



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

ANA BEATRIZ DE OLIVEIRA JERONYMO

**Avaliação do potencial probiótico de bactérias acidoláticas produtoras
de substância antimicrobiana isoladas de mussarela de búfala**

São José do Rio Preto
2013

ANA BEATRIZ DE OLIVEIRA JERONYMO

**Avaliação do potencial probiótico de bactérias acidoláticas produtoras
de substância antimicrobiana isoladas de mussarela de búfala**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Barretto Penna

São José do Rio Preto
2013

ANA BEATRIZ DE OLIVEIRA JERONYMO

**Avaliação do potencial probiótico de bactérias acidoláticas produtoras
de substância antimicrobiana isoladas de mussarela de búfala**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Barretto Penna
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Svetoslav Dimitrov Todorov
USP- São Paulo

Prof^ª. Dr^ª. Mara Corrêa Lelles Nogueira
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
18 de fevereiro de 2013

No fim tudo dá certo, se não deu certo
é porque ainda não chegou ao fim.

(Fernando Sabino)

Dedico este trabalho....

Aos meus pais Álvaro e Maria Auxiliadora, motivo do meu esforço para eu querer
sempre ser melhor.

Os meus mais sinceros agradecimentos ...

A Deus, pela sabedoria nas pequenas coisas, e por me proporcionar estas e tantas outras oportunidades enriquecedoras.

Aos amores da minha vida Álvaro, Maria Auxiliadora, Ana Paula, Ana Carolina, Ana Julia, Ana Cecília e Lisa pelo apoio e compreensão este tempo todo, e principalmente por me ajudar a realizar um sonho! Amo vocês e MUITO OBRIGADA por tudo!

Ao meu marido Felipe Ceneviva, pela paciência, pelos inúmeros conselhos e por estar sempre ao meu lado em todas as minhas decisões.

A todos os meus familiares pelo apoio e incentivo.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna, pela dedicação, confiança, paciência e apoio.

Às minhas queridas amigas Ana Cláudia e Natália pelos conselhos, companheirismo e ótimo convívio diário.

Às minhas amigas de laboratório Janaina, Aline, Vivian, Sabrina, Luana, Tatiane e Fernanda. Muito obrigada por todos os conselhos e por todos os momentos de descontração no laboratório.

À minha querida amiga Bia pela ajuda, conselhos e apoio em todas as fases da minha vida.

Ao Mathieu e Daniel pela realização dos experimentos e pelo companheirismo. Aos meus amigos da UNESP, Aline, Mariana, Felipe, Juliano, Thais e Simone pela parceria durante a realização do meu mestrado.

À Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco pelo apoio na realização de alguns experimentos e doação de cepas utilizadas neste trabalho.

À Profa. Dra. Mara Corrêa Lelles Nogueira pelas sugestões na minha qualificação e doação de cepas utilizadas neste trabalho.

Aos técnicos Luiz e Ginaldo pelo auxílio durante os experimentos.

Sumário

	Pág.
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. Bactérias acidoláticas: características e importância em alimentos	19
2.2. Substâncias antimicrobianas produzidas por BAL	21
2.2.1. Bacteriocinas	22
2.2.2. Aplicação de bacteriocinas em alimentos	26
2.3. <i>Listeria monocytogenes</i>	28
2.4. Propriedades de BAL probióticas	29
2.4.1. Resistência ao trato gastrointestinal (TGI)	31
2.4.2. Colonização do TGI	32
2.4.3. Resistência de BAL a drogas de diferentes classes	33
2.4.4. Segurança	34
3. OBJETIVOS	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1. Produção de substâncias antimicrobianas	39
4.1.1. Culturas de bactérias acidoláticas	39
4.1.2. Obtenção do sobrenadante livre de células (SLC)	39
4.1.3. Micro-organismos indicadores	40
4.1.4. Verificação da atividade inibitória do SLC.....	40
4.1.5. Diluição crítica	41
4.1.6. Identificação das cepas produtoras das substâncias antimicrobianas	43

4.1.7.	Avaliação da natureza das substâncias antimicrobianas	43
4.1.8.	Determinação da estabilidade das substâncias antimicrobianas em diferentes pH	44
4.1.9.	Determinação da estabilidade das substâncias antimicrobianas em diferentes temperaturas	45
4.1.10.	Determinação da estabilidade das substâncias antimicrobianas na presença de agentes químicos	45
4.1.11.	Determinação do efeito inibitório de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 pelas cepas 26 e 32 em diferentes matrizes	46
4.2.	Avaliação do potencial probiótico	47
4.2.1.	Sobrevivência das cepas de BAL durante a simulação das condições do TGI em diferentes matrizes	47
4.2.2.	Determinação do efeito de medicamentos	48
4.2.3.	Determinação de auto agregação e co-agregação.....	49
4.2.4.	Determinação de hidrofobicidade	50
4.2.5.	Avaliação da atividade da enzima β -galactosidase	51
4.2.6.	Pesquisa de genes associados à adesão na mucosa intestinal	51
4.2.7.	Pesquisa de genes associados a fatores de virulência, produção de aminas biogênicas e resistência a antibióticos	52
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1.	Produção de substâncias antimicrobianas	54
5.1.1.	Verificação da atividade inibitória do SLC e identificação dos isolados.....	54
5.1.2.	Natureza das substâncias antimicrobianas	57
5.1.3.	Estabilidade das substâncias antimicrobianas em diferentes pH	60
5.1.4.	Estabilidade das substâncias antimicrobianas em diferentes temperaturas.....	62
5.1.5.	Estabilidade das substâncias antimicrobianas na presença de. agentes químicos	64
5.1.6.	Efeito inibitório das cepas 26 e 32 sobre <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644 pelas em diferentes matrizes	65

5.2.	Potencial probiótico	68
5.2.1.	Sobrevivência ao trato gastrointestinal (TGI)	68
5.2.2.	Efeito de medicamentos	71
5.2.3.	Auto-agregação e co-agregação	79
5.2.4.	Hidrofobicidade	83
5.2.5.	Atividade da enzima β -galactosidase	84
5.2.6.	Genes associados a adesão (<i>mub</i> , <i>mapA</i> e EF-Tu)	85
5.2.7.	Genes associados a fatores de virulência, produção de aminas biogênicas e resistência a antibióticos	85
6.	CONCLUSÕES	88
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

LISTA DE TABELAS

	Pág.
1. Micro-organismos indicadores utilizados e meios de cultura.	42
2. <i>Primers</i> , temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos relacionados com genes de adesão a mucosa do intestino	52
3. <i>Primers</i> , temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos relacionados com genes de virulência, produção de aminas biogênicas e genes de resistência à vancomicina.	53
4. Relação do número de micro-organismos indicadores sensíveis à substância antimicrobiana e número total de micro-organismos testados.	58
5. SLC das cepas produtoras de substâncias antimicrobianas frente à <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644, <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090, <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19443 e <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> UCV10CET, usando o método “ <i>Spot-on-the-lawn</i> ” com diluição crítica.	59
6. Efeito das enzimas na atividade antimicrobiana (UA/mL) do SLC das cepas 26 e 32.	60
7. Efeito do valor de pH na atividade antimicrobiana (UA/mL) do SLC das Cepas 26 e 32.	61
8. Efeito da temperatura na atividade antimicrobiana (UA/mL) do SLC da Cepa 26.	62
9. Efeito da temperatura na atividade antimicrobiana (UA/mL) do SLC da Cepa 32.	63
10. Efeito de diferentes agentes químicos na atividade antimicrobiana (UA/mL) no SLC das cepas 26 e 32.	65
11. População de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 (log UFC/mL) estocadas em leite UHT integral e desnatado na presença de BAL produtoras de bacteriocinas.	66
12. População de BAL (log UFC/mL) das cepas 13, 24, 28 e 32 após a simulação <i>in vitro</i> do trato gastrointestinal.	70

13.	Efeito de medicamentos comerciais no crescimento das cepas de BAL (13, 24, 28 e 32).	73
14.	Resistência das cepas 13, 24, 28 e 32 aos antibióticos. Halos de inibição em milímetros.	79
15.	Verificação da presença de genes de adesão à mucosa.	85
16.	Verificação da presença de genes associados à virulência, resistência a antibióticos e aminas biogênicas.	87

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
1. Agregação das cepas 13, 24, 28 e 32, <i>Lc. mesenteroides</i> UCV10CET, <i>E. faecalis</i> ATCC 19443, <i>L. innocua</i> ATCC 33090 e <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 a 4°C.	82
2. Agregação das cepas 13, 24, 28 e 32, <i>Lc. mesenteroides</i> UCV10CET, <i>E. faecalis</i> ATCC 19443, <i>L. innocua</i> ATCC 33090 e <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 a 37°C.	82
3. Agregação das cepas 13, 24, 28 e 32, <i>Lc. mesenteroides</i> UCV10CET, <i>E. faecalis</i> ATCC 19443, <i>L. innocua</i> ATCC 33090 e <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 a 42°C.	83

RESUMO

As bactérias acidoláticas (BAL) constituem um grupo de micro-organismos heterogêneos Gram positivos, catalase negativos, anaeróbios facultativos e produtores de ácido láctico. Estas bactérias têm despertado grande interesse na indústria de alimentos devido à produção de substâncias antimicrobianas, tais como as bacteriocinas. Estas substâncias têm a capacidade de reduzir a contaminação por patógenos e deteriorantes em alimentos, resultando em produtos com maior vida de prateleira. Outra característica importante presente em algumas linhagens de BAL é apresentar efeitos benéficos aos consumidores. O objetivo desse trabalho foi avaliar a produção de substâncias antimicrobianas por 38 cepas de BAL isoladas de mussarela de búfala, caracterizar as bacteriocinas quanto ao espectro de ação, estabilidade em diferentes pH, estabilidade térmica e resistência a agentes químicos. Para as cepas produtoras de bacteriocina também foi avaliado o efeito inibitório de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 em leite UHT integral e leite UHT desnatado, e avaliar o potencial probiótico. Das trinta e oito cepas de BAL isoladas de mussarela de búfala, oito foram produtoras de substância antimicrobiana. Essas cepas foram identificadas como: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (cepa 13), *Lactobacillus casei* (cepa 24), *Leuconostoc citreum* (cepa 28) e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (cepas 26, 30 e 32). O estudo da natureza do composto confirmou que os compostos microbianos são bacteriocinas. As bacteriocinas produzidas pelas cepas 26 e 32 não foram afetadas pelo calor, extremos de pH e diferentes detergentes. As cepas 26 e 32 reduziram a população do micro-organismo patogênico *L. monocytogenes* ATCC 7644 quando inoculadas em leite UHT integral e leite UHT desnatado, apresentando um efeito bacteriostático. As cepas 13, 24, 28 e 32 apresentaram sobrevivência ao trato gastrointestinal quando inoculadas em MRS, leite UHT integral e leite UHT desnatado. As cepas foram inibidas por drogas de diferentes classes, por exemplo, anti-inflamatórios, anti-histamínicos, anti-hipertensivos e antibióticos. Entretanto, obtiveram ótimos resultados de auto-agregação, co-agregação e hidrofobicidade. A produção da enzima β -galactosidase foi observada nas cepas 13, 24 e 32, e somente a 13 e 24 apresentaram o gene de adesão à mucosa (EF-Tu). Somente a cepa 13 não apresentou nenhum dos fatores genéticos de virulência, sendo considerada a cepa de maior potencial probiótico entre as BAL estudadas.

Palavras chaves: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, preservação dos alimentos, bacteriocinas, probióticos.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria (LAB) are a heterogeneous group of Gram-positive microorganisms, catalase negative, facultative anaerobes and lactic acid producers. These bacteria have attracted great attention from the food industry due to the production of antimicrobial substances such as bacteriocins. These substances have the ability to reduce food spoilage and contamination by pathogens, resulting in products with longer shelf life. Another important feature present in some strains of LAB is to provide benefits to consumers. The aim of this study is to evaluate the production of antimicrobial substances by 38 LAB strains isolated from water-buffalo mozzarella cheese, and characterize the spectrum of activity of the bacteriocins, stability at different pH values, thermal stability and its resistance to chemicals. The bacteriocin-producing strains were also evaluated regarding the inhibitory effect on *L. monocytogenes* ATCC 7644 in UHT whole milk and UHT skim milk, and the probiotic properties. Six of the thirty-eight strains of LAB isolated from water-buffalo mozzarella cheese produced antimicrobial substances. These strains were identified as *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (strain 13), *Lactobacillus casei* (strain 24), *Leuconostoc citreum* (strain 28) and *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (strains 26, 30 and 32). The study of the nature of the antimicrobial compounds confirmed that they are bacteriocins. The bacteriocins produced by strains 26 and 32 were not affected by heat, extreme pH and different detergents. Strains 26 and 32 reduced the pathogenic microorganism *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 population when inoculated in UHT whole and UHT skim milk, presenting a bacteriostatic effect. Strains 13, 24, 28 and 32 survived during the passage through the simulated gastrointestinal tract when inoculated into MRS, UHT whole milk and UHT skim milk. The strains were inhibited by different classes of drugs, for example, anti-inflammatory, antihistaminic, antihypertensives, and antibiotics. However, excellent results were obtained regarding self-aggregation, co-aggregation and hydrophobicity. The β -galactosidase enzyme production was observed in the strains 13, 24 and 32 but only 13 and 24 presented the elongation factor Tu gene (EF-Tu). Only strain 13 did not show genes encoding virulence factor, being considered the strain with the greatest probiotic potential among the studied LAB.

Keywords: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, bacteriocins, food preservation, probiotics.

1. INTRODUÇÃO

As bactérias acidoláticas (BAL) são utilizadas há séculos na produção de uma variedade de produtos lácteos fermentados. Além disso, as BAL são utilizadas para a conservação de alimentos devido à produção de metabólitos antimicrobianos, tais como peróxido de hidrogênio, ácido láctico, ácido acético, diacetil e bacteriocinas. A utilização de bacteriocinas como bioconservantes em alimentos tem sido estudada extensivamente, uma vez que são eficazes no controle de micro-organismos patogênicos e deteriorantes (SULLIVAN; ROSS; HILL, 2002).

A bioconservação constitui uma forma natural de controlar o desenvolvimento microbiano devido ao seu potencial como substituto natural dos conservantes químicos. Nas indústrias de alimentos, a bioconservação pode ser utilizada juntamente com as boas práticas de fabricação e higienização para evitar o crescimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes (MATAGARAS; DORSINOS; METAXOPOULOS, 2003; THERON; LUES, 2007; GILLOR; ETZION; RILEY, 2008; NASCIMENTO; MORENO; KUAYE, 2008a).

Algumas cepas bacterianas, além de produzirem metabólitos antimicrobianos, possuem propriedades probióticas. Probióticos são micro-organismos vivos que trazem efeitos benéficos ao hospedeiro quando administrados adequadamente. As bactérias a serem utilizadas em preparações probióticas devem ser reconhecidas como substâncias seguras - GRAS (*Generally Recognized as Safe*) e serem capazes de ultrapassar as barreiras presentes no trato gastrointestinal (TGI) para alcançar seu local de ação e exercerem seu papel. Além disso, as linhagens probióticas devem possuir características positivas, tais como: resistência tanto à acidez gástrica como a toxicidade da bile presente no intestino, capacidade de colonizar o trato gastrointestinal, inibir patógenos

intestinais, e estimular o sistema imunológico (FAO/WHO, 2001; VIMALA; DILLEP, 2006; SANCHEZ, et al. 2009; SAAD, 2006).

A produção de substâncias antimicrobianas pode aumentar as chances de uma bactéria probiótica sobreviver na competição encontrada no trato gastrointestinal. De acordo com O'Flaherty; Klaenhammer (2010), há fortes evidências em estudos realizados *in vitro* demonstrando que as bactérias probióticas são capazes de utilizar os efeitos antimicrobianos *in vivo*.

Atualmente, as indústrias de alimentos enfrentam o grande desafio de atender a demanda dos consumidores por alimentos seguros, com efeitos benéficos ou probióticos, com longa vida de prateleira, que sejam minimamente processados e produzidos sem conservantes químicos. Desta forma, o uso de compostos antimicrobianos produzidos por BAL probióticas pode proporcionar essas características ao alimento, sendo uma opção tecnológica atraente em substituição ao uso de aditivos, além de trazer benefícios ao consumidor, tais como intolerância a lactose, redução do colesterol sérico, melhora do equilíbrio do TGI, redução na incidência de alergias, melhora da saúde do trato urogenital e estímulo do sistema imunológico pelo aumento da quantidade de anticorpos IgA (COTTER; HILL; ROSS, 2005; GÁLVEZ et al., 2008; GILLOR; ETZION; RILEY, 2008; CHIEN et al, 2010).

Neste sentido é importante avaliar a produção de substâncias antimicrobianas por cepas de BAL isoladas de produtos lácteos fermentados e caracterizar as bacteriocinas quanto ao espectro de ação, estabilidade em diferentes pH, estabilidade térmica e resistência a agentes químicos. Também é necessário avaliar o potencial probiótico de cepas de BAL em diferentes matrizes alimentícias.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Bactérias acidoláticas: características e importância em alimentos

As bactérias acidoláticas (BAL) compreendem um grupo de micro-organismos com diversas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas semelhantes. Estas bactérias são Gram-positivas, apresentam a forma de cocos ou bacilos, não formam esporos, são anaeróbias facultativas ou microaerófilas, fastidiosas, ácidos tolerantes, e produzem ácido lático como o principal produto da fermentação dos carboidratos. Estes micro-organismos são catalase negativos (com exceção de alguns *Pediococcus* e *Lactobacillus*, que produzem pseudo-catalase) e se reproduzem por fissão binária (FERREIRA, 2003; SALMINEN; VON WRIGHT; OUWEHAND, 2004; WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006).

A maioria das BAL pertence ao gênero *Lactobacillus*. Estas estão presentes na natureza, particularmente em ambientes ricos em nutrientes, incluindo silagens, vegetais fermentados e também fazem parte da microbiota autóctone da cavidade oral, vagina e trato digestório do homem e animais, onde exercem influência benéfica. Além do gênero *Lactobacillus*, as BAL incluem membros dos gêneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. As BAL podem ser mesófilas ou termófilas, com temperaturas ótimas de multiplicação variando de 30 a 37°C e 45 a 50°C, respectivamente (HOLZAPFEL; GEISEN; SCHILLINGER, 1995; FORSYTHE, 2002; SALMINEN; VON WRIGHT; OUWEHAND, 2004; MERK; BORELLI; KORTING, 2005; CHERIGUENE et al., 2007).

A classificação das bactérias lácticas em diferentes gêneros é baseada na: i) morfologia, ii) multiplicação em diferentes temperaturas, iii) configuração do ácido

lático produzido, iv) modo de fermentação da glicose, v) capacidade de multiplicação em altas concentrações salinas e vi) tolerância às condições ácidas e básicas. Além disso, a taxonomia atual das BAL também leva em conta a relação filogenética entre os diferentes micro-organismos desse grupo, elucidada através do sequenciamento do RNA ribossômico (HOLZAPFEL et al., 2001).

De acordo com o produto final da fermentação, as bactérias lácticas se dividem em dois grupos: as homofermentativas e as heterofermentativas. O grupo das bactérias homofermentativas abrange os gêneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e alguns *Lactobacillus*, que utilizam a via Embden-Meyerhof (glicolítica) para transformar os carboidratos principalmente em ácido lático. Por outro lado, as bactérias heterofermentativas utilizam a via da fosfoacetolase para produzir além do ácido lático, CO₂, etanol, acetato e citrato a partir da glicose. Os membros desse grupo incluem *Leuconostoc*, *Weissella* e alguns *Lactobacillus* (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; FORSYTHE, 2002; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

As BAL desempenham um papel essencial na maioria dos alimentos fermentados, e uma ampla variedade de cepas são rotineiramente utilizadas na produção de derivados lácteos, cárneos, de vegetais e produtos de panificação. Além da importância de inibir micro-organismos patogênicos e deteriorantes, esse grupo de bactérias também auxilia na melhora da textura e das propriedades sensoriais dos alimentos (RAY; DAESCHEL, 1992; FONDÉN et al., 2000; D'SOUZA et al., 2002). Por estes motivos, nas indústrias de alimentos a adição de cepas de BAL ou subprodutos dessas bactérias está sendo muito utilizada na bioconservação dos produtos (GARCIA et al., 2004; KYUNGWHA; AZLIN, 2007).

A maioria das linhagens de BAL usadas em alimentos não tem potencial patogênico, com exceção de *Streptococcus* e *Enterococcus*, que podem ser patógenos

oportunistas. Pela produção de substâncias antimicrobianas, as BAL criam um microambiente desfavorável a diversos micro-organismos, inclusive aqueles com potencial patogênico, sendo esta característica a base de inúmeros métodos de conservação de alimentos por fermentação. As condições ácidas do meio melhoram a competitividade das BAL, que apresentam maior tolerância ao baixo pH extra e intracelular, comparado às demais bactérias (COLLINS; THORNTON; SULLIVAN, 1998; LEE et al., 1999; GUCHTE et al., 2002).

2.2. Substâncias antimicrobianas produzidas por BAL

As BAL têm a capacidade de inibir o crescimento e a produção de toxinas em várias espécies bacterianas. Essa inibição decorre de uma gama de metabólitos produzidos por essas bactérias, denominados substâncias antimicrobianas, incluindo os ácidos orgânicos (lático, acético, propiônico, entre outros), o peróxido de hidrogênio, o diacetil e as bacteriocinas (KLAENHAMMER, 1993; DEEGAN et al., 2006; GÁLVEZ et al., 2009).

