

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



Dissertação

Caracterização de *Enterococcus durans* LAB18se *Lactococcus lactis* subsp
*lactis*R7 isolados de queijos

Charlene Carvalho da Cunha
Bacharel em Química de Alimentos

Pelotas, 2017

Charlene Carvalho da Cunha

Caracterização de *Enterococcus durans* LAB18se *Lactococcus lactis* subsp
*lactis*R7 isolados de queijos

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos
da Universidade Federal de Pelotas,
como requisito à obtenção do título
de Mestre em Ciência e Tecnologia
de Alimentos.

Comitê de orientação
Profª. Drª. Simone Pieniz
Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2017

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Maicon Fabrício que sempre me incentivou, não mediu esforços para me ajudar e me acompanhou nesta caminhada.

Ao meu filho Lucas pela paciência e compreensão pelas horas que deixamos de estar juntos.

A minha família e amigos que me apoiaram e compreenderam os momentos de ausência.

A minha amiga Júlia pela ajuda, incentivo e companherismo.

Aos demais colegas pela ajuda na execução do meu trabalho.

A Professora Simone Pieniz e ao Professor Wladimir pela oportunidade, ensinamentos e por terem confiado na minha capacidade.

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

ACAPES pela bolsa de mestrado concedida.

A todos vocês meus sinceros agradecimentos!

RESUMO

A procura por bactérias ácido-láticas (BAL) com propriedades benéficas a saúde, melhoria nas características sensoriais, digestibilidade, qualidade nutricional, bem como na preservação dos alimentos tem sido o foco de intensas pesquisas na última década. O isolamento e caracterização de novas espécies são vantajosos para obtenção de linhagens com características taxonômicas, tecnológicas e funcionais diferenciadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar fatores de virulência e atividade probiótica do isolado *Enterococcus durans* (LAB18s), proveniente de queijo minas frescal, bem como isolar, identificar, caracterizar, avaliar o potencial probiótico e os aspectos de segurança de isolados de BAL, provenientes de queijo ricota, para possível aplicação como cultura probiótica. Verificou-se que o isolado LAB18s é homofermentativo, lipase positiva e gelatinase negativa, possui atividade antagonista contra *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Não foi detectada a presença do operon *icaADBC*, os quais são relacionados à formação de biofilme, indicando segurança em relação a um possível uso em alimentos. Além disso, o isolado LAB18s carrega dois genes de enterocinas, o gene L50A/B e o gene P. O isolado R7, obtido de queijo ricota, foi identificado molecularmente como *Lactococcus lactis* subsp *lactise* apresentou características probióticas nas análises de tolerância ao pH ácido, sais biliares, suco gástrico simulado e suco intestinal simulado. Além disso, foi sensível aos seis antimicrobianos testados, não forma biofilme, é homofermentativo, bem como não apresentou atividade hemolítica, nem das enzimas DNase, gelatinase e lipase. O isolado R7 apresentou ainda, capacidade de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade, indicando potencial para ser utilizado como probiótico. Da mesma forma, apresentou atividade antagonista contra *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e atividade antioxidante. Por meio dos resultados obtidos conclui-se que, tanto o LAB18s isolado de queijo minas frescal quanto o R7 isolado de queijo ricota apresentaram características probióticas e aspectos de segurança compatíveis para futura utilização como culturas iniciadoras em alimentos. São

resultados promissores, no entanto, há necessidade de pesquisa de genes codificadores de virulência e toxicidade para possível aplicação.

Palavras-chave: Bactérias ácido-láticas; segurança; virulência; potencial probiótico

ABSTRACT

The search for new lactic-acid bacteria (LAB) with beneficial properties has been the focus of intensive research in the current years. The isolation and characterization of new species are advantageous to obtain lineages with different taxonomic, technological and functional properties. The aim of this study was to evaluate the virulence and antimicrobial activity of *Enterococcus durans* (LAB18s) isolated from cheese "minas frescal", as well as to isolate, identify, characterize and evaluate the probiotic potential and safety aspects of a new strain of BAL from Cheese "ricotta type" for the possible application as a probiotic culture. In the results of isolate LAB18s, gelatinase negative, lipase positive, homofermentative activity, antagonistic activity against the *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* were observed in the well diffusion assay by well, and activity against *E. coli*, *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes* by the "Spot on the lawn" method. The presence of the icaADBC operon was not detected indicating safety in relation to a possible alimentary use; the presence of two enterocin genes, the L50A/B gene and the P gene were pronounced. The R7 strain isolated from ricotta cheese, identified as *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, presented probiotic characteristics against tolerance analysis at acid pH, bile salts, simulated gastric juice and simulated intestinal juice. It was classified as sensitive against all antibiotics tested, non-biofilm forming, homofermentative, presented negative activity for analysis of hemolysis, DNase, gelatinase and lipase. The isolate R7 also presented self-aggregation, coaggregation and hydrophobicity capacity indicating potential to be used as probiotic. Likewise, it presented antagonistic activity against *Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, and antioxidant activity both by the TBARS and DPPH methods. By means of the results obtained, it was concluded that both LAB18s isolated from fresh minas cheese and R7 isolated from ricotta cheese presented probiotic characteristics and safety aspects compatible for future use as starter cultures in foods. There are promising results, however, there is a need for research on genes coding for virulence and toxicity for possible application.

Keywords:Lactic-acid bacteria; characterization; probiotic potential

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Capacidade de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade do isolado R7.....	46
Figura 2.	Atividade hemolítica do isolado R7 em ágar sangue suplementado com 7% (v/v) de sangue de cavalo.....	50
Figura 3.	Atividade da DNase em ágar DNase. Atividade positiva para <i>S. aureus</i> ATCC 25923 (controle positivo) e atividade negativa do isolado R7.....	51
Figura 4.	Inibição da peroxidação lipídica pelo método TBARS (A) e a análise da capacidade antioxidante do sobrenadante livre de células dos isolados por métodos DPPH (B). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * Os valores com as mesmas letras não apresentam diferença estatística significativa entre os grupos.....	
Figura 5.	Análise genotípica de genes formadores do operon <i>icaADBC</i> (<i>icaA</i> , <i>icaB</i> , <i>icaC</i> e <i>icaD</i>).....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Micro-organismos patogênicos utilizados na análise da atividade antagonista do isolado (LAB18s e isolado R7).....	29
Tabela 2.	Protocolo de oxidação da Reação ao Ácido Tiobarbitúrico.....	31
Tabela 3.	Protocolo de oxidação - Curva Padrão.....	32
Tabela 4.	Oligonucleotídeos de sense (f) e anti-sense (r) e condições de reação de PCR utilizados para identificação dos genes de adesão intercelular <i>icaA</i> , <i>icaB</i> , <i>icaC</i> e <i>icaD</i>	36
Tabela 5.	Oligonucleotídeos e condições de reação de PCR utilizados para identificação dos genes de enterocinas.....	37
Tabela 6.	Identificação do isolado R7 pelo sequenciamento do 16S rRNA.....	38
Tabela 7.	Análise de tolerância aos ácidos do isolado R7.....	39
Tabela 8.	Análise de tolerância aos sais biliares, do isolado R7.....	40
Tabela 9.	Análise de tolerância ao suco gástrico do isolado R7.....	42
Tabela 10.	Análise de tolerância ao suco intestinal simulado do isolado R7.....	43
Tabela 11.	Análise de suscetibilidade do isolado R7 aos antimicrobianos e classificação segundo o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI).....	48
Tabela 12.	Atividade antagonista dos isolados LAB18s e R7.....	54

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	11
2.	Objetivos.....	13
2.1	Objetivo geral.....	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3.	Referencial teórico.....	14
3.1	<i>Enterococcus</i>	14
3.2	<i>Lactococcus</i>	15
3.3	Fatores de virulência.....	16
3.4	Formação de biofilme	18
3.5	Probióticos.....	19
3.6	Bacteriocinas.....	21
4.	Materiais e Métodos.....	23
5.	Resultados e Discussão.....	37
5.1	Isolamento, caracterização e identificação do isolado R7.....	37
5.2	Coloração de Gram.....	37
5.3	Caracterização probiótica do isolado R7.....	38
5.3.1	Tolerância ao pH ácido, aos sais biliares, ao suco gástrico e ao suco intestinal simulados do isolado R7.....	38
5.3.2	Capacidade de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade do isolado R7.....	44
5.4	Análise de segurança do isolado R7.....	48
5.4.1	Avaliação fenotípica de resistência a antimicrobianos do isolado R7.....	48
5.4.2	Atividade hemolítica do isolado R7.....	50
5.4.3	Atividade DNase do isolado R7.....	51
5.4.4	Avaliação da capacidade de formação de biofilme do isolado R7.....	53
5.4.5	Produção de gelatinase do isolado R7.....	51
5.4.6	Produção de lipase do isolado R7.....	51
5.5	Atividade antagonista contra bactérias patogênicas para os isolados LAB18s e R7.....	52
5.6	Perfil fermentativo dos isolados LAB18s e R7.....	55
5.7	Capacidade antioxidante do isolado R7.....	55
5.8	Extração e análise genotípica dos isolados LAB18s e R7.....	57
5.8.1	Análise genotípica para identificação de genes de adesão intercelular do isolado LAB18s.....	57
5.8.2	Análise genotípica para identificação de genes de enterocinas do isolado <i>E. durans</i> LAB18s.....	58
6	Conclusão	61
7.	Considerações finais.....	62
8.	Referências.....	63

1. INTRODUÇÃO

O aumento na procura de um estilo de vida mais saudável e o desenvolvimento de produtos com características funcionais têm feito com que ocorra um crescimento pela demanda de alimentos probióticos (GIRAFFA, 2003). A procura por bactérias ácido-láticas (BAL) com propriedades benéficas à saúde, melhoria nas características sensoriais, digestibilidade, qualidade nutricional, bem como na preservação dos alimentos tem sido o foco de intensas pesquisas nos últimos anos. As BAL, além de prolongar a vida útil dos alimentos por meio de processos fermentativos, exercem influências sobre as características sensoriais e nutricionais dos alimentos. Algumas dessas bactérias são muito utilizadas na indústria de alimentos devido a apresentarem características tecnológicas, bioprotetoras e probióticas, sendo capazes de proporcionar propriedades desejáveis aos alimentos, bem como benefícios à saúde (GIRAFFA, 2003). Esses micro-organismos ainda podem apresentar atividade antagonista contra outras bactérias, por meio da produção de metabólitos ativos com propriedades antimicrobianas, como ácidos orgânicos (principalmente láctico e acético), CO₂, peróxido de hidrogênio, diacetil e bacteriocinas (DEEGAN et al., 2006).

De acordo com a Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO) (2002), probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, ao serem administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Segundo Schillinger et al. (2005), esses micro-organismos devem apresentar características como: sobrevivência a acidez estomacal, capacidade de multiplicação e adesão ao epitélio intestinal; capacidade de suportar condições adversas, como a presença de sais biliares, suco gástrico, pancreático e entérico; ter efeito antagonista às bactérias prejudiciais; e não ser toxigênico ou patogênico para o hospedeiro.

Beresford et al. (2004) descrevem que os gêneros de BAL mais encontrados em queijos são: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus*.

O isolamento e a caracterização de novas espécies de BAL ainda não investigadas são de suma importância haja vista que podem ser vantajosas

para obtenção de linhagens com características taxonômicas, tecnológicas e funcionais diferenciadas (ORTU et al., 2007). Estas novas linhagens devem ser isentas de fatores de virulência e resistência à antimicrobianos, garantindo segurança aos alimentos, pois a ingestão e o uso de novas linhagens com benefícios específicos está diretamente ligado à saúde pública. Os novos isolados com características probióticas devem apresentar tolerância aos antimicrobianos usados na prática clínica, entretanto, não devem ser capazes de transferir essa resistência a outras bactérias, comensais ou oportunistas (DEL PIANO et al., 2006). Mesmo que atualmente haja linhagens probióticas bem caracterizadas e disponíveis, as novas linhagens podem trazer benefícios específicos à saúde. Além disso, estudos demonstram potencial bacteriocinogênico/ou probiótico para microbiota constituída de BAL (MEIRA, 2011; HERMANNNS et al., 2013; JERONYNO-CENEVIVA, et al., 2014).

Desta forma, o isolado *Enterococcus durans* LAB18s, utilizado no presente estudo, foi obtido de pesquisa previamente realizada por Pieniz (2013), apresentando características probióticas e de segurança já comprovados, sendo realizados estudos complementares quanto as características de virulência e atividade antimicrobiana. Pelo fato do isolado LAB18s não ter apresentado atividade antimicrobiana satisfatória (objetivo principal deste estudo), foi isolado outro micro-organismo, oriundo de queijo ricota, para sequência do estudo, o qual foi identificado por meio do sequenciamento do 16S DNA como *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (R7).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a virulência e atividade antimicrobiana do isolado LAB18s, proveniente de queijo minas frescal, bem como isolar, identificar, caracterizar, avaliar o potencial probiótico e os aspectos de segurança do micro-organismo isolado de ricota.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as características de virulência e atividade antimicrobiana do isolado LAB 18s, proveniente de queijo minas frescal;
- Isolar, identificar e caracterizar fenotípicamente BAL provenientes de queijo ricota;
- Avaliar o potencial probiótico do isolado R7;
- Avaliar a segurança microbiológica dos isolados LAB 18s e R7;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos isolados LAB18s e R7 contra bactérias patogênicas;
- Avaliar o perfil fermentativo dos isolados LAB18s e R7.;
- Avaliar a capacidade antioxidante do sobrenadante (SLC) do isolado R7;
- Realizar a extração e análise molecular do R7 e caracterização genotípica dos isolados LAB18s e do R7.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Enterococcus*

O gênero *Enterococcus* tem grande importância no que se refere à fermentação ou deterioração de alimentos. Esses micro-organismos podem contribuir para a maturação de queijos, desenvolvimento de características organolépticas como aroma de certos queijos e produtos cárneos fermentados devido atividades glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas (SETTANNI; CORSETTI, 2008; GOMES et al., 2010; OGAKI, 2015). Entretanto, algumas linhagens estão relacionadas a infecções nosocomiais e são causadoras de enfermidades humanas como bacteremia ou infecções do trato urinário, endocardite, além de algumas espécies poderem carrear multirresistência a antimicrobianos, bem como portarem fatores de virulência (GOMES et al., 2010).

Enterococcus são cocos Gram-positivos, não formadores de esporos, que pertencem ao grupo das BAL, que além de outros compostos bioativos, podem produzir bacteriocinas. Apesar de ser catalase negativa, podem produzir pseudo-catalase, sobreviver a variações de temperaturas (5 °C a 50°C) e pH (4,6 a 9,9), apresentar resistência a sais biliares (40%) e a altas concentrações de NaCl (6,5%) (FISCHER et al., 2009; FRANZ et al., 2011).

Pertencem à Família Enterococcaceae, sendo encontrados, principalmente, no trato gastrointestinal de animais e humanos. Além de serem encontrados em animais de sangue quente, podem também ser encontrados em locais bastante distintos, como solo, águas superficiais, águas residuais, vegetais e alimentos, principalmente em laticínios e produtos cárneos (GIRAFFA, 2002; HIDANO et al., 2015). A maior parte das linhagens são homofermentativas, apresentando produção de ácido lático devido fermentação da glicose sem produção de gás.

De acordo com Giraffa (2003), alguns *Enterococcus* isolados de leite têm sido identificados como produtores de bacteriocinas (enterocinas), ou seja, possuem capacidade de inibir bactérias deteriorantes de alimentos e patogênicas, tais como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas*, entre outros. *Enterococcus* normalmente apresentam uma maior atividade proteolítica do que outras BAL, sendo considerados de grande importância para a

maturação de queijos com o desenvolvimento de aromas característicos, sendo desta forma, utilizados como culturas iniciadoras (CENTENO et al., 1996).Entretanto, a sua utilização deve ser feita com cautela devido riscos que podem oferecer à saúde pública, frente a isso, os novos isolados devem ser avaliados em relação à capacidade de transferência de genes de resistência a antimicrobianos, presença de gelatinase, capacidade hemolítica, resistência ao pH ácido e sais biliares(OGIER et al., 2008).

3.2 *Lactococcus*

Lactococcus são cocos Gram-positivos, dispostos em pares ou curtas cadeias, apresentam formato ovóide com cerca de 0,5 a 1,5 µm de comprimento, catalase negativa, oxidase negativa, com temperatura ótima de crescimento em 30°C. Podem crescer a 10°C e não crescem em caldo com pH ajustado a 9,6 ou em caldo contendo 6,5% de NaCl. Possuem requerimento de oxigênio facultativo, não produzem esporos, não apresentam motilidade e possuem metabolismo homolático, onde o ácido láctico é o único ou principal produto resultante da fermentação da glicose (MADIGAN et al., 2005).*Lactococcus lactis* é caracterizada pela capacidade de produzir ácido a partir da rafinose, ramnose e sorbitol (MADIGAN et al., 2005).

