524, 2013.

FERNANDES, R. P. P.; FREIRE, M, T, A; PAULA, E. S. M.; KANASHIRO, A. L. S.; CATUNDA, F. A. P; ROSA, A.F; BALIEIRO, J. C. C; TRINDADE, M. A. Stability of lamb loin stored under 145 refrigeration and packed in different modified atmosphere packaging systems. *Meat Science*, v. 96, p. 554–561, 2014.

FERREIRA, C. L. L. F. 2003. **Grupo de bactérias lácticas – Caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas**. In: *Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção*. Viçosa, p. 206.

FEY, P. D.; OLSON, M. E. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiology*, v. 5, n.6, p.917-933, 2010.

FISCHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, v. 15, p.1749-1757, 2009.

Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. 2001, posting date. Regulatory and clinical aspects of dairy probiotics. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. (Online.)

FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; CALLEWAERT, R.; DEVREESE, B.; VAN BEEUMEN, J.; DE VUYST, L. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *Journal of Applied Microbiology*, v. 94, p. 214-229, 2003.

FRANCO, B. Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, p. 863, 2016.

FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.; CARVALHO, J.C.A.P. Probióticos-Revisão. *Higiene Alimentar*, v. 20, p.22-33, 2006.

FRANZ, C. M. A. P.; MUSCHOLL-SILBERHORN, A. B.; YOUSIF, N. M. K.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; HOLZAPFEL, W. H.; Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Applied Environmental Microbiology*, v.67, p. 4385-4389, 2001.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E. Antibacterial Activities of Phenolic Benzaldehydes and Benzoic Acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, v. 66, n. 10, p. 1811-1821, 2003.

FURLAN, R.L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B.C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: 5º Simpósio Técnico de

Incubação, Matrizes de corte e Nutrição, 2004, Balneário Camboriú. Anais... Santa Catarina, p. 6-26. 2004.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p.163-171, 2002.

GOTTELAND, M.; VIZCARRA, M.; MAURY, E. Efecto de un producto lácteo con probióticos y prebióticos sobre la función digestiva de sujetos sanos y constipados. **Revista Chilena de Nutrición**, v. 37, n. 3, p. 340-351, 2010.

GRANATO, D.; MASSON, M. L.; RIBEIRO, J. C. B. Sensory acceptability and physical stability evaluation of a prebiotic soy-based dessert developed with passion fruit juice. **Ciência de Tecnologia em Alimentos**, Campinas, v. 32, n.1, p. 119-125, 2012.

GUEDES NETO, L. G.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, n. 57, v. 2, p. 245-250, 2005.

HACKER, J.; KAPER, J.B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 641-679. 2000.

HARRIS, L. J; DAESCHEL, M. A; STILES, M. E; KLAENHAMMER, T. R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, v. 52, p. 384-387, 1989.

HERMANNNS, Gislaine. **Potencial bacteriocinogênico e probiótico de bactérias ácido lácticas isoladas de leite e queijos artesanais**. 2013. 100 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2013.

HUANG, Y.; ADAMS, M. C. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 253-260, 2004.

HUGAS, M. Bacteriogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, Champaign, v. 49, n. 1, p. 139-150, 1998.

HUSAIN, S. Effect of ferric iron on siderophore production and pyrene degradation by *Pseudomonas fluorescens* 29L. **Current Microbiology**, v. 57, p. 331–334, 2008.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Probiotics. **Best Practice Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p. 299-313, 2004.

JAGER, S., E.F. STANGE, J. Wehkamp. Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease. **Langenbecks Arch Surgerys**, v. 398, n. 1, p. 1-12. 2013.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: editora Artmed, 2005. 517-542 p.

JEFFERSON, K.K. What drives bacteria to produce a biofilme. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 236, p.163-173, 2004.

JERNBERG, C., LÖFMARK, S., EDLUND, C., & JANSSON, J. K. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. **Microbiology**, v. 156, n. 11, p. 3216-3223, 2010.

JETT, B. D.; HUYCK, M. M.; GILMORE, M. S. bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiology Reviews**, v. 7, n. 4, p. 462-478, 1994.

JIN, L.Z.; HO, T.W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN. Probiotics in poultry: modes of action. **World's Poultry Science Journal**, v.53, p.351-368, 1997.

KHEMALLELAKUN, S.; BAUMGARTNER, J.C.; PRUKSAKOM, S. Autoaggregation and Coaggregation of bacteria associated with acute endodontic infections. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v.32, n.4, p.312-318, 2006.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 12, n. 1-3, p. 39-45, 1993.

KLAENHAMMER, T. R.; KULLEN, M.J. Selection and design of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.15, n. 50, p. 45-57, 1999.

KOCH, S.; HUFNAGEL, M.; THEILACKER, C.; HUEBNER, J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities, **Vaccine**, v.22, p. 822-830, 2004.