Segundo Guchte et al. (2002), a produção de ácidos orgânicos pela fermentação da glicose diminui o pH do alimento, e inibe o desenvolvimento de bactérias patogênicas ou deteriorantes, que na maioria das vezes não são capazes de crescer em baixos valores de pHs, mantendo a boa qualidade dos alimentos fermentados.

O peróxido de hidrogênio é produzido por diversos processos metabólicos, podendo ser acumulado na falta da enzima catalase. O peróxido de hidrogênio produzido por BAL pode participar do sistema lactoperoxidase, um fator antibacteriano natural do leite cru. Entretanto, para ativação desse sistema são necessários três componentes: peróxido de hidrogênio, a enzima lactoperoxidase e o tiocianato (naturalmente presente no leite). O tiocianato é oxidado pelo peróxido de hidrogênio,

catalisado pela enzima lactoperoxidase (também naturalmente presente no leite), formando ácido hipotiocianico (HOSCN) e hipotiocianato (HSCN⁻), conhecidos como compostos antimicrobianos (FORSYTHE, 2002).

O diacetil é um composto que confere aroma à manteiga, e também tem propriedades antimicrobianas. Segundo Jay (2005), a quantidade necessária desse composto no alimento é de 200 mg/mL para inibição das leveduras e bactérias Gram-negativas e de 300 mg/mL para a inibição de bactérias Gram-positivas.

2.2.1 Bacteriocinas

Bacteriocinas produzidas por BAL são pequenos peptídeos catiônicos, termoestáveis, sintetizados nos ribossomos das bactérias e que possuem atividade antimicrobiana, não atuando contra as bactérias que as produzem, e que apresentam atividade principalmente sobre bactérias Gram-positivas, dentre as quais estão importantes patógenos veiculados por alimentos, tais como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (HERNÁNDEZ; CARDELLE; ZÁRATE, 2005; DEEGAN et al., 2006, GÁLVEZ et al., 2009).

As bacteriocinas foram identificadas pela primeira vez pelo cientista Gratia em 1925 em culturas de *Escherichia coli*, produtoras de colicina. Entretanto, somente em 1928 foi identificada a primeira bacteriocina produzida por uma bactéria do grupo das BAL, a nisina (COTTER; HILL; ROSS, 2005).

A família das bacteriocinas inclui uma diversidade de proteínas classificadas quanto ao: i) tamanho, ii) alvo microbiano, iii) modo de ação e iv) mecanismos de imunidade, sendo dividida em bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas e bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-negativas (GORDON; OLIVER; LITTLEFIELD-WYER, 2007; HENG et al., 2007).

Na literatura estão citadas classificações de bacteriocinas elaboradas por Klaenhammer (1993), Cotter; Hill e Ross (2005), Heng et al. (2007) e Zouhir, Hammami e Hamida (2010).

Baseado na sua estrutura primária, massa molecular, estabilidade ao aquecimento e organização molecular, a proposta de classificação das bacteriocinas mais consistente foi realizada por Heng et al. (2007). Os autores agruparam as bacteriocinas produzidas pelas bactérias Gram-positivas em quatro classes: Classe I é formada por peptídeos lantibióticos (que possuem o aminoácido lantionina (Lan) em sua estrutura, subdivididos em três grupos: a) bacteriocinas com estrutura linear, b) bacteriocinas com estrutura globular, c) bacteriocinas formadas por mais de um componente; Classe II é formada por peptídeos não modificados (não lantibióticos e não cíclicos), de peso molecular inferior a 10 kDa, também subdivididos em três grupos: a) bacteriocinas ativas frente a *Listeria monocytogenes*, b) bacteriocinas multi-componentes, que precisam de dois ou mais peptídeos para serem ativas, c) bacteriocinas variadas, de baixo peso molecular e que não se enquadrarem em a e b; Classe III é formada por peptídeos de peso molecular superior a 10 kDa, subdivididas em a) peptídeos que agem causando lise celular, b) bacteriocinas de alto peso molecular que inibem as células alvo por outros meios que diferem da lise celular, e a Classe IV é formada por proteínas cíclicas.

Entretanto, Zouhir, Hammami e Hamida (2010) observaram as similaridades estruturais de algumas bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas. Os autores concluíram que diversas bacteriocinas apresentaram classificações incoerentes, pois entre 107 bacteriocinas estudadas, 20 apresentaram ao mesmo tempo mais de uma classe ou subclasse. Com isso, estes autores classificaram as bacteriocinas em 12 grupos, com base na sequência de aminoácidos.

Os genes produtores das bacteriocinas são muitas vezes organizados em operons compostos por quatro genes, que podem ser localizados no cromossomo, em plasmídeos ou transposons. Esses genes incluem os seguintes subtipos: i) gene estrutural responsável pela síntese do pré-peptídeo ou pré-bacteriocina, ii) gene de imunidade, iii) gene que codifica um transportador ABC que libera a bacteriocina e iv) gene que codifica uma proteína que não está envolvida no sistema ABC e é essencial para a excreção da bacteriocina (KLAENHAMMER, 1993; NES et al., 1996).

A produção de bacteriocinas ainda não está bem compreendida, mas um dos possíveis fatores está relacionado com a competição entre micro-organismos pelas mesmas fontes de nutrientes, permitindo à célula produtora dominar e se estabelecer em um dado nicho ecológico. Acredita-se que o mecanismo de produção de bacteriocinas seja regulado por *sensor de quorum*, no qual as células presentes no ambiente produzem moléculas sinais (autoindutoras) em função da densidade populacional. Quando a concentração celular do micro-organismo produtor excede um limiar, a expressão dos genes desse micro-organismo é induzida a produzir e liberar o composto antimicrobiano no meio extracelular, podendo atuar no micro-organismo alvo (EIJSSINK et al., 2002; TUROVSKIY et al., 2007).

As bacteriocinas geralmente exercem a sua atividade antimicrobiana na parede celular ou na membrana celular dos organismos-alvo, quer por inibição da biossíntese da parede celular ou na formação de poros, resultando em morte. A consequência da formação de poros é a dissipação da força protônica (PMF) que está envolvida diretamente com a síntese de ATP, fosforilação de proteínas, síntese e rotação dos flagelos e transporte de proteínas. Entretanto, estudos mostraram que as bacteriocinas podem inibir também a síntese dos ácidos nucleicos e de proteínas, e até mesmo inibir a

atividade enzimática (BRUNO; MONTVILLE, 1993; SULLIVAN; ROSS; HILL, 2002; BROGDEN, 2005).

As bacteriocinas produzidas por BAL possuem várias propriedades que as tornam adequadas para aplicações biotecnológicas: i) geralmente são reconhecidas como substâncias seguras - GRAS, ii) não são ativas e tóxicas em células eucarióticas, iii) são inativadas por proteases digestivas, tendo pouca influência sobre a microbiota intestinal, iv) são tolerantes aos extremos de pH e calor, v) têm um espectro antimicrobiano relativamente amplo contra muitas bactérias patogênicas e deteriorantes de origem alimentar, e vi) têm o modo de ação bactericida ou bacteriostático, normalmente agindo sobre a membrana citoplasmática, sem resistência cruzada com antibióticos (GÁLVEZ et al.; 2007; TODOROV, 2009a).

A aplicação de bacteriocinas em alimentos já obteve bons resultados. Diversos estudos relatam a inibição de *Listeria* sp. e *Staphylococcus aureus*. Recentemente, Reis et al. (2012) elaboraram uma revisão sobre os compostos antimicrobianos produzidos por BAL e suas aplicações em alimentos. Os autores mostraram que o uso de BAL em produtos lácteos e cárneos para a conservação de alimentos pode melhorar a otimização e a garantia de qualidade dos produtos alimentícios, e ao mesmo tempo, reter a qualidade sensorial dos produtos, tais como a cor, sabor, textura e valor nutricional.

A bacteriocina nomeada enterocina produzida por uma cepa de *Enterococcus faecium* inibiu *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* (JAVED et al., 2010). A bacteriocina produzida por *Lactobacillus sakei* inibiu uma cepa de *Listeria monocytogenes* (CARVALHO et al., 2010).

Castro et al. (2011) obtiveram a inibição da *Listeria innocua* e *Staphylococcus aureus* por cepas de *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus sakei* produtoras de bacteriocinas. Bacteriocinas produzidas por cepas de *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus*

lactis e *Leuconostoc lactis* inibiram uma cepa de *Staphylococcus aureus* (LUO et al., 2011).

Parada et al. (2007) relatam a inibição de *Listeria monocytogenes* por cepas de *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc gelidum*. Masuda et al. (2011) isolaram de pickles japonês uma cepa de *Lc. mesenteroides* TK41401 que inibiram cepas de *Bacillus coagulans*.

2.2.2. Aplicação de bacteriocinas em alimentos

A nisina foi a primeira bacteriocina comercializada, sendo produzida por uma cepa de *Lactococcus lactis*, cujo nome é derivado do termo "N-inhibitory substances" (NiS) adicionado do sufixo INA. Esse peptídeo exerce ação através da formação de poros na membrana celular resultando em perda do material citoplasmático. Hoje, a bacteriocina pediocina PA1/AcH produzida por uma cepa de *Pediococcus pentosaceus* também é utilizada na conservação de alimentos (CLEVELAND et al., 2001; DEVI; HALAMI, 2011).

Nas duas últimas décadas, vários trabalhos relataram BAL produtoras de bacteriocinas isoladas de diferentes produtos fermentados, tais como vegetais, frutas, queijo, carne e peixe (TODOROV, 2009a; PINGITORE et al., 2012; BISCOLA et al., 2013).

A maioria dos estudos realizados indica claramente que a aplicação de bacteriocinas na conservação de alimentos pode oferecer vários benefícios, como: i) vida de prateleira prolongada, ii) proteção extra durante o armazenamento em temperaturas inadequadas; iii) redução do risco de transmissão de patógenos através da cadeia alimentar; iv) redução das perdas econômicas devido à deterioração dos alimentos; v) redução da utilização de conservantes químicos; vi) diminuição da

aplicação de tratamentos térmicos agressivos, sem comprometer a segurança dos alimentos; vii) melhora na conservação de nutrientes e vitaminas, assim como nas propriedades sensoriais dos alimentos; vii) permitem a comercialização de alimentos inovadores (menos ácidos, com um menor teor de sal, e com um maior teor de água) e viii) conseguem satisfazer as demandas industriais e também dos consumidores (FRANZ; HOLZAPFEL, 2004; GÁLVEZ et al., 2007).

As bacteriocinas podem ser aplicadas nos alimentos através de três formas: i) usar um preparado de bacteriocinas purificadas ou semi-purificadas como um ingrediente do alimento; ii) utilizar as culturas produtoras de bacteriocinas diretamente no alimento como cultura *starter* e iii) incorporar um ingrediente previamente fermentado com um bactéria produtora de bacteriocina. As últimas alternativas não necessitam de aprovação legal, porém a bacteriocina purificada necessita, pois nessa forma ela deve ser rotulada como aditivo. Segundo a legislação brasileira de produtos lácteos, há permissão do uso de nisina na dose de 12,5 mg/kg em queijos fundidos, requeijões e queijos pasteurizados (BRASIL, 1997; DEEGAN; COTTER; HILL, 2006).

Diversos fatores podem afetar a atividade das bacteriocinas nos alimentos, como por exemplo: i) ligação das bacteriocinas aos componentes do alimento; ii) inativação das bacteriocinas por proteases; iii) mudanças na parede ou na membrana celular dos micro-organismos alvo, como resposta a fatores ambientais; iv) mudança na solubilidade e na carga eletrostática das bacteriocinas; v) concentração de cloreto de sódio e vi) pH inicial e temperatura da amostra (GÄNZLE; WEBER; HAMMES, 1999; DELGADO et al., 2007).

Dependendo da sua natureza, as bacteriocinas podem agir como bactericidas ou bacteriostáticas. Com isso, nos últimos anos, têm sido realizadas muitas pesquisas com diferentes concentrações de bacteriocinas, com a finalidade de desenvolver aplicações

ideais para alimentos, as quais poderão ser utilizadas industrialmente. Com isso, dependendo das matérias-primas utilizadas, das condições de processamento, distribuição e armazenamento, os diferentes tipos de alimentos podem favorecer a multiplicação de bactérias, resultando na deterioração do alimento ou mesmo uma toxinfecção alimentar. Portanto, a eficácia da ação das bacteriocinas a serem utilizadas pelas indústrias depende de uma cuidadosa verificação do processo de produção do alimento e da atuação na bactéria alvo (BRUNO; MONTVILLE, 1993; GALVÉZ et al., 2008).

2.3. *Listeria monocytogenes*

O micro-organismo *Listeria monocytogenes* é um patógeno que causa uma doença conhecida como listeriose. *L. monocytogenes* infecta principalmente indivíduos mais susceptíveis a doenças, tais como grávidas, idosos, recém-nascidos e adultos imunocomprometidos. A infecção por este micro-organismo pode causar aborto, doenças gastrointestinais ou septicemia e, na maioria das vezes leva a morte o indivíduo infectado (DOGANAY, 2003; ORNDORFF et al., 2006).

Listeria monocytogenes tem sido detectado em alimentos em diversos países, podendo ser encontrado em leite cru e pasteurizado, queijos, carne bovina, suína, aves, peixes, embutidos, derivados cárneos crus e termo-processados, além de refeições preparadas para consumo imediato. Na indústria de alimentos, o controle deste patógeno é um desafio devido à grande ocorrência e à capacidade desse micro-organismo de sobreviver em lugares hostis. Além disso, a capacidade do desenvolvimento em baixas temperaturas aumenta o risco do enriquecimento seletivo do patógeno durante o armazenamento (LIANOU; SOFOS, 2007; GANDHI; CHIKINDAS, 2007; FREITAG; PORT; MINER, 2009).

2.4. Propriedades de BAL probióticas

Probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, podem trazer benefícios para a saúde do hospedeiro. Vários micro-organismos são usados como probióticos, entre eles BAL, bactérias não ácido-láticas e leveduras. As cepas de BAL probióticas reconhecidas pela legislação brasileira são *L. acidophilus*, *L. casei* Shirota, *L. casei* var. *defensis*, *L. casei* var. *rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. lactis* e *E. faecium*. As principais cepas encontradas em alimentos são *L. rhamnosus* GG (Valio), *L. casei* Shirota (Yakult); *L. acidophilus* NCFM (Rhodia) e La-5 e Lc-1 (Chr. Hansen) (FAO/WHO, 2001; SANDERS, 2003; BRASIL, 2008; REIS et al., 2011).

Para garantir um efeito consistente, os probióticos devem ser utilizados em condições adequadas (incluindo dose e tempo de utilização). A recomendação de micro-organismos viáveis que devem ser ingeridos é baseada na porção diária do produto pronto para consumo, sendo o mínimo estipulado de 10^8 a 10^9 UFC por grama ou mililitro ao dia (SAAD, 2006; BRASIL, 2008).

Os melhores exemplos conhecidos de matrizes alimentares contendo bactérias probióticas são os leites fermentados e iogurtes, que geralmente devem ser consumidos em dias ou semanas após a produção, sendo melhores que outros produtos de origem animal, tais como queijo e sorvete (NAGPAL et al., 2007; CRUZ et al., 2009a; CRUZ et al., 2009b).

Os benefícios atribuídos aos probióticos podem incluir: i) atenuação de reações alérgicas; ii) aumento da biodisponibilidade de determinados nutrientes; iii) redução da concentração do colesterol sérico; iv) melhora da saúde do trato urogenital; v) aumento da quantidade de anticorpos IgA circulantes; vi) bloqueio da adesão de bactérias patogênicas a tecidos epiteliais; vii) tratamento de doenças inflamatórias intestinais,

como a síndrome do intestino irritado; viii) constipação intestinal; ix) tratamento de câncer no intestino e x) controle de infecções orais (HART et al., 2004; GALDEANO; PERDIGÓN, 2005; SAULNIER; GIBSON; KOLIDA, 2008; VANDERPOOL; YAN; POLK, 2008; REIS et al., 2011; CHIANG; PAN, 2012).

Outro benefício atribuído às bactérias probióticas é o alívio dos sintomas da intolerância à lactose, pois essas bactérias lácticas presentes em produtos probióticos produzem a enzima β -D-galactosidase, responsável pela hidrólise da lactose em glicose e galactose, resultando em menor teor de lactose nos produtos fermentados e no intestino dos humanos (GHEYTANCHI et al., 2010).

A resistência ao suco gástrico e à bile estão entre os testes frequentemente sugeridos para avaliação do potencial probiótico de uma cepa bacteriana. Para apresentar potencial probiótico o micro-organismo deve ser: i) inócuo; ii) manter-se viável por longo tempo durante a estocagem e transporte; iii) tolerar o baixo pH do suco gástrico; iv) resistir a ação da bile e das secreções pancreáticas e intestinais; v) não transportar genes transmissores de resistência aos antibióticos; vi) resistir a fagos e vii) sobreviver em baixa concentração de oxigênio (SCHILLINGER; GUIGAS; HOLZAPFEL, 2005; MATHARA et al., 2008; RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

2.4.1. Resistência ao trato gastrointestinal (TGI)

A sobrevivência de bactérias probióticas no trato gastrointestinal de humanos ou animais é um processo complexo e envolve a disponibilidade de nutrientes, tipo de dieta, interações com as bactérias autóctones no TGI, propriedades de adesão, características de auto-agregação e co-agregação (TODOROV et al., 2011a).

As BAL são submetidas a condições adversas, quando expostas ao suco gástrico, enzimas digestivas e sais biliares. O baixo pH do estômago e a ação antimicrobiana da pepsina são conhecidos por proporcionar uma barreira contra a entrada de bactérias no trato intestinal. O pH do estômago, em geral, encontra-se entre 2,5 e 3,5. Com isso, valores de pH de 1 a 5 têm sido utilizados para análises *in vitro* simulando a fase gástrica (CHARTERIS et al., 1998; HOLZAPFEL et al., 1998; LISERRE; RE; FRANCO, 2007; KONG; SINGH, 2008; BURITI; CASTRO; SAAD, 2010; TODOROV et al., 2011a).

O duodeno, no início do intestino delgado, também apresenta condições adversas às BAL, em virtude da presença de sais biliares. A concentração de 0,15- 0,3% de sais biliares têm sido recomendadas como adequada para seleção de bactéria probiótica, para uso em humanos (YANG; ADAMS, 2004; BEGLEY; GAHAN; HILL, 2005).

A perda intensa da viabilidade dos micro-organismos durante a passagem pelo trato gastrointestinal tem elevado a busca por novas estratégias para a manutenção da viabilidade. Entre elas, a seleção de cepas resistentes às condições do TGI, a adição de uma matriz alimentícia adequada, como o leite ou iogurte, e até mesmo a adição de prebióticos, que atuam estimulando seletivamente a atividade de algumas bactérias do cólon, ou ainda a utilização da microencapsulação dos probióticos, que tem sido sugerido como um método promissor para a sua proteção (KOS et al., 2000; KONG; SINGH, 2008; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

2.4.2. Colonização do TGI

As BAL com perfil probiótico após sobreviverem às condições adversas do TGI devem conseguir se aderir às células epiteliais do intestino, formando uma defesa contra

a colonização de micro-organismos patogênicos. A adesão dos patógenos à mucosa é inibida pela competição na adsorção ao muco ou às células epiteliais, mas em alguns casos, pode ser inibida pela produção de peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (REID; BURTON, 2002; GALDEANO et al., 2007).

A agregação é uma característica importante para a formação de biofilme pelas bactérias probióticas, auxiliando-as na aderência a mucosa intestinal de humanos e animais. No entanto, a co-agregação entre as BAL e outras bactérias como *Listeria monocytogenes*, pode ser considerada uma característica positiva, pois é um dos passos para eliminar os micro-organismos patogênicos do TGI (TODOROV; DICKS, 2008b).

A agregação e co-agregação são específicas de cada cepa e provavelmente envolve proteínas com funções específicas, tais como ligação ao muco, agregação e adesão intracelular. *Lactobacillus plantarum* tem um número de genes codificantes de proteínas que podem reconhecer ou ligar aos componentes do ambiente (KLEEREBEZEM et al., 2010).

A hidrofobicidade celular é a interação inespecífica entre as cepas bacterianas e as células do hospedeiro. A interação inicial pode ser fraca, muitas vezes reversível, seguidas por processos envolvendo adesão mediada por mecanismos mais específicos envolvendo as proteínas da superfície celular e os ácidos lipoteicóicos. As bactérias com elevada hidrofobicidade geralmente apresentam fortes interações com as células da mucosa do hospedeiro (ROJAS; ASCENCIO; CONWAY, 2002; ROSS; JONSSON, 2002).

A hidrofobicidade pode ajudar a célula no processo de adesão, mas não é um pré-requisito para a bactéria conseguir uma forte adesão. Além disso, a hidrofobicidade varia geneticamente entre as cepas da mesma espécie. Um possível mecanismo para a aderência das bactérias probióticas e colonização no hospedeiro envolve a ligação de

células da superfície dos micro-organismos com a camada do muco protetor que recobre as células epiteliais no TGI. Essas cepas produzem proteínas específicas para a adesão, tais como a fibrinectina (*Fbp*), proteína de ligação do colágeno (*CnBP*), proteína de ligação ao muco (*mub*), proteína que promove a adesão ao muco (*mapA*) e o fator de alongação (EF-Tu). Entretanto, atualmente, as proteínas de maior interesse para a adesão de bactérias probióticas nas células intestinais são *mub*, *mapA* e EF-Tu. O estudo genético da produção dessas proteínas é importante para avaliar a capacidade de colonização no TGI (SCHAR-ZAMMARETTI; UBBINK, 2003; KLEEREBEZEM et al., 2010; DUARY; BATISH; GROVER, 2012).