O gênero *Lactococcus* pertence ao grupo das BAL, apresentando cinco espécies, as quais são divididas em subespécies, sendo *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*, as mais comuns e utilizadas como culturas iniciadoras para a produção de produtos lácteos fermentados. Devido às suas propriedades tecnológicas, são muito utilizados na indústria de produtos lácteos, na produção de queijos e coalhada, tendo como principal função o desenvolvimento de atividades acidificantes e proteolíticas, e, conseqüentemente, de textura, sabor e aroma, além de atuar como bioconservadores, por meio da produção de compostos antimicrobianos, como os ácidos orgânicos e bacteriocinas(CASALTA et al., 2008).

Nos últimos anos, bacteriocinas oriundas de bactérias Gram-positivo, incluindo os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* e alguns membros de *Streptococcus*, têm sido alvo de intenso estudo em diversos níveis, inclusive em relação à

caracterização molecular, devido ao potencial prático de aplicações como bioconservadores e probióticos (MEHTA et al., 2013).

Autores relatam que algumas cepas bacteriocinogênicas de *Lactococcus* apresentaram atividade antimicrobiana contra patógenos de importância em alimentos, indicando seu potencial para o controle de micro-organismos indesejados, como *L.monocytogenes* (COSENTINO et al., 2012; HELLAL et al., 2012).

3.3 Fatores de virulência

Segundo Schaechter et al. (1999), fatores de virulência são determinantes que permitem a bactéria invadir, colonizar e evitar o sistema de defesa do organismo, estabelecendo uma vantagem competitiva e conseqüentemente dano ao hospedeiro. De acordo com os autores essa designação passou a significar qualquer componente do micro-organismo que seja capaz de provocar doença ou que potencialize essa capacidade.

Diversos fatores de virulência foram descritos em enterococcus, tais como: gelatinase, uma protease com função de viabilizar nutrientes peptídicos aos micro-organismos, onde o gene *gelE* codifica essa metaloprotease que pode ser danosa ao hospedeiro devido a capacidade de hidrolização do colágeno, caseína, gelatina e hemoglobina (GIRIDHARA UPADHYAYA et al., 2009; SANTOS et al., 2015). Atividade hemolítica é tida como um marcador de virulência e sua ausência vêm sendo utilizada como um dos critérios de seleção para culturas utilizadas em alimentos (FRANZ et al., 1999), onde, as hemolisinas, também conhecidas como citolisinas, que são agentes citotóxicos contribuem para o poder invasivo da bactéria; α -hemolisina é uma proteína capaz de lisar as hemácias e atuar na membrana celular de leucócitos, ocasionando extravasamento do conteúdo da célula e morte celular. O gene regulador *agr* controla a alfa toxina que é produzida durante a fase pós-exponencial do crescimento bacteriano (BHAKDI et al., 1991); β -hemolisina é uma proteína que atua na membrana citoplasmática, devido formação de poros na membrana a célula torna-se instável ocorrendo assim o extravasamento do conteúdo celular; Essa proteína tem como uma das funções a obtenção de ferro e também é formada na fase pós-exponencial do crescimento bacteriano

(HUSEBY et al., 2007); Adiferença entre estas principais hemolisinas é a ação lítica que causam nos eritrócitos (BUTT et al., 1998).

Outro marcador de virulência muito investigado em cepas de origem alimentar é a detecção da atividade DNase, que hidrolisa as ligações fosfodiéster entre os nucleotídeos que compõe o DNA (ÇITAK et al., 2003). De acordo com Barbosa et al. (2010), a DNase é uma enzima capaz de degradar o ácido nucleico (DNA), promovendo uma vantagem competitiva à cepa, permitindo, assim, a infecção do hospedeiro; a bactéria produz para se defender de vírus e bacteriófagos que é um problema de BAL na indústria de laticínios.

Além dos fatores de virulência, o perfil de suscetibilidade à antimicrobianos é um quesito que deve ser averiguado em linhagens de uso em alimentos. A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético relacionado à genes presentes no micro-organismo, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos e impedem a ação dos fármacos usados no tratamento das infecções (TAVARES, 1996; LEVY et al., 2004).

Micro-organismos que possuem genes de resistência transmissíveis são de grande risco à saúde pública, devido a capacidade de transmissão destes genes para outras bactérias (TAVARES, 1996; LEVY et al., 2004). Esta resistência pode ser natural, onde ocorre mutações durante o processo reprodutivo e resultam em erros de cópia na seqüência de bases que formam o DNA cromossômico, responsáveis pelo código genético, ou seja quando todos micro-organismos de uma mesma espécie apresentam resistência a um determinado antibiótico, ou adquirida que é verificada quando apenas algumas cepas da mesma espécie se tornam resistentes e geralmente ocorre por meio da transferência horizontal de genes, através de plasmídeos, transposons e bacteriófagos (LEVY, 2004).

O gênero *Enterococcus* comumente apresenta elevada capacidade de transferência genética por meio de diferentes mecanismos, o que contribui para o aumento da virulência destes micro-organismos. Frente a isso, tem-se uma enorme preocupação em relação à segurança de *Enterococcus* para uso em alimentos, visto que, essas bactérias podem adquirir genes de virulência por conjugação natural (EATON; GASSON, 2001).

Segundo De Vuyst et al. (2003), isolados de *Enterococcus* spp. que não apresentam atividade hemolítica e não carregam genes da citolisina e da resistência a vancomicina podem ser considerados seguros e utilizados como culturas iniciadoras ou probióticas.

3.4 Formação de Biofilme

Biofilme é um agregado de bactérias aderidas sobre uma superfície, disposta em multicamadas finas e envolta por uma matriz polimérica amorfa e hidratada, produzida pelos próprios micro-organismos (FEY; OLSON, 2010; ROHDE et al., 2010), onde a formação ocorre por meio de quatro etapas sequenciais: aderência, acumulação/maturação e desprendimento, sendo que a principal substância envolvida na fase de acumulação é um polissacarídeo de superfície, poli- β (1,6)-N-acetil-D-glicosamina (PNAG), denominado adesina polissacarídica intercelular (PIA) (MACK et al., 1996, ROHDE et al., 2010).

De acordo com Heilmann et al.(1996), a PIA é uma molécula acumulativa produzida pelo locus *icaRADBC*; A PIA é um polissacarídeo que é regulado pelo operon de quatro genes de biossíntese (*icaADBC*) e um gene de regulação (*icaR*) (MACK et al., 1996; CONLON et al., 2002), onde este operon codifica as proteínas IcaA, IcaD, IcaB e IcaC. Quando o único gene expresso é o *icaA*, diminui a atividade da enzima transferase. No entanto, quando o gene *icaA* é co-expresso com o *icaD*, verifica-se um aumento de aproximadamente 20 vezes na atividade desta enzima, o que determina a formação de oligômeros com 10 a 20 resíduos de β -1,6-N-acetilglicosamina (GERKE et al.,1998). O produto do gene *icaC* é uma proteína de membrana, com 10 domínios transmembrana, onde atuação é essencial para uma PIA totalmente funcional (GERKE et al.,1998). Na co-expressão de *icaA* e *icaD* ocorre a produção de oligômeros de Nacetilglicosamina com comprimento máximo de 20 resíduos, entretanto na co-expressão destes com *icaC* ocorre a síntese de cadeias mais longas, com aproximadamente 130 resíduos, e que reagem com anti-soro PIA-específico, ao contrário do que ocorre com oligômeros curtos (GERKE et al.,1998).O produto do *icaB* é associado à superfície da célula e é responsável pela atividade e desacetilação da PIA, ou seja, fator que resulta em um polímero positivamente carregado importante para sua interação com a

superfície negativamente carregada da célula bacteriana (VUONG et al., 2004; FILHO 2014).

Os micro-organismos aderidos no biofilme possuem proteção exercida pelo EPS (exopolissacarídeo), com isso, são mais propícias as trocas genéticas, a proteção contra células do sistema imune, maiores quantidades de nutrientes, além de suportar as mudanças de pH e altas concentrações de antimicrobianos, pois apresentam de 10 a 100 vezes mais resistência aos antibióticos do que células planctônicas (MOHAMED et al., 2007; PALMER et al., 2007).

Segundo Yu et al. (2012), um dos principais sistemas de manutenção das atividades do biofilme está relacionado com o mecanismo de *quorum-sensing*, que consiste na produção e liberação de moléculas sinalizadoras e auto-indutoras, no qual, a concentração aumenta em função da densidade populacional bacteriana. Por meio deste, as bactérias de uma comunidade sincronizam as atividades atuando como um organismo multicelular, devido a capacidade de um determinado estímulo dessas moléculas auto-indutoras favorecendo alterações na expressão genética e conseqüentemente um determinado comportamento (WATERS, 2005).

Biofilmes são relacionados com infecções alimentares, a presença de micro-organismos e o desenvolvimento de biofilmes em locais de processamento de alimentos tornam estes ambientes potenciais fontes de contaminação (MOHAMED et al., 2007). Com isso, ressalta-se a importância das bactérias formadoras de biofilme, pois estas possuem capacidade de transferência genética, incidência de virulência entre outras características que devem ser observadas no que se refere a micro-organismos que serão utilizados em culturas alimentares por se tratar de risco à saúde pública.

3.5 Probióticos

De acordo com a FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization) (2001), probióticos são definidos como micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Desta forma, várias espécies e gêneros de bactérias poderiam ser considerados potenciais

probióticos, entretanto, comercialmente, as linhagens mais importantes são as de BAL geralmente reconhecidas como seguras (Generally Recognized as Safe - GRAS) (VASILJEVIC et al., 2008).

O consumo de probióticos vem sendo associado aos benefícios relacionados à saúde, tais como, maior resistência gastrointestinal à colonização por patógenos devido à ação de seus metabólitos (ácido acético, lático, bacteriocinas, etc), manutenção da microbiota intestinal após a utilização de antibióticos, modulação de resposta imune, prevenção de diarreias e doenças inflamatórias do intestino, entre outras (VASILJEVIC, 2008). Além disso, segundo Isolauri et al. (2004), Reid et al. (2005) e Kechagia et al. (2013), as BAL ainda apresentam potenciais efeitos benéficos, como redução do acúmulo de compostos tóxicos ou cancerígenos e controle de alguns tipos de câncer, favorecimento da tolerância à lactose e diminuição dos níveis séricos de colesterol.

Além do efeito benéfico à saúde, essas bactérias promovem melhorias nas características sensoriais dos alimentos como sabor, textura, cor, aroma, bem como digestibilidade e qualidades nutricionais do produto fermentado por meio da produção de ácidos e outras substâncias que conferem sabor e aroma específicos. Também auxiliam na preservação dos alimentos, com isso, são amplamente utilizadas na indústria alimentícia (DE MARTINIS et al., 2003; GÁLVEZ et al., 2007; RAMIREZ et al., 2011).

Vasiljevic et al. (2008) e Ventura et al. (2009), descrevem que os benefícios relacionados a saúde são bem específicos para cada linhagem, sendo que não há uma linhagem universal que proporciona todos os benefícios. Esses autores relatam que os probióticos exercem efeitos benéficos por meio dos processos de modificação do pH por meio da produção de ácidos orgânicos, competição com patógenos por sítios de ligação, atividade antagonista sobre patógenos pela produção de compostos antimicrobianos, efeito de barreira no intestino, síntese e aumento da disponibilização de nutrientes (hidrólise de proteínas e lipídeos), produção de enzimas (β -galactosidase, sal biliar hidrolase), estimulação de células imunomodulatórias, redução da atividade de enzimas que ativam a carcinogênese e inibição do

crescimento ou “auto-destruição” de células tumorais (produção de ácidos graxos de cadeia curta).

Segundo Ranadheera et al. (2010), para um micro-organismo ser considerado como probiótico, deve apresentar algumas características como: manter-se viável durante o tempo de estocagem, bem como de transporte do produto; sobreviver à presença de ácido gástrico e a bile; não apresentar genes de resistência a antimicrobianos; não apresentar genes que codificam fatores de virulência; apresentar genes de adesão à mucosa e níveis de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade. Em relação à segurança dos probióticos, devem ser observados fatores que incluem patogenicidade e virulência que compreendem toxicidade, atividade metabólica e propriedades intrínsecas dos micro-organismos (NAGPAL et al., 2012).

Saad (2006) cita que os probióticos possuem três possíveis mecanismos de atuação: primeiro, a redução do número de células viáveis por meio da produção de compostos com ação antimicrobiana e a competição por nutrientes e por sítios de adesão; segundo, a alteração do metabolismo microbiano frente ao aumento ou diminuição da atividade enzimática; e terceiro, o estímulo da imunidade do hospedeiro por meio do aumento dos anticorpos e da atividade dos macrófagos.

3.6 Bacteriocinas

Diversas substâncias podem ser produzidas pelos micro-organismos como mecanismo de defesa, tais como ácidos orgânicos, exotoxinas, agentes líticos como a lisozima, antibióticos, peróxido de hidrogênio, radicais livres e bacteriocinas. De acordo com Chen et al. (2003b) e Cotter et al. (2005), as bacteriocinas são definidas como compostos proteicos excretados para o meio celular que interferem na multiplicação de outras bactérias e cuja a célula produtora apresenta um mecanismo específico de resistência contra a bacteriocina produzida. O modo de ação das bacteriocinas depende de fatores como concentração ou grau de purificação da bacteriocina, fatores ambientais (pH, compostos antimicrobianos, temperatura, presença de agentes que alteram a parede celular, entre outros) e estado fisiológico das células indicadoras (fase de crescimento, por exemplo).

A ação pode ter efeito bactericida ou bacteriostático dependendo da concentração (CINTAS et al., 2001; JUODEIKIENE et al., 2012). Esta ação antimicrobiana envolve o aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática das células alvo, ocorrendo assim um extravasamento de pequenas partículas citoplasmáticas, despolarização do potencial da membrana e normalmente a morte celular (SIMOVA et al., 2009). Quando o micro-organismo é cultivado em condições de estresse, como temperaturas sub ótimas ou pH ácido, ocorre o favorecimento da produção de bacteriocina, com isso, diminui a taxa de multiplicação microbiana, melhora a utilização de energia e aumenta a disponibilidade de metabólitos para a síntese das bacteriocinas (VAN DEN BERGHE et al., 2006).

De acordo com Moreno et al. (2008), as bacteriocinas são proteínas com atividade antibacteriana, encontradas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As bacteriocinas exibem atividade contra alguns importantes patógenos de veiculação alimentar, como *L.monocytogenes*, *S.aureus*, *C.botulinum* e *B.cereus* (HERNANDEZ et al., 2008).

A viabilidade do uso de bacteriocinas nos alimentos ocorre em função de algumas características que as bacteriocinas produzidas por BAL apresentam, como segurança (GRAS); não apresentam toxicidade às células eucarióticas; normalmente apresentam tolerância a valores extremos de pH e temperatura; são inativadas por proteases no trato gastrointestinal; são termoestáveis e possuem espectro de ação antimicrobiano contra um grande número de bactérias (GÁLVEZ et al., 2007; TODOROV, 2009).

De acordo com Gálvez et al. (2008), apenas a nisina, produzida por *L.lactis*, e a pediocina, produzida por *Pediococcus acidilactici*, são utilizadas comercialmente como biopreservantes nos alimentos, comercialmente. As bacteriocinas podem ser utilizadas como agentes bioconservantes de alimentos sendo adicionadas na fermentação do alimento com BAL produtoras de bacteriocinas, adicionadas purificadas ou semi-purificadas no alimento ou, adição de ingrediente fermentado por BAL bacteriocinogênicas. Assim, estas oferecem benefícios específicos como aumento da vida útil do alimento, substituição de conservantes presentes em alguns alimentos e redução do risco de veiculação de micro-organismos patogênicos.

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento de BAL de queijo Ricota

Foram utilizadas amostras de queijo ricotada marca Santa Clara, adquirida comercialmente na cidade de Pelotas. Conforme normas preconizadas (SILVA et al., 2001), as unidades analíticas (amostras de ricota) foram coletadas assepticamente e transferidas para sacos de Stomacher previamente esterilizados e tarados sobre uma balança, onde foram homogeneizadas. O preparo da primeira diluição consistiu na adição de 225 mL de água peptonada 0,1% a 25 g da amostra de queijo ricota. Após, foram transferidos para um Stomacher, durante 2 minutos, para a homogeneização das amostras. O intervalo entre a homogeneização e o prosseguimento da análise não ultrapassou três minutos. Foram realizadas três diluições seriadas das amostras homogeneizadas até a diluição 10^{-4} . Para isolamento das BAL, foi realizada a semeadura de 0,1 mL de cada diluição em superfície de placas de Petri esterilizadas, contendo ágar Man Rogosa Sharpe (MRS), as quais foram incubadas a 30°C por 48-72 horas.