KOSTINEK, M., SPECHT, I., EDWARD, V. A., PINTO, C., EGOUNLETY, M., SOSSA, C., MBUGUA, S., DORTU, C., THONART, P., TALJAARD, L., MENGU, M., FRANZ, C. M. A. P., HOLZAPFEL, W. H. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, 114, 342-351. 2007.

KOWALSKI, W.J.; KASPER, E.L.; HATTON, J.F.; MURRAY, B.E.; NALLAPAREDDY, S.R.; GILLESPIE, M.J. *Enterococcus faecalis* adhesion, Ace, mediantes attachment to particulate dent. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 7, p. 634-637, 2006.

KULLISAAR, T.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M.; VIHALEMM, T.; ANNUK, H.; KAIRANE, C.; KILK, A. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.72, p. 215–224, 2002.

LEWUS, C.; KAISER, A.; MONTVILLE, T. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Appl Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1683-1688, 1991.

LIEBERMAN, M.; MARKS, A. D. Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach. 4 ed. Philadelphia: Wolter Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013. 1014 p.

LIMA, C.D.L.C., LIMA, L. A., CERQUEIRA, M.M.O.P., FERREIRA, E.G. & ROSA, C. A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. 2009.

LIN, M.Y.; CHANG, F.J. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 45, n.8, p.1617-1622, 2000.

LIU, X.; LIU, W.; ZHANG, Q.; TIAN, F.; WANG, G.; ZHANG, H.; CHEN, W. Screening of lactobacilli with antagonistic activity against enteroinvasive *Escherichia coli*. **Food Control**, v. 30, n. 2, p. 563-568, 2013.

LODDI, M.M.; GONZALES, E.; TAKITA, T.S.; MENDES, A. A.; ROÇA, R. O. Uso de probiótico e antibiótico sobre o desempenho, o rendimento e a qualidade de carcaça de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.4, p.1124-1131, 2000.

LODDI, M. M.; MORAES, V. M. B.; NAKAGHI, L. S. O.; TUCCI, F. M.; HANNAS, M. I.; ARIKI, J.; BRUNO, L. D. G. Mannan oligosaccharide and organic acids on intestinal morphology integrity of broilers evaluated by scanning electron microscopy. Proceeding of the 11th **European Poultry Science Conference**, Bremen, p. 6-10. 2002.

LUIZ, W.; ALMEIDA, G. D. E.; FERRARI, S.; SOUZA, J. V.; DAIANE, C.; MATIUZZI, M.; DIAS, F. S. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. **Food Control**, v. 53, p. 96–103, 2015.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Evolução e sistemática microbianas. Microbiologia de Brock. São Paulo: Prentice Hall, p. 302-330, 2004.

MAHASNEH, A. M.; HAMDAN, S.; MAHASNEH, S. A. Probiotic Properties of *Lactobacillus* Species Isolated from Local Traditional Fermented Products. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 2, p. 81–87, 2015.

MARAGKOUidakis, P. A.; ZOUMPOPOULOU, G.; MIARIS, C.; KALANTZOPOULOS, G.; POT, B.; TSAKALIDOU, E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 189-199, 2006.

MARRA, A.; DIB-HAJJ, F.; LAMB, L.; KACZMAREK, F.; SHANG, W.; BECKIUS, G.; MILICI, A. J.; MEDINA, I.; GOOTZ, T. D.; Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. **Diagnostic Microbiology**, v. 58, p. 59-65, 2007.

MATSUMOTO, K.; TAKADA, T.; SHIMIZU, K.; KADO, Y.; KAWAKAMI, K.; MAKINO, I.; YAMAOKA, Y.; HIRANO, K.; NISHIMURA, A.; KAJIMOTO, O.; NOMOTO, K. The effect of a probiotic milk product containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the

defecation frequency and the intestinal microflora of sub-optimal health state volunteers: a randomized placebo-controlled cross-over study. **Bioscience & Microflora**, v. 25, n. 2, p. 39-48, 2006.

MEDEIROS, Aline Weber. **Avaliação dos fatores de virulência e a capacidade de formação de biofilme *in vitro* em isolados alimentares e clínicos de *Enterococcus sp.* e utilização de PCR-RFLP para a identificação de *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus gallinarum*.** 2011. 116 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Molecular) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MEIRA, Stela Maris Meiste. **Potencial probiótico de bactérias lácticas e atividades biológicas de leite e queijo de ovelha.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MEIRA, S. M. M.; HELFER, V. E.; VELHO, R. V.; MEDINA, L. F. C.; BRANDELLI, A. identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 75-80, 2010.