2.4.3. Resistência de BAL a drogas de diferentes classes

A capacidade de uma bactéria resistir à exposição aos antimicrobianos pode representar uma ameaça à saúde humana e animal, portanto é uma característica importante que precisa ser avaliada. A resistência a um antibiótico pode ser inerente a uma espécie bacteriana ou gênero (resistência intrínseca) ou adquirida por mutação ou aquisição de genes (DANIELSEN; WIND, 2003; COCCONCELLI; CATIVELLI; GAZZOLA, 2004; TENOVER, 2006; AMMOR; FLORES; MAYO, 2007; TOOMEY et al., 2009).

Existe uma grande preocupação em relação à BAL resistentes aos antibióticos, pois a presença dessa bactéria nos alimentos e no trato gastrointestinal (TGI) humano pode agir como reservatório de genes de resistência aos antibióticos e transferir esses genes para bactérias presentes no ambiente do TGI, tornando-as multirresistentes. Por exemplo, cepas de *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp. e *Pediococcus* sp. têm elevada resistência à vancomicina, e alguns *Lactobacillus* sp. são por natureza resistentes à

bacitracina, cefoxitina, gentamicina, estreptomicina e vancomicina (DICKS; TODOROV, FRANCO, 2009).

O tratamento de indivíduos com drogas não antibióticas durante um longo período em combinação com o consumo de alimentos probióticos é outro fator que precisa ser considerado, pois é possível ocorrer uma interação negativa, reduzindo o efeito desses alimentos funcionais. A mínima concentração inibitória (MIC) da droga é o principal fator na sobrevivência e desenvolvimento da cepa probiótica, sendo que a dose diária da droga consumida deve ser relacionada com o MIC para a BAL probiótica (TODOROV et al., 2011c).

2.4.4. Segurança

As características de segurança também devem ser avaliadas e incluem a presença de fatores genéticos de virulência, genes de produção de aminas biogênicas e genes de resistência a antibióticos. O estudo genético de fatores de virulência incluem os seguintes genes: *gelE* (gelatinase), *hyl* (hialuronidase), *asa1* (substância de agregação), *esp* (proteína de superfície enterococos), *cylA* (citolisina), *efaA* (antígeno da endocardite), *ace* (adesão ao colágeno), *hdc1* e *hdc2* (histidina decarboxilase), *tdc* (tirosina decarboxilase), *odc* (ornitina decarboxilase) e *van A* e *van B* (resistência a vancomicina).

Hoje, se sabe o quanto é importante estudar fatores genéticos de virulência em BAL que podem ser aplicadas para bioconservação de alimentos. O gênero *Enterococcus* é alvo de maior preocupação, pois esses micro-organismos são patógenos oportunistas. Os fatores de virulência podem estar relacionados com a adesão da bactéria nas células do hospedeiro, ou com fatores de invasão das células epiteliais ou

até mesmo com a capacidade desse micro-organismo causar um desequilíbrio no sistema imunológico (DE SOUZA, 2003).

Alguns produtos secretados pelo micro-organismo tais como a enzima hialuronidase, podem interagir com os receptores dos linfócitos e induzir a resposta autoimune. A hialuronidase facilita o espalhamento das bactérias e toxinas por todo o tecido do hospedeiro, causando danos a esses tecidos. Outro fator de virulência é a produção de citolisina, que é uma exotoxina capaz de causar hemólise nas células do hospedeiro e também desequilibrar o sistema imunológico (HAAS; SHEPARD; GILMORE, 2004; DE SOUZA, 2003; FRANZ; HOLZAPFEL, 2004; KAYAOGLU; ORSTAVIK, 2004).

A expressão da substância de agregação (*asa 1*), também deve ser considerada, pois esta substância age na translocação do patógeno do gênero *Enterococcus* nas células epiteliais. A expressão do gene antígeno da endocardite (*efaA*) produzido por *E. faecalis* é essencial para o crescimento dessa espécie e a possível ligação desta ao colágeno, fibrinogênio e fibronectina, que são prejudiciais as células do hospedeiro (FRANZ; HOLZAPFEL, 2004).

A proteína de superfície de enterococos (*esp*) é ancorada na parede celular do micro-organismo que esta associada com a produção de biofilme. O gene *ace* facilita a ligação de cepas de *Enterococcus* sp. ao colágeno, e é expressado durante infecções humanas (FRANZ; HOLZAPFEL, 2004; HENDRICKX et al., 2009).

A resistência à vancomicina ocorre devido à presença de operons que codificam enzimas para: (i) síntese de precursores de baixa afinidade, em que o C-terminal D-Ala é transferido por um d-lactato (D-Lac) ou por um d-serina (D-Ser), modificando assim o alvo de ligação da vancomicina, e (ii) eliminação dos precursores de alta afinidade, que

são normalmente produzidos pelo hospedeiro, removendo assim o alvo de ligação da vancomicina (ARTHUR; REYNOLDS; COUVALIN, 1996; COURVALIN, 2013).

O gene de resistência à vancomicina, *van A*, foi o primeiro tipo de resistência descrito, sendo este mediado pelo transposon Tn1546 e elementos intimamente ligados a ele. O transposon codifica uma desidrogenase (*van H*), que reduz o piruvato a D-lac, e uma ligase conhecida como *van A*, que catalisa a formação da ligação de éster entre o D-Ala e o D-Lac (ARTHUR et al., 1996; COURVALIN, 2013).

Outro gene relacionado à resistência a vancomicina é o *van B*, que tem a sua organização e funcionalidade semelhante ao gene *van A*, mas difere na sua regulação, pois o operon *van B* contém genes de codificação de uma desidrogenase, uma ligase e uma dipeptidase (EVERS et al., 1996; COURVALIN, 2013).

Algumas espécies de BAL podem produzir aminas biogênicas (AB), que são compostos formados pela descarboxilação de um aminoácido. A presença desses compostos tem sido tradicionalmente usada para indicar a indesejada ação de microorganismos. As altas concentrações de AB indicam a deterioração de produtos alimentares ou produtos com o processamento precário (RUSSO et al., 2010).

As atividades de descarboxilases não estão distribuídas amplamente entre as bactérias, no entanto, os gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* são descritos como capazes de produzir as enzimas aminodescarboxilases. As aminas biogênicas produzidas por BAL têm sido encontradas em vários produtos fermentados, incluindo carnes, diferentes variedades de queijos, e vinhos. As principais aminas biogênicas encontradas nos alimentos são a histamina produzida pela via histidina descarboxilase (*hdc*), tiramina produzida pela via tirosina descarboxilase (*tdc*), putrescina produzida pela via ornitina descarboxilase (*odc*) e a

cadaverina produzida pela via lisina (MARCOBAL et al.; 2004; LUCAS; CLAISSE; LONVAUD-FUNEL, 2008; CAÑAS et al.; 2009; ROMANO et al., 2013).

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

1. Avaliar a produção de substâncias antimicrobianas em trinta e oitos cepas de BAL isoladas de mussarela de búfala e caracterizar as bacteriocinas quanto o espectro de ação, estabilidade em diferentes pH, estabilidade térmica e resistência a agentes químicos e NaCl.
2. Determinar o efeito inibitório sobre *L. monocytogenes* em leite UHT integral e leite desnatado das cepas de BAL produtoras de substâncias antimicrobianas.
3. Avaliar as propriedades probióticas das cepas produtoras de substâncias antimicrobianas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Produção de substâncias antimicrobianas

4.1.1. Culturas de bactérias acidoláticas

Foram escolhidas aleatoriamente trinta e oito cepas de bactérias acidoláticas, previamente isoladas do processamento de mussarela de búfala da coleção de culturas do laboratório de Leite e Derivados do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” (IBILCE/UNESP).

As culturas selvagens foram estocadas em caldo Man-Rogosa-Sharpe - MRS (Difco) a -80°C, adicionadas de glicerol estéril como crioprotetor. Na ocasião do uso, essas culturas lácticas foram retiradas do congelador e mantidas à temperatura ambiente para descongelamento. Para a ativação foi feita a inoculação em 10 mL de caldo MRS (2%, v/v), e incubação a 30°C/24h em aerobiose (VON MOLLENDORFF; TODOV; DICKS, 2007).

4.1.2. Obtenção do sobrenadante livre de células (SLC)

Durante a etapa de ativação das culturas foram produzidas e liberadas as substâncias antimicrobianas. Para a preparação do SLC foi retirado 10 mL de cada cultura reativada para a centrifugação a 8.000 g por 10 min, a 4 °C. Em seguida, os SLC foram aquecidos a 80°C durante 10 minutos. O pH final do SLC foi ajustado para 6,5 com NaOH 1 M (TODOROV; DICKS, 2004).

4.1.3. Micro-organismos indicadores

Foram testados 95 micro-organismos indicadores Gram-positivos, cedidos pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (FCF-USP), 16 micro-organismos indicadores Gram-negativos, cedidos pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Doenças Dermatológicas, Infeciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, e 19 micro-organismos indicadores eucariotos (leveduras) do banco de culturas do Laboratório de Leites e Derivados – IBILCE/UNESP (Tabela 1).

As cepas de *Aeromonas* sp., *Aeromonas sobria*, *Campylobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Citrobacter freundii*, *Citrobacter braakii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Salmonella* sp., e *Salmonella* Runsen foram reativadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco) a 30°C por 24 h e as cepas de *Enterococcus* sp., *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* e *Pediococcus acidilactici* foram reativadas em caldo MRS a 30°C por 24 h (Todorov et al. 2010b). As cepas de leveduras foram reativadas em caldo MPL (Meio para levedura: 2,0% de glicose, 0,5% de extrato de levedura, 1,0% de cloreto de sódio, 0,23% de fosfato de sódio monobásico e 0,5% de sulfato de amônio) a 25°C por 18-24 h sob agitação de 180 rpm (THARMARAJ; SHAH, 2009).

4.1.4. Verificação da atividade inibitória do SLC

Para a verificação da produção de substâncias antimicrobianas, as trinta e oito cepas de bactérias lácticas foram submetidas ao teste de antagonismo pelo método "Spot-

on-the-lawn", descrito por Todorov et al. (2011b). Após a obtenção do SLC (item 4.1.2), uma alíquota de 10 µL foi transferida para placas de Petri contendo uma camada de 20 mL de caldo BHI, caldo MRS ou caldo MPL suplementado com 0,8% de ágar, conforme o experimento, contendo de 10⁵-10⁶ do micro-organismo indicador (Tabela 1). Após completa absorção da alíquota pelo meio de cultura, as placas foram incubadas a 30°C por 18-24h para os micro-organismos indicadores Gram-positivos e Gram-negativos, e as placas contendo leveduras foram incubadas a 25°C por 18-24h, observando-se a presença de halo inibição maior que 2 mm ao redor das alíquotas.

4.1.5. Diluição crítica

Foi realizado o teste de diluição crítica do SLC sem nenhum tratamento adicional para as cepas que deram resultados positivos no teste 4.1.4 (Cepas 13, 24, 26, 28, 30 e 32). O SLC foi diluído sucessivamente em placas de microtitulação de 96 poços, nas proporções de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128 em tampão fosfato 0,2 M estéril (pH 6,5). A atividade antimicrobiana foi expressa em unidade arbitrária (UA/mL), sendo calculada pela equação:

$$a^b \times 100$$

em que, 'a' representa o fator de diluição e 'b' a última diluição que produziu zonas de inibição medindo no mínimo 2 mm de diâmetro.

Após as diluições dos sobrenadantes, foi realizado o método *spot-on-the-lawn* para avaliar a atividade antimicrobiana dos sobrenadantes diluídos. Nessa etapa, foram utilizados somente alguns micro-organismos indicadores: *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. innocua* ATCC 33090, *E. faecalis* ATCC 19443 e *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* UCV10CET. As placas foram incubadas a 30°C por 18-24 h. Após esse período, foi observada a presença de halos de inibição (TODOROV; DICKS, 2006a).

Tabela 1. Micro-organismos indicadores utilizados e meios de cultura.

Micro-organismos indicadores	Meio de cultura
Bactérias Gram-positivas	
<i>Enterococcus</i> sp. (V1, V2, V3, V4, V5, V6, V7, V8, V9, V10, V11, V12, V13, V14, V15, V16, V17, V18, V19, V20, V28, V31, V32, V33, V34, V35, V36, V37, V38, V39)	MRS
<i>Enterococcus faecium</i> (S5, ST211a, ST211, ET05, ET88, ET12)	MRS
<i>Enterococcus faecalis</i> (V21, V22, V23, V24, V25, V26, V27, V29, V30, V40, V41, V42, V43, ATCC 19443)	MRS
<i>Lactobacillus curvatus</i> (ET06, ET30, ET31)	MRS
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> (ET32, B15, B16)	MRS
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> (B1, B2, B5)	MRS
<i>Lactobacillus fermentum</i> (ET35)	MRS
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (D2, D3, D4, D5, B17)	MRS
<i>Lactobacillus paracasei</i> (D60)	MRS
<i>Lactobacillus plantarum</i> (ST8, ST202, ST216, Ander 4)	MRS
<i>Lactobacillus sakei</i> (ST153, ST154, ST22, 2a, Monica)	MRS
<i>Lactococcus lactis</i> (D6)	MRS
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> UCV10CET, 5916 PA	MRS
<i>Listeria monocytogenes</i> (L506, L620, L603, L211, 1/2a 409, R506, R104, R103, 4b211, 1/2a 709, 1/2a 620, 4b724, 1/2a 106, 4b703, ATCC 7644)	BHI
<i>Listeria innocua</i> (ATCC 33090)	BHI
<i>Pediococcus acidilactici</i> (ET34)	MRS
Bactérias Gram-negativas	
<i>Aeromonas</i> sp. (S102)	BHI
<i>Aeromonas sobria</i> (S147)	BHI
<i>Campylobacter</i> sp. (2079467, 2061063)	BHI
<i>Citrobacter</i> sp. (S88)	BHI
<i>Citrobacter freundii</i> (Lac34)	BHI
<i>Citrobacter braakii</i> (Lac17)	BHI
<i>Escherichia coli</i> (S143, Lac60, 594)	BHI
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (S105, Lac3, S116)	BHI
<i>Salmonella</i> sp. (53, 57)	BHI
<i>Salmonella</i> Runsen (55)	BHI
Leveduras	
<i>Candida guilliermondii</i> (B2 10-1, B2 10-2, B2 10-8, B2 10-9)	MPL
<i>Candida krusei</i> (B2 10-13, B2 10-14, B2 10-15, B2 10-20)	MPL
<i>Candida pseudotropicalis</i> (B1 1-1, B1 1-2, B1 1-3)	MPL
<i>Candida tropicalis</i> (B1 1-4, B1 7-13, B1 7-14, B1 7-15, B1 9-3, B1 9-5)	MPL
<i>Geotrichum candidum</i> (B2 1-4, B3 8-6)	MPL

MRS = De Man, Rogosa, Sharpe agar (Difco), BHI = Brain Heart Infusion agar (Difco), MPL= Meio para levedura.

Durante este teste da atividade crítica as cepas 13, 24 e 28 não apresentaram estabilidade na produção da substância antimicrobiana, então se optou por continuar os outros testes de caracterização das substâncias antimicrobianas somente com as cepas 26, 30 e 32.

4.1.6. Identificação das cepas produtoras das substâncias antimicrobianas

As cepas produtoras de substância antimicrobiana foram identificadas por Silva (2010) usando a técnica 16S rRNA como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Cepa 13), *Lactobacillus casei* (Cepa 24), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (Cepa 26, 30 e 32) e *Leuconostoc citreum* (Cepa 28).

As cepas 26, 30 e 32 são da mesma espécie (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*), sendo as cepas 26 e 30 são provenientes de uma mesma amostra (queijo com 28 dias de estocagem), e a cepa 32 é também proveniente de queijo com 28 dias de estocagem, mas de outra coleta. Paula (2012) analisou a diversidade genética entre as cepas, utilizando a técnica molecular do RAPD (*Randon Amplification of Polymorphic DNA*). Os resultados mostraram que as cepas 26 e 30 são idênticas geneticamente, portanto, os outros testes da avaliação de produção de substância antimicrobiana foram feitos somente com as cepas 26 e 32.

4.1.7. Avaliação da natureza das substâncias antimicrobianas

As substâncias antimicrobianas produzidas pelas cepas 26 e 32 foram submetidas ao teste de sensibilidade a enzimas. Os sobrenadantes das culturas de BAL, obtidos conforme descrito anteriormente (item 4.1.2), foram tratados com as enzimas: pepsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), α -quimiotripsina de pâncreas

bovino tipo II (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), protease de *Aspergillus saitoi* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), lipase de *Aspergillus niger* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), catalase de fígado bovino (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), tripsina de pâncreas suíno (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) e amilase de *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), na concentração de 1 mg/mL.

Após a adição da enzima em 2 mL do SLC, os tubos foram mantidos a 30°C por 2 horas, e em seguida aquecidos a 97°C por 3 minutos para a inativação enzimática. Após, as amostras foram resfriadas até a temperatura ambiente. Os SLC foram então testados quanto à atividade inibitória frente à *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. innocua* ATCC 33090, *E. faecalis* ATCC 19443 e *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* UCV10CET, empregando-se o teste “spot-on-the-lawn”, com diluição crítica até 1:128, conforme descrito no item 4.1.5, com incubação a 30°C por 18-24h (TODOROV; DICKS, 2006a).

4.1.8. Determinação da estabilidade das substâncias antimicrobianas em diferentes valores de pH

A determinação da estabilidade das substâncias antimicrobianas presente nos SLC das cepas 26 e 32 em diferentes valores de pH foi realizada conforme descrito por Todorov et al. (2011b). O pH do sobrenadante de cada cultura foi ajustado com HCl 1M ou NaOH 1 M para 2, 4, 6, 8, 10 e 12, mantidos nessas condições por 2 horas a 30°C, e em seguida, corrigido para o pH 6,5, com adição de HCl 1M ou NaOH 1M. Os sobrenadantes foram então testados quanto à atividade inibitória frente à *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. innocua* ATCC 33090, *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* UCV10CET e *E. faecalis* ATCC 19443, empregando-se o teste “spot-on-

the-lawn” com diluição crítica até 1:128, conforme descrito no item 4.1.5, com incubação a 30°C por 18-24h (TODOROV; DICKS, 2006a).

4.1.9. Determinação da estabilidade das substâncias antimicrobianas em diferentes temperaturas

Os SLC das cepas 26 e 32 foram submetidos ao teste de estabilidade térmica. O teste foi realizado conforme Todorov et al. (2011b). Foi retirado 1 mL do SLC e transferido para um tubo Eppendorf, sendo conservados por 30 minutos, 1 hora e 2 horas a 25°C, 30°C, 37°C, 45°C, 60°C, 100°C e também por 15 minutos a 121°C, conforme o tratamento. Para a avaliação da atividade antimicrobiana após o tratamento térmico, os sobrenadantes foram testados quanto à atividade inibitória frente à *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. innocua* ATCC 33090, *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* UCV10CET e *E. faecalis* ATCC 19443, empregando-se o teste “*spot-on-the-lawn*” com diluição crítica até 1:128, conforme descrito no item 4.1.5, com incubação a 30°C por 18-24h (TODOROV; DICKS, 2006a).

4.1.10. Determinação da estabilidade das substâncias antimicrobianas na presença de agentes químicos

Para testar a estabilidade dos SLC das cepas 26 e 32 aos agentes químicos foi transferido 1 mL dos sobrenadantes para tubos aos quais foram adicionados conforme o tratamento, Tween[®] 20 (Synth, São Paulo, Brasil), Tween[®] 80 (Synth, São Paulo, Brasil), SDS (Synth, São Paulo, Brasil), Triton X-100 (Synth, São Paulo, Brasil), Na-EDTA (Synth, São Paulo, Brasil), Uréia (Synth, São Paulo, Brasil) e NaCl até atingir a concentração de 1% (TODOROV et al., 2008a). Para a avaliação da atividade antimicrobiana após o tratamento com agentes químicos, os sobrenadantes foram então

testados quanto à atividade inibitória frente à *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. innocua* ATCC 33090, *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* UCV10CET e *E. faecalis* ATCC 19443, empregando-se o teste “*spot-on-the-lawn*” com diluição crítica até 1:128, conforme descrito no item 4.1.5, com incubação a 30°C por 18-24h (TODOROV; DICKS, 2006a).

4.1.11. Determinação do efeito inibitório de Listeria monocytogenes ATCC 7644 pelas cepas 26 e 32 em diferentes matrizes

Amostras de leite UHT integral contendo 3,25% de gordura (Batavo) e leite UHT desnatado com 0% de gordura (Batavo) foram adquiridos no supermercado local. A cepa de *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi reativada em tubos separados contendo leite UHT integral e leite UHT desnatado (8 log UFC/mL) a 30°C/18-24 h e diluída em solução salina (8,5 g/L NaCl) contando aproximadamente 6 log UFC/mL. Após, 500 µL desta solução foi adicionado em cada tubo contendo 10 mL de leite UHT integral e 10 mL de leite UHT desnatado previamente cultivados com as cepas 26 e 32 cultivadas a 30°C/18-24 h. Amostras controles contendo os diferentes tipos de leite adicionados de *L. monocytogenes* foram preparadas. As amostras foram armazenadas a 4°C para simular a estocagem refrigerada e a contagem de *L. monocytogenes* foi realizada no ágar seletivo para *L. monocytogenes* (Himedia) nos tempos 0, 7 e 14 dias (MALHEIROS et al., 2012).