Após o isolamento, nove BAL foram testadas quanto a capacidade probiótica (descrito a seguir, item 4.3), sendo que um dos micro-organismos (R7) apresentou melhor desempenho quanto as características probióticas em todos os procedimentos analisados. Desta forma, o mesmo foi selecionado para estudos posteriores.

4.2 Coloração de Gram

O isolado R7 foi submetido à coloração de Gram de acordo com a metodologia descrita por Bier (1985). Foi realizado um esfregaço da cultura em uma lâmina de vidro, seguido da fixação do esfregaço ao ar em superfície plana e seca; coloração com violeta cristal por aproximadamente um minuto, seguido de coloração com solução de lugol por um minuto. Após, a lâmina foi descorada com álcool a 95% até o descorante fluir límpido e, em seguida, foi utilizada a solução de fucsina básica por 30 segundos, seguido de lavagem com água destilada e secagem ao ar. Após as lâminas foram examinadas ao microscópio óptico (Olympus BX41) com aumento de 100x.

4.3 Caracterização probiótica do isolado R7

4.3.1 Tolerância aos sais biliares

A avaliação da resistência do isolado aos sais biliares foi realizada em 10 mL de MRS esterilizado suplementado com uma mistura de sódio colato de sódio e desoxicolato (Sigma), numa proporção de 1:1, até obter as concentrações finais de 0,1, 0,25, 0,5 e 1,0 (w/v). A contagem de células viáveis foi determinada após a exposição a sais biliares a 0, 1, 2, 3 e 4 horas de incubação, em placas contendo ágar MRS após diluições em série das amostras e incubação a 37°C durante 24 horas. Os valores foram expressos como log unidades formadoras de colônias por mL (Log UFC.mL^{-1}) (PERELMUTER; FRAGA; ZUNINO, 2008).

4.3.2 Tolerância ao pH ácido

A resistência do isolado a condições ácidas foi realizada de acordo com Erkkila e Petaja (2000), com algumas modificações. O isolado foi cultivado em caldo MRS à 37 °C durante 24 horas. Após, 500µL do inóculo foi adicionado em tubos contendo 5mL de caldo de MRS esterilizado com os seguintes valores de pH: 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 (ajustado com HCl 1N, quando necessário). O pH 7 foi utilizado como controle. As contagens de células viáveis foram determinadas após a exposição às condições ácidas nos tempos 0, 2, e 4 horas à 37°C. O experimento foi realizado em duplicata. As contagens de células viáveis foram expressas em Log UFC.mL^{-1} . A percentagem de sobrevivência foi calculada como se segue: % de sobrevivência = $\frac{\text{final (Log UFC.mL}^{-1})}{\text{controle (Log UFC.mL}^{-1})} \times 100$.

4.3.3 Tolerância ao trato gastrointestinal de forma simulada (TGS)

A resistência à passagem pelo trato gastrointestinal foi avaliada de forma simulada, sendo realizada conforme Huang e Adams (2004). Primeiramente, foi realizada a ativação do isolado a partir do cultivo em 5 mL de caldo MRS e incubação a 37 °C, por 24 horas, com posterior passagem para 10 mL de caldo MRS e nova incubação a 37 °C, por 24 horas. O cultivo foi, então, centrifugado a 7.000 x g por 10 min, a 4°C, e o *pellet* obtido, lavado duas vezes com tampão fosfato salina (PBS, Laborclin®), com posterior ressuspensão em solução

salina a 0,5%. Uma alíquota de 200 μL da suspensão celular foi misturada em 300 μL de solução salina e à 1 mL de suco gástrico ou suco intestinal simulado, com posterior incubação à 37 °C. O suco gástrico simulado consistiu de 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de pepsina (Sigma-Aldrich®) e pH 2,5, enquanto o suco intestinal foi composto por 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de pancreatina (Sigma-Aldrich®) e pH 8,0. A influência da presença de um alimento sobre a sobrevivência do isolado à passagem pelo trato gastrointestinal de forma simulada, foi avaliada substituindo-se a solução salina por 300 μL de leite integral, reconstituído a 10% (m/v) e, a influência da presença de sais biliares sobre a sobrevivência à passagem pelo trato intestinal de forma simulada, foi avaliada pela adição de 0,5% de bile bovina (Sigma-Aldrich®) ao suco intestinal. A contagem do número de células viáveis durante a passagem pelo trato gástrico foi realizada nos tempos 0, 15, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos a 36°C, enquanto a contagem à passagem pelo trato intestinal foi realizada nos tempos 0, 60, 120, 180 e 240 minutos a 36°C, em placas de Petri contendo ágar MRS.

4.3.4 Capacidade de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade

As propriedades *in vitro* de autoagregação e coagregação foram realizadas conforme descrito por Collado, Meriluoto e Salminen (2008) e a hidrofobicidade foi realizada como descrito por Vinderola e Reinhemer (2003), ambas com modificações. Suspensões celulares das culturas crescidas em caldo MRS a 37°C por 24 horas, a uma absorbância de $0,25 \pm 0,02$ a $\text{DO}_{600\text{nm}}$, foram preparadas para os testes.

A autoagregação foi determinada a 20 e 37°C, nos tempos de 2, 4 e 24 horas. A absorbância foi medida a $\text{DO}_{600\text{nm}}$ e os resultados foram expressos em percentual, conforme $[1 - (A_{600\text{ nm da suspensão inicial}}/A_{600\text{ nm da suspensão final}}) \times 100]$. Para determinar a capacidade de coagregação do isolado ao patógeno *L. monocytogenes*, volumes iguais das suspensões celulares bacterianas foram misturados e incubados a 37°C. A absorbância foi monitorada em 2, 4 e 24 horas. Os resultados foram expressos em percentual, conforme $[(A_{\text{pat}} + A_{\text{isol}})/2 - (A_{\text{mix}})] / [(A_{\text{pat}} + A_{\text{isol}})/2] \times 100$, onde A_{pat} e A_{isol} representam a absorbância das suspensões bacterianas em separado em

tubos controle e Amix representa a absorvância das suspensões celulares misturadas nos diferentes tempos (inicial e final).

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 2horas a 37°C, a fase aquosa foi cuidadosamente removida e a absorvância a DO_{600nm} foi medida. A hidrofobicidade foi determinada como o percentual de adesão, conforme $[(A0-A)/A0] \times 100$, onde A0 e A são as absorvâncias antes e depois da extração com tolueno, respectivamente.

4.4Análise de aspectos de segurança doisoladoR7

4.4.1 Avaliação fenotípica de resistência a antimicrobianos

O teste de susceptibilidade a antimicrobianos foi realizada de acordo com o método padrão de difusão em ágar, recomendado peloClinical & Laboratory Standards Institute (CLSI,2015), sendo os micro-organismos testados classificados em sensíveis ou resistentes. Os isolados foram previamente inoculados em placas contendo ágar Mueller-Hinton (MH) e incubados à 35 °C por 24 horas. Após o crescimento, colônias dos micro-organismos foram ressuspendidas em solução salina esterilizada (0,9%) e mensuradas espectrofotometricamente a $0,150 \pm 0,02$ (Densidade Óptica - DO_{600nm}) a qual corresponde ao padrão de turbidez de 0,5 na Escala de McFarland($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, com auxílio de swabs, placas de ágarMH foram inoculadas com a solução padronizada, contendo discos de papel com seis antimicrobianos comumente utilizados em ambiente hospitalar: clindamicina-2µg (CLI), cloranfenicol-30µg (CLO), Meropen-10µg (MER), Eritromicina-15µg (ERI), vancomicina-30µg (VAN) e penicilina-10µg (PEN), todos da marca Laborclin. Após a incubação, foi mensurado o diâmetro das zonas de inibição dos diferentes antibióticos testados. O experimento foi realizado em duplicata em três repetições independentes e os dados foram expressos em mm.

4.4.2 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi realizada de acordo com Foulquié-Moreno et al. (2003). A bactéria foi testada inoculando-a em Placas de Petri contendo

ágar sangue, suplementado com 7% (v/v) de sangue de cavalo, as quais foram incubadas à 37°C por 48 horas. Atividade positiva para β -hemólise resulta em uma lise completa dos eritrócitos com aparecimento de um halo claro em torno da colônia, enquanto uma reação α -hemólise envolve a lise parcial dos eritrócitos.

4.4.3 Atividade DNase

A atividade de DNase foi testada como descrito por Bannerman (2003), com adaptações, utilizando o ágar DNase Teste com azul de toluidina (Himedia). O isolado R7 foi estriado diretamente na placa contendo o ágar DNase, bem como o micro-organismo controle *S. aureus* ATCC 25923, incubando-se por 24 horas à 37°C. Após, as placas foram cobertas com HCl 1N, por 3 minutos. A presença de halo claro em torno das colônias foi indicativo de resultado positivo.

4.4.4 Avaliação da capacidade de formação de biofilme

A capacidade de formação de biofilme do isolado R7 foi analisada de acordo com Stepanovic et al. (2000), onde o isolado foi previamente inoculado em uma placa de Petri contendo ágar BHI e incubada a 35 °C durante 24 horas. Placas de microtitulação foram preenchidas com 180 μ L de caldo BHI esterilizado. Após crescimento *overnight*, as colônias do micro-organismo 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 contendo 180 μ L de caldo BHI. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 25923 foi utilizado como controle positivo e, como controle negativo, foi utilizado apenas caldo BHI. As placas foram cobertas e incubadas a 35 °C durante 24 horas. Após o crescimento, as culturas foram aspiradas com uma pipeta de canais múltiplos e os poços foram lavados três vezes com uma solução de 200 mL de solução salina. A micro-placa foi invertida sobre papel absorvente e as amostras foram fixadas, posteriormente, com 150 mL de metanol (CH_3OH), durante 20 minutos. Após, o metanol foi descartado e as placas foram mantidas invertidas *overnight*. As amostras foram coradas com 150 μ L de cristal violeta (5 g.L^{-1}) durante 15 minutos. Posteriormente, as placas

foram invertidas e o excesso foi removido sob água corrente. Em seguida, após um curto período de secagem, 150µL de etanol (95% v/v) foi adicionado. As placas foram mantidas durante 30 minutos e a absorvância foi medida com um leitor de microplacas (Anthos 2010 Tipo 4894 17550) a 450nm. Com base na densidade ótica (DO) produzida pelos biofilmes, o micro-organismo foi classificado nas seguintes categorias: não produtor de biofilme (0), fraco (+), moderado (++) ou forte produtor de biofilme (+++), como descrito anteriormente por Stepanovic et al. (2000). O ponto de corte de DO (ODC) foi definido como três desvios padrão acima da média OD do controle negativo. As cepas foram classificadas como segue: $OD \leq OD_c$ = sem produção de biofilme, $OD_c < OD \leq (2 \times ODC)$ = fraco produtor, $(2 \times ODC) < OD \leq (4 \times ODC)$ = moderado produtor $(4 \times ODC) < OD$ = forte produtor. Todos os testes foram realizados em duplicata.

4.4.5 Produção de gelatinase dos isolados LAB 18s e R7

A detecção da produção de gelatinase foi realizada de acordo com Marra et al. (2007). Os isolados em estudo *E. durans* LAB18s e R7 foram inoculadas em tubos contendo 4mL de BHI com 12% de gelatina por 24 horas a 37°C. Após a incubação, os tubos foram colocados em banho de gelo por 30 minutos, sem agitação. No experimento foi utilizado um controle negativo (4mL de BHI com 12% de gelatina) e um controle positivo (4mL de BHI com 12% de gelatina + *S. aureus* ATCC 25923). A solidificação do meio indica resultado negativo, e a liquefação indica positivo.

4.4.6 Produção de lipase dos isolados LAB 18s e R7

A produção de lipase foi realizada de acordo com Barbosa et al. (2010) com modificações. Alíquotas de 1µL contendo inóculo dos isolados LAB18s e R7 foram semeadas em placas de Petri contendo ágar BHI suplementado com 2g.L⁻¹ de CaCl₂ e 10g.L⁻¹ de Tween 80, em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Atividade lipolítica foi identificada pela formação de halos opacos ao redor das colônias.

4.5 Atividade antagonista dos isolados LAB 18s e R7 contra bactérias patogênicas

4.5.1 “Spot on the lawn”

Utilizou-se a técnica “Spot on the lawn”, proposta por Lewus e Montville (1991), com adaptações. Primeiramente, foi obtido o sobrenadante livre de células dos isolados de BAL a partir dos cultivos em caldo MRS (1% v/v) os quais foram incubados a 35°C por 24 horas. Após, os cultivos foram centrifugados a 1400 x g a 4°C por 20 minutos. Após, o sobrenadante de cada cultivo foi neutralizado (pH 6,5-7,0), utilizando-se solução de NaOH 1N (Synth[®]), e aquecido a 80°C por 10 minutos. Dois microlitros (2 µL) da suspensão foram inoculados nas placas de Petri contendo ágar Trypticase de Soja adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSAYE). As placas foram incubadas em anaerobiose à 30°C durante 24 horas e, em seguida, foram adicionados cerca de 8 mL de BHI contendo 1% de ágar e 1% de cultura das cepas listadas na Tabela 1, obtidas em caldo TSBYE a 30°C por 18 horas. As placas foram incubadas novamente à 30°C durante 24 horas. A presença de halos de inibição indica potencial antagonista. O experimento foi realizado em triplicata e o resultado foi expresso em mm.

Tabela 1. Micro-organismos patogênicos utilizados para a análise da atividade antagonista dos isolados *E. durans* LAB18s e R7

Classe	Micro-organismo	Origem
Gram-negativa	<i>E. coli</i> ATCC 8739	*ATCC
	<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	ATCC
Gram-positiva	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114	ATCC
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	ATCC

*ATCC: American Type Culture Collection

4.5.2 Difusão em ágar por poços

A técnica de difusão em ágar foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Harris et al. (1989). Poços, de aproximadamente 5 mm foram perfurados em placas de Petri contendo TSA-YE ou BHI adicionado de 1% de ágar, inoculados com 1% de cultura das cepas listadas na Tabela 1,

incubadas em TSB-YE à 30°C por 18 horas. Nestes poços foram adicionados 20 µL de sobrenadante dos cultivos em análise, provenientes de caldo BHI incubados à 30°C por 18 horas, centrifugados a 14000 rpm por 10 minutos (centrífuga eppendorf 5417c), neutralizados (pH 7) com NaOH 1N (Synth®), e esterilizados por filtração em membrana GVWP 01300 0,22 µm. O antagonismo foi detectado pela formação de halo de inibição do crescimento da cultura indicadora ao redor da cultura. O experimento foi realizado em triplicata.

4.5.3 Difusão em ágar por discos

Os micro-organismos indicadores foram suspensos em solução de NaCl a 0,85% padronizado para DO_{600nm} de 0,150 em espectrofotômetro, o que corresponde a uma solução padrão de turbidez McFarland 0,5. Após, o sobrenadante livre de células de cada cultivo foi neutralizado (pH 6,5-7,0), utilizando-se solução de NaOH 1N (Synth®), e aquecido a 80°C por 10 min. Uma alíquota de 20 µL de sobrenadante dos isolados LAB18e e R7 foi aplicada sobre discos de celulose esterilizados (5 mm) em placas de ágar BHI previamente inoculadas com uma zaratoga embebida em uma cultura de cada bactéria indicadora. As placas de Petri foram incubadas a 37°C e as zonas de inibição foram medidas após 24 horas. O mesmo procedimento foi realizado para avaliar a atividade antimicrobiana de extrato intracelular. O diâmetro das zonas de inibição foram medidos utilizando um compasso de calibre e os halos ≥ 7 mm foram considerados inibitórios (BROMBERG et al., 2006). O experimento foi realizado em triplicata.

4.6 Perfil fermentativo dos isolados LAB 18s e R7

A capacidade de fermentar glicose com produção de gás (CO_2) foi determinada a partir do cultivo de 24 horas a 37°C em caldo MRS (1% v/v). Os isolados foram reinoculados (1% v/v) em caldo MRS suplementado com 3% de glicose (Synth®), em tubos de ensaio contendo tubos de Durham e incubados a 37°C por 48 horas (LIMA et al., 2009). *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338 e *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. Nos tubos em que se observou turvação do meio e produção de gás, os isolados foram classificados como heterofermentativos,

enquanto aqueles que apresentaram somente turvação do meio, foram classificados como homofermentativos. O ensaio foi realizado em duplicata.

4.7 Capacidade antioxidante do isolado R7

4.7.1 Preparo do sobrenadante livre de células

Os isolados foram inoculados em 10mL de caldo MRS e incubados a 35°C por 24 horas. Após este período, as células foram centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi neutralizado (pH 6,5) com hidróxido de sódio (NaOH) 1M e aquecido à 95°C por 5 minutos (BROMBERG et al., 2006). O sobrenadante livre de células de cada micro-organismo foi usado na análise de atividade antioxidante.