MEIRA, S. M. M.; HELFER, V. E.; VELHO, R. V.; LOPES, F. C.; BRANDELLI, A. Probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from Brazilian regional ovine cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 79, n. 1, p. 119-127, 2012.

MOGENSEN, G.; SALMINEN, S.; O'BRIEN, J.; OUWEHAND, A.; HOLZAPFEL, W. H.; SHORTT, C.; FONDÉN, R.; MILLER, G.; DONOHUE, D. Food microorganisms - health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. **Bulletin of the International Dairy Federation**, Montreal, n. 377, p. 4-9, 2003.

MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1581- 1588, 2007.

MORAES, P. M.; PERIN, L. M.; ORTOLANI, M. B. T.; YAMAZI, A. K.; VIÇOSA, G. N.; NERO, L. A. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. **LWT - Food Science and Technology**, n. 43, p. 1320-1324, 2010.

MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. S289-S196, 2006.

Moura C. Potencial antioxidante de extratos hidroalcoólicos de mirtilo, polpa de açaí e *gojiberry*: efeito na estabilidade oxidativa e sensorial em queijo *petitsuisse*(mestrado): Paraná - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016.
MURRAY, B.E. Diversity among multidrug-resistant enterococci. **Emerging Infectious Diseases journal**, v. 4, p. 37-47, 1998.

NELSON, R. W.; COUTO, G. C. Medicina interna de pequenos animais. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1324 p.

NOMURA, M.; KOBAYASHI, M.; NARITA, T.; KIMOTO-NIRA, H.; OKAMOTO, T. Phenotypic and molecular characterization of *Lactococcus lactis* from milk and plants. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 2, p. 396-405, 2006.

OHKAWA, H.; OHISHI, H.; YAGI, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.38, n.1, p.1-21, 2002.

OMURA, Michele Harumi. **Características probióticas e de segurança de bactérias do ácido láctico predominantes em leite humano**. 2014. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2014.

PAN, X. D.; CHEN, F. Q.; WU, T. X.; TANG, H. G.; ZHAO, Z. Y. Prebiotic oligosaccharides change the concentrations of short-chain fatty acids and the microbial population of mouse bowel. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 10, n. 4, p. 258–263, 2009.

PANDEY, A.; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R.; DUSSAP, C.G. *Advances in Fermentation Technology*. Nova Delhi: Asiatech Publisher Inc; 2008.

PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A.; OBA, A.; NORKUS, E. A.; KODAWARA, L. M.; LIMA, T. M. A. Morfologia intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 98, n. 547, p. 125-134, 2003.

PELÍCIA, Kleber. **Efeito de promotores biológicos e químicos sobre o desempenho, rendimento de carcaça e qualidade da carne em frangos de corte tipo colonial**. 2004. 61 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

PERELMUTER, K.; FRAGA, M.; ZUNINO, P. *In vitro* activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 1718-1725, 2008.

PIENIZ, S.; ANDREAZZA, R.; OKEKE, B. C.; CAMARGO, F. A. O.; BRANDELLI, A. Antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus* species isolated from meat and dairy products. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 4, p. 923-931, 2015.

PUPIN, A.M. Probióticos, prebióticos e simbióticos: aplicações em alimentos funcionais. Seminário Novas Alternativas de Mercado, Campinas: ITAL, p. 133-145, 2002.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radicals Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

REID, G.; JASS, J.; SEBULSKY, M. T.; MCCORMICK, J. K. Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v. 16, n. 4, p. 658-672, 2003.

RODRÍGUEZ, E.; CALZADA, J.; ARQUÉS, J. L.; RODRÍGUEZ, J. M.; NUNEZ, M.; MEDINA, M. Antimicrobial activity of Pediocin-producing *Lactococcus lactics* on *Listeria monocytogenes*, *Staphilococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v. 15, p. 131-137, 2005.

RODRIGUES, H. G.; DINIZ, Y. S.; FAINE, L. A.; FERNANDES, A. A. H.; NOVELLI, E. L. B. Nutritional supplementation with natural antioxidants: effect of rutin on HDL-cholesterol concentration. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 3, p. 315-320, 2003.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SAAD, Susana Marta Isay; CRUZ, Adriano Gomes; FARIA, José de Assis Fonseca. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Livraria Varela, 2011.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; MATTO, J.; MATTILA-SANDHOLMA, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197 – 215, 2000.

SAIDET, J. A. O.; GILLILAND, S. E. Antioxidative Activity of Lactobacilli Measured by Oxygen Radical Absorbance Capacity. **Journal Dairy Science**, v. 88, p. 1352-1357, 2005.

SALMINEN, M.K.; RAUTELIN, H.; TYNKKYNEN, S.; POUSSA, T.; SAXELIN, M.; VALTONEN, V.; JARVINEN, A. Lactobacillus bacteremia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. **Clinical Infectious Diseases**, V. 1, n.42, p. 35-44, 2006.