4.2. Avaliação do potencial probiótico

4.2.1. Sobrevivência das cepas de BAL durante a simulação das condições do TGI em diferentes matrizes

As cepas 13, 24, 28 e 32 foram testadas quanto à sobrevivência nas condições do trato gastrointestinal em meio MRS, leite integral UHT e leite desnatado UHT. Os simulados gástricos e entéricos foram preparados de acordo Buriti, Castro e Saad (2010), com modificações. Foi realizada a reativação das cepas de bactéria láctica em 10 mL de MRS, 10 mL leite integral UHT e em 10 mL leite desnatado UHT durante 24 horas a 30°C, conforme o experimento. Em seguida, foi feita a suspensão das células da bactéria reativada em 90 mL de solução salina 0,5%. Essa solução foi distribuída em 4 tubos com capacidade para 10 mL.

A solução de pepsina (3g/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) e lipase de *Aspergillus niger* (0,9 mg/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) foram adicionadas aos tubos com as suspensões de BAL com o pH previamente ajustado para 2,0-2,5 com HCl 0,5 N. Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C sob agitação de 150 rpm. Após, foi realizada a contagem das BAL nos tempos 0, 30 e 60 de análise, pela técnica de “*pour-plate*” no meio MRS ágar, utilizando diluições decimais preparadas com 0,1% (p/v) de água peptonada. As placas foram incubadas a 30°C por 48 h.

Na etapa seguinte, os valores de pH das amostras foram ajustados para 4,3-5,2 com a adição de pancreatina (1 g/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) e sais biliares (10 g/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), e as amostras foram incubadas novamente por 120 minutos a 37°C sob agitação de 150 rpm. Em seguida, foi realizada a contagem das BAL no tempo 240 minutos da análise, como descrito anteriormente.

Na última etapa, os valores de pH das amostras foram ajustados para 6,7-7,5 com a adição de pancreatina (1 g/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos) e sais biliares (10 g/L) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Estados Unidos), com a incubação por 120 minutos a 37°C sob agitação de 150 rpm. Em seguida, foi realizada a contagem das BAL no tempo de 360 minutos da análise, como descrito anteriormente.

4.2.2. Determinação do efeito de medicamentos

Foi testado o efeito de medicamentos comerciais (Tabela 12) de diferentes grupos (analgésico, antipirético, analgésico combinado com outros medicamentos, antiemético, anti-histamínico, anti-histamínico combinado com outros medicamentos, ansiolítico, sedativo, anti-hipertensivo, contraceptivo, diurético, hiperlipidêmico, não esteroide anti-inflamatório, inibidor da bomba de prótons, antidepressivo, descongestionante, neuro-sedativo, hepatoprotetor, antimetabólico, relaxante muscular, glicocorticoide, anti-hemorrágico e vasodilatador) na viabilidade das cepas 13, 24, 28 e 32. Foi realizada a reativação das cepas no caldo MRS a 37°C por 24 h. Em seguida, foi inoculada uma concentração de 10^6 UFC/mL de cada uma das cepas de BAL em caldo MRS suplementado com 0,8% de ágar. Após a solidificação do meio, foi adicionado 10 µL de cada medicamento, seguida por incubação a 37°C por 24 h. Foi avaliado o diâmetro dos halos em mm ao redor de cada medicamento. Para halos de inibição > 2 mm foi testada a concentração inibitória mínima (MIC) do medicamento, com a diluição seriada. Após, foi adicionado uma alíquota de 10 µL de cada diluição do medicamento na superfície do MRS ágar contendo a BAL sensível. Foi feita a incubação a 37°C por 18-24 h (TODOROV et al., 2011a).

As cepas 13, 24, 28 e 32 também foram testadas frente aos antibióticos: ampicilina 10 µg, ceftazidima 30 µg, cefuroxona 30 µg, ciprofloxacina 5 µg,

cloranfenicol 30 µg, eritromicina 15 µg, fosfomicina 50 µg, gentamicina 10 µg, neomicina 30 µg, nitrofurantoina 300 µg, norfloxacinina 10 µg, oxaciclina 1 µg, penicilina 10 µg, estreptomicina 300 µg, teicoplanina 30 µg, tetraciclina 30 µg, tobramicina 10 µg e vancomicina 30 µg por disco. Foi realizada a reativação das cepas 13, 24, 28 e 32 em caldo MRS a 30°C por 24 h. Em seguida, foi inoculada uma concentração de 10⁶ UFC/mL de cada uma das cepas de BAL em caldo MRS suplementado com 0,8% de ágar. Após a solidificação, os discos dos antibióticos foram colocados na superfície do meio distribuído nas placas, seguida por incubação a 30°C por 24 h. Foi avaliado o diâmetro dos halos ao redor do disco de antibiótico, sendo considerado positivo halos > 2 mm ao redor do disco (TODOROV et al., 2011a).

4.2.3. Determinação da auto-agregação e co-agregação

As cepas 13, 24, 28 e 32 foram reativadas em caldo MRS durante 24 horas a 30°C e centrifugadas (7000 g por 10 minutos a 20°C), lavadas, ressuspensas e diluídas em solução salina estéril 0,85%. Em seguida, 1 mL da suspensão das células foi transferido para um recipiente de 2 mL obtendo a densidade óptica (DO) de aproximadamente 0,3. Após, as amostras foram incubadas a 4°C, 37°C e 42°C durante 1 hora. Foi realizada a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda 660 nm antes (DO₀) e após 60 minutos (DO₆₀) de incubação. Para a determinação da DO₆₀, as culturas foram centrifugadas a 300 g durante 2 minutos a 20°C.

A auto-agregação foi determinada utilizando a seguinte equação (TODOROV et al., 2011a):

$$\% \text{ auto-agregação} = [(DO_0 - DO_{60}) / DO_0] \times 100$$

em que: a DO₀ refere-se a DO inicial, e a DO₆₀ refere-se a DO obtida após 60 minutos de incubação.

Para a avaliação da co-agregação, as cepas 13, 24, 28, 32 e os micro-organismos indicadores *E. faecalis* ATCC 19443 e *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* UCV10CET foram cultivados em 10 mL de caldo MRS e as cepas de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. innocua* ATCC 33090 em BHI a 30°C. As células foram centrifugadas após 24 horas (7000 g por 10 minutos a 20°C), lavadas, e ressuspensas em solução salina 0,85% estéril, obtendo a DO de aproximadamente 0,3. A co-agregação foi determinada pela leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda 660 nm antes (DO₀) e após 60 minutos (DO₆₀) de incubação de 500 uL da cepa de BAL e 500 uL do micro-organismo indicador. Para realizar a leitura após 60 minutos, as células foram centrifugadas a 300 g por 2 min a 20°C. A co-agregação foi calculada usando a seguinte equação (Todorov et al., 2011a):

$$\% \text{ de co-agregação} = [(DO_0 - DO_{60}) / DO_0] \times 100$$

em que: a DO₀ refere-se a DO inicial, DO₆₀ refere-se a DO obtida após 60 minutos de incubação. Os experimentos foram realizados em triplicatas em duas ocasiões diferentes.

4.2.4. Determinação da hidrofobicidade

A capacidade das células das cepas 13, 24, 28 e 32 de aderir aos substratos hidrofóbicos foram determinadas de acordo com a metodologia de Todorov e Dicks (2008) e Doyle e Rosenberg (1995). As células foram centrifugadas (6700 g por 6 min a 4°C), lavadas duas vezes com tampão fosfato 0,1 M, ressuspensas na mesma solução e realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 580 nm antes da incubação (DO₀). Um mililitro e meio da suspensão celular foram adicionados em 1,5 mL de n-hexadecano (Sigma) e misturados por 2 minutos. A fase aquosa e a fase orgânica separaram-se após 30 minutos em repouso à temperatura ambiente. Um mililitro da fase aquosa foi removido para determinar a DO. Os experimentos foram

conduzidos em triplicatas em duas ocasiões diferentes. A porcentagem da hidrofobicidade foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ hidrofobicidade} = [(DO_0 - DO_{30})/DO_0] \times 100$$

em que: DO_0 refere-se a DO inicial e a DO_{30} refere-se a DO após 30 minutos de repouso.

4.2.5. Avaliação da atividade da enzima β -galactosidase

A atividade de β -galactosidase das cepas 13, 24, 28 e 32 foi determinada utilizando discos de papel impregnados com o-nitrofenil- β -D-galactopiranosose (Discos de ONPG, Fluka), de acordo com as instruções do fornecedor. As cepas foram reativadas por 18 h a 30°C e foram estriadas em placas de Petri contendo ágar MRS, e incubação a 30°C por 48 h, em aerobiose. Uma colônia de cada cultura foi transferida e misturada em um tubo contendo 0,1 mL de solução salina estéril, e acrescentou-se o disco de ONPG. Os tubos foram incubados a 30°C, e foram observados durante 6 h, em intervalos de 1 h. A mudança de cor amarela pela liberação do composto cromogênico, o-nitrofenol, indica resultado positivo para produção de β -galactosidase. O teste foi realizado em duas ocasiões diferentes, em duplicata (VINDEROLA; REINHEIMER, 2003).

4.2.6. Pesquisa de genes associados com a adesão na mucosa intestinal

Os DNAs das cepas 13, 24, 28 e 32 foram extraídos por Silva (2010) usando o Kit “Easy DNA” TM (Invitrogen, Carlsbad, California), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA das cepas foram submetidos a reações de PCR, de acordo com Ramiah et al. (2007) para a detecção de genes relacionados a adesão à mucosa, tais como: proteína de ligação ao muco (*mub*), proteína que promove a adesão ao muco (*mapA*) e o fator de alongação (EF-Tu). Os produtos de amplificação foram submetidos

à eletroforese com gel de agarose de 1,0% a 2,0% (p/v) contendo brometo de etídio (Sigma). Os *primers*, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos estão detalhados na Tabela 2.

Tabela 2. *Primers*, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos relacionados com adesão à mucosa do intestino.

Gene	<i>Primers</i>	TA (°C)	TF (bp)
<i>Mub</i>	GTAGTTACTCAGTGACGATCAATG TAATTGTAAAGGTATAATCGGAGG	46	150
<i>mapA</i>	TGGATTCTGCTTGAGGTAAG GACTAGTAATAACGCGACCG	48	156
EF-Tu	TTCTGGTTCGTATCGATCGTG CCACGTAATAACGCACCAAC	50	161

mub (proteína de ligação ao muco); *mapA* (proteína que promove a adesão ao muco); EF-Tu (fator de alongação). TA: temperatura de anelamento; TF: tamanho do fragmento.

4.2.7. Pesquisa de genes associados a fatores de virulência, produção de aminas biogênicas e resistência a antibióticos

Os DNAs das cepas 13, 24, 28 e 32 foram submetidos a reações de PCR de acordo com Vankerckhoven et al. (2004), De Las Rivas, Marcobal e Muñoz. (2005) e Martin-Platero et al. (2009), para a detecção de genes relacionados à virulência e à produção de aminas biogênicas, tais como: *gel E* (gelatinase), *esp* (proteína de superfície de enterococo), *asa 1* (substância de agregação), *hdc1* e *hdc2* (histidina descarboxilase), *hyl* (hialuronidase), *odc* (ornitina descarboxilase), *ace* (proteína de aderência ao colágeno), *tdc* (tirosina descarboxilase), *efa A* (antígeno da endocardite), *cylA* (citolisina). A pesquisa dos genes de resistência aos antibióticos *van A* e *van B* (ambos relacionados à vancomicina) também foi realizada.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese com gel de agarose 2,0% (p/v) contendo brometo de etídio (Sigma). Os *primers*, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos estão detalhados na Tabela 3.

Tabela 3. Primers, temperatura de anelamento e tamanho dos fragmentos relacionados com genes de virulência, produção de aminas biogênicas e genes de resistência à vancomicina.

Alvo	Gene	Primers	TA °C	TF (bp)	Referência
Virulência	<i>ge/E</i>	TATGACAATGCTTTTGGGAT AGTGCACCCGAAATAATATA	47	213	Vankerchoven et al. 2004
	<i>hyl</i>	ACAGAAGAGCTGCAGAAATG GACTGACGTCCAAGTTTCCA	53	276	Vankerchoven et al. 2004
	<i>asa1</i>	GCACGCTATTACGAACTATGA TAAGAAGAACAATCACCCACGA	50	375	Vankerchoven et al. 2004
	<i>esp</i>	AGATTTTCATCTTTGATTCCTG AATTGATTCTTTAGCATCTGG	47	510	Vankerchoven et al. 2004
	<i>cylA</i>	ACTCGGGGATTGATAGGC GCTGCTAAAAGCTGCGCTT	52	688	Vankerchoven et al. 2004
Resistência a antibióticos	<i>efaA</i>	GCCAAATTGGACAGACCCCTC CGCCTTCTGTTCTCTTTGGC	57	688	Martin-Platero et al. 2009
	<i>ace</i>	GAATTGAGCAAAAGTTCACG GTCTGTCTTTTCACTTGTTTC	48	1008	Martin-Platero et al. 2009
	<i>van A</i>	TCTGCAATAGAGATAGCCGC GGAGTAGCTATCCCAGCATT	52	377	Martin-Platero et al. 2009
	<i>van B</i>	GCTCCGCAGCCTGCATGGAC AACGATGCCGCCATCCTCCTGC	60	529	Martin-Platero et al. 2009
	<i>hdc1</i>	AGATGGTATTGTTCTTATG AGACCATACACCATAACCTT	46	367	De Las Rivas et al. 2005
Aminas biogênicas	<i>hdc2</i>	AAYTCNTTYGAYTTYGARARG ATNGNGANCCDATCATYTRTGNC	50	534	De Las Rivas et al. 2005
	<i>tdc</i>	GAYATNATNGGNATNGGNYTNGAYCAG CCRTARITCNGGNATAGCRAARTCNGTRG	55	924	De Las Rivas et al. 2005
	<i>odc</i>	GTNTTYAAYGCNGAYAAARCANTAYTTY GT ATNGARTTNAGTTCRCAYTTYTCNNG	54	1446	De Las Rivas et al. 2005

* *ge/E* (gelatinase), *hyl* (hialuronidase), *asa1* (substância de agregação), *esp* (proteína de superfície enterococos), *cylA* (citolisina), *efaA* (antígeno da endocardite), *ace* (adesão ao colágeno), *van A* e *van B* (resistência a vancomicina), *hdc1* e *hdc2* (histidina decarboxilase), *tdc* (tirosina decarboxilase) e *odc* (ornitina decarboxilase). TA: temperatura de anelamento; TF: tamanho do fragmento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção de substâncias antimicrobianas

5.1.1. Verificação da atividade inibitória do SLC e identificação dos isolados

Dentre as trinta e oito cepas de BAL avaliadas, somente seis apresentaram atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos indicadores. A relação entre o número de micro-organismos sensíveis e o total de micro-organismos indicadores está apresentada na Tabela 4.

Todos os seis SLC das bactérias produtoras de substâncias antimicrobianas inibiram amplo espectro de bactérias: *Enterococcus sp.* (V35); *Enterococcus faecalis* (V22; V30; V41); *Listeria monocytogenes* (L506; 1/2a 620; 4b724; 1/2a106; 4b703; ATCC 7644); *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* UCV10CET. Por outro lado, os micro-organismos indicadores *Enterococcus sp.* (V1; V9; V17); *Listeria monocytogenes* (R103); *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (D2, D3, D4, D5, B17), *Lactococcus lactis* (D6), *Lactobacillus paracasei* (D60), *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (B1, B2, B5) e *Lactobacillus delbrueckii* (B15, B16) não foram inibidos por nenhuma cepa de BAL produtora de substância antimicrobiana. As seis cepas de BAL foram efetivas na inibição de grande quantidade de cepas de *L. monocytogenes* de origem alimentar. As cepas 26, 28 e 30 inibiram 68,75% das cepas de *L. monocytogenes* testadas, sendo essa característica de grande interesse para as indústrias, pois sua aplicação pode contribuir para a segurança dos alimentos.

O patógeno *Listeria monocytogenes* tem sido detectado em alimentos em diversos países, podendo ser encontrada em leite cru e pasteurizado, queijos, carne bovina, suína, aves, peixes, embutidos, produtos cárneos crus e termo processados, além de refeições preparadas para consumo imediato. Na indústria de alimentos, o controle

deste patógeno é um desafio devido a grande ocorrência e a capacidade desse micro-organismo de sobreviver em lugares hostis. Além disso, a capacidade do crescimento em baixas temperaturas aumenta o risco do enriquecimento seletivo do patógeno durante o armazenamento (LIANOU; SOFOS, 2007; GANDHI; CHIKINDAS, 2007; FREITAG; PORT; MINER, 2009).

Baseado na elevada atividade contra *Listeria monocytogenes*, as bacteriocinas produzidas por essas cepas de BAL são provavelmente da classe IIa, sugerida por Heng et al. (2007), uma vez que as bacteriocinas dessa classe apresentam atividade frente a *L. monocytogenes*. Entretanto, para a confirmação da classe da bacteriocina, é necessário o conhecimento de sua estrutura, tal como a determinação da sequência de aminoácidos. Diversos gêneros de BAL produtoras de bacteriocinas ativas frente a diferentes cepas de *L. monocytogenes* de origem alimentar foram relatados por vários pesquisadores (TOMÉ et al., 2009; JAVED et al., 2011; TODOROV et al., 2011a ; MORAES et al., 2012; SIP et al., 2012; BISCOLA et al., 2013).

Os SLC das cepas produtoras de substâncias antimicrobianas não inibiram nenhuma cepa dos gêneros *Lactobacillus* e *Lactococcus*, demonstrando que essas cepas apresentam potencial para aplicação tecnológica em alimentos, pois não inibem micro-organismos normalmente utilizados na fabricação de alimentos fermentados e de produtos lácteos. Por outro lado, as cepas 26 e 30, identificadas como *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, inibiram *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, o que é comum, pois as bacteriocinas produzidas por BAL usualmente são antagonistas frente a micro-organismos geneticamente relacionados.

Entretanto, a cepa 13, identificada como *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, não inibiu três cepas dos micro-organismos indicadores dessa mesma espécie (B1, B2 e B5-Tabela 4). Muito provavelmente os micro-organismos indicadores testados não foram

inibidos por possuírem genes de imunidade similares aos das BAL produtoras de bacteriocinas. Resultados similares foram demonstrados por outros pesquisadores. Anastasiadou et al. (2008) detectou uma bacteriocina produzida por *Pediococcus pentosaceus*, que inibiu várias espécies de BAL, mas não foi ativa frente a cepas do gênero *Pediococcus*. Todorov; Vaz-Velho; Dicks (2010b) demonstraram em seus resultados que uma cepa de *Lb. plantarum* produtora de substância antimicrobiana inibiu poucos isolados de BAL, mas inibiu 4/8 (50%) das cepas de *Lb. plantarum* testadas. Entretanto, resultados interessantes foram relatados por Albano et al. (2007), ao utilizarem uma cepa de *Pediococcus acidilactici*, não observaram inibição em todos os isolados de BAL testados.

É importante ressaltar que as substâncias antimicrobianas produzidas pelas cepas 13, 24, 26, 28, 30 e 32 também apresentaram inibição frente bactérias Gram-negativas patogênicas isoladas de humanos: *Aeromonas* sp., *Aeromonas sobria*, *Citrobacter* sp., *Citrobacter freundii*, *Campylobacter* sp., *Escherichia coli*. Essas características não são muito comuns em bactérias acidoláticas produtoras de substâncias antimicrobianas, pois normalmente essas substâncias atuam frente a micro-organismos filogeneticamente relacionados, porém alguns autores também já relataram resultados semelhantes (TODOROV; DICKS, 2006a; KOS et al., 2008; TAMANG; TAMANG 2009; TODOROV et al., 2010c; TODOROV et al., 2011b).

Micro-organismos indicadores eucariotos também foram utilizados, mas nenhuma das cepas produtoras de substâncias antimicrobianas foi ativa frente a estes micro-organismos (Tabela 4). Resultados semelhantes foram observados por Todorov et al. (2006c) com uma cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HV219 que não foi eficaz na inibição de uma cepa de *Candida albicans*.

Por outro lado, Paula (2010) observou a inibição de *Candida albicans* e *Candida laurenti* com o SLC da cepa comercial de *L. acidophilus* La-5, e na presença deste mesmo sobrenadante o desenvolvimento da levedura *Debaryomyces hansenii* var. *fabrii* foi potencializado.

A diluição crítica foi realizada somente com quatro micro-organismos indicadores, tais como *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. innocua* ATCC 33090, *E. faecalis* ATCC 19443 e *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* UCV10CET. Entretanto, somente as cepas 26, 30 e 32 apresentaram estabilidade na produção de substâncias antimicrobianas frente a estes micro-organismos, sendo que a cepa 26 apresentou a máxima inibição, com atividade de 1600 UA/mL, enquanto as cepas 30 e 32 apresentaram atividade de 800 UA/mL (Tabela 5).