4.7.2 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). Tubos de ensaio contendo água Mili Q e azeite de oliva extra virgem foram incubados em banho maria a 80°C, submetidos à oxidação com 100µM de sulfato ferroso, por 10 minutos. Após, foram adicionados em cada tubo uma alíquota da amostra (sobrenadante livre de células), Lauril Sulfato de Sódio (SDS) 8,1%, Tampão de Ácido Acético pH 3,44 e Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 0,6%, como demonstrado na Tabela 2. Em seguida, foram incubados novamente em banho maria a 100°C por 1 hora.

Tabela 2. Protocolo de oxidação do ensaio da Reação ao Ácido Tiobarbitúrico

TUBOS	H ₂ O Mili Q	Sulfato ferroso (10µL)	Azeite de Oliva (EV*)	Amostra	SDS (8,1%)	TAMPÃO (pH 3,44)	TBA (0,6%)
Controle	500µL	50µL	300µL	—	200µL	500µL	500µL
Branco	1050µL	—	—	400µL	200µL	500µL	—
Amostra	200 µL	50µL	300µL	400µL	200µL	500µL	500µL

Fonte: Adaptado de Ohkawa et al. (1979).

*EV: Azeite de Oliva Extra Virgem.

Os produtos da reação foram determinados por medida de absorbância em 532nm, em espectrofotômetro. A concentração de TBARS foi calculada por meio de uma curva padrão, com concentrações conhecidas de 1,1,3,3 – tetrametoxipropano, e os resultados foram expressos em nm de malonaldeído (MDA)/g de amostra. A curva padrão foi composta por concentrações de água destilada, MDA 0,03mM, SDS 8,1%, Tampão de ácido acético pH 3,44 e TBA 0,6%, como indicado na Tabela 3, e incubados em banho maria à 100°C, por 1 hora. O experimento foi realizado em 4 repetições.

Tabela 3. Protocolo de oxidação - Curva Padrão

TUBOS	H ₂ O Mili Q	MDA (0,03mM)	SDS (8,1%)	TAMPÃO (pH 3,44)	TBA (0,6%)
1	300µL	—	200µL	500µL	500µL
2	250µL	50µL	200µL	500µL	500µL
3	200µL	100µL	200µL	500µL	500µL
4	100µL	200µL	200µL	500µL	500µL
5	—	300µL	200µL	500µL	500µL

Fonte: Adaptado de Ohkawa et al. (1979).

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

O método DPPH foi utilizado de acordo com o descrito por Brand-Williams et al. (1995), baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515nm. O DPPH foi preparado na concentração de 60µmol L⁻¹, dissolvido em álcool metílico (CH₃OH), 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 de amostra (sobrenadante livre de células) para tubos de ensaio contendo 3,9mL da solução dissolvida do radical DPPH (60µmol L⁻¹) e homogeneizada em vórtex. Após o preparo, as soluções foram armazenadas em ambiente escuro por 45 minutos. Como solução controle foi

utilizado 0,1mL da solução controle (composta por 40mL álcool metílico 50%, 40mL acetona 70% e 20mL água destilada) com 3,9mL do radical DPPH ($60 \mu\text{mol L}^{-1}$) e, após homogeneizada, foi armazenada no escuro por 45 minutos. Como branco foi utilizado 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 atingiu a estabilidade.

4.8 Extração de DNA genômico e análise molecular e genotípica

4.8.1 Extração de DNA genômico dos isolados LAB18se R7

A extração do DNA genômico foi realizada por meio do método de lise química, onde, primeiramente, os isolados *E.durans* LAB18s e R7 foram inoculados em placas de Petri contendo ágar BHA, as quais foram incubadas a 37°C por 24 horas, para avaliação da pureza da cultura. O DNA genômico dos isolados foi extraído em microtubos, onde, uma alçada do crescimento dos isolados foi repassada para os microtubos de 1,5mL contendo $100 \mu\text{L}$ de EAR Buffer e $5 \mu\text{L}$ de Proteinase K ($20 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ *Invitrogen*[®]) a 55°C durante 4 horas. Após resfriamento das amostras em temperatura ambiente foi adicionado $750 \mu\text{L}$ de TE Buffer. Após centrifugação, foi utilizado $1 \mu\text{L}$ do sobrenadante contendo o DNA extraído para a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O DNA extraído foi utilizado para a identificação molecular e análise genotípica.

4.8.2 Amplificação do DNA por Reação em Cadeia da Polimerase dos isolados LAB18se R7

O gene 16S rRNA dos isolados foi amplificado utilizando oligonucleotídeos iniciadores universais 27F (5'-AGATTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Foram preparadas reações contendo $17 \mu\text{L}$ de mistura especial para PCR (GoTaq- Promega, Madison, WI USA), $1 \mu\text{L}$ de cada oligonucleotídeo iniciador, $1 \mu\text{L}$ de amostra e $1 \mu\text{L}$ de água ultra-pura (milli-q), totalizando $20 \mu\text{L}$ de volume final. Em um termociclador da marca Amplitherm, o gene 16S rRNA de cada isolado foi

amplificado, utilizando-se as condições de reações: desnaturação inicial, 95°C durante 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação à 95°C durante 30 s, anelamento à 50°C durante 1 minuto e extensão à 72°C durante 1 minuto; e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados pela PCR foram analisados em gel de agarose a 1% após eletroforese. A visualização dos fragmentos obtidos foi realizada em fotodocumentador com transiluminação ultravioleta após coloração com Syber Safe (Invitrogen®). Os produtos da PCR foram recortados do gel e enviados ao Hillna- SP para purificação e sequenciamento.

4.8.3 Sequenciamento do DNA do isolado R7

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 (Laboratório de Biotecnologia – UFPel). A partir do sequenciamento, através da comparação no GEN BANK obteve-se a identidade da BAL avaliada em nível de espécie, sendo o isolado R7 identificado como *Lactococcus lactis* subsp *lactis*.

4.8.4 Análise genotípica para identificação de genes de adesão intercelular do isolado LAB18s

Por meio da amplificação do DNA por PCR foram avaliados quatro genes relacionados à formação de biofilme. A técnica visa detectar a presença do gene de adesão intercelular A (*icaA*), gene de adesão intercelular B (*icaB*), gene de adesão intercelular C (*icaC*) e gene de adesão intercelular D (*icaD*), descritos na Tabela 4, no isolado LAB18s, utilizando como controle positivo para formação de biofilme a cepa padrão *Staphylococcus epidermidis* ATCC 25923. A análise constou da adição de 1µL de DNA extraído da amostra, o qual foi adicionado em um mix contendo 17µL de GoTaq, 1µL de oligonucleotídeo iniciador específico para cada gene, 1µL de água ultra pura (milli-q), totalizando 20µL de volume final. Os genes foram amplificados em um termociclador Amplitherm®, utilizando as condições de reação: desnaturação inicial, 95°C durante 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação à 95°C durante 30 s; anelamento à 50 °C durante 1 minuto e extensão à 72°C durante 1 minuto; e extensão final a

72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados pela PCR foram analisados em gel de agarose a 1% após eletroforese. A visualização dos fragmentos resultantes foi obtida em um fotodocumentador com transiluminação ultravioleta após coloração com Syber Safe (*Invitrogen*[®]). O protocolo de amplificação foi realizado, com temperatura de anelamento distinta de 50°C.

Tabela 4. Oligonucleotídeos sense (f) e anti-sense (r) e condições de PCR utilizados para identificação dos genes de adesão intercelular *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*

Identificação	Oligonucleotídeos Sequência 5' – 3'	TF*	CP**	Referências
icaAf	TCTCTTGCAGGAGCAATCAA	188pb***	<i>S. epidermidis</i>	Arciola et al.
icaAr	TCAGGCACTAACATCCAGCA		ATCC 25923	(2001)
icaBf	ATGGCTTAAAGCACACGACGC	526pb	<i>S. epidermidis</i>	Ziebuhr et al.
icaBr	TATCGGCATCTGGTGTGACAG		ATCC 25923	(1999)
icaCf	ATAAACTTGAATTAGTGTATT	989pb	<i>S. epidermidis</i>	Ziebuhr et al.
icaCr	ATATATAAACTCTCTCTTAACA		ATCC 25923	(1999)
icaDf	CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA	198pb	<i>S. epidermidis</i>	Arciola et al.
icaDr	ATGGTCAAGCCCAGACAGAG		ATCC 25923	(2001)

*TF: tamanho do fragmento

**CP: Controle positivo

***pb: pares de base

4.8.5 Análise genotípica para identificação de genes de enterocinas presentes no isolado LAB18s

Colônias do isolado LAB18s foram submetidas a PCR para identificação dos genes das enterocinas A, B, P, L50A/B, descritos na Tabela 5. Para isto, 1µL de DNA extraído da amostra, foi adicionado em um mix contendo 17µL de GoTaq, 1µL de oligonucleotídeo iniciador específico para cada gene, 1µL de água ultra-pura (*milli-q*), totalizando 20µL de volume final. Os genes foram amplificados em um termociclador Amplitherm[®], utilizando-se as condições de reação: desnaturação inicial, 95°C durante 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação à 95°C durante 30 s, anelamento à 50°C durante 1 minuto e extensão à 72°C durante 1 minuto; e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados pela PCR foram analisados em gel de agarose a 1% após eletroforese. A visualização dos fragmentos resultantes foi obtida em um fotodocumentador com transiluminação ultravioleta após coloração com Syber

Safe (*Invitrogen*[®]). O protocolo de amplificação foi realizado, com temperatura de anelamento distinta de 50°C.

Tabela 5. Oligonucleotídeos e condições de PCR utilizados para identificação dos genes de enterocinas

Identificação	Oligonucleotídeos Sequência 5' – 3'	TA*	TF**	CP***	Referências
Enterocina A-f	CATCATCCATAACTATATTTG	56	126pb****		Du Toit et al.
Enterocina A-r	AAATATTATGGAAATGGAGTGTAT			----	(2000)
Enterocina B-f	GAAAATGATCACAGAATGCCTA	58	162pb	<i>E. hirae</i>	Du Toit et al.
Enterocina B-r	GTTGCATTTAGAGTATACATTTG				(2000)
Enterocina P-f	TATGGTAATGGTGTATTATTGTAAT	58	120pb	----	Du Toit et al.
Enterocina P-r	ATGTCCCATACCTGCCAAAC				(2000)
Enterocina L50A/B-f	STGGGAGCAATCGCAAATTAG	56	98pb		Du Toit et al.
Enterocina L50A/B-r	ATTGCCCATCCTTCTCCAAT			----	(2000)

*TA: temperatura de anelamento

**TF: tamanho do fragmento

***CP: Controle positivo

****pb: pares de base

4.9 Análise estatística dos dados

Os dados experimentais foram expressos como média \pm desvio padrão e avaliados por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5% para comparação das médias, por meio do programa o programa ASSISTAT (versão 7.7 beta).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e identificação

Dos nove isolados obtidos das amostras de ricota, o isolado R7 que apresentou resultados promissores de acordo com o esperado foi identificado molecularmente como pertencente ao gênero *Lactococcus*, espécie *lactis*, subespécie *lactis* (*L. lactis* subsp *lactis*), o qual foi depositado no GenBank sob número de acesso KF879126, apresentando similaridade de 99,8% com sequências similares baseadas no gene 16S rRNA depositadas no GenBank, conforme demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6. Identificação do isolado R7 pelo sequenciamento do 16S rRNA

Gênero	Espécie	Número de acesso GenBank	Similaridade (%)
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i>	KF879126	99,8

O gênero *Lactococcus* tem sido amplamente utilizado na indústria alimentícia, pois além de normalmente as cepas apresentarem segurança microbiológica, apresentam características probióticas, contribuem sensorialmente e, por meio da síntese de vitaminas, proteínas e aminoácidos essenciais, colaboram para o aumento do valor nutritivo do produto (GIRAFFA, 2004).

5.2 Coloração de Gram

O isolado R7 apresentou morfologia de cocos e coloração compatível com Gram-positiva quando foi submetido a caracterização morfológica pelo teste de coloração de Gram.

5.3 Caracterização probiótica do isolado R7

5.3.1 Tolerância ao pH ácido, aos sais biliares, ao suco gástrico e ao suco intestinal simulados

Os resultados das análises de tolerância ao pH ácido, aos sais biliares, ao suco gástrico e ao suco intestinal simulados do isolado R7, provenientes de queijo ricota, estão apresentados abaixo.

Tabela 7. Análise de tolerância aos ácidos do isolado *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (R7). Os resultados foram expressos em Log UFC/mL⁻¹ ± desvio padrão

Tolerância a ácidos			
	0 horas	2 horas	4 horas
--- Log UFC/mL ⁻¹ ± Desvio Padrão ---			
Controle	7,78±0,02 ^{*A}	7,78±0,03 ^A	7,83±0,07 ^A
pH2	7,93±0,12 ^A	8,13±0,02 ^{AC} ^b	7,18±0,00 ^B ^b
pH3	7,60±0,00 ^A	7,76±0,13 ^A	7,81±0,01 ^A
pH4	8,42±0,04 ^A ^b	7,76±0,09 ^B ^a	7,01±0,15 ^C ^b

*Letras maiúscula: linha/ Letra minúscula: coluna

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7 observa-se que, no tempo de 0h, o isolado R7 apresentou viabilidade superior no pH4 quando comparado ao controle e demais tratamentos ($p < 0,005$). Já no tempo de 2h o isolado apresentou viabilidade superior quando comparado ao controle e demais tratamentos ($p < 0,005$). Entretanto quando avaliado no tempo de 4h, observou-se redução significativa da viabilidade nos pHs 2 e 4, quando comparados ao controle ($p < 0,005$). Da mesma forma, quando analisada a viabilidade por tratamento nos tempos de 0h, 2h e 4h, observou-se que no pH 3, a viabilidade manteve-se intacta, não apresentando diferença significativa entre os tempos analisados. Porém, ao analisar os pHs 2 e 4, observou-se redução significativa da viabilidade ($p < 0,005$) no decorrer de 4h, comparada aos demais tempos analisados. Este resultado demonstra que o isolado apresenta capacidade de sobrevivência em pH ácido, mesmo após 4h de incubação em todos os pHs, e principalmente no pH 2. Desta forma, o isolado apresenta potencial para ser utilizado como um probiótico, apresentando resistência as condições ácidas do pH estomacal.

A resistência ao trânsito gástrico humano é um importante critério de seleção de micro-organismos probióticos. De acordo com Vinderola e Reinheimer (2003), aproximadamente 2,5 litros de suco gástrico, com pH em torno de 2, é secretado diariamente no estômago. 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. Além disso, os alimentos sólidos geralmente permanecem no estômago entre 2 a 4 horas, portanto, podem servir como veículo para os micro-organismos, elevando o pH e viabilizando a sua sobrevivência no estômago.

Meira (2011) avaliou a capacidade de sobrevivência de BAL isoladas de leite e queijos de ovelha expostas à diferentes condições ácidas após 4 horas de incubação, e observou que as linhagens de *Lactobacillus* apresentaram-se resistentes quando expostas as condições de pH 3 e 4 com até 4 horas de incubação, porém, não apresentaram viabilidade quando expostas ao pH 2. Resultado semelhante foi encontrado por Hwanhlem et al. (2010), onde linhagens de *Lactobacillus* foram capazes de manter sua viabilidade quando expostas a condições de acidez com pH entre 2,5 – 4,0, no entanto, em valores de pH inferiores ocorreu perda de viabilidade.

Tabela 8. Análise de tolerância aos sais biliares do isolado *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (R7). Os resultados foram expressos em Log UFC/mL \pm desvio padrão

	Tolerância aos sais biliares		
	0 horas	2 horas	4 horas
	--- Log UFC/mL ⁻¹ \pm Desvio Padrão ---		
Controle	7,78 \pm 0,02 ^{*A^a}	7,78 \pm 0,03 ^{A^a}	7,83 \pm 0,07 ^{A^a}
0,1%	8,32 \pm 0,06 ^{A^b}	7,83 \pm 0,18 ^{B^a}	7,64 \pm 0,01 ^{B^a}
0,3%	8,20 \pm 0,04 ^{A^b}	7,07 \pm 0,10 ^{B^b}	6,70 \pm 0,00 ^{B^b}
0,5%	8,20 \pm 0,06 ^{A^b}	6,69 \pm 0,30 ^{B^b}	6,55 \pm 0,21 ^{B^b}
1,0%	7,71 \pm 0,23 ^{A^a}	0,00 \pm 0,00 ^{B^c}	0,00 \pm 0,00 ^{B^c}

*Letras maiúscula: linha/ Letra minúscula: coluna

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 8 observa-se que, no tempo de 0h, o isolado R7 apresentou viabilidade superior nos tratamentos de 0,1%, 0,3% e 0,5% de sais biliares quando comparado ao controle e demais tratamentos (1%) ($p < 0,005$). Quando avaliada a viabilidade em 2h de incubação, o isolado apresentou redução significativa desta na concentração

de 0,3% e 0,5% de sais biliares quando comparado ao controle e concentração de 0,1% ($p < 0,005$), e não apresentou viabilidade quando exposto a 1,0%. Já quando avaliado no tempo de 4h de incubação, observou-se resultado semelhante ao encontrado no tempo de 2h de incubação, ou seja, redução significativa da viabilidade em 0,3% e 0,5% de sais biliares e não apresentou viabilidade quando exposto a 1,0%.