SAMONA, A.; ROBINSON, R. K. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 44, n. 3, p. 64-66, 1991.

SCHAECHTER, M.; MEDOFF, G.; EISENSTEIN, B.L. Mechanisms of microbial disease. 3th edition. Ed. Lippincott, Williams & Wilkins. (1999).

SCHWAB, J. P.; EDELWEISS, M. I. A. Identification of *Listeria monocytogenes* in human placentas and abortion species through immunohistochemical technique. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 111-114, 2003.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 4, p. 894-907, 2000.

SEHN, Carla Pohl. **Avaliação da atividade bacteriocinogênica e características probióticas do isolado *Lactobacillus curvatus* LC254 e da utilização da sua substância antimicrobiana em filmes biodegradáveis**. 2015. 118 f. Tese

(Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

SEMEDO, T.; SANTOS, M. A.; LOPES, M. F.; FIGUEIREDO, J. J.; BARRETO M. T. C.; TENREIRO, R. Virulence factors in food, clinical and reference Enterococci: A common trait in the genus. **Systematic and Applied Microbiology**, v, 26, p. 13-22, 2003.

SIES, H.; STAHL, W.; SEVANIAN, A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. **Journal of Nutrition**, v. 135, n.5, p. 969-72, 2005.

SILVA, C.R.; PINHEIRO, A.L.B.C. Utilização de Probióticos como Melhoradores de Desempenho em Aves. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.5, n.6, p.690-706, 2008.

SILVA, Neusely da; JUNQUEIRA, Valéria Christina Amstalden; SILVEIRA, Neliane Ferraz de Arruda; TANIWAKI Marta Hiromi; GOMES Renato Abeilar Romeiro; OKAZAKI Margarete Midori. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 317 p.

SONGISEPP, E.; KULLISAAR, T.; HÜTT, P.; ELIAS, P.; BRILENE, T.; ZILMER, H.; MIKELSAAR, M. A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 7, p. 2017-2023, 2005.

SOUSA, C. M. DE M.; SILVA, H. R.; VIEIRA, G. M. J.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. DA; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. DE M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, I. B.; CARDOSO, C. V.; POPPE, S. C.; BONDAN, E. F. Lipid peroxidation in female dogs bearing mammary gland carcinomas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 5, 2017.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal Microbiology Methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.

SUSSMUTH, S. D.; MUSCHOLL-SILBERHORN, A.; WIRTH, R.; SUSA, M.; MARRE, R.; ROZDINSKI, E. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* with human macrophages and suppresses respiratory burst. **Infection and Immunity**, v.68, n.9, p.4900-4906, 2000.

TAVAKOLI, M.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; HEJAZI, M.A.; AZIZI, M.H.; ABBASI, S. Characterization of Probiotic Abilities of Lactobacilli Isolated from Iranian Koozeh Traditional Cheese. **Polish Journal Of Food And Nutrition Sciences**, v, 67, p. 41-48, 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed; 2012.161p.

TOURNUT, J.R. Probiotics. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1998, Botucatu. Anais... Botucatu: SBZ, p.179-199, 1998.

TREVORS, J. T. The composition and organization of cytoplasm in prebiotic cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n.3, p. 1650-1659, 2011.

TUOHY, K. M.; PROBERT, H. M.; SMEJKAL, C. W.; GIBSON, G. R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 15, p. 692-700, 2003.

VAZ, M.; CHOUPINA, A. Lipases: Biocatalizadores da Hidrólise de Triacilgliceróis. **Revista eletrônica de biologia**, v. 5, n. 3, p. 42 - 58, 2012.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 271-275, 2000.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, Amsterdam, v.36, p.895-904, 2003.

WANG, M.; TSAO, R.; ZHANG, S.; DONG, Z.; YANG, R.; GONG, J.; PEI, Y. Antioxidant activity, mutagenicity/ anti-mutagenicity, and clastogenicity/anti-clastogenicity of lutein from marigold flowers. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 1522-1529, 2006.

ZANONI, S.; POMPEI A.; CORDISCO, L.; AMARETTI, A.; ROSSI, M.; MATTEUZZI D. Growth kinetics on oligo- and polysaccharides and promising features of three antioxidative potential probiotic strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1266–1276, 2008.

WANG, L.; DONG, M.; ZHENG, J.; SONG, Q.; YIN, W.; LI, J.; NIU, W. Relationship of biofilm formation and gelE Gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from Root canals in Patients Requiring Endodontic Retreatment. **Journal of Endodontics**, v.37, n. 5, p.631-636, 2011.

XIE, W.; KHOSASIH, V.; SUWANTO, A.; KIM, H. K. Characterization of lipases from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from human facial sebaceous skin. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n.1, p.84-91, 2012.