5.1.2. Natureza das substâncias antimicrobianas

Conforme citado anteriormente, as cepas 13, 24 e 28 não apresentaram estabilidade na produção de substâncias antimicrobianas, e a cepa 30 é geneticamente semelhante à cepa 32. Com isso, os demais testes foram realizados apenas com as cepas 26 e 32.

Houve a inativação completa dos SLC das cepas 26 e 32 após o tratamento com as enzimas proteolíticas (pepsina, lipase, protease, tripsina e quimiotripsina), indicando que o composto é de natureza proteica. A atividade permaneceu constante quando o SLC das cepas 26 e 32 foram tratados com a enzima catalase, indicando que o H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) não era o responsável pela inibição (Tabela 6). Além disso, a atividade antimicrobiana não foi alterada quando os SLC foram tratados com a enzima α -amilase, indicando que essas bacteriocinas não são da classe IV, pois os carboidratos não estão envolvidos na sua estrutura molecular (KLAENHAMMER, 1993; HENG et al., 2007).

Tabela 4. Relação do número de micro-organismos indicadores sensíveis à substância antimicrobiana e número total de micro-organismos testados.

Micro-organismos indicadores	Meio ^a	Inibição das cepas produtoras ^b					
		13	24	26	28	30	32
Bactérias Gram-positivas							
<i>Enterococcus</i> sp.	MRS	8 ^c /30 ^d	4/30	8/30	8/30	9/30	5/30
<i>E. faecalis</i>	MRS	8/14	4/14	6/14	6/14	7/14	4/14
<i>E. faecium</i>	MRS	0/6	0/6	1/6	1/6	1/6	0/6
<i>Lactobacillus curvatus</i>	MRS	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>L. delbrueckii</i>	MRS	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	MRS	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>L. fermentum</i>	MRS	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>L. plantarum</i>	MRS	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>L. sakei</i>	MRS	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	MRS	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	MRS	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1
<i>Lactococcus lactis</i>	MRS	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Pediococcus acidilactici</i>	MRS	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Listeria innocua</i>	BHI	0/1	1/1	0/1	1/1	0/1	1/1
<i>Listeria monocytogenes</i>	BHI	10/16	9/16	11/16	11/16	11/16	7/16
Bactérias Gram-negativas							
<i>Aeromonas sobria</i>	BHI	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Aeromonas</i> sp.	BHI	1/1	1/1	0/1	0/1	1/1	1/1
<i>Campylobacter</i> sp.	BHI	1/2	1/2	1/2	½	1/2	1/2
<i>Citrobacter</i> sp.	BHI	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Citrobacter freundii</i>	BHI	1/1	1/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Citrobacter braakii</i>	BHI	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Escherichia coli</i>	BHI	2/3	2/3	1/3	1/3	1/3	1/3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHI	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>Salmonella</i> sp.	BHI	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
<i>Salmonella</i> Runsen	BHI	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Leveduras							
<i>Candida guilliermondii</i>	MPL	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
<i>Candida krusei</i>	MPL	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
<i>Candida pseudotropicalis</i>	MPL	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>Candida tropicalis</i>	MPL	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
<i>Geotrichum candidum</i>	MPL	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

^a MRS = De Man, Rogosa, Sharpe agar (Difco), BHI = Brain Heart Infusion agar (Difco), MPL= Meio para levedura.

^b Número de micro-organismos indicadores sensíveis aos compostos antimicrobianos produzidos pelas cepas de BAL testadas.

^c número de cepas inibidas, ^d número total de cepas.

Tabela 5. SLC das cepas produtoras de substâncias antimicrobianas frente à *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Enterococcus faecalis* ATCC 19443 e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* UCV10CET, usando o método “Spot-on-the-lawn” com diluição crítica.

Cepas	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> UCV10CET	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19443	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090
13	-	-	-	-
24	-	-	-	-
26	1600 UA/mL	1600 UA/mL	1600 UA/mL	800 UA/mL
28	-	-	-	-
30	800 UA/mL	800 UA/mL	400 UA/mL	400 UA/mL
32	800 UA/mL	800 UA/mL	400 UA/mL	400 UA/mL

Neste teste da avaliação da natureza das substâncias antimicrobianas, e nos testes do efeito de diferentes valores de pH e de diferentes temperaturas na atividade antimicrobiana das cepas 26 e 32, observou-se que nenhuma das cepas inibiu o micro-organismo indicador *L. innocua* ATCC 33090, provavelmente a quantidade de células do micro-organismo indicador interferiu na inibição pela bacteriocina.

As culturas de BAL cujos sobrenadantes perderam atividade após o tratamento com as enzimas proteolíticas foram consideradas produtoras de bacteriocina, uma vez que as bacteriocinas, por definição, apresentam natureza proteica. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores. Todorov e Dicks (2009) observaram que uma bacteriocina produzida por *Pediococcus pentosaceus* foi inibida pelas enzimas pepsina, lipase, protease, tripsina e quimiotripsina e continuaram ativas quando tratada com as enzimas catalase e α -amilase. Todorov (2010) relatou que as bacteriocinas produzidas pelas cepas *Lb. plantarum*, *E. faecium* e *Lc. lactis* perderam a atividade antimicrobiana quando tratadas pelas enzimas proteinase, pepsina e tripsina, mas

quando tratadas com as enzimas α -amilase e catalase nenhuma mudança de atividade foi relatada.

Tabela 6. Efeito das enzimas na atividade antimicrobiana (UA/mL) do SLC das cepas 26 e 32.

Cepas	Enzimas	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> UCV1/0CET	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19443	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090
26	α -amilase	200 UA/mL	400 UA/mL	200 UA/mL	-
	Pepsina	-	-	-	-
	Lipase	-	-	-	-
	Catalase	200 UA/mL	800 UA/mL	-	-
	Protease	-	-	-	-
	Tripsina	-	-	-	-
	Quimio-Tripsina	-	-	-	-
32	α -amilase	-	200 UA/mL	-	-
	Pepsina	-	-	-	-
	Lipase	-	-	-	-
	Catalase	-	400 UA/mL	-	-
	Protease	-	-	-	-
	Tripsina	-	-	-	-
	Quimio-Tripsina	-	-	-	-

(-) = resultado negativo

5.1.3. Estabilidade das substâncias antimicrobianas em diferentes pH

Os resultados de atividades dos SLC das cepas 26 e 32 após 1 hora em pH de 2 a 10 estão apresentados na Tabela 7. Conforme pode ser observado, o efeito do pH na atividade do SLC variou de acordo com a cepa testada.

As substâncias antimicrobianas produzidas pelas cepas 26 e 32 perderam atividade quando o valor de pH foi ajustado para 12. No entanto, em geral, os alimentos não apresentam este valor de pH, então não seria um problema para a aplicação da bacteriocina em alimentos. Resultados semelhantes foram obtidos por Albano et al.

(2007), quando estudaram o efeito da variação do pH nos SLC das cepas de *Pediococcus acidilactici*. As bacteriocinas produzidas, nomeadas de bacHA-6111-2 e bacHA-5692-3, não apresentaram atividade em pH 12. Entretanto, algumas bacteriocinas são estáveis em pH extremamente alcalino. Todorov et al. (2010b) e Todorov et al. (2011b) observaram que a bacteriocina produzida por *Lb. plantarum* e *E. faecium* mantiveram a atividade na faixa de pH 2 a 12.

As bacteriocinas produzidas pelas cepas 26 e 32 mostraram estabilidade em pH ácido, o que demonstra a aplicação potencial desses peptídeos ou de suas cepas bacteriocinogênicas como bioconservadores em alimentos fermentados, tais como salame, picles, leites fermentados, além de queijos e manteiga.

Tabela 7. Efeito do valor de pH na atividade antimicrobiana (UA/mL) do SLC das cepas 26 e 32.

Cepas	pH	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> UCV10CET	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19443	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090
26	2	200 UA/mL	400 UA/mL	400 UA/MI	-
	4	400 UA/mL	800 UA/mL	400 UA/MI	-
	6	400 UA/mL	800 UA/mL	400 UA/mL	-
	8	400 UA/mL	800 UA/mL	400 UA/MI	-
	10	-	400 UA/mL	-	-
32	2	-	-	200 UA/mL	-
	4	400 UA/mL	400 UA/mL	200 UA/mL	-
	6	400 UA/mL	400 UA/mL	200 UA/mL	-
	8	400 UA/mL	400 UA/mL	200 UA/mL	-
	10	400 UA/mL	-	200 UA/mL	-

(-) = resultado negativo.

5.1.4. Estabilidade das substâncias antimicrobianas em diferentes temperaturas

As bacteriocinas presentes nos SLC das cepas 26 e 32 são termoestáveis, uma vez que mantiveram a atividade antimicrobiana após todas as combinações de tempo e temperatura testados, suportando a autoclavagem a 121°C por 15 minutos (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8. Efeito da temperatura na atividade antimicrobiana (UA/mL) do SLC da cepa 26.

T(°C)	Tempo	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> UCV10CET	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19443	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090
25	30 min	-	800 UA/mL	-	-
	1 hora	-	800 UA/mL	-	-
	2 horas	-	800 UA/mL	-	-
30	30 min	-	800 UA/mL	-	-
	1 hora	-	800 UA/mL	-	-
	2 horas	-	800 UA/mL	-	-
37	30 min	-	800 UA/mL	-	-
	1 hora	-	800 UA/mL	-	-
	2 horas	-	800 UA/mL	-	-
45	30 min	-	800 UA/mL	-	-
	1 hora	-	800 UA/mL	-	-
	2 horas	-	800 UA/mL	-	-
60	30 min	-	800 UA/mL	-	-
	1 hora	-	800 UA/mL	-	-
	2 horas	-	800 UA/mL	-	-
100	30 min	-	800 UA/mL	-	-
	1 hora	-	800 UA/mL	-	-
	2 horas	-	800 UA/mL	-	-
121	20 min	-	400 UA/mL	-	-

(-) = resultado negativo.

A atividade do SLC da cepa 26 foi a mesma após 30 minutos, 1 hora e 2 horas nas temperaturas de 25°C a 100°C, e houve redução da atividade antimicrobiana quando

exposta a 121°C por 15 minutos(Tabela 8). Por outro lado, o SLC da cepa 32 manteve a mesma atividade após 30 minutos, 1 hora e 2 horas nas temperaturas de 25°C a 100°C, e também manteve a atividade antimicrobiana quando exposta a 121°C por 15 minutos, condições normalmente utilizadas no processo de autoclavagem (Tabela 9).

Tabela 9. Efeito da temperatura na atividade antimicrobiana (UA/mL) do SLC da cepa 32.

T(°C)	Tempo	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> UCV10CET	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19443	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090
25	30 min	-	800 UA/mL	400 UA/mL	-
	1 hora	-	800 UA/mL	200 UA/mL	-
	2 horas	-	800 UA/mL	200 UA/mL	-
30	30 min	-	800 UA/mL	400 UA/mL	-
	1 hora	-	800 UA/mL	200 UA/mL	-
	2 horas	-	800 UA/mL	200 UA/mL	-
37	30 min	-	800 UA/mL	400 UA/mL	-
	1 hora	-	800 UA/mL	200 UA/mL	-
	2 horas	-	800 UA/mL	200 UA/mL	-
45	30 min	-	800 UA/mL	400 UA/mL	-
	1 hora	-	800 UA/mL	200 UA/mL	-
	2 horas	-	800 UA/mL	200 UA/mL	-
60	30 min	-	800 UA/mL	200 UA/mL	-
	1 hora	-	800 UA/mL	200 UA/mL	-
	2 horas	-	800 UA/mL	200 UA/mL	-
100	30 min	-	800 UA/mL	200 UA/mL	-
	1 hora	-	800 UA/mL	200 UA/mL	-
	2 horas	-	800 UA/mL	200 UA/mL	-
121	20 min	-	800 UA/mL	-	-

(-) = resultado negativo.

Outros pesquisadores obtiveram resultados semelhantes em relação ao efeito da temperatura na atividade das bacteriocinas produzidas por BAL. Carvalho et al. (2010)

demonstraram que a bacteriocina produzida por uma cepa de *Lb. sakei* subsp. *sakei* 2a permaneceu estável com o tratamento de até 121°C por 15 minutos. Entretanto, a bacteriocina R1333 produzida por uma cepa de *Lb. sakei* manteve ativa após 2 horas a 100°C, mas perdeu a sua atividade a 121°C por 15 minutos (TODOROV et al., 2011b).

5.1.5. Estabilidade das substâncias antimicrobianas na presença de agentes químicos

O efeito de 1 % dos agentes químicos Triton X-114, Tween 80, Tween 20, NaCl, EDTA, SDS e uréia na atividade do SLC das cepas 26 e 32 pode ser visto na Tabela 10. Esses resultados indicam que, de maneira geral, a atividade antimicrobiana dos SLC não foi afetada por esses agentes químicos.

A estabilidade das bacteriocinas produzidas pelas cepas 26 e 32 na presença de agentes químicos é de grande importância sob o ponto de vista tecnológico e laboratorial, pois estes compostos podem ser utilizados nas etapas de purificação da bacteriocina, em técnicas de biologia molecular e em práticas bioquímicas, e o NaCl é comumente utilizado no processamento de alimentos.

Resultados semelhantes foram obtidos com as bacteriocinas produzidas por *Lb. plantarum* ST69BZ, *E. faecium* ST62BZ, *Lb. lactis* ST63BZ, ST611BZ, ST612BZ e *Pediococcus pentosaceus* ST44AM. Essas bacteriocinas permaneceram ativas após o tratamento com SDS, Tween 20, Tween 80, Triton X-100, NaCl e uréia (TODOROV; DICKS, 2009; TODOROV, 2010). Entretanto, Albano et al. (2007), com um experimento semelhante observaram que houve redução da atividade das bacteriocinas produzidas por cepas de *Pediococcus acidilactici* HA-6111-2 e HA-5692-3 quando expostas a esses agentes químicos.

Tabela 10. Efeito de diferentes agentes químicos na atividade antimicrobiana (UA/mL) do SLC das cepas 26 e 32.

Cepas	Agentes	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> UCV1/0CET	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19443	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090
26	Triton-X 100	-	800 UA/mL	400 UA/mL	800 UA/mL
	Tween 80	400 UA/mL	800 UA/mL	400 UA/mL	800 UA/mL
	Tween 20	800 UA/mL	800 UA/mL	400 UA/mL	800 UA/mL
	NaCl	800 UA/mL	800 UA/mL	400 UA/mL	800 UA/mL
	EDTA	800 UA/mL	800 UA/mL	400 UA/mL	800 UA/mL
	SDS	800 UA/mL	800 UA/mL	400 UA/mL	800 UA/mL
	Uréia	800 UA/mL	800 UA/mL	400 UA/mL	800 UA/mL
32	Triton-X 100	800 UA/mL	800 UA/mL	200 UA/mL	800 UA/mL
	Tween 80	400 UA/mL	800 UA/mL	200 UA/mL	400 UA/mL
	Tween 20	800 UA/mL	800 UA/mL	400 UA/mL	400 UA/mL
	NaCl	400 UA/mL	800 UA/mL	200 UA/mL	800 UA/mL
	EDTA	400 UA/mL	800 UA/mL	200 UA/mL	800 UA/mL
	SDS	200 UA/mL	800 UA/mL	200 UA/mL	800 UA/mL
	Uréia	800 UA/mL	800 UA/mL	200 UA/mL	800 UA/mL

(-)= resultados negativos. Os agentes químicos estavam na concentração de 1%.

5.1.6. Efeito inibitório das cepas 26 e 32 sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 em diferentes matrizes

No presente trabalho, a contagem inicial inoculada nos leites UHT integral e desnatado de *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi de aproximadamente 10^6 UFC/mL. As inoculações das cepas 26 e 32 foram de aproximadamente 10^8 UFC/mL, sendo que esta população permaneceu após os 14 dias de estocagem na presença do micro-organismo patogênico.

Após 14 dias de estocagem na presença da cepa 26, produtora de bacteriocina, o micro-organismo teste apresentou a mesma população no leite integral e no leite desnatado, enquanto, a população de *L. monocytogenes* ATCC 7644 no leite integral e

leite desnatado na presença da cepa 32, também produtora de bacteriocina, variou de 5,62 a 6,04 log UFC/mL (Tabela 11). Esses resultados demonstraram que não houve multiplicação de *L. monocytogenes*, ou houve inibição na presença das cepas de BAL. A análise de variância mostrou que houve diferença significativa entre os tratamentos, sendo que o tratamento cuja matriz foi o leite integral e a cepa 32 foi o que apresentou a maior inibição da *L. monocytogenes*. Após 14 dias de estocagem a população reduziu para 5,62 log UFC/mL (Tabela 11).

Quando somente *L. monocytogenes* foi inoculado nos dois diferentes tipos de leite (controle), houve aumento significativo de aproximadamente 2 log UFC/mL, obtendo uma população de 10^8 UFC/mL após 14 dias de estocagem.

Tabela 11. População (log UFC/mL) de *L. monocytogenes* ATCC 7644 estocadas em leite UHT integral e desnatado na presença de BAL produtoras de bacteriocinas.

Tempo	Tratamentos	Matrizes	
		LI	LD
0 dias	LM+26	6,27±0,38 ^{Bb}	6,89±0,14 ^{Ab}
	LM+32	7,29±0,20 ^{Aa}	7,43±0,27 ^{Aa}
	LM	6,78±0,40 ^{Aab}	6,31±0,22 ^{Bc}
7 dias	LM+26	6,42±0,48 ^{Ab}	5,92±0,95 ^{Ab}
	LM+32	6,79±0,95 ^{Aab}	6,59±0,93 ^{Aab}
	LM	7,72±0,15 ^{Aa}	7,80±0,11 ^{Aa}
14 dias	LM+26	6,55±0,47 ^{Ab}	7,06±0,09 ^{Ab}
	LM+32	5,62±0,30 ^{Ac}	6,04±0,19 ^{Ac}
	LM	8,67±0,18 ^{Aa}	8,69±0,29 ^{Aa}

LM= *L. monocytogenes* ATCC 7644; LI= Leite integral; LD= leite desnatado; ^A letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ($p < 0,05$); ^a letras iguais na mesma coluna, para um mesmo tempo de armazenamento não diferem estatisticamente ($p < 0,05$). Média ± Desvio padrão. Média de 2 repetições em duplicata (n=4).

Estes resultados demonstraram que as cepas de BAL foram capazes de controlar ou inibir o desenvolvimento de *L. monocytogenes*, quando comparados ao controle (sem BAL). A análise de variância (ANOVA) mostrou que não houve diferença significativa

entre os dois diferentes tipos de leite UHT quanto à inibição do micro-organismo patogênico (Tabela 11).

É importante ressaltar que este experimento foi realizado com alta concentração inicial de *L. monocytogenes* ATCC 7644 (10^6 UFC/mL). Pode-se supor que em menores populações as bacteriocinas produzidas pelas cepas 26 e 32 poderiam ser mais eficazes (TODOROV et al., 2011a). Rilla; Martinez e Rodrigues (2004) observaram a ação de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IPLA729 frente ao micro-organismo patogênico *S. aureus* em duas diferentes concentrações 10^4 UFC/mL (amostra 1) e 10^6 UFC/mL (amostra 2). Após 24h de incubação não foi detectado *S aureus* na amostra 1, entretanto, na amostra 2 foi detectado a população de 10^4 UFC/mL.

Os resultados obtidos demonstram que as cepas de BAL 26 e 32 apresentam potencial para serem aplicadas em produtos lácteos ou em outros produtos fermentados como uma alternativa adicional para a redução da contaminação do patógeno *L. monocytogenes* nestes alimentos. A aplicação dessas cepas em conjunto com as boas práticas de fabricação (BPF) pode auxiliar na obtenção de alimentos seguros para o consumo.

A atividade inibitória apresentada por bactérias produtoras de bacteriocina em meios de cultura (*in vitro*) pode não ser eficaz em matrizes alimentares. Vários fatores presentes nos alimentos podem influenciar no efeito antimicrobiano, por exemplo, interação com aditivos e ingredientes, inativação por enzimas alimentares e mudanças no pH do alimento (GÁLVEZ et al., 2009; COLLINS et al., 2011; HARTMANN; WILKE; ERDMANN, 2011; BALCIUNAS et al., 2013).

Pesquisadores obtiveram resultados semelhantes quando inocularam as cepas de BAL produtoras de bacteriocina, ou somente a bacteriocina (SLC ou purificada) frente à *L. monocytogenes* em diferentes matrizes alimentares. Pingitore et al. (2012)

observaram que uma cepa de *Enterococcus mundtii* CRL35 teve um efeito bacteriostático em queijo Minas durante 12 dias de estocagem, propositalmente contaminado com uma cepa de *L. monocytogenes* 426.

Segundo Arqués et al. (2011), a nisina (Nisaplin[®], Danisco) em combinação com a reuterina (beta-hidroxipropionaldeído) tiveram um efeito bacteriolítico em leite propositalmente contaminado com *L. monocytogenes* Ohio. Entretanto, Nascimento, Moreno e Kuaye (2008b) observaram que não houve diferença na população de *L. monocytogenes* entre amostras de queijo Minas contendo cepas de BAL produtoras de bacteriocina e cepas de BAL não produtoras de bacteriocina.