O isolado R7 apresentou tolerância aos sais biliares, sendo observadas contagens de células viáveis em praticamente todas as concentrações e tempos avaliados, demonstrando assim capacidade de sobrevivência na presença destes, sugerindo assim, característica probiótica.

A tolerância aos sais biliares presentes no intestino delgado é uma das barreiras que a bactéria probiótica deve permear, além de condições adversas, a bactéria deve manter-se viável durante o tempo de trânsito do alimento que comumente dura entre 1 a 4 horas. Para a seleção de bactérias probióticas tem sido recomendada a utilização de concentrações entre 0,15 – 0,3% de sais biliares. Segundo Begley et al. (2006), os principais componentes da bile são os sais biliares, que possuem capacidade de desorganizar a estrutura de membranas celulares, sendo assim, tóxicos às células vivas. Estes solubilizam os lipídeos e são fundamentais no processo de digestão de gorduras, além de apresentarem ação antimicrobiana, dissolvendo a membrana bacteriana. Frente a isso, observa-se que o isolado R7 provavelmente possui enzimas que hidrolizam esses sais provocando a desestruturação celular.

O potencial probiótico de BAL isoladas de leite e queijos de ovelha foi avaliado por Meira (2011), o qual verificou que essas bactérias foram capazes de tolerar apenas baixas concentrações de sais biliares (0,1 e 0,3%). Apenas a linhagem LCN 56 (*Lactobacillus plantarum*) apresentou concentração celular acima do limite de detecção quando exposta a 0,5% de sais biliares. Além disso, nenhuma das linhagens avaliadas apresentou viabilidade acima do limite de detecção após as 4 horas de incubação. Considerando que a concentração de sais biliares de 0,15 a 0,3% tem sido recomendada para a avaliação *in vitro* da passagem pelo intestino delgado (Huang et al., 2004), o autor concluiu que as BAL isoladas de leite e queijo de ovelha apresentam potencial nestas condições.

Tabela 9. Análise de tolerância ao suco gástrico simulado do isolado *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (R7). Os resultados foram expressos em Log UFC/mL \pm desvio padrão

Tolerância ao suco gástrico simulado			
	0 horas	2 horas	4 horas
--- Log UFC/mL ⁻¹ \pm Desvio Padrão ---			
Controle	7,78 \pm 0,02 ^{*A^a}	7,78 \pm 0,03 ^{A^a}	7,83 \pm 0,07 ^{A^a}
Pepsina pH 2	8,42 \pm 0,17 ^{A^b}	7,27 \pm 0,00 ^{B^b}	7,21 \pm 0,05 ^{B^b}
Pepsina pH 2 + Leite	8,64 \pm 0,14 ^{A^b}	8,52 \pm 0,08 ^{A^c}	8,34 \pm 0,04 ^{B^c}

*Letras maiúscula: linha/ Letra minúscula: coluna

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 9 observa-se que, no tempo de 0h, o isolado R7 apresentou viabilidade superior nos tratamentos com pepsina pH 2 e pepsina pH 2 + leite, quando comparado ao controle ($p < 0,005$). No tempo de 2h de incubação, o isolado apresentou viabilidade inferior no tratamento de pepsina pH 2 ($p < 0,005$), entretanto apresentou viabilidade superior com pepsina pH 2 + leite, quando comparado ao controle ($p < 0,005$). Já quando avaliado no tempo de 4h de incubação, observou-se resultado semelhante ao encontrado no tempo de 2h de incubação, ou seja, viabilidade inferior no tratamento de pepsina pH 2, e viabilidade superior em pepsina pH 2 + leite, quando comparado ao controle ($p < 0,005$).

Com isso, pode-se inferir relação à tolerância ao suco gástrico simulado que o isolado R7 apresentou viabilidade em todas condições testadas, apresentando aumento de um log no crescimento quando utilizou-se a matriz alimentícia leite + pepsina, possivelmente devido a proteção que o alimento propicia à bactéria.

De acordo com Charteris et al. (1998), para que ocorra a colonização e os efeitos benéficos, a cultura probiótica deve chegar ao intestino com uma população de no mínimo 6 log UFC.mL⁻¹ e, neste estudo, observou-se que o isolado R7 manteve sua viabilidade acima deste valor mínimo preconizado.

Segundo Huang et al. (2004), a adição do alimento faz com que ocorra aumento do pH, e isso possivelmente é um dos fatores que contribuem para o aumento da viabilidade das linhagens testadas nas condições de baixo pH. As linhagens podem chegar ao intestino em alta concentração quando tamponados por alimentos ou encapsuladas, promovendo assim efeitos benéficos.

Sehn (2015) avaliou a capacidade de sobrevivência ao suco gástrico simulado do isolado *Lactobacillus curvatus* (LC254), e verificou que a linhagem não teve capacidade de sobrevivência ao suco gástrico simulado nas condições de pH 2,5 + 3 mg.mL⁻¹ de pepsina. Entretanto, quando exposto ao suco gástrico simulado inoculado juntamente com leite integral, a bactéria se manteve viável entre 1 e 2 horas, observando assim o efeito protetor que o alimento pode apresentar sobre a sobrevivência do isolado durante a passagem no estômago do hospedeiro.

Tabela 10. Análise de tolerância ao suco intestinal simulado do isolado *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (R7). Os resultados foram expressos em Log UFC/mL ± desvio padrão

Tolerância ao suco intestinal simulado			
	0 horas	2 horas	4 horas
--- Log UFC/mL ⁻¹ ± Desvio Padrão ---			
Controle	7,78±0,02 ^{*A^b}	7,78±0,03 ^{A^b}	7,83±0,07 ^{A^b}
Pancreatina pH 8	9,06±0,03 ^{A^a}	8,76±0,08 ^{B^a}	8,16±0,06 ^{C^a}
Pancreatina pH 8 + 0,5% de sais biliares	6,87±0,08 ^{A^c}	0,00±0,00 ^{B^c}	0,00±0,00 ^{B^c}

*Letras maiúscula: linha/ Letra minúscula: coluna

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10 observa-se que, no tempo de 0h, o isolado R7 apresentou viabilidade superior no tratamento de pancreatina pH 8 e inferior no tratamento de pancreatina pH 8 + 0,5% de sais biliares quando comparado ao controle ($p < 0,005$). No tempo de 2h de incubação, o isolado apresentou viabilidade superior no tratamento de pancreatina pH 8 e, entretanto, quando exposto ao tratamento de pancreatina pH 8 + 0,5% de sais biliares, este não apresentou tolerância ao suco intestinal

simulado ($p < 0,005$). Da mesma forma, quando avaliado no tempo de 4h, observou-se resultado semelhante ao encontrado no tempo de 2h, ou seja, viabilidade superior no tratamento de pancreatina pH 8, e não apresentou tolerância ao suco intestinal simulado quando exposto ao tratamento de pancreatina pH 8 + 0,5% de sais biliares ($p < 0,005$).

Sehn (2015) observou que o isolado LC254 foi capaz de resistir às condições do trato intestinal simulado (pancreatina 1 mg.mL⁻¹ e pH 8,0), sem diferença significativa entre suas contagens no tempo inicial e após 4 horas, verificando que o isolado apresenta potencial para alcançar o intestino e promover efeitos benéficos na presença do alimento e sais biliares, resultado similar ao encontrado no presente estudo.

Ao avaliar o LAB18s, proveniente de queijo “minas fresca”, Pieniz (2014) verificou alta capacidade de sobrevivência na presença de suco gástrico simulado contendo pepsina (pH 3,0) e suco intestinal simulado contendo pancreatina (pH 8, com ou sem adição de sais biliares). A viabilidade do isolado LAB18s também foi satisfatória quando exposto a pH 3,0 e 4,0, embora se tenha observado uma diminuição na contagem de células viáveis quando analisado o pH 2, resultado que se assemelha com o encontrado no presente estudo.

5.3.2 Análise da Capacidade de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade do isolado R7

A capacidade de adesão às células epiteliais e superfície da mucosa são características que vem sendo utilizadas como pré-requisito para seleção de bactérias probióticas, visando a colonização do trato gastrointestinal, prevenindo a eliminação por peristaltismo e promovendo vantagem competitiva no ecossistema (DEL RE et al., 2000).

A autoagregação, coagregação e hidrofobicidade do isolado R7 foi analisada, e os resultados obtidos indicam que esse microrganismo possui propriedades de adesão mais baixas. Sabe-se que a auto-agregação e coagregação entre bactérias desempenham um papel importante na prevenção da colonização de superfícies por agentes patogênicos (GARCÍA-CAYUELA et al., 2014), como é sabido que as habilidades de co-agregação de cepas de

bactérias ácido lácticas pode interferir na capacidade das espécies patogênicas em infectar o hospedeiro e pode prevenir a colonização de patógenos transmitidos por alimentos (GARCÍA-CAYUELA et al., 2014).

Na Figura 3 pode-se observar os resultados obtidos na avaliação da capacidade de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade do isolado R7 proveniente de queijo ricota. A capacidade de autoagregação do isolado R7 aumentou exponencialmente no decorrer do tempo avaliado, atingindo valor máximo em 4 horas (25%) e, posteriormente, ocorrendo decréscimo. O mesmo foi verificado em relação à capacidade de coagregação (18%) do isolado.

Todorov et al. (2011) verificaram que o percentual de autoagregação de isolados de *L. curvatus* a 37°C foi menor que 10% e que as linhagens apresentaram baixos níveis de coagregação com *L. monocytogenes* 603 (<20%). Fernandes (2017) avaliou isolados de *Pediococcus pentosaceus* provenientes de leite de ovelha e observou que os isolados apresentaram valores superiores a 82% em relação à capacidade de autoagregação e superiores a 60% em relação à capacidade de coagregação. Dos Santos et al. (2014), avaliaram a capacidade de autoagregação e observaram que *Lactobacillus* spp. isolados de amostras de queijo coalho produzido na região Nordeste do Brasil apresentaram uma variação de 28,8% para *L. rhamnosus* e de 83,7% para *L. plantarum*.

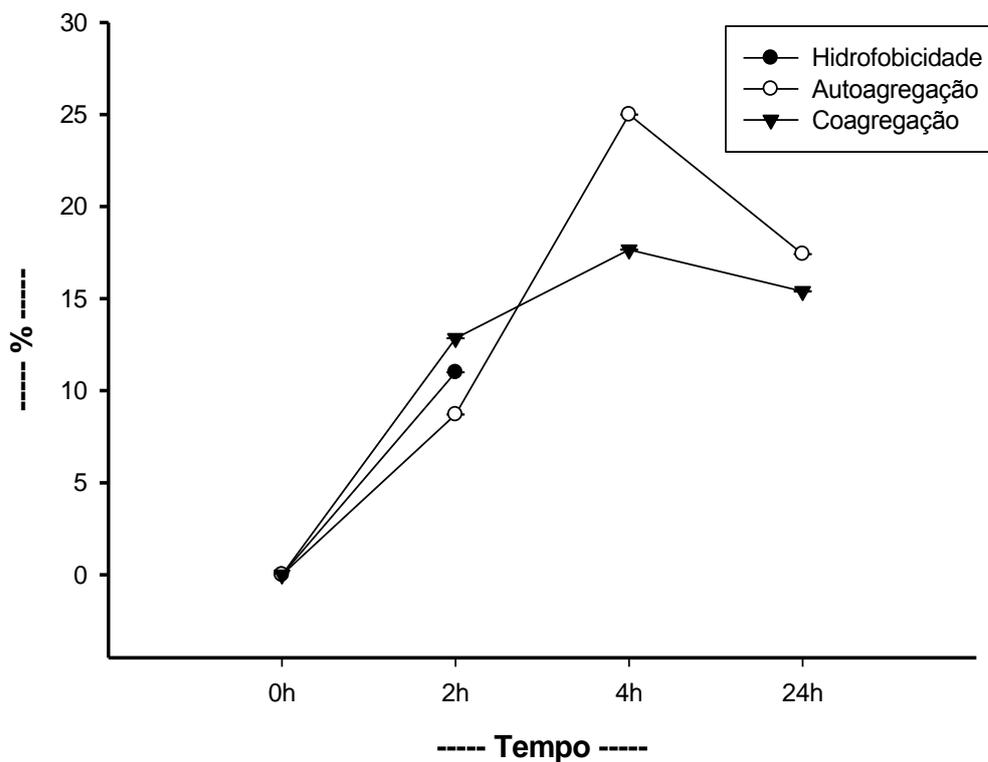


Figura 1. Capacidade de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade em diferentes tempos do isolado *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolado de queijo ricota

De acordo com Collado et al. (2008), a habilidade de autoagregação é essencial para a adesão de espécies probióticas às células epiteliais, sendo esta uma característica mais presente nos isolados probióticos do que nos demais isolados. Além do mais, estes isolados que possuem capacidade de coagregação podem formar uma barreira para prevenir a colonização por patógenos.

Neste estudo, o isolado R7 mostrou capacidade de adesão de 11% no teste de hidrofobicidade. Marthara et al. (2008) descrevem a hidrofobicidade como habilidade de aderência a hidrocarbonetos, onde, quanto maior o valor, maior a capacidade de adesão.

Vinderola et al. (2003) descrevem que a capacidade de hidrofobicidade e autoagregação estão diretamente ligadas à habilidade de adesão a superfície epitelial, sendo o primeiro passo necessário para a colonização pelos microorganismos probióticos. A hidrofobicidade ocorre em função das propriedades hidrofóbicas dos componentes da membrana externa do organismo. Supõe-se

que as interações hidrofóbicas exercem um papel importante na adesão de bactérias às células epiteliais.

Fernandes (2017) avaliou isolados de *Pediococcus pentosaceus* provenientes de leite de ovelha e verificou que todos os isolados apresentaram valores de hidrofobicidade inferior a 10%. Dos Santos et al. (2014), avaliaram amostras de queijo coalho produzido na região Nordeste do Brasil e verificaram que oito isolados de *Lactobacillus* apresentaram baixos índices de hidrofobicidade, em especial *L. Plantarum* (5,4%). Pieniz et al. (2015) avaliaram a capacidade de autoagregação e hidrofobicidade do isolado LAB18s proveniente de queijo minas frescal, e verificaram que o isolado exibiu propriedades satisfatórias de adesão.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que o isolado R7 possui potencial para ser utilizado como probiótico, uma vez que apresenta capacidade de auto-agregação e coagregação com *L. monocytogenes*, um importante patógeno de origem alimentar, aliado aos outros resultados encontrados.

5.4 Análise de segurança do isolado R7

5.4.1 Avaliação fenotípica de resistência a antimicrobianos

O isolado R7 apresentou sensibilidade frente a todos os antimicrobianos testados, de acordo com os padrões CLSI, conforme demonstrado na Tabela 8.

Schittler (2012) avaliou 16 isolados de *E. faecium* provenientes de leite *in natura* e observou que 94% dos isolados apresentaram sensibilidade à ampicilina, 81% a tetraciclina e 100% a vancomicina, antibióticos de grande importância clínica. Renye et al. (2009), nos Estados Unidos da América, relataram que todos os 33 isolados de *Enterococcus* provenientes de queijo apresentaram sensibilidade à vancomicina.

Landeta et al. (2013) avaliaram *Staphylococcus* coagulase negativa, provenientes de produtos cárneos, verificaram que dos 16 isolados de *S. carnosus* nenhum apresentou resistência aos antibióticos testados, porém, o isolado de *S. xylosus* demonstrou resistência à ampicilina e penicilina, ambos pertencentes da classe dos β -Lactâmicos.

Em estudo realizado por Pieniz et al. (2015) o isolado LAB18s, proveniente de queijo Minas Frescal apresentou sensibilidade para todos os antibióticos testados, demonstrando assim, segurança quanto ao seu uso em alimentos.

Tabela 11. Análise de suscetibilidade do *Lactococcus lactis* subsp *lactis* aos antimicrobianos e classificação segundo CLSI (2015). Os resultados foram expressos em mm \pm desvio padrão

Antimicrobianos	R7	CLSI Classificação	
	Zonas de inibição (mm)	Sucetibilidade (zona mm)	*S-I-R
Clindamicina	25,0 \pm 0,81	\geq 21	S
Eritromicina	26,5 \pm 0,60	\geq 23	S
Penicilina	28,2 \pm 1,20	\geq 15	S
Cloranfenicol	27,0 \pm 0,81	\geq 18	S
Meropenen	34,0 \pm 1,40	\geq 16	S
Vancomicina	22,7 \pm 0,96	\geq 17	S

*S- suscetível, I- intermediário, R- resistente

Segundo Giraffa (2002), a resistência bacteriana a antimicrobianos está relacionada com o uso destas drogas na terapêutica humana e veterinária. A resistência aos antimicrobianos pode ser acentuada por uma maior capacidade de formação de biofilme. Uma maior resistência a antimicrobianos vem sendo observada em bactérias presentes no sistema de biofilme, quando comparada com células planctônicas que são de fácil eliminação. Isso ocorre devido a proteção ao estresse ambiental que o biofilme exerce sobre as bactérias, contribuindo assim, para a colonização e permanência desses micro-organismos no ambiente (PUTFAL, 2013).