5.2. Potencial probiótico

5.2.1. Sobrevivência ao trato gastrointestinal

As cepas 13, 24, 28 e 32 sobreviveram até os 360 minutos de análise, que é equivalente ao tempo da passagem da bactéria pelo trato gastrointestinal de humanos, sendo essas cepas consideradas potencialmente probióticas (Tabela 12).

Mesmo havendo uma redução da população durante a simulação *in vitro* da fase gástrica ao longo do tempo, nas diferentes matrizes, a população residual (4 a 7 log UFC/mL) apresenta potencial para alcançar o intestino e promover os efeitos benéficos.

Durante a fase gástrica (30 a 120 minutos de análise), no meio MRS a população sobrevivente da cepa 28 foi significativamente maior que as outras cepas (7,29 log UFC/mL). No leite integral, a sobrevivência de todas as cepas foi significativamente igual, enquanto no leite desnatado, a cepa 24 foi a que obteve a maior sobrevivência (5,80 log UFC/mL).

Durante a fase entérica I (240 minutos de análise), a cepa 32 obteve a maior sobrevivência na matriz MRS e no leite desnatado, obtendo populações de 4,42 log

UFC/mL e 4,57 log UFC/mL, respectivamente. Entretanto, não houve diferença significativa na sobrevivência das cepas quando o leite integral foi utilizado.

Na fase entérica II (360 minutos de análise), todas as cepas não apresentaram diferença significativa na sobrevivência quando inoculadas no leite desnatado. Entretanto, quando inoculadas no leite integral, as cepas 13 e 28 as maiores populações. No meio MRS, somente a cepa 32 foi significativamente diferente, sendo o resultado da população inferior às outras cepas de BAL.

As cepas 13 e 28 não apresentaram diferença significativa de sobrevivência durante a simulação da passagem pelo TGI nas diferentes matrizes. Entretanto, a cepa 24 obteve a maior sobrevivência quando inoculadas no meio MRS e leite desnatado, enquanto a cepa 32 obteve maior sobrevivência quando inoculadas no leite desnatado.

A sobrevivência ao TGI foi relatada por outros pesquisadores. Esta é uma importante característica para avaliar a capacidade de uma cepa de passar pelo TGI e permanecer viável para exercer o efeito benéfico no hospedeiro. No trabalho realizado por Buriti, Castro e Saad (2010), foi observada maior sobrevivência de *Lb. acidophilus* La-5 presente no mousse de goiaba simbiótico refrigerado e no mousse congelado nas condições de simulação do TGI *in vitro*, na presença do prebiótico inulina.

Um trabalho realizado por Ji et al. (2013) com uma cepa de *Lc. citreum*, demonstrou que esta cepa sobreviveu 2 horas no pH 3,0, simulando a fase gástrica, com redução da população em 2 log UFC/mL, entretanto, durante a fase entérica com a adição da bile e aumento do pH, a população desta cepa se manteve constante.

Segundo Todorov et al. (2008a), uma cepa de *Lb. rhamnosus* GG foi resistente ao trato gastrointestinal. Charteris et al. (1998) obtiveram 100% de sobrevivência às condições do TGI quando as cepas de *L. casei* 212.3 e *Bifidobacterium infantis* 25962 estavam na presença de proteínas do leite.

Liserre, Re e Franco (2007) observaram que a cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* não sobreviveu durante os 360 minutos de análise no TGI. Entretanto, quando esta cepa foi encapsulada com alginato-quitosana, resistiu às condições do TGI obtendo contagem final de 10^5 a 10^6 UFC/g.

Tabela 12. População de BAL (log UFC/mL) das cepas 13, 24, 28 e 32 após a simulação *in vitro* do trato gastrointestinal.

Tempo (minutos)	Matrizes	Cepas			
		13	24	28	32
0	MRS	9,28±0,32 ^{Aa}	9,24±0,16 ^{Aa}	9,08±0,06 ^{Aa}	9,01±0,12 ^{Ab}
	LI	9,39±0,15 ^{Aa}	8,72±0,48 ^{Ba}	8,83±0,18 ^{ABb}	9,37±0,16 ^{Aa}
	LD	9,17±0,04 ^{Aa}	8,75±0,30 ^{Ba}	8,71±0,04 ^{Bb}	9,10±0,09 ^{Ab}
30	MRS	5,25±0,25 ^{Bb}	4,72±0,84 ^{Ba}	8,56±0,20 ^{Aa}	8,30±0,00 ^{Aa}
	LI	6,44±0,51 ^{Aa}	3,76±0,34 ^{Ca}	4,62±0,73 ^{BCb}	5,21±0,85 ^{ABb}
	LD	4,93±0,31 ^{Ab}	4,77±0,67 ^{Aa}	4,58±0,67 ^{Ab}	4,59±0,76 ^{Ab}
120	MRS	4,74±0,30 ^{Bab}	4,70±0,93 ^{Ba}	7,29±0,34 ^{Aa}	3,94±0,11 ^{Ba}
	LI	4,55±0,22 ^{Ab}	4,55±0,67 ^{Aa}	4,58±0,44 ^{Ab}	4,96±0,94 ^{Aa}
	LD	5,00±0,00 ^{Aba}	5,80±0,46 ^{Aa}	3,92±0,92 ^{Bb}	3,98±0,28 ^{Ba}
240	MRS	3,54±0,46 ^{Ba}	2,46±0,53 ^{Cb}	4,11±0,08 ^{Aba}	4,42±0,14 ^{Aa}
	LI	4,51±0,33 ^{Aa}	3,76±0,98 ^{Aab}	4,60±0,61 ^{Aa}	4,34±0,80 ^{Aa}
	LD	4,02±0,90 ^{Aba}	4,33±0,71 ^{Aba}	2,83±0,56 ^{Bb}	4,57±0,66 ^{Aa}
360	MRS	4,06±0,43 ^{Aab}	3,89±0,47 ^{Aa}	4,08±0,09 ^{Aab}	2,79±0,14 ^{Bc}
	LI	4,53±0,35 ^{Aa}	3,52±0,45 ^{Ba}	4,33±0,40 ^{Aa}	4,19±0,23 ^{Aba}
	LD	3,29±0,82 ^{Ab}	4,18±0,87 ^{Aa}	3,44±0,41 ^{Ab}	3,56±0,43 ^{Ab}

^A letras iguais na mesma linha para o mesmo tempo de análise não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$). ^a letras iguais na mesma coluna para o mesmo tempo de análise não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$). Média ± Desvio padrão. Média de 2 repetições em duplicata (n=4).

Pesquisas realizadas com a sobrevivência de bactérias probióticas são de grande importância para a seleção e desenvolvimento de novos produtos probióticos, e também, para melhorar o entendimento do possível mecanismo envolvendo os efeitos benéficos desses micro-organismos. Vários testes têm sido feitos para aumentar a sobrevivência das BAL no TGI, incluindo a seleção de cepas adaptadas a condições de *stress*, como alterações de pH e diversas concentrações de bile, tamponamento de iogurte com uma

mistura de proteínas do leite, uso de técnicas de microencapsulação, administração de cepas probióticas com leite ou com proteínas de leite e prebióticos (AKALIN et al., 2007; KAILASAPATHY, 2012).

5.2.2. Efeito de medicamentos

Como mostra a Tabela 13, as cepas testadas foram inibidas por drogas da classe dos anti-inflamatórios contendo ibuprofeno, cetoprofeno e diclofenaco de potássio. As cepas de BAL também foram inibidas por anti-histamínicos contendo cloridrato de prometazina e loratadina. Além disso, houve inibição por um dos medicamentos da classe dos anti-hipertensivos contendo na sua composição maleato de enalapril, sendo que este medicamento faz parte dos anti-hipertensivos doados pelo programa Farmácia Popular do Brasil, do governo federal.

As quatro cepas de BAL usadas nesta pesquisa foram testadas frente a 65 medicamentos, sendo que os medicamentos tiveram menor efeito (7,69%) no desenvolvimento da cepa 32, seguida da cepa 24 (12,30%), e das cepas 13 e 28 (15,38%).

Estudos recentes demonstraram também o efeito negativo desses medicamentos frente a bactérias probióticas (BOTES et al., 2008; CARVALHO et al., 2009; TODOROV; LEBLANC; FRANCO, 2012), Entretanto, não foram localizados na literatura trabalhos que testaram ampla variedade de drogas. Em um estudo realizado por Todorov et al. (2007), o diclofenaco de potássio e o ibuprofeno inibiram o crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HV219. Resultados semelhantes foram demonstrados por Todorov e Dicks (2008), em que o diclofenaco de sódio inibiu cepas de *L. platarum* ST8KF e ST341LD, *E. faecium* ST311LD e *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ST33LD. Entretanto, o crescimento da cepa de *L. acidophilus* La-14 não

foi inibido por nenhuma droga composta por diclofenaco de sódio, ibuprofeno ou diclofenaco de potássio (TODOROV et al., 2011c).

Todas as cepas foram extremamente sensíveis ao metotrexato de sódio, sendo que a cepa 13, 24 e 28 tiveram um MIC inferior a 0,4 mg/mL e a cepa 32 teve um MIC igual a 0,5 mg/mL. O metotrexato é um medicamento da classe dos anti-metabólicos comumente utilizado no tratamento de câncer, doenças auto-imunes, tal como artrite reumatoide. Esta terapia é continuada por 55 a 82% dos pacientes após dois anos de tratamento (SWIERKOT et al., 2012). Assim, para os pacientes que fazem uso deste medicamento, a ação dos probióticos é altamente comprometida, uma vez que os probióticos perdem a viabilidade na presença desta droga.

Um resultado extremamente preocupante é a inibição das cepas pela dipirona sódica. Esse medicamento é comumente utilizado por pessoas de diversas idades, de crianças até adultos. A dipirona sódica, nas concentrações de 70 mg/mL (migraliv) e 100 mg/mL (novalgina), inibiu o desenvolvimento das cepas 13, 28 e 32. Entretanto, outros analgésicos que contêm dipirona sódica em sua composição, tais como buscopan composto (50 mg/mL), dorflex (60 mg/mL) e neosaldina (60 mg/ mL) não inibiram as cepas de BAL, provavelmente devido ao uso de menores concentrações de dipirona. Por outro lado, o lisador (100 mg/mL) contém a mesma quantidade de dipirona que a novalgina, além de cloridrato de adifenina e cloridrato de prometazina e não inibiu o desenvolvimento das cepas de BAL. Uma possibilidade seria que os outros compostos presentes no lisador neutralizaram o efeito da dipirona no desenvolvimento das cepas de BAL.

Tabela 13. Efeito de medicamentos comerciais no crescimento das cepas de BAL (13, 24, 28 e 32).

Nome comercial	Concentração (mg/mL)	Substância ativa	Grupo do medicamento	Cepas de BAL			
				13	24	28	32
AAS adulto	100	Acido acetilsalicílico	Anti-inflamatório e analgésico	R	R	R	R
Advil	40	Ibuprofeno	Analgésico	12 [10,0]	15 [20,0]	15 [20,0]	24 [40,0]
Aldactone	5	Espironolactona	Diurético	R	R	R	R
Ansiopax	46,8	Kava	Ansiolítico e sedativo	R	R	R	R
Buscopan	2	Butilbrometo de escopolamina	Antiespasmódico e	R	R	R	R
composto	50	Dipirona sódica	analgésico	R	R	R	R
Biprofenid	30	Cetoprofeno	Anti-inflamatório e analgésico	17 [30,0]	17 [30,0]	R	R
Cardiolol	1,25	Carvedilol	Antianginoso e anti-hipertensivo	R	R	R	R
Celebra	40	Celecoxibe	Anti-inflamatório	R	R	R	R
Cerazette	0,0015	Desogestrel	Anticoncepcional	R	R	R	R
Clonotril	0,1	Clonazepam	Anticonvulsivante e sedativo	R	R	R	R
Cloridrato de fexofenadina	36	Cloridrato de fexofenadina	Anti-alérgico	R	R	R	R
Cloridrato de prometazina	5	Cloridrato de prometazina	Anti-histamínico	R	R	13 [5,0]	R
Cloridrato de propranolol	8	Cloridrato de propranolol	Anti-hipertensivo	R	R	R	R
Cloxacolam	0,4	Cloxacolam	Ansiolítico e sedativo	R	R	R	R
Cozaar	20	Losartana potássica	Anti-hipertensivo e inibidor da Eca	R	R	R	R
Decongex plus	2,4	Maleato de bronfeniramina	Descongestionante	R	R	R	R
	3	Cloridrato de fenilefrina					
Diasec	0,4	Cloridrato de loperamida	Anti diarreico	R	R	R	R
Diovan amlo fix	32	Valsartana	Anti-hipertensivo	R	R	R	R
	1	Anlodipino					

Continuação

Nome comercial	Concentração (mg/mL)	Substância ativa	Grupo do medicamento	Cepas de BAL				
				13	24	28	32	
Dipirona sódica	100	Dipirona sódica	Analgésico	R	R	R	R	
Doliprane	200	Paracetamol	Analgésico	R	R	R	R	
Dorflex	60 10 7	Dipirona sódica Cafeína Citrato de orfenadrina	Analgésico, anti-inflamatório e miorrelaxante	R	R	R	R	
Dramim B6	10 2	Dimenidrinato Cloridrato de piridoxina	Antiemético	R	R	R	R	
Ebastel	2	Ebastina	Anti-histamínico	R	R	R	R	
Enalprin	4	Maleato de enalapril	Anti-hipertensivo	R	R	R	R	
Flamador	10	Cetoprofeno	Analgésico, anti-inflamatório e anti-reumático	R	R	R	R	
Ibuprofene Biogaran	40	Ibuprofeno	Anti-inflamatório	17 [40,0]	17 [40,0]	15 [40,0]	21 [40,0]	
Levoid	0,0176	Levotiroxina sódica	Tireóide	R	R	R	R	
LipLess	20	Ciprofibrato	Anti-hipertriglicéidêmico	R	R	R	R	
Lisador	100 2 1	Dipirona sódica Cloridrato de adifenina Cloridrato de prometazina	Analgesico, Antiespasmódico Intestinal e uterino	R	R	R	R	
Loratadina	2	Loratadina	Anti-histamínico	23 [<0,4]	23 [<0,4]	29 [<0,4]	R	
Maleato de enalapril	2	Maleato de enalapril	Anti-hipertensivo	21 [1,25]	24 [1,25]	29 [2,5]	R	
Maracujina	5 2,5 2,5	Passiflora alata Erythrina mulungu Crataegus oxyacantha	Neurosedativo	21 [5,0]	R	R	R	
Maxsulid	80	Nimesulida betaciclodextrina	Analgésico, Anti-inflamatório e Antipiretico	R	R	R	R	

Continuação

Nome comercial	Concentração (mg/mL)	Substância ativa	Grupo do medicamento	13	24	28	32
Meloxicam	3	Meloxicam	Anti-inflamatório	R	R	R	R
Meticorten	4	Prednisona	Anti-inflamatório	R	R	R	R
Metiocolin B12	20	DL-metionina	Hematoprotetor	R	R	R	R
	5	Cloreto de colina					
	10	Inositol					
	0,0004	Cianocobalamina					
Metotrexato	0,5	Metotrexato de sódio	Antimetabólico	37 [$<0,4$]	31 [$<0,4$]	35 [$<0,4$]	19 [0,5]
Migraliv	0,2	Mesilato de diidroergotamina	Antienxaquecoso				
	70	Dipirona sódica		22 [8,75]	R	13 [44,0]	29 [8,75]
	20	Cafeína					
Mioflex	60	Paracetamol	Analgésico,	R	11 [60,0]	R	R
	30	Carisoprodo	anti-inflamatório e				
	15	Fenilbutazona	miorreaxante				
Miosan	1	Cloridrato de Ciclobenzaprina	Relaxante muscular	R	R	R	R
Miosan	6	Cloridrato de Ciclobenzaprina	Relaxante muscular	R	R	21 [6,0]	R
Motilium	2	Domperidona	Antiemético	23 [1,0]	15 [0,5]	14 [$<0,4$]	R
Neosaldina	60	Dipirona sódica	Analgésico e antipirético	R	R	R	R
	6	Mucato de isometepteno					
	6	Cafeína anidra					
Novalgina	100	Dipirona sódica	Antitérmico e analgésico	9 [100,0]	R	25 [6,25]	11 [25,0]
Omepramedi	4	Omeprazol	Antiulceroso e inibidor de bomba de prótons	R	R	R	R
Paracetamol	150	Paracetamol	Analgésico e Antitérmico	R	R	R	R
Plaq	15	Bissulfato de clopidogrel	Anti-hipertensivo	R	R	R	R
Plasil	2	Cloridrato de metoclopramida	Antiemético	R	R	R	R
Prelone	1	Prednisolona	Glicocorticóide	R	R	R	R

Continuação

Nome comercial	Concentração (mg/mL)	Substância ativa	Grupo do medicamento	Cepas de BAL		
				13	24	28
Profenid entérico	100	Cetoprofeno	Anti-inflamatório, antitérmico e analgésico	R	R	R
Primoston	0,4 0,002	Acetato de noretisterona Etinilestradiol	Anti-hemorragico	R	R	R
Resfenol	80 0,8 0,8	Paracetamol cloridrato de fenilefrina maleato de clorfeniramina	Anti-térmico e analgésico	R	R	R
Rupafin	2,56	Fumarato de rupatadina	Anti-alérgico	R	R	R
Selozok	10	Succinato de metoprolol	Insuficiência cardíaca	R	R	R
Sinvalip	4	Sinvastatina	Anti-lipêmico	R	R	R
Somalgin cardio	20	Acido acetilsalicílico	Anti-inflamatório	R	R	R
Spasfon LYOC	16	Phloroglucinol	Anti-inflamatório	R	R	R
Tamisa 30	0,015 0,006	Gestodeno Etinilestradiol	Contraceptivo oral	R	R	R
Toragesic	2	Trometanol	Analgésico	R	R	R
Transamin	50	Acido tranexamico	Anti-hemorragico	R	R	R
Tylenol	100 6	Paracetamol Cloridrato de pseudoefedrina	Antitérmico e analgésico	R	R	R
Tylenol DC	100	Paracetamol	Analgésico	R	R	R
Tylex	6 100	Fosfato de codeína Paracetamol	Analgésico	R	R	R
Vasativ	20	Cilostazol	Vasodilatador	R	R	R
Vertex	10	Dicloridrato de flunarizina	Vasodilatador	R	R	R

Hoje é comum pacientes que estão consumindo alimentos probióticos estarem ao mesmo tempo fazendo uso de algum medicamento. Por isso, é interessante determinar o efeito de medicamentos na viabilidade das cepas de BAL (TODOROV et al., 2011c). Os resultados obtidos podem ser úteis para os médicos, farmacêuticos e pacientes na escolha dos medicamentos para evitar perda do efeito terapêutico do alimento probiótico. Sob o ponto de vista tecnológico, a cepa 32 tem o maior potencial de aplicação nos alimentos, uma vez que apresentou maior resistência na presença dos medicamentos.

As cepas 28 e 32 foram resistentes a três antibióticos dos 19 antibióticos testados. Entretanto, a cepa 13 foi resistente a quatro antibióticos, e a cepa 24 foi resistente somente a dois antibióticos. Todas as cepas testadas foram resistentes frente à vancomicina (Tabela 14).

A resistência aos antibióticos pode ser inata, ou intrínseca, relacionada com a fisiologia dos micro-organismos, sendo uma característica inerente em certas espécies de bactérias, não sendo afetada pelo uso abusivo de antibióticos. Por exemplo, algumas bactérias podem utilizar estratégias temporárias em que os genes são expressos de uma forma diferente ou até mesmo suprimidos, a fim de permitir a sobrevivência na presença de antibióticos. Sabe-se que o gênero *Leuconostoc* tem a resistência intrínseca a vancomicina, devido às características singulares da sua parede celular (HEMME; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, 2004; ROSENBLATT-FARRELL, 2009).

No entanto, a forma intrínseca de resistência não é a principal fonte de preocupação para a saúde humana e animal. A grande maioria dos micro-organismos resistentes aos antibióticos surgiu com mudanças genéticas, adquirindo através de mutação, ou por captação do material genético pela transferência horizontal

(ROSENBLATT-FARRELL, 2009; DICKS et al., 2009; CAPITA; ALONSO-CALLEJA, 2013).

Diante disso, nos últimos anos, maior atenção tem sido dada aos alimentos como potencial transportador de genes de resistência a antibióticos. Sabe-se que as culturas *starters* usadas em alimentos fermentados tem o potencial de servir como reservatório desses genes, aumentando o risco de transferi-los para outras bactérias. A preocupação com o aumento da resistência aos antibióticos comumente usados na medicina aumentou o número de pesquisas relacionadas em analisar a resistência a antibióticos destinados ao uso na biotecnologia alimentar (KASTNER et al., 2006; HUMMEL; HOLZAPFEL; FRANZ, 2007).

Resultados semelhantes foram obtidos por outros pesquisadores. Birri et al. (2012) observaram que cepas de *L. casei* foram sensíveis a tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina e ampicilina, entretanto, todas essas cepas foram resistentes à vancomicina.

Todorov et al. (2011a) demonstram a inibição de cepas de *Lb. curvatus* ET 06, ET30 e ET31, *Lb. fermentum* ET35, *Lb. delbueckii* ET32, *Pediococcus acidilacti* ET34 por antibióticos. Liu et al. (2009) observaram, dentre as cepas testadas, que *E. faecium*, *Lb. plantarum* e *Lactococcus lactis* tinham sensibilidade a vários antibióticos, entretanto, algumas cepas obteve resistência aos antibióticos testados. Todorov e Dicks (2008) observaram a inibição do crescimento de *Enterococcus faecium* ST311LD, *Lb. plantarum* ST8KF e *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ST33LD pelos antibióticos.

Tabela 14. Resistência das cepas 13, 24, 28 e 32 aos antibióticos. Halos de inibição em milímetros.

Antibióticos ($\mu\text{g}/$ disco)	Classificação	Cepas			
		13	24	28	32
Ampicilina 10	Penicilina/ β -lactâmico (interfere na síntese da parede celular)	22	23	22	25
Ceftazidina 30	3 ^a geração cefalosporina/ β -lactâmico (interfere na síntese da parede celular)	12	15	24	17
Cefuroxona 30	β -lactâmico (interfere na síntese da parede celular)	23	34	32	25
Ceftiofur 30	3 ^a geração cefalosporina/ β -lactâmico (interfere na síntese da parede celular)	29	36	31	23
Ciprofloxacina 5	Fluoroquinolona (inibe a topoisomerase II)	24	18	10	14
Cloranfenicol 30	Cloranfenicol (previne a ligação de peptídeos – inibe a síntese proteica)	22	22	28	22
Eritromicina 15	Macrolídeo (inibe a síntese proteica)	24	22	24	28
Fosfomicina 50	β -lactâmico (interfere na síntese da parede celular)	0	22	0	0
Gentamicina 10	Aminoglicosídeo (inibe a síntese proteica)	16	10	10	22
Neomicina 30	Aminoglicosídeo (inibe a síntese proteica)	26	15	17	23
Nitrofuration 300	Derivado da nitrofurona (inibe o ácido nucleico)	0	28	24	18
Norfloxacina 10	Quinolonas (inibe a enzima DNA girase)	10	20	10	10
Oxaciclina 1	β -lactâmico (interfere na síntese da parede celular)	14	0	18	10
Penicilina 10	Penicilina/ β -lactâmico (interfere na síntese da parede celular)	28	22	28	28
Streptomomicina 300	Aminoglicosídeo (inibe a síntese proteica)	20	22	14	28
Teicoplanina 30	Glicopeptídeo (inibe a síntese da parede celular da bactéria)	0	16	0	0
Tetraciclina 30	Tetraciclina (Inibe a síntese proteica)	30	28	26	26
Tobramicina 10	Aminoglicosídeo (inibe a síntese proteica)	23	20	25	20
Vancomicina 30	Glicopeptídeo (inibe a síntese da parede celular da bactéria)	0	0	0	0

Em negrito = cepas resistentes aos antibióticos

5.2.3. Auto-agregação e co-agregação

A agregação mostrou ser específica para cada cepa, e pode variar no mesmo grupo taxonômico (TODOROV et al., 2011a). A auto agregação e co-agregação das cepas de BAL estão apresentadas nas Figuras 1 a 3. A cepa 13 obteve o maior nível de

auto-agregação na temperatura de 37°C (59,2%), o que já era esperado, pois essa bactéria é mesófila. Entretanto, a cepa 24 obteve resultados semelhantes nas temperaturas de 4°C e 37°C (59,45 e 58,2%, respectivamente). As cepas 28 e 32 obtiveram o maior resultado (55,2%) de auto-agregação a 4°C, 55,2% e 31,4%, respectivamente.

No entanto, a cepa 32 apresentou a menor porcentagem de auto-agregação comparada com as outras cepas testadas neste trabalho. Estes resultados foram baixos comparados com outras cepas de BAL, como *Lb. paracasei* ST284BZ (99%), e *Lb. pentosaceus* ST712BZ (67%) (TODOROV; DICKS, 2008). Essas temperaturas foram escolhidas para avaliar o comportamento da cepa na temperatura de estocagem refrigerada (4°C), de desenvolvimento na temperatura corporal (37°C) e de desenvolvimento na temperatura de fabricação de leites fermentados (37°C e 42°C).

As BAL se agregam à mucosa intestinal e às células epiteliais prevenindo a adesão de micro-organismos patogênicos. A aderência na mucosa intestinal é de grande importância para que os micro-organismos sobrevivam e se multipliquem no hospedeiro (ROOS; JONSSON, 2002).

A co-agregação precisa ser discutida levando em conta o espectro de atividade da bacteriocina produzida pela cepa de BAL pois se as bacteriocinas produzidas por essas cepas de BAL não inibirem o parceiro da co-agregação, as duas cepas podem se ligar e facilitar a produção do biofilme. Entretanto, se a bacteriocina for ativa frente ao parceiro da co-agregação, a alta co-agregação pode facilitar o modo de ação da bacteriocina, com isso facilitando a eliminação do parceiro da co-agregação do sistema TGI (TODOROV; LE BLANC; FRANCO, 2012).

Nos resultados obtidos no teste 4.1.4., o micro-organismo patogênico *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi sensível à bacteriocina produzida por todas as cepas de

BAL testadas. Com isso, foi interessante para a nossa pesquisa obter resultados altos de co-agregação das BAL com esta cepa patogênica (41-50%, 28-55%, 30-49%, respectivamente a 4°C, 37°C e 42°C). Entretanto, a cepa de *L. innocua* ATCC 33090 não foi inibida pelos compostos antimicrobianos produzidos pela cepa 13, e os resultados de co-agregação dessas cepas foram altos (52,8%, 58,9% e 36,1% respectivamente a 4°C, 37°C e 42°C).

Os maiores resultados encontrados na co-agregação foi na temperatura de 4°C (40 a 60%) quando as cepas de BAL estavam agregadas a *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* UCV10CET, *E. faecalis* ATCC 19443, *L. innocua* ATCC 33090, *L. monocytogenes* ATCC 7644 (Figuras 1a 3). Quando utilizamos a temperatura de 37°C, para simular o TGI, os resultados não foram muito diferentes (20-60%) dos resultados obtidos a 4°C. Os altos níveis de co-agregação das cepas 13, 24 e 28 (47-52%) com a cepa não patogênica de *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* UCV10CET a 37°C podem facilitar a presença dessas espécies no TGI (TODOROV et al., 2011a).

Quando foi realizado o experimento a 37°C, a cepa 32 obteve os menores resultados na co-agregação com *Lc. mesenteroides* UCV10CET (20,1%), *E. faecalis* ATCC 19443 (30,3%), *L. innocua* ATCC 33090 (24,3%) e *L. monocytogenes* ATCC 7644 (28,1%).

Resultados inferiores aos obtidos nesta pesquisa foram obtidos por Todorov et al. (2011b). A co-agregação de diferentes cepas de BAL (*Lb. curvatus* ET30, *Lb. curvatus* ET31, *Lb. delbrueckii* ET32, *Lb. fermentum* ET35) isoladas de salmão, com a cepa de *E. faecalis* ATCC 19443 a 37°C variou de 10 a 20%.

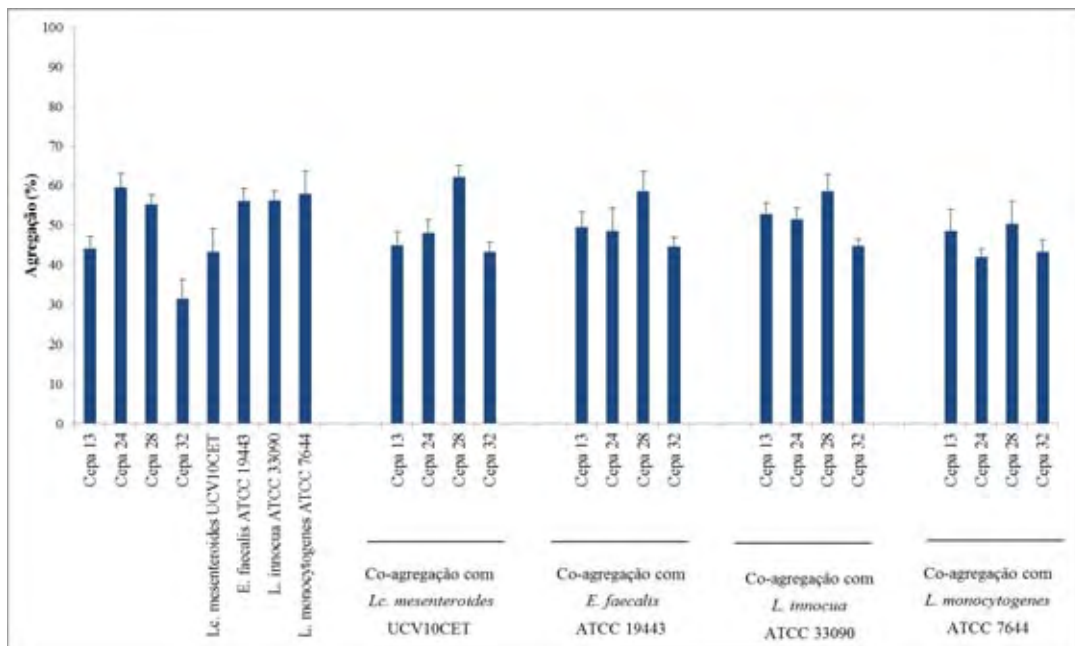


Figura 1. Agregação das cepas 13, 24, 28 e 32, *Lc. mesenteroides* UCV10CET, *E. faecalis* ATCC 19443, *L. innocua* ATCC 33090 e *L. monocytogenes* ATCC 7644 a 4°C.

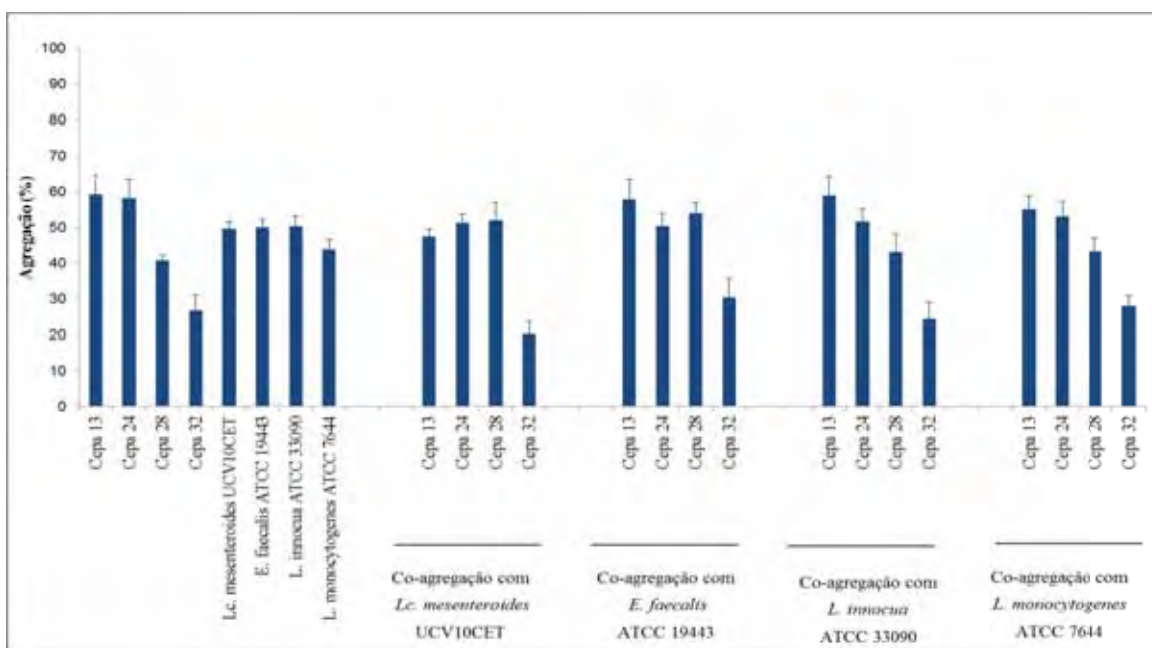


Figura 2. Agregação das cepas 13, 24, 28 e 32, *Lc. mesenteroides* UCV10CET, *E. faecalis* ATCC 19443, *L. innocua* ATCC 33090 e *L. monocytogenes* ATCC 7644 a 37°C.

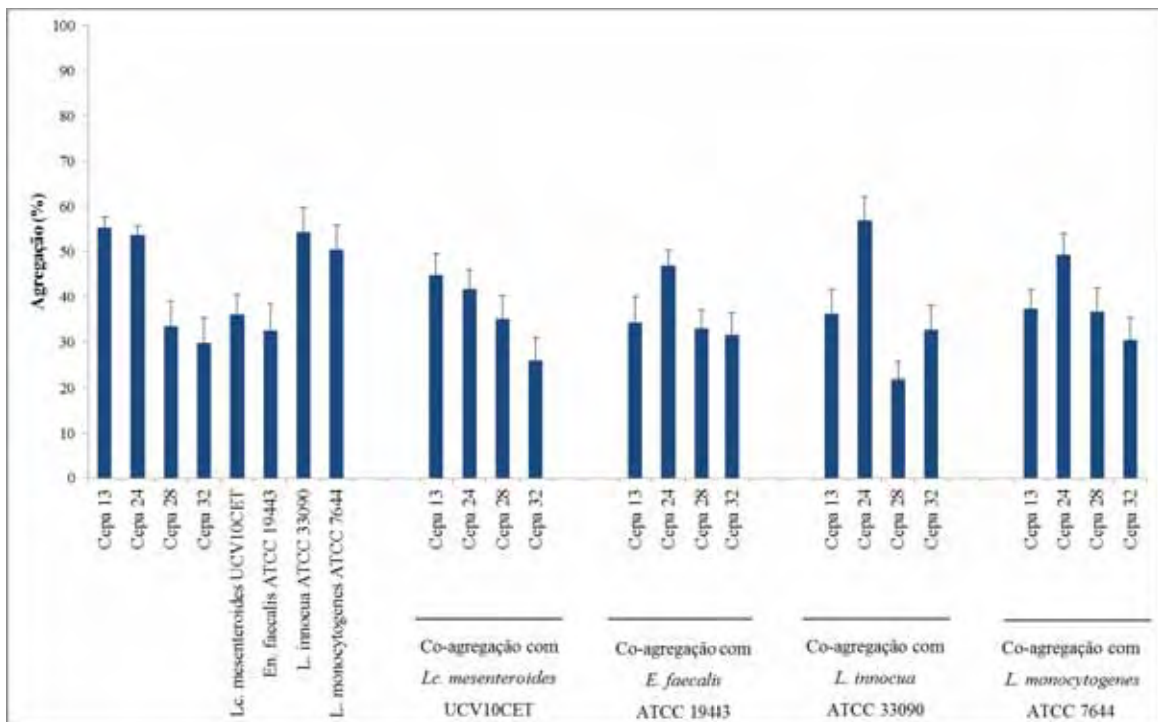


Figura 3. Agregação das cepas 13, 24, 28 e 32, *Lc. mesenteroides* UCV10CET, *E. faecalis* ATCC 19443, *L. innocua* ATCC 33090 e *L. monocytogenes* ATCC 7644 a 42°C.

Na temperatura de 42°C, simulando o processo de fermentação, a cepa 24 obteve o maior nível de co-agregação com as cepas patogênicas, *L. monocytogenes* ATCC 7644 (49,1%), *L. innocua* ATCC 33090 (56,8%) e *E. faecalis* ATCC 19443 (46,7%), assim, se houver a produção de bacteriocinas pode-se evitar ou reduzir o desenvolvimento dos micro-organismos patogênicos nos alimentos.

5.2.4. Hidrofobicidade

Neste presente trabalho todas as cepas apresentaram altos níveis de hidrofobicidade, 68,9%, 64,9%, 66,7% e 72,2% para as cepas 13, 24, 28 e 32, respectivamente. Bactérias com alta porcentagem de hidrofobicidade normalmente apresentam alta capacidade de adesão às células da mucosa intestinal. Para determinar o caráter hidrofóbico da superfície celular de uma cepa *in vitro*, hoje são utilizados vários

compostos apolares, como o n-hexadecano e o tolueno (GUGLIELMOTTI et al., 2007; TODOROV et al., 2011a).

Segundo Schar-Zammaretti e Ubbink (2003), a hidrofobicidade está relacionada com a adesão da bactéria probiótica na mucosa, mas não é um pré-requisito para uma forte aderência às células.

Todorov, Le Blanc e Franco (2012) e Todorov et al. (2011b) ao estudarem o potencial hidrofóbico obtiveram resultados semelhantes, com cepas de *L. plantarum* ST16Pa (68,7%), *L. fermentum* (78,9%), no entanto, outras cepas de BAL apresentaram resultados inferiores, tais como: *L. delbrueckii* (43,7%), e *Pediococcus acidilactici* (51,3%).

5.2.5. Atividade da enzima β -galactosidase

A produção da enzima β -galactosidase por cepas de BAL é de grande importância para a saúde do consumidor, pois esta enzima tem a função de hidrolisar a lactose em galactose e glicose. Neste estudo, as cepas 13, 24 e 32 são produtoras desta enzima, entretanto, a cepa 28 não foi produtora.

As pessoas intolerantes à lactose, cuja produção de β -galactosidase no intestino é baixa ou deficiente, podem consumir leite fermentado por estas cepas, pois estas bactérias irão degradar a lactose, reduzindo ou eliminando os sintomas da intolerância.

Outros pesquisadores obtiveram resultados semelhantes com cepas de BAL. Meira et al. (2012) obtiveram resultados positivos com cepas de *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* e *Lb. parabuchneri*. Paula (2012) também observou a produção de β -galactosidase por uma cepa de *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*.

5.2.6. Genes associados à adesão (*mub*, *mapA*, *EF-Tu*)

As cepas de BAL 13 e 32 apresentaram o gene *EF-Tu*, entretanto, todas as cepas de BAL testadas não apresentaram os genes *mub* e *mapA* (Tabela 15). O gene de alongação (*EF-Tu*) é uma proteína de adesão, que também se liga à mucina e auxilia na colonização de algumas cepas de bactérias probióticas no TGI (DUARY; BATISH; GROVER, 2012). Desta forma, as cepas 13 e 32 tem maior probabilidade de colonizar o TGI e resultar em efeitos benéficos para o hospedeiro.

Resultados semelhantes foram obtidos por outros pesquisadores. Todorov e Dicks (2008) observaram a presença desse gene em cepas *Lb. plantarum* (ST26MS, ST28MS, ST23LD, ST341LD, 423, ST8KF) e *Lc. mesenteroideis* subsp. *mesenteroides* ST33LD.

Tabela 15. Verificação da presença de genes de adesão à mucosa.

Genes	Cepas			
	13	24	28	32
<i>Mub</i>	-	-	-	-
<i>Mapa</i>	-	-	-	-
<i>EF-Tu</i>	+	-	-	+

(-) negativo. (+) positivo

5.2.7. Genes associados a fatores de virulência, produção de aminas biogênicas e resistência a antibióticos

Somente a cepa 24 apresentou gene de resistência à *van A* (Tabela 16). Mesmo sabendo que o gênero *Lactobacillus* não é na maioria dos casos patogênico e, portanto, clinicamente menos importante que o gênero *Enterococcus* e *Streptococcus*, é necessário analisar a presença de genes de resistência a antibióticos, pois se sabe que

existe uma preocupação de que essas bactérias não patogênicas atuem como um reservatório de genes de resistência e podem transferir esses genes para bactérias patogênicas e oportunistas durante a passagem pelo TGI, contribuindo assim para a transferência desses genes (SALYERS; GUPTA; WANG, 2004).

Várias pesquisas já demonstraram ser possível a transferência de genes de resistência de cepas de *Lactobacillus* para cepas de bactérias patogênicas (GEVERS; HUYS; SWINGS, 2003; JACOBSEN et al., 2007).

Resultados semelhantes foram apresentados por Moraes et al. (2012), entre 20 cepas de *Enterococcus* sp., somente duas cepas apresentaram positividade para o gene de resistência à *van A*, e uma cepa também apresentou positividade para o gene de resistência à *van B*.

Além dos genes de resistência à vancomicina é importante realizar alguns testes de fatores de virulência que comumente são realizados para cepas do gênero *Enterococcus*, por exemplo, gelatinase (*gelE*), hialuronidase (*hyl*), substância de agregação (*asa1*), proteína de superfície de enterococos (*esp*), citolisina (*cylA*), antígeno da endocardite (*efaA*), proteína de adesão ao colágeno (*ace*), e os genes de descarboxilase do aminoácido tais como, histidina descarboxilase (*hdc1* e *hdc2*), tirosina descarboxilase (*tdc*), ornitina descarboxilase (*odc*) (VANKERCKHOVEN et al., 2004; MARTIN-PLATERO et al., 2009).

A cepa 13 não apresentou nenhum gene de virulência, a cepa 24 apresentou o gene *ace*, entretanto, a cepa 28 apresentou somente o gene *odc* e a cepa 32 contém os genes *asa1* e *tdc*. Nenhuma das cepas apresentaram os genes *gelE*, *hyl*, *esp*, *cylA*, *efaA*, *hdc1* e *van B*. Em um estudo relatado por Moraes et al. (2012), todas as cepas de *Enterococcus* sp. obtiveram resultados positivos para o gene *asa1*, e apenas uma das cepas obteve resultado negativo para o gene *gelE*. Em outro estudo realizado por Cotton

et al. (2010), uma cepa de *Lc. mesenteroides* e de *L. casei* isoladas de vinho não apresentaram nenhum dos genes de amins biogênicas (*hdc*, *tdc* e *odc*). Entretanto, cepas de *L. brevis* e *L. hilgardii* também isoladas de amostras de vinhos, apresentaram os genes *tdc* e *tdc* e *hdc*, respectivamente.