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

É importante notar que o micro-organismo R7 foi isolado de produtos lácteos (queijo ricotta) e, portanto, de produto animal (leite de vaca). O uso de antibióticos em animais de produção leva ao desenvolvimento e disseminação de organismos resistentes a fluoroquinolonas, cefalosporinas de terceira e quarta geração e vancomicina, entre outros (COLLIGNON et al., 2009). Os seres humanos estão expostos a bactérias resistentes a antimicrobianos e a genes de resistência que estão presentes na cadeia alimentar. Alguns estudos sugeriram que a maioria das *E. coli* resistentes aos antibióticos carregadas por pessoas podem ter se originado em animais de produção (JOHNSON et al., 2006). Mitigar os riscos da resistência antimicrobiana à saúde humana requer estratégias de gestão de risco para o uso de antimicrobianos em animais. Para diminuir o desenvolvimento e a propagação de bactérias alimentares antimicrobianas resistentes a alimentos, devemos reduzir o uso de antibióticos em animais alimentares e diminuir o uso abusivo de antimicrobianos em medicina humana (COLLIGNON et al., 2009).

Devido ao isolado R7 apresentar sensibilidade aos antimicrobianos de uso clínico avaliados, verifica-se que esta linhagem apresenta um potencial uso como cultura iniciadora e/ou probiótica.

5.4.2 Atividade hemolítica

Na análise de atividade hemolítica, observou-se hemólise incompleta pelo isolado R7, proveniente de amostra de queijo ricota, a qual foi caracterizada como α -hemólise, conforme pode ser observado na Figura 1. Este é um resultado relevante que indica que o isolado pode ser utilizado em alimentos pois não apresenta risco à saúde, visto que não apresenta este fator de virulência.



Figura 2.Atividade hemolítica do isolado R7 em ágar sangue suplementado com 7% (v/v) de sangue de cavalo.

Hermanns (2013) avaliou BAL isoladas de amostras de leites e queijos artesanais, e observou que nenhum dos isolados apresentou atividade da enzima β -hemolisina. Da mesma forma, Schittler (2012) observou que nenhum dos 16 isolados de *E. faecium* provenientes de leite *in natura* apresentaram atividade da enzima β -hemolisina. Pieniz et al. (2015) também verificaram que o isolado LAB18s proveniente de queijo minas frescal, não apresentou qualquer atividade hemolítica (γ -hemólise, α -hemólise e / ou β -hemólise) após 48 horas de incubação em placas de ágar Sangue suplementado com sangue de carneiro (7%).

Barbosa et al. (2010), Eaton e Gasson (2001) e Semedo et al. (2003), relataram que é baixa a frequência da atividade β -hemolítica em *Enterococcus* isolados de alimentos sendo comumente observada a α -hemólise. No entanto, a ausência da atividade hemolítica não significa que o isolado não possua

potencial de virulência e que a capacidade de produzir α -hemólise normalmente não é considerada um fator de virulência (BARBOSA et al., 2010). De acordo com Franz et al. (2001), a produção de hemolisina é um fator importante nas infecções causadas por *Enterococcus* spp. sendo identificado em maior frequência em isolados de amostras clínicas do que de alimentos.

5.4.3 Atividade da DNase

O isolado R7 não apresentou atividade DNase, conforme demonstrado na Figura 3, resultado que é relevante, visto que, este fator de virulência serve como critério de seleção para micro-organismos serem utilizados em alimentos.

Pieniz et al. (2015) observaram DNase negativa para o isolado LAB18s proveniente de queijo Minas Frescal. Almeida Júnior et al. (2015) isolaram BAL a partir de amostras de leite de cabra e observaram que nenhum dos isolados apresentou atividade da DNase. Moraes (2011), avaliou isolados de BAL de leite cru e queijo, e também verificou que nenhum destes apresentou resultado positivo para atividade de DNase.

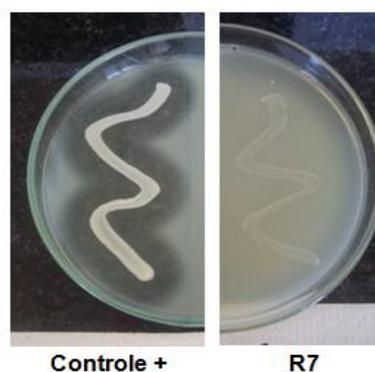


Figura 3. Atividade da DNase em ágar DNase. Atividade positiva (Controle +) para *S. aureus* ATCC 25923 (controle positivo) e atividade negativa para *L. lactis* subsp *lactis* (R7).

A DNase é uma enzima capaz de degradar o ácido nucleico (DNA), permitindo, desta forma, a infecção do hospedeiro. Esse fator de virulência normalmente é observado com menor frequência em amostras oriundas de alimentos quando comparados com amostras clínicas (FRANZ et al., 2001; BARBOSA et al., 2010).

5.4.4 Avaliação da capacidade de formação de biofilme

O isolado R7 não mostrou capacidade de formação de biofilme *in vitro*, sendo classificado como não formador de biofilme, de acordo com o padrão estabelecido por Stepanovic et al. (2000). Este é um resultado promissor, visto que biofilmes são relacionados com infecções alimentares e o desenvolvimento de biofilmes em locais de processamento de alimentos tornam estes ambientes potenciais fontes de contaminação.

Gomes et al. (2008), avaliaram a prevalência e caracterizaram *Enterococcus* spp. isolados de alimentos, e entre os alimentos avaliados estavam amostras de queijo ricota, e verificaram que estes isolados apresentaram fraca capacidade de formação de biofilme, resultado semelhante ao encontrado no presente estudo. Ao contrário, Medeiros (2011) avaliou isolados de *Enterococcus* provenientes de amostras de origem alimentar e verificou que a maioria demonstrou um fenótipo de formação de biofilme *in vitro* (95,7%), sendo que destes, 55,7% apresentaram forte capacidade de formação de biofilme.

5.4.5 Produção de gelatinase pelos isolados LAB18s e R7

Observou-se que os isolados LAB18s e R7 não apresentaram atividade da gelatinase. Este resultado é relevante, visto que a gelatinase é uma protease com capacidade para hidrolisar várias substâncias, como a gelatina, o colágeno, a caseína, a hemoglobina e outros pequenos peptídeos biologicamente ativos (JETT et al., 1994). Segundo Wang et al. (2011), a gelatinase é a expressão do gene *gelE*, fenotipicamente detectada *in vitro* por liquefação de um determinado meio de cultura contendo gelatina.

Moraes (2011) avaliou o fator de virulência gelatinase de BAL isoladas de amostras de leite cru e de queijo, e observou que dos 43 *Enterococcus* spp. avaliados, apenas 11 apresentaram atividade da enzima gelatinase. Barbosa et al. (2010) avaliaram 1060 isolados de *Enterococcus* spp. provenientes de fermentados cárneos e observaram que 26% dos isolados apresentaram atividade da gelatinase. Sieladie et al. (2011) isolaram 15 *Lactobacillus* spp. de leite bovino cru e observaram que nenhum isolado

apresentou atividade da 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.

Barbosa et al. (2010) e Lindenstrauß et al. (2011), verificaram que a gelatinase é um fator de virulência frequentemente observado e relataram que este fator está somente associado à espécie *E. faecalis*. De acordo com Diarra et al. (2010) a degradação das proteínas da matriz extracelular do hospedeiro pela gelatinase é importante fator na patogenicidade de *E. faecalis*. Pressupõe-se que a função da gelatinase na patogênese por esse micro-organismo seja o fornecimento de nutrientes para as bactérias a partir da degradação do tecido do hospedeiro (FISCHER et al., 2009).

5.4.6 Produção de lipase pelos isolados LAB18s e R7

No teste de produção de lipase pôde-se observar que o isolado R7 proveniente de queijo ricota, não apresentou atividade lipolítica é um bom resultado, visto que está ligado a segurança alimentar.

Moraes (2011) avaliou BAL isoladas de amostras de leite cru e queijo as quais apresentaram atividade lipolítica negativa. Já o isolado LAB18s proveniente de queijo minas frescal apresentou resultado positivo para atividade lipolítica. Santos (2012) verificou atividade lipolítica de 71 isolados de *Enterococcus* spp. provenientes de amostras alimentares líquidas e sólidas, de águas e de superfícies, e observou atividade lipolítica positiva em 32% dos isolados avaliados.

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, sendo mais pesquisadas e identificadas em isolados clínicos de *Enterococcus* spp. Xie et al. (2012) relatam em seu estudo que as lipases são enzimas que hidrolisam as emulsões de lipídeos de cadeia longa, sendo que, as lipases microbianas são de grande relevância no metabolismo lipídico bacteriano, no envolvimento em processos patogênicos (CHEN et al., 2003).

5.5 Atividade antagonista contra bactérias patogênicas dos isolados LAB18s e R7

O resultado da atividade antagonista do isolado LAB18s, proveniente de queijo minas frescal, e R7 isolado de queijo ricota contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa estão apresentados na Tabela 12.

Pode-se observar que o isolado LAB18s apresentou atividade antagonista pelos testes de difusão em agar por poços e “Spot on the lawn”, inibindo três das quatro bactérias patogênicas testadas, sugerindo que esse isolado produz substâncias antagonistas dentre elas, possivelmente, bacteriocinas. No entanto, quando testados pelo método de difusão em agar por disco que, utiliza o sobrenadante livre de células, este não expressou atividade.

Tabela 12. Atividade antagonista do sobrenadante livre de células dos isolados LAB18s e R7 contra bactérias Gram-positiva (G+) e Gram-negativa (G-).

Micro-organismos indicadores	Difusão em poços		Difusão em discos		“Spot on the lawn”	
	<i>E. durans</i> LAB18s	<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i> R7	<i>E. durans</i> LAB18s	<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i> R7	<i>E. durans</i> LAB18s	<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i> R7
	----- zonas de inibição mm -----				Presença	
<i>E. coli</i> ATCC 8739 (G-)	0,0±0,0	8,0±0,0	*----	11±0,15	+	**
<i>Salmonella Enteritidis</i> ATCC 13076 (G-)	8,0±0,0	8,0±0,0	----	9,5±0,03	+	**
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114 (G+)	8,0±0,0	8,0±0,0	----	----	+	**
<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (G+)	8,0±0,0	8,0±0,0	----	12±0,06	----	**

*--- sem atividade

** não testado

Por meio de seu metabolismo, as bactérias do ácido lático tornam os carboidratos em ácido lático. No entanto, outros metabolitos, tais como peptídeos antimicrobianos que podem inibir vários micro-organismos patogênicos e em deterioração, também podem ser produzidos. Assim, a busca

constante por bactérias de ácido lático que produzem substâncias com potencial antimicrobiano torna-se importante para a aplicação como culturas iniciadoras (CASTELLANO et al., 2017). Entretanto, alguns autores sugerem testar o sobrenadante de cultura produzido pelos micro-organismos em diferentes condições *in vitro*, pois a composição química, a temperatura de crescimento e o pH do meio podem afetar na produção de metabólitos de origem proteica (TODOROV et al., 2004).

Em relação ao isolado R7, observa-se que este apresentou atividade antimicrobiana contra os patógenos testados em dois testes realizados (difusão em agar porpoços e “Spot on the lawn”), porém, ao avaliar pelo teste de difusão em agar por disco, o micro-organismo não apresentou atividade antagonista contra *L. monocytogenes* possivelmente este resultado se deu devido não ter ocorrido a correta difusão no disco (Tabela 12).

Dessa forma, observou-se que tanto o LAB18s quanto o R7 demonstraram habilidade em inibir *L. monocytogenes* e outros importantes patógenos de interesse alimentar, sugerindo, assim, o uso destes no controle da contaminação de alimentos.

Em outros estudos foram observadas atividade antagonista de BAL nativas oriundas de produtos fermentados. Nero et al. (2008) investigaram o potencial antagonista de 360 colônias de BAL isoladas de leite cru e verificaram que 25,3% apresentaram atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* e 9% contra *Salmonella* Enteritidis. De acordo com os autores, pode ocorrer interferência no crescimento e desenvolvimento de patógenos como *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. quando se trata de alimentos com altas populações microbianas, visto que, estes necessitam de condições específicas para o seu crescimento.

Meira et al. (2010) verificaram a atividade antagonista de seis BAL isoladas de leite e queijo de ovelha frente a seis bactérias patogênicas (*L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus*, *B. cereus*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*). Todos isolados testados apresentaram zonas de inibição frente aos patógenos quando utilizado o método “spot on the lawn”, sendo que, os sobrenadantes das culturas não apresentaram atividade antagonista contra os patógenos indicadores.

Por meio do seu metabolismo, as BAL transformam carboidratos em ácido láctico. Entretanto, outros metabólitos como peptídeos antimicrobianos que podem inibir diversos micro-organismos patogênicos e deteriorantes também podem ser produzidos. Com isso, a constante procura por BAL que produzam substâncias com potencial antimicrobiano torna-se importante para a aplicação como culturas iniciadoras.

5.6 Perfil fermentativos isolados LAB 18s e R7

Os isolados LAB18s e R7 foram submetidos ao teste de fermentação de glicose a fim de determinar seus perfis fermentativos, visto que é um teste importante para bactérias que possam ser utilizadas em alimentos. Ambos isolados não apresentaram produção de gás a partir da fermentação da glicose, sugerindo que são homofermentativas.

Estes resultados são promissores, uma vez que as bactérias de ácido láctico homofermentativas são desejáveis para o uso como culturas iniciadoras, pois produzem ácido láctico, evitando sabor e características indesejáveis. A aplicação de culturas homo ou heterofermentativas dependerá do tipo de alimento a ser produzido, uma vez que cada um possui características específicas (KOSTINEK et al., 2007).

Sengun et al. (2009) caracterizaram como BAL homofermentativa 73,5% dos isolados de amostras de Tarhana, um tradicional produto fermentado a base de iogurte oriundo da Turquia. Hermanns (2013) avaliou amostras leite e queijos artesanais da região noroeste do Rio Grande do Sul, e todos os 21 isolados, foram identificados como BAL, com características bacteriocinogênicas e probióticas não apresentaram produção de gás a partir da fermentação da glicose sendo classificados como homofermentativos, resultado que corrobora o presente estudo.

5.7 Capacidade antioxidante do isolado R7

O resultado da capacidade antioxidante do R7 pode ser observado na figura abaixo (Figura 4). A avaliação pelo método de TBARS demonstrou que o isolado apresentou potencial antioxidante, sendo observada inibição da peroxidação lipídica. Já pelo método de DPPH, verificou-se atividade

antioxidante, onde o isolado exibiu capacidade de sequestrar o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) observado por meio da mudança na sua coloração, que passa da cor violeta para coloração amarela quando entra em contato com a substância antioxidante.

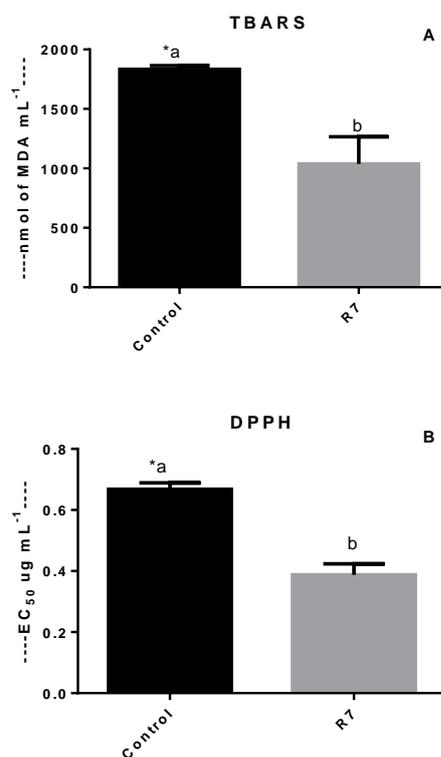


Figura4. Inibição da peroxidação lipídica pelo método TBARS (A) e a análise da capacidade antioxidante do sobrenadante livre de células dos isolados por métodos DPPH (B). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. * Os valores com as mesmas letras não apresentam diferença estatística significativa entre os grupos.

Zanoni et al.(2008) investigaram e caracterizaram três isolados de BAL, *Bifidobacterium lactis* B 933, *Lactobacillus plantarum* LP 1 e *Streptococcus thermophilus* Z 57, em relação à capacidade antioxidante. Os autores verificaram que todos os isolados apresentaram atividade antioxidante pelo método de inibição da peroxidação lipídica (TBARS) corroborando o resultado encontrado no presente estudo. Lin e Chang (2000) verificaram a capacidade oxidativa de *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 e *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 e observaram atividade antioxidativa significativa (28 a 45% de

capacidade para o *L. acidophilus* ATCC 4356). Pieniz (2010) avaliou a capacidade antioxidante de *Enterococcus* sp., *E. faecalis*, *E. faecium* e *E. hirae* por meio das metodologias de TBARS e DPPH, e verificou que os isolados apresentaram capacidade antioxidante por ambos os métodos avaliados.

A atividade antioxidante é analisada para verificar capacidade do isolado em estudo na prevenção ou inibição dos danos oxidativos provocados nos organismos vivos por meio da produção de radicais livres. Bactérias ácido láticas que apresentam propriedade de sequestrar radicais livres são de grande interesse para a indústria alimentícia devido à capacidade de evitar a deterioração e, conseqüentemente, aumentar a vida útil dos produtos, mantendo seu valor nutricional. Além disso, na área da saúde esses compostos ajudam na proteção das células e tecidos contra danos oxidativos (WANG et al., 2012).

5.8 Extração de DNA e análise genotípica

5.8.1 Análise genotípica para identificação de genes de adesão intercelular do isolado LAB18s

A presença de fatores de virulência é uma das grandes preocupações quando se trata do gênero *Enterococcus*, devido a estes contribuírem para a severidade de infecções. Na análise genotípica realizada com os genes formadores do operon *ADBC* (*icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*), os quais são relacionados a formação de biofilmes, não foi detectada a sua presença, conforme pode ser observado na Figura 5. Este resultado apresenta relevância, pois indica que este micro-organismo apresenta segurança com relação a um possível uso alimentar.

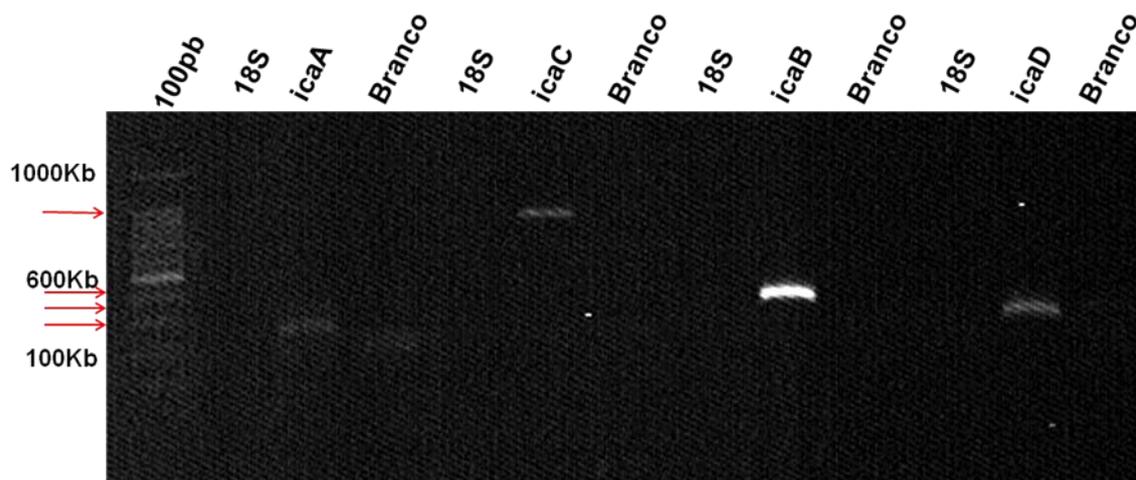


Figura 5. Análise da presença de genes formadores de biofilme por eletroforese em gel de agarose a 1% com produto de PCR para genes do operon *icaADBC* (*icaA*(188pb), *icaB*(526pb), *icaC*(989pb) e *icaD*(198pb)), com *S. epidermidis* ATCC 25923 como controle positivo para os genes *icaA*, *icaB*, *icaC* e *icaD*, formadores de biofilme.

Em estudo anterior realizado por Pieniz et al. (2015), o isolado *E. durans* LAB18s proveniente de queijo “minas frescal” apresentou forte capacidade de formação de biofilme. Entretanto, este fator não foi associado com a presença de genes de virulência, sendo que esta capacidade pode ser relacionada com as propriedades de adesão dos probióticos (Pieniz et al., 2014). Pieniz et al. (2015) investigaram a presença dos genes de virulência *ace* (proteínas de adesão ao colágeno), *agg* e *asa* (substância de agregação) por PCR, e estes não foram detectados no isolado *E. durans* LAB18s. Da mesma forma, os autores constataram, por meio da amplificação por PCR, que o isolado *E. durans* LAB18s não apresentou os genes de virulência *bopA* (putative glycosyltransferase), *bopB* (beta-phosphoglucomutase), *bopC* (aldose 1-epimerase), e *bopD* (sugar-binding transcriptional regulator), envolvidos no metabolismo de maltose e formação de biofilme, apresentando importante papel relacionado com patologias clínicas (DONLAN; COSTERTON, 2002).

5.8.2. Análise genotípica enterocinas do isolado *E. durans* LAB18s

No presente estudo foram analisados cinco genes das enterocinas A, B, P, L50A/B no isolado *E. durans* LAB18s. Destes, foi observada a presença de dois genes estruturais de enterocinas, o gene L50A/B e o gene P.

Özdemir et al. (2011) identificaram a presença dos genes estruturais das enterocinas A, B, P e L50A/B em 94,7% de 57 isolados de *Enterococcus* spp. obtidos de água, alimentos e animais. Schittler (2012) observou que dos 16 isolados de *Enterococcus* obtidos de leite *in natura*, 93,75% apresentaram o gene da enterocina L50A/B. Já Moraes (2011) avaliou a presença do gene da enterocina L50A/B em isolados de *Enterococcus* spp., provenientes de leite *in naturae* queijo, e não encontrou isolados portadores dessa enterocina.

Moraes (2011) verificou que dos 43 isolados de *Enterococcus* spp., 62,8% apresentavam mais de um gene estrutural de enterocinas (L50A/B, AS-48, P, A, B). Stropfová et al. (2008) avaliaram 427 isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* provenientes de animais, de alimentos e de ração animal, e observaram que 234 isolados (54,8%) apresentaram um ou mais genes estruturais de enterocinas. Resultado semelhante ao do presente estudo, no qual o isolado *E. durans* LAB18s demonstrou a presença de dois genes, L50A/B e P.

Segundo Franz et al. (2007), a produção de múltiplas bacteriocinas e a alta frequência de diversos genes produzidos por *Enterococcus* spp. ocorre devido à eficiência dos mecanismos de transferência genética, visto que, isolados de *Enterococcus* spp. possuem mecanismos de intercâmbio genético conjugativo (transposons conjugativos e plasmídeos com alta frequência de transferência) e não conjugativos como alguns plasmídeos.

A produção de bacteriocinas é uma vantagem competitiva para as espécies deste gênero bacteriano, pois juntamente com a tolerância a condições físico-químicas adversas (concentração de sais, ácidos, etc), *Enterococcus* torna-se um dos principais gêneros associados a alimentos lácteos. De acordo com Giraffa et al. (1995) e Giraffa et al. (2003), as espécies deste gênero estão associadas tanto à maturação, quanto à desenvolvimento de sabores característicos em queijos. Com isso, a utilização de isolados bacteriocinogênicos de *Enterococcus* spp. como culturas iniciadoras preveniria o desenvolvimento de deteriorantes como *Clostridium tyrobutyricum* e patógenos como *L. monocytogenes*, além de propiciar características desejáveis ao produto.

6. CONCLUSÃO

Por meio dos resultados obtidos conclui-se que, tanto o LAB18 isolado de queijo minas frescal quanto o R7 isolado de queijo ricota apresentaram características probióticas e aspectos de segurança compatíveis para futura utilização como culturas iniciadoras em alimentos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo faz parte de um estudo maior em que o isolamento, identificação e caracterização do isolado em estudo está sendo investigado com o objetivo de usá-lo como composto probiótico *in vivo* no tratamento e profilaxia do câncer de cólon. Além disso, é importante enfatizar que este micro-organismo está sendo estudado na detecção de genes envolvidos na adesão, agregação e resistência à vancomicina (dados ainda não publicados). Do mesmo modo, este isolado está sendo analisado quanto à capacidade de produção de ácido linoleico conjugado (CLA) e folato para uso futuro em matrizes alimentares.

8. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA JÚNIOR, W. L. G.; FERRARI, I. S.; SOUZA, J. V.; SILVA, C. D. A.; COSTA, M. M.; DIAS, F. S. Characterization and evaluation of lactic acidbacteria isolated from goat milk. **Food Control**, v. 53, p. 96–103, 2015.
- ARCIOLA, C.R.; BALDASSARRI, L.; MONTANARO, L. Presence of icaD genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 2151-2156, 2001.
- BARBOSA, J., GIBBS P.A., TEIXEIRA P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in North of Portugal. **Food Control**, 21:651-656. 2010.
- BANNERMAN, T. M. Staphylococcus, Micrococcus and other catalase-positivecocci that grow aerobically. In P. R. Murray (Ed.), **Manual of clinical microbiology** (8th ed.). (pp. 384e404). Washington, DC: ASM Press. 2003.
- BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C. G. M. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n.3, p.1729-1738, 2006.
- BHAKDI, S.; TRANUM-JENSEN, J. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. **Microbiological reviews**, v. 55, n. 4, p. 733–751, 1991.
- BIER, O. G. **Microbiologia e imunologia**. 24 ed., p.1234, São Paulo: Melhoramentos, 1985.
- BERESFORD, T.; WILLIAS, A. The microbiology of cheese ripening. In: FOX, P.F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. (Ed.). **Cheese chemitry physics and microbiology**, 3 ed. Amsterdam: Elsevier, p. 287-317, v.1, General aspects, 2004.
- BISCOLA, V.; TODOROV, S.D.; CAPUANO, V.S.C.; ABRIQUEL, 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.
- BUTT, H. L. et al. An association of membrane-damaging toxins from coagulase-negative staphylococci and chronic orofacial muscle pain. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, n. 7, p. 577–584, 1 jul. 1998.

- CASALTA, E.; MONTEL, M. C. Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactococcus genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 271–273, 2008.
- 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.
- CENTENO, J.; MENÉNDEZ, S.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v.33, p.307-313, 1996.
- CHARTERIS, W. P.; PHILLIP, M. K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal of Dairy Technology**, v. 51, n. 4, p. 123–136, 1998.
- CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEART, T. Detection and impact of protease and lipase activities in Milk powders. **International Dairy Journal**, v.13, p.255-275. 2003.
- CHEN, H.; HOOVER, D. G. bacteriocins and their food applications. **Comprehensive Reviews Food Science**, v.2, p.82-100, 2003b.
- CINTAS, L.M.; CASAUS, M.P.; HERRANZ, C.; NES, I.F.; HERNÁNDEZ, P.E. Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. **Food Science and Technology International**, v. 7, n. 4, p. 281-305, 2001.
- ÇITAK, S.; VARLIK, Ö.; GÜNDOĞAN, N. Slime production and DNase activity of Staphylococci isolated from raw milk. **Journal of Food Safety**, v. 23, n. 4, p. 281–288, nov. 2003.
- CLADERA-OLIVEIRA, F. **Produção, caracterização, purificação parcial e aplicação de um peptídeo antimicrobiano produzido por *Bacillus licheniformis* P40**. 2004. 118f. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do sul, Porto Alegre, 2004.
- CLSI. (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. Third Edition 28, No. 8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA; 2008.

CLSI. (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. M100-S25, Wayne, PA, 2015.

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**, 4: 132-141. 2009.

COLON, K. M.; HUMPHREYS, H.; O’GARA, J. P. “icaR encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of ica operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*”. **Journal of Bacteriology**. 184 (16): 4400-8. 2002.

COSENTINO, S.; FADDA, M.E.; DEPLANO, M.; MELIS, R.; POMATA, R.; PISANO, M.B. Antilisterial activity of nisin-like bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from traditional Sardinian dairy products. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.

COTTER, P. D.; HILL, C., ROSS, P. R. Bacteriocins: Developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.777-778, 2005.

CRUXEN, C. E. S. **Caracterização fenotípica, molecular e avaliação do potencial tecnológico de Estafilococos coagulase negativa isolados de queijos da região sudoeste do Rio Grande do Sul/Brasil**. 2016. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

DEEGAN, L. C.; COTTER, P; D.; HILL, C.; ROSS, P. R. bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, v.16, p.1058-1071, 2006.

DEL PIANO, M.; MORELLI, L.; STROZZI, G.P.; ALLESINA, S.; BARBA, M.; DEIDDA, F.; LORENZINI, P.; BALLARÉ, M.; MONTINO, F.; ORSELLO, M.; SARTORI, M.; GARELLO, E.; CARMAGNOLA, S.; PAGLIARULO, M.;

- CAPURSO, L. Probiotics: from research to consumer. **Digestive and Liver Disease**, v.38, p. S248-S255, 2006.
- DEL RE, B., SQORBATI, B., MIGLIOLI, M., PALENZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 438–442, 2000.
- DE MARTINIS, E.C.P.; SANTAROSA, P.R.; FREITAS, F.Z. Caracterização preliminar de bacteriocinas produzidas por seis cepas de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos embalados a vácuo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, n.2, p.195-199, 2003.
- DEWNTI, R; WONG, A. C.L. Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of food Microbiology**. N.26, p.147-164, 1995.
- DEVRIESE, L. A.; POT, B.; COLLINS, M. D. Phenotypic identification of the genus enterococcus and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p.399-408, 1993.
- DE VUYST, L. F.; MORENO, M.R.; REVETS, H. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. **International Journal of Food Microbiology**, v.84, p.99-318, 2003.
- DIARRA M. S., REMPEL H., CHAMPAGNE J., MASSON L., PRITCHARD J., TOPP E. Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes in *Enterococcus* spp: Characterization of Isolates from Broiler Chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, 76(24):8033-8043. 2010
- DONLAN, R.M., COSTERTON, J.W., Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**. 15, 167-93. 2002.
- DOS SANTOS, K. M. O.; VIEIRA, A. D. S.; BURITI, F. C. A.; DE MELO FRANCO, B. D. G.; BRUNO, L. M.; BORGES, M. F.; TODOROV, S. D.; DO NASCIMENTO, J. C. F.; ROCHA, C. R. C.; DE MELO, M. E. S.; DE SOUZA LOPES A. C. Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Dairy Science & Technology**. DOI 10.1007/s13594-014-0201-6, INRA and Springer-Verlag France, 2014.
- DU TOIT, M.; FRANZ, C.M.A. P.; DICKS, M.L.T.; HOLZAPFEL, W.H. Preliminary Characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium*

and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.482-494, 2000.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied Environmental microbiology**, v. 67, p.1628-1635, 2001.

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.

FERNANDES, Mayara Leal. **Avaliação in vitro do potencial de segurança, probiótico e tecnológico de *pediococcus pentosaceus* isolado de leite de ovelhas.**2017.47pg. Dissertação(Mestrado em Saúde Animal) - Universidade de Brasília Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal. Brasília-DF, 2017.

FEY, P. D.; OLSON, M. E. Current concepts in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Future microbiology**, v. 5, n. 6, p. 917–33, 2010.

FILHO, Renato Geraldo da Silva. **Produção de biofilme em amostras clínicas de *S. epidermidis*: influência de concentrações subinibitórias de antissépticos (etanol e clorexidina) e associação com potenciais marcadores de virulência.**2014.156 pg. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2014.

FISCHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**.v15, p.1749-1757, 2009.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO), 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food—Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Meeting Report, London Ontario, Canada. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/95s0316/95s-0316-rpt0282-tab-03-ref-19-joint-faowho-vol219.pdf>>. Acesso em: 22 de janeiro de 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION - FAO/WHO. Probiotics in food.

Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutrition Paper 85. FAO, Rome, Italy, 2006.

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

FRACALANZZA, S. A., SCHEIDEGEER, E. M., SANTOS, P. F., LEITE, P. C., TEIXEIRA, L. M. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 102(7):853-9. 2007

FRANZ, C.; HOLZAPFEL, W. H.; STILES, M. E. Enterococci at the crossroads of food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 1-24. 1999.

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.

FRANZ, C. M. A. P.; VAN BELKUM, M. J.; HOLZAPFEL, W. H.; ABRIOUEL, H.; GÁLVEZ, A. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. **FEMS Microbiology Reviews**, v.31, p. 293-310, 2007.

FRANZ, C.M.; HUCH, M.; ABRIOUEL, H.; HOLZAPFEL, W.; GÁLVEZ, A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **International Journal of Food Microbiology**, 151:125. 2011.

GÁLVEZ, A., ABRIOUEL, H., LÓPEZ, R.L.; OMAR, N. B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**. v.120, n. 1-2, p. 51–70, 2007.

GÁLVEZ, A., LÓPEZ, R.L.; ABRIOUEL, H., VALDIVIA, E.; OMAR, N. B. Application of bacteriocinins in the control of food borne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**. v.28, n.2, p. 125-152, 2008.

GARCÍA-CAYUELA, T., KORANY, A. M., BUSTOS, I., DE CADIÑANOS, L. P. G., REQUENA, T., PELÁEZ, C., & MARTÍNEZ-CUESTA, M. C. Adhesion

abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. **Food Research International**, 57, 44-50.2014.

GERKE, C., KRAFT, A., SÜßMUTH, R., SCHWEITZER, O., GÖTZ, F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 29, p. 18586–93, 17, 1998.

GIRAFFA, G. Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-listeria factors in dairy technology. **Food Microbiology**, v.12, p.291-299, 1995.

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

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2-3, p. 215–222, 2003.

GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial population during food fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 251-260, 2004.

GIRIDHARA UPADHYAYA PM, RAVIKUMAR KL, UMAPATHY BL. Review of virulence of *Enterococcus*: an emerging nosocomial pathogen. **Indian Journal of Medical Microbiology**; 27: 301-5. 2009.

GOMES, B. C.; ESTEVES, C.T.; PALAZZO, I. C. V.; DARINI, A. L.C.; FELIS, G. E.; SECHI, L. A.; FRANCO, B. D. G. M.; MARTINIS, E. C. P. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**. v.25, p.668-675, 2008.

GOMES, B. C.; FRANCO, B. D. G. M.; DE MARTINIS, E. C. P. Dualistic aspects of *Enterococcus* spp. in foods. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, Badajoz, v. 1, n. 1, p. 1119-1125, 2010.

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**, Ames, v.52, n.6, p.384-387, 1989.

HARDIE, J. M.; WHILEY, R. A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Journal of Applied Microbiology**, v.83, p.S1-S11. 1997.

- HEILMANN, C. SCHWEITZER, O., GERKE, C., VANITTANAKOM, N., MACK, D., GÖTZ, F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Molecular microbiology**, v. 20, n. 5, p. 1083–91, 1996.
- HELLAL, A.; AMROUCHE, L.; FERHAT, Z.; LARABA, F. Characterization of bacteriocin from *Lactococcus* isolated from traditional Algerian dairy products. **Annals of Microbiology**, v.62, n.1, p.177-185, 2012.
- HERMANNNS, Gislaine. **Potencial bacteriocinogênico e probiótico de bactérias ácido lácticas isoladas de leite e queijos artesanais**. 2013. 100pg. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 2013.
- HERNANDEZ, D.; CARDEL, E.; ZÁRATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF 711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. **Brasizilian Journal Food Techonology**, v.11, n.2, p. 120-127, 2008.
- HIDANO, A.; YAMAMOTO, T.; HAYAMA, Y.; MUROGA, N.; KOBAYASHI, S.; NISHIDA, T.; TSUTSUI, T. Unraveling Antimicrobial Resistance Genes and Phenotype Patterns among *Enterococcus faecalis* Isolated from Retail Chicken Products in Japan, **PLOS ONE**, v. 10, p. 1-15, 2015.
- HWANHLEM, A.; WATTHANASAKPHUBAN, N.; RIEBROY, S.; BENJAKUL, S.; HKITTIKUN, A.; MANEERAT, S. Probiotic lactic acid bacteria from Kung-Som: isolation, screening, inhibition of pathogenic bacteria. **International Journal of Food Science and Techonology**, Oxford, v.45, p.594-601, 2010.
- 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.
- HUSEBY, M. et al. Structure and biological activities of beta toxin from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 23, p. 8719–8726, 2007.
- ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Probiotics. Best Practice e **Research Clinical Gastroenterology**, London, v.18, n.2, p.299-313, 2004.
- JERONYMO-CENEVIVA, A.B.; DE PAULA, A.T.; SILVA, L.F.; TODOROV, S.D.; FRANCO, B.D.G.M.; PENNA, A.L.B. Probiotic Properties of Lactic Acid

Bacteria Isolated from Water-Buffered Mozzarella Cheese. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 6, n. 3-4, p. 141-156, 2014.

JETT, B. D., HUYCKE, M. M., GILMORE, M. S. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**. 7(4), 462- 478. 1994.

JOHNSON, J. R., KUSKOWSKI, M. A., MENARD, M., GAJEWSKI, A., XERCAVINS, M., & GARAU, J. Similarity of human and chicken *Escherichia coli* isolates with relation to ciprofloxacin resistance status. **Journal of Infectious Diseases**, 194, 71-78.2006.

JUODEIKIENE, G.; BARTKIENE, E.; VISKELIS, P.; URBONAVICIENE, D.; EIDUKONYTE, D.; BOBINAS, C. Fermentation processes using lactic acid bacteria producing bacteriocins for preservation and improving functional properties of food products. In: Petre M, editor. **Advances in applied biotechnology**. Intech, Croatia. pp. 63-100. 2012.

KECHAGIA, M.; BASOULIS, D.; KONSTANTOPOULOU, S.; DIMITRIADI, D.; GYFTPOULOU, K.; SKARMOUTSOU; FAKIRI, E.M. Health benefits of probiotics: a review. **ISRN Nutrition**, v. 2013, Article ID481651, 7 pages, 2013.

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.

LANDETA, G.; CURRIEL, J. A.; CARRASCOSA, A. V.; MUNOZ, R.; DE LAS RIVAS, B. Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from Spanish dry cured meat products. **Meat Science**, v. 93, n. 3, p.387–396, 2013.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature medicine**, v. 10, n. 12, p.122–129, 2004.

- LEWUS, C.; KAISER, A.; MONTVILLE, T. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.1683-1688, 1991.
- 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.
- LINDENSTRAUß A. G., PAVLOVIC M., BRINGMANN A., BEHR J., EHRMANN M. A., VOGEL R. F. Comparison of genotypic and phenotypic cluster analysis of virulence determinants and possible role of CRISPR elements towards their incidence in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. **Systematic and Applied Microbiology**, 34:553-560. 2011.
- LIN, M.; CHANG, F. J. Antioxidative Effect of Intestinal Bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. **Digestive Diseases and Sciences**, Stanford, v.45, n. 8, p.1617-1622, 2000.
- MACK, D. HAEDER M, SIEMSEN N, LAUFS R. Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. **The Journal of infectious diseases**, v. 174, n. 4, p. 881–4, 1996.
- MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. Brock biology of microorganisms. **Upper Saddle River: Prentice Hall**. 11.ed. 992p. 2005.
- 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.
- 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 and Infectious Disease**, 58:59-65. 2007.
- MATHARA, J. M.; SCHILLINGER, U.; KUTIMA, P. M.; MBUGUA, S. K.; GUIGAS, C.; FRANZ, C.; HOLZAPFEL, W. H. Functional Properties of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Maasai Traditional Fermented Milk Products in Kenya. **Current Microbiology**, v. 56, p. 315-321, 2008.

MAURIELLO, G.,CASABURI, A.; BLAIOTTA, G.; VILLANI, F. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. **Meat Science**, v. 67, n. 1, p. 149-158, 2004.

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. 116pg.Dissertação (Mestrado)- Universidade federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 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**, p75-80, 2010.

MEIRA, Stela Maris Meister. **Potencial Probiótico De Bactérias Lácticas e Atividades Biológicas de Leite e Queijos de Ovelha**. 2011. 107p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, BR-RS, 2011.

MEHTA, R.; ARYA, R.; GOYAL, K.; SINGH, M.; SHARMA, A.K. Bio-preservative and Therapeutic Potentialof Pediocin: Recent Trends and Future Perspectives. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 172-178,2013.

MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B. Biofilm formation by enterococci. **Journal of Medical microbiology**. V.56, p.1581-1588, 2007.

MORAES, Paula Mendonça. **Identificação molecular de Bactérias Ácido Lácticas isoladas de leite cru e queijo, e pesquisa de genes de bacteriocinas**. 2011.89p. Dissertação (*Magister Scientiae*) - Programa de Pós-Graduação em medicina veterinária, Universidade Federal de Viçosa, BR-MG, 2011.

MORRISON, D.; WOODFORD, N.; COOKSON, B. Enterococci as emerging pathogens of humans. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p.S89-S99. 1997.

- MURRAY, B.,E. The life and times of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiology Reviews**. V.3, n.1, p.46-65, 1990.
- NALLAPAREDY, S.R.; QIN, X.; WEINSTOCK, G.M.; HOOK, M.; MURRAY, B.E. Enterococcus faecalis adhesion, Ace, attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. **Infection and Immunity**, v. 9, n. 68, p. 5218-5224, 2000.
- NAGPAL, R.; KUMAR, A.; KUMAR, M. Fortification and fermentation of fruit juices with probiotic lactobacilli. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1573–1578, 2012.
- NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; ORTOLANI, M. B. T.; BARROS, M. A. F.; BELOTI, V.; FRANCO, B. D. G. M. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. In raw Milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses and Public Health**, v.55, p.229-305, 2008.
- OCAÑA, V., NADER-MACÍAS, M. E. Vaginal lactobacilli: self- and coaggregating ability. **British Journal of Biomedical Sciences**, 59, 183e190. 2002.
- OGIER, J. C.; SERROR, P. Safety assessment of dairy microorganisms: the Enterococcus genus. **International Journal of Microbiology**, v.126, p. 291-301, 2008.
- OGAKI, M. B.; FURLANETO, M. C.; FURLANETO-MAIA, L. General aspects of bacteriocins. **Brazilian Journal Food Technology**, 18: 267-276, 2015.
- 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.
- ORTU, S.; FELIS, G.E.; MARZOTTO, M.; DERIU, A.; MOLICOTTI, P.; SECHI, L.A.; DELLAGLIO, F.; ZANETTI, S. Identification and functional characterization of Lactobacillus strains isolated from milk and Gioddu, a traditional Sardinian fermented milk. **International Dairy Journal**, v. 17, p.1312–1320, 2007.
- ÖZDEMİR, G. B.; ORYAŞIN, E.; BIYIK, H. H.; ÖZTEBER, M.; BOZDOĞAN, B. Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 182-187, 2011.

PALMER, J.; FLINT, S.; BROOKS, J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v.34, n.9, p.577-588, 2007.

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. Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e capacidade de bioacumulação de selênio em células de *Enterococcus* (mestrado) Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA). Pg. 109. Porto Alegre, 2010.

PIENIZ, S., ANDREAZZA, R., ANGHINONI, T.; CAMARGO, F.; BRANDELLI, A. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. **Food Control**. 37, 251-256, 2014.

PIENIZ, S., MOURA, T. M., CASSENEGO, A. V., ANDREAZZA, R., FRAZZON, A.G., CAMARGO, F. A. O., BRANDELLI, A. Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect. **Food Control**. 51:49-54, 2015.

PUFFAL, Júlia. **Investigação de genes de resistência a antimicrobianos e da capacidade de formação de biofilme em isolados de *Salmonella enteritidis***. 2013. 53pg. Mestrado - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; Porto Alegre.2013.

RAMIREZ, J.C.R.; ULLOA, P.R.; VELASQUEZ, G.; ULLOA, J.A.; ROMERO, F.A. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. **Revista Fuente**, Nayrit, v.2, n.7, 2011.

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

REID, G.; HAMMOND, J.A. Probiotics: some evidence of their effectiveness. **Canadian Family Physician**, v.51, p.1487-1493, 2005.

RENYE, J. A; SOMKUTI, G. A; PAUL, M.; HEKKEN, D. L. VAN. Characterization of antilisterial bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolates from Hispanic-style cheeses. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 261-8, 2009.

ROHDE, H., FRANKENBERGER, S., ZA"HRINGER, U., MACK, D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. **European journal of cell biology**, v. 89, n. 1, p. 103–11, jan. 2010.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências farmacêutica**, São Paulo, v.42, n.1, p.2-16, 2006.

SAITED, 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.

SANTOS, Veronica Soares dos. **Diversidade microbiana, suscetibilidade a antibióticos e fatores de virulência em *Enterococcus* spp.** 2012. 59pg. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Aplicada. Universidade de Lisboa Faculdade de Ciências Departamento de Biologia Vegetal. 59pg Lisboa, Portugal. 2012.

SANTOS, K. M. O.; VIEIRA, A. D. S.; SALLES, H. O.; OLIVEIRA, J. S.; ROCHA, C. R. C.; BORGES, M. F.; BRUNO, L. M.; FRANCO, B. D. G. M.; TODOROV, S. D. Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 46, p. 237-249, 2015.

SCHAECHTER, M., C. N. ENGLEBERG, I. B. EISENSTEIN, G. M. Mechanisms of microbial disease. **Ed. Lippincott, Williams & Wilkins**. 3th edition. 1999. SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; HOLZAPFEL, W. H. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 1289-1297, 2005.

SCHITTLER, Liziane. **Isolamento e caracterização fenotípica e molecular de bactérias ácido lácticas bacteriocinogênicas em leite in natura da Região oeste de Santa Catarina.** 2012. 92pg. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS. 2012.

SENGUN, I. Y.; NIELSEN, D. S.; KARAPINAR, M. Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. **International Journal of Food Microbiology**, v.135, p. 105-111, 2009.

SEHN, Carla Pohl. **Avaliação da atividade bacteriocinogênica e características probióticas do isolado *Lactobacillus curvatus* LC254 e da utilização da sua bacteriocina em filmes biodegradáveis.** 2015. 116 f. Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

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

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable foodbiopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, Turin, v. 121, n. 2, p. 123-138, 2008.

SHANKAR, N.; LOCKATELL, C. V.; BAGHDAYAN, A.S.; DRACHENBERG, C.; GILMORE, M. S.; JOHNSON, D. E.; Role of Enterococcus faecalis surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. **Infection and Immunity**. v.69, n.7, p. 4366-4372, 2001.

SIELADIE, D. V. et al. Probiotic Properties of Lactobacilli Strains Isolated From Raw Cow Milk in the Western Highlands of Cameroon. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 9, p. 12–28, 2011.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 317p.

SIMOVA, E. D.; BESHKOVA, D.B.; DIMITROV, Z. H. P. Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocinas produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p.692-701, 2009.

SOBRINO-LÓPEZ, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. **International Dairy Journal**, v.18, p.329-343, 2008.

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**. 40(2): 175–179, 2000.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos.** 2 ed. São Paulo: Atheneu, p.792, 1996.

- STROMPFOVÁ, V.; LAUKOVA, A.; SIMONOVA, M.; MARCIN, M. Occurrence of the structural enterocin A, P, B, L50B genes in enterococci of different origin. **Veterinary microbiology**, v.132, p.293-301, 2008.
- TODOROV, S. D.; REENEN, C. A. VAN; DICKS, L. M. T. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 149–157, 2004.
- TODOROV, S. D. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* e production, genetic organization and mode of action. A review. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 209-221, 2009.
- TODOROV, S.D., HO, P., VAZ-VELHO, M. DICKS, L.M.T. Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. **Meat Science**.v. 84, n. 3, p. 334–343, 2010.
- TODOROV, S.D., FURTADO, D.N., SAAD, S.M.I., TOME, E., FRANCO, B.D.G.M. Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 971–986, 2011.
- TODOROV, S. D.; LE BLANC, J. G.; FRANCO, B. D. G. M. Evaluation of the probiotic potential and effect of encapsulation on survival for *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 28, n, 3, p. 973-984, 2012.
- 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(5), p.631-636. 2011.
- WANG, S. Y.; CAMP, M. J.; EHLENFELDT, M. K. Antioxidant capacity and α -glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium* spp.) cultivars. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1759–1768, jun. 2012.
- WATERS, C. M.; BASSLER, B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v.21, p.319-46, 2005.

- VAN DEN BERGHE, E.; DE WINTER, T.; DE VUYST, L. Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature and pH dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. **International Journal of Food Microbiology**, v.107, p.159-170, 2006.
- VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics from Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18, p.714-728, 2008.
- VENTURA, M.; O'FLAHERTY, S.; CLAEISSON, M. J.; TURRONI, F.; KLAENHAMMER, T. R.; SINDEREN, D. V.; O'TOOLE, P. W. Genome-scale analyses of healthpromoting bacteria: probiogenomics. **Nature Reviews-Microbiology**, v.7, p.61-73, 2009.
- 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**, v. 36, p. 895-904, 2003.
- VUONG, C. KOCIANOVA, S., VOYICH, J. M., YAO, Y., FISCHER, E. R., A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 52, p. 54881-6, 24, 2004.
- YU, D. L.; ZHAO, T.; XUE, T.; SUN, B. L. ZHAO, T. *Staphylococcus aureus* autoinducer-2 quorum sensing decreases biofilm formation in a calcium-dependent manner. **BMC Microbiol**, London, v.12, p.288, 2012.
- 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.
- 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**, Northern Ireland, v.105, p.1266-1276, 2008.
- ZIEBUHR, W.; KRIMMER, V.; RACHID, S.; LOSSNER, I.; GOTZ, F.; HACKER, J.A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. **Molecular Microbiology**, v. 32, p. 345-56, 1999.