Os genes *hdc1* e *hdc2*, *tdc* e *odc* quando expressos produzem as amins biogênicas histamina, tiramina e ornitina, respectivamente. Baixos níveis de amins biogênicas nos alimentos não são considerados um sério risco a população, mas quando consumido em concentrações excessivas podem causar efeitos tóxicos aos consumidores (CAÑAS et al.; 2009; ROMANO et al., 2013).

Tabela 16. Verificação da presença de genes associados à virulência, resistência a antibióticos e amins biogênicas

Genes	Cepas			
	13	24	28	32
<i>gelE</i> (gelatinase)	-	-	-	-
<i>hyl</i> (hialuronidase)	-	-	-	-
<i>asa1</i> (substância de agregação)	-	-	-	+
<i>esp</i> (proteína de superfície de enterococos)	-	-	-	-
<i>cylA</i> (citolisina)	-	-	-	-
<i>efaA</i> (antígeno da endocardite)	-	-	-	-
<i>ace</i> (proteína de adesão ao colágeno)	-	+	-	-
<i>van A</i> (vancomicina)	-	+	-	-
<i>van B</i> (vancomicina)	-	-	-	-
<i>hdc1</i> (histidina descarboxilase)	-	-	-	-
<i>hdc2</i> (Histidina descarboxilase)	-	-	-	-
<i>tdc</i> (Tirosina descarboxilase)	-	-	-	+
<i>odc</i> (Ornitina descarboxilase)	-	-	+	-

(-) negativo. (+) positivo

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que:

- 1- Seis cepas de BAL isoladas de mussarela de búfala (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* - cepa 13, *L. casei* - cepa 24, *Lc. citreum* - cepa 28 e *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* - cepas 26, 30 e 32) produziram substância antimicrobiana de natureza proteica (bacteriocinas). As bacteriocinas produzidas pelas cepas 26 e 32 são resistentes ao calor, extremos de pH e diferentes detergentes.
- 2- As cepas 26 e 32 reduziram a população do micro-organismo patogênico *L. monocytogenes* ATCC 7644 quando inoculadas em leite UHT integral e leite UHT desnatado, apresentando um efeito bacteriostático.
- 3- As cepas 13, 24, 28 e 32 apresentaram sobrevivência ao trato gastrointestinal quando inoculadas em MRS, leite UHT integral e leite UHT desnatado. As cepas foram inibidas por drogas da classe dos anti-inflamatórios, anti-histamínicos, anti-hipertensivos e antibióticos. Entretanto, obtiveram ótimos resultados de auto-agregação, co-agregação e hidrofobicidade. A produção da enzima β -galactosidase foi observada nas cepas 13, 24 e 32, e somente a 13 e 24 apresentaram o gene de adesão à mucosa (EF-Tu). Somente a cepa 13 não apresentou nenhum dos fatores genéticos de virulência, sendo considerada a cepa de maior potencial probiótico entre as BAL estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKALIN, A. S.; GONÇ, S.; UNAL, G.; FENDERVA, S. Effects of fructooligosaccharide and whey protein concentrate on the viability of starter culture in reduced-fat probiotic yogurt during storage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n. 2, p. 222-227, 2007.

ALBANO, H.; TODOROV, S. D.; REENEN, C. A.; HOGG, T.; DICKS, L. M. T.; TEIXEIRA, P. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 116, n. 2, p. 239-247, 2007.

AMMOR, M. S.; FLORES, A. B.; MAYO, B. Antibiotic resistance in not-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, London, v. 24, n. 6, p. 559-570, 2007.

ANASTASIADOU, S.; PAGAGIANII, M.; FILIOUSIS, G.; AMBROSIADIS, I.; KOIDIS, P. Growth and metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged fermentation. Purification, characterization and properties of the produced pediocin SM-1. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 43, n. 6, p. 448-454, 2008.

ARQUÉS, J. L.; RODRÍGUEZ, E.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Combined effect of reuterin and lactic acid bacteria bacteriocins on the inactivation of food-borne pathogens in milk. **Food Control**, Guildford, v. 22, n.3, p. 457-461, 2011.

ARTHUR, M.; REYNOLDS, P.; COURVALIN, P. Glycopeptide resistance in enterococci. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 4, n.10, p. 401–407, 1996.

BALCIUNAS; E. M.; MARTINEZ, F. A. C.; TODOROV, A. D.; FRANCO, B. D. G. M.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R. P. S. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, Guildford, v. 32, n. 1, p. 134-142, 2013.

BEGLEY, M. C. G. M.; GAHAN, C. G.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 4, p. 625-651, 2005.

BIRRI, D. J.; BREDE, D. A.; TESSEMA, G. T.; NES, I. F. Bacteriocin production, antibiotic susceptibility and prevalence of haemolytic and gelatinase activity in faecal lactic acid bacteria isolated from healthy ethiopian infants. **Microbial Ecology**, New York, DOI 10.1007/s00248-012-0134-7, 2012.

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

BOTES, M.; LOOS, B.; VAN REENEN, C. A.; DICKS, L. M. T. Adhesion of the probiotic strains *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus platarum* 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 190, n. 5, p. 573-584, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria nº 359, de 14 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade de qualidade do requeijão. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**. Brasília, DF, 04 set. 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticas**: lista de alegações de propriedades funcionais aprovadas. Brasília, DF, julho, 2008.

BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature**, London, v. 3, n. 3, p. 238-250, 2005.

BRUNO, M. E.; MONTVILLE, T. J. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 9, p. 3003-3010, 1993.

BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 137, n. 2-3, p. 121-129, 2010.

CAÑAS, P. M. I.; ALONSO, S. G.; PÉREZ, P. R.; PRIETO, S. S.; ROMERO, E. G.; HERREROS, M. L. L. P. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni* isolates from malolactic fermentation of Tempranillo wine. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 4, p. 907-910, 2009.

CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, New York, v. 53, n. 1, p. 11–48, 2013.

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

CARVALHO, K. G.; BAMBIRRA, F. H.; KRUGER, M. F.; BARBOSA, M. S.; OLIVEIRA, J. S.; SANTOS, A. M.; NICOLI, J. R.; BEMQUERER, M. P.; MIRANDA, A.; SALVUCCI, E. J.; SESMA, F. J.; FRANCO, B. D. Antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a, a bacteriocinogenic strain isolated from a Brazilian meat product. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, Houndmills, v. 37, n. 4, p. 381-390, 2010.

CARVALHO, K. G.; KRUGER, M. F.; FURTADO, D. N.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M. Evaluation of the role of environmental factors in the human gastrointestinal tract on the behaviour of probiotic cultures *Lactobacillus casei* Shirota and *Lactobacillus casei* LC01 by the use of semi-dynamic in vitro model. **Annals of Microbiology**, London, v. 59, n.3, p. 439-445, 2009.

CASTRO, M. P.; PALAVECINO, N. Z.; HERMAN, C.; GARRO, O. A.; CAMPOS, C. A. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. **Meat Science**, Barking, v. 87, n. 4, p. 321-329, 2011.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Development and application of *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, n. 5, p. 759-768, 1998.

CHERIGUENE, A.; CHOUGRANI, F.; BEKADA, A. M. A.; EL SODA, M.; BENSOLTANE, A. Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian

goats' milk. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 6, n.15, p. 1854-1861, 2007.

CHIANG, S. S.; PAN, T. M. Beneficial effects of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and its fermented products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 93, n.3, p. 903-916, 2012.

CHIEN, Y. L.; WU, L. Y.; LEE, T. C.; HWANG, L. S. Cholesterol-lowering effect of phytosterol-containing lactic-fermented milk powder in hamsters. **Food Chemistry**. Barking, v. 119, n. 3, p. 1121–1126, 2010.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, n. 1, p. 1-20, 2001.

COCCONCELLI, P. S.; CATTIVELLI, D.; GAZZOLA, S. Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 88, n. 2-3, p. 315-323, 2004.

COLLINS, B.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. The impact of nisin on sensitive and resistant mutants of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 110, n. 6, p. 1509-1514, 2011.

COLLINS, J.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, n. 2, p. 487-490, 1998.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 10, p. 777-788, 2005.

COTTON, M.; ROMANO, A.; SPANO, G.; ZIEGLER, K.; VETRANA, C.; DESMARAIS, C.; LONVAUD-FUNES, A.; LUCAS, P.; COTTO, E. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria in wine and cider. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 27 n. 1, p. 1078-1085, 2010.

- CRUZ, A. G.; BURITI, F. C. A.; SOUZA, C. H. B.; FARIA, J. A. F.; SAAD, S. M. I. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science Technology**, Cambridge, v. 20, n. 8p. 344-354, 2009b.
- CRUZ, A.G.; ANTUNES, A. E. C.; SOUZA, A. L. O. P.; FARIA, J. A. F.; SAAD, S. M. I. Ice-cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, Barking, v. 42, n. 3, p. 1233-1239, 2009a.
- D'SOUZA A. L.; RAJKUMAR, C.; COOKE, J.; BULPITT, C. J. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhea: meta-analysis. **British Medical Journal**, London, v. 324, n. 7350, p. 1-6, 2002.
- DANIELSEN, M.; WIND, A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 82, n. 1, p. 1-11, 2003.
- DE LAS RIVAS, B.; MARCOBAL, A.; MUÑOZ, R. Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 244, n. 2, p. 367–372, 2005.
- DE SOUZA, C. P. Pathogenic mechanisms of prokaryotic cells: na evolutionary view. **Brazilian Journal Infection Disease**, v. 7, n. 1, p. 23-31, 2003.
- DEEGAN, L. H; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal**, Barking, v. 16, n. 9, p. 1058-1071, 2006.
- DELGADO, A., NOÉ-ARROYO, F., BRITO, D., PERES, C., FEVEREIRO, P., GARRIDO-FERNÁNDEZ, A. Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 130, n. 2, p.193-201, 2007.
- DEVI, S. M.; HALAMI, P. M.; Detection and characterization of pediocin PA-1/AcH like bacteriocin producing lactic acid bacteria. **Current Microbiology**, New York, v. 63, n. 2, p. 181-185, 2011.

DICKS, L. M. T.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M. Current status of antibiotic resistance in lactic acid bacteria. In: **Antibiotic Resistance: Causes and Risk Factors, Mechanisms and Alternatives**. p. 379-425. New York: Nova Publisher, 2009.

DOGANAY, M. Listeriosis clinical presentation. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 173-175, 2003.

DUARY, R. K.; BATISH, V. K.; GROVER, S. Relative gene expression of bile salt hydrolase and surface proteins in two putative indigenous *Lactobacillus plantarum* strains under in vitro gut conditions. **Molecular Biology Reports**, Basel, v. 39, n. 3, p. 2541–2552, 2012.

EIJNSINK, V. G.; AXELSSON, L.; DIEP, D. B.; HAVARSTEIN, L. S.; HOLO, H.; NES, I. F. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 81, n. 1-4, p. 639–654, 2002.

European Food Safety Authority (EFSA), Technical guidance- Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. **EFSA Journal**, Parma, v. 732, n. 1, p. 2-15, 2008.

EVERS, S.; COURVALIN, P. Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS(B)-VanR(B) two-component regulatory system in *Enterococcus faecalis* V583. **Journal Bacteriology**, Washington, v. 178, n. 5, p. 1302–1309, 1996.

FAO-WHO 2001. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. Report of a joint FAO-WHO expert consultation on evaluation of the health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, 34p. Cordoba, 2001.

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

FONDÉN, R.; MOGENSEN, G.; TANAKA, R.; SALMINEN, S. Effect of culture-containing dairy products on intestinal microflora, human nutrition and health – current knowledge and future perspectives. **Bulletin of International Dairy Federation**, Brussels, v. 352, n. 1, p. 5-30, 2000.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002, 424p.

FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H. The genus *Enterococcus*: biotechnological and safety issues. In **Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects** ed. Salminen, S.; von Wright, A.; Ouwehand, A. p. 199-248. New York: Marcel Dekker, Inc., 2004.

FREITAG, N. E.; PORT, G. C.; MINER, M. D. *Listeria monocytogenes* - from saprophyte to intracellular pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 7, n. 9, p. 623-628, 2009.

GALDEANO, C. M.; PERDIGÓN, G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. **Clinical and Vaccine Immunology**, Washington, v. 13, n. 2, p. 219-226, 2005.

GALDEANO, C.; DE MORENO, A.; VINDERELA, G.; BONET, M. E.; PERDIGON, G. A proposal model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. Review. **Clinical Vaccine Immunology**, Washington, v. 15, n. 4, p. 485-492, 2007.

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

GÁLVEZ, A.; DUBOIS-DAUPHIN, R. R.; GHALFI, H. H.; CAMPOS, D.; THONART, P. Description of two *Enterococcus* strains isolated from traditional Peruvian artisanal-produced cheeses with a bacterion-like inhibitory activity. **Biotechnologie Agronomie Société et Environnement**, v. 13, n. 1, p. 349-356, 2009.

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

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 1, p. 1-15, 2007.

GÄNZLE, M. G.; WEBER, S.; HAMMES, W. P. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 46, n. 3, p. 207-217, 1999.

GARCIA, M. T.; CANAMERO, M. M.; LUCAS, R.; OMAR, N. B.; PULIDO, R. P.; GÁLVEZ, A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin EJ97 produced by *Enterococcus faecalis* EJ97. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n. 2, p. 161-170, 2004.

GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. In vitro conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other Gram-positive bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 225, n. 1, p. 125–130, 2003.

GHEYTANCHI, E.; HESMATI, F.; SHARGH, B. K.; NOWROOZI, J.; MOVAHEDZADH. Study on β -galactosidase enzyme produced by isolated lactobacilli from milk and cheese. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 4, n. 6, p. 454-458, 2010.

GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. **Applied Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 81, n. 4, p. 591-606, 2008.

GORDON, D.; OLIVER, E.; LITTLEFIELD-WYER, J. **The diversity of bacteriocins in Gram-negative bacteria**. In: Riley, M.; Chavan, M., editors. *Bacteriocins: ecology and evolution*. Berlin Springer; p. 5-18, 2007.

GUCHTE, M.; SERROR, P.; CHERVAUX, C.; SMOKVINA, T.; ERLICH, S. D.; MAGUIN, E. Stress responses in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 82, n. 1-4, p. 187-216, 2002.

GUGLIELMOTTI, D.; MARCÓ, M. B.; VINDEROLA, C.; DE LOS REYES, G.; REINHEIMER, J.; QUIBERONI, A. Spontaneous *Lactobacillus delbrueckii* phage-

resistant mutants with acquired bile tolerance. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 119, n. 3, p. 236-242, 2007.

HAAS, W.; SHEPARD, B. D.; GILMORE, M. S.; Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. **Nature**, London, v. 415, n. 6867, v. 84-87, 2004.

HART, A. L.; LAMMERS, K.; BRIGIDI, P.; RIZELLO, F.; GIONCHETTI, P.; CAMPIERI, M.; KAMM, M. A.; KNIGHT, S. C.; STAGG, A. J. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. **Gut: An International Journal of Gastroenterology and Hepatology**, London, v. 53, n. 11, p. 1602-1609, 2004.

HARTMANN, H. A.; WILKE, T.; ERDMANN, R. Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 146, n. 2, p. 192–199, 2011.

HEMME, D.; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, C. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. **International Dairy Journal**, Barking, v. 14, n. 6, p. 467-494, 2004.

HENG, N.; WESCOMBE, P.; BURTON, J.; JACK, R.; TAGG, J. The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. In: Riley, M.; Chavan, M., editors. **Bacteriocins: ecology and evolution**. Berlin, Springer: p. 45-92, 2007.

HERNÁNDEZ, D.; CARDELLE, 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* TF 711. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 99, n. 1, p. 77-84, 2005.

HOLT, J.; KRIEG, N.; SNEATH, P.; STALEY, J.; WILLIAMS, S. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9th-ed. USA, 1994.

HOLZAPFEL, W. H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes.

International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 343-362, 1995.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJORKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food nutrition. **American Journal Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, n. 2, p. 365-373, 2001.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; SCHILLINGER, U.; HUIS, V. J.H. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 41, n. 2, p. 85-101, 1998.

HUMMEL, A.; HOLZAPFEL, W. H.; FRANZ, C. M. A. P. Characterisation and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. **Systematic and Applied Microbiology**, New York, v. 30, n. 1, p. 1-7, 2007.

JACOBSEN L.; WILCKES, A.; HAMMER, K.; HUYS, G.; GEVERS, D.; ANDERSEN, S. R. Horizontal transfer of tet(M) and erm(B) resistance plasmids from food strains of *Lactobacillus plantarum* to *Enterococcus faecalis* JH2-2 in the gastrointestinal tract of gnotobiotic rats. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 59, n. 1, p.158–166, 2007.

JAVED, A.; MASUD, T.; UL AIN, Q.; IMRAN, M.; MAQSOOD, S. Enterocins of *Enterococcus faecium*, emerging natural food preservatives. **Annual Microbiology**, Palo Alto, v. 61, n. 4, p. 699-708, 2011.

JAVED, I.; AHMED, S.; MANAM, S.; RIAZ, M.; AHMAD, B.; ALI, M. I.; HAMEED, A, CHAUDRY, G. J. Production, characterization, and antimicrobial activity of a bacteriocin from newly isolated *Enterococcus faecium* IJ-31. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 73, n. 1, p. 44-52, 2010.

JAY, J. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 711p.

JI, Y.; KIMA, H.; PARK, H.; LEE, J.; LEE, H.; SHIN, H.; KIM, B.; FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H. Functionality and safety of lactic bacterial strains from Korean kimchi. **Food Control**, Guildford, v. 31, n. 2, p. 467-473, 2013.

KAILASAPATHY, K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. **Current Issues Intestinal Microbiology**, Wymondham, v. 3, n. 2, p. 39-48, 2012.

KASTNER, S.; PERRETEN, V.; BLEULER, H.; HUNGENSCHMIDT, G.; LACROIX, C.; MEILE, L. Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.29, n. 2, p. 145-155, 2006.

KAYAOGLU, G.; ORSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Critical Review Oral Biology Medical**, London, v. 15, n. 5, p. 308-320, 2004.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 12, n. 2-3, p. 39-85, 1993.

KLEEREBEZEM, M.; HOLS, P.; BERNARD, E.; ROLAIN, T.; ZHOU, M.; SIEZEN, R. J.; BRON, P. A. The extracellular biology of the lactobacilli. **FEMS Microbiology Reviews**, London, v. 34, n. 2, p. 199–230, 2010.

KONG, F.; SINGH, R. P. A model stomach system to investigate disintegration kinetics of solid foods during gastric digestion. **Journal Food Science**, Champaign, v. 73, n. 5, p. 202-210, 2008.

KOS, B.; SUSKOVIC, J.; BEGANOVIC, J.; GJURACIC, K.; FRECE, J.; IANNACCONE, C.; CONGANELLA, F. Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 24, n.5; p. 699-707, 2008

KOS, B.; SUSKOVIC, J.; GORETA, J.; MATOSIC, S. Effect of Protectors on the Viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in Simulated Gastrointestinal Conditions. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 38, n. 2, p. 121-127, 2000.

KYUNGWHA, L.; AZLIN, M. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* on sliced roast beef by cetylpyridinium chloride and acidified sodium chlorite. **Food Microbiology**, London, v. 24, n. 1, p. 89-94, 2007.

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

LIANOU, A.; SOFOS, J. N. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n. 9, p. 2172-2198, 2007.

LISERRE, A. M.; RÉ, M. I.; FRANCO, B. D. G, M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, New York, v. 21, n. 1, p. 1-16, 2007.

LIU, C.; ZHANG, Z. Y.; DONG, K.; YUAN, J. P.; GUO, X. K. Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. **Biomedical and Environmental Sciences**, San Diego, v. 22, n. 5, p. 401-412, 2009.

LUCAS, P.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A. High frequency of histamine producing bacteria in enological environment and instability of the phenotype. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 74, n. 3, p. 811817, 2008.

LUO, F.; FENG, S.; SUN, Q.; XIANG, W.; ZHAO, J.; ZHANG, J.; YANG, Z. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from kurut, a traditional naturally-fermented yak milk from Qinghai-Tibet plateau. **Food Control**, Guildford, v. 22, n. 1, p. 50-53, 2011.

MALHEIROS, P. S.; SANT'ANNA, V.; UTPOTT, M.; BRANDELLI, A. Antilisterial activity and stability of nanovesicle-encapsulated antimicrobial peptide P34 in milk. **Food Control**, Guildford, v. 23, n. 1, p. 42-47, 2012.

MARCOBAL, A.; DE LAS RIVAS, B.; MORENO-ARRIBAS, M. V.; MUNOZ, R. Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 239, n. 2, p. 213-22, 2004.

MARTIN-PLATERO, A. M.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M.; MARTINEZ-BUENO, M. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats'

milk cheese. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 132, n. 1, p. 24-32, 2009.

MASUDA, Y.; ONO, H.; KITAGAWA, H.; ITO, H.; MU, F.; SAWA, N.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Identification and characterization of leucocyclicin Q, a novel cyclic bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* TK41401. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 22, 2011, p. 8164–8170, 2011.

MATAGARAS, M.; DORSINOS, E. H.; METAXOPOULOS, J. Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere at 4+/-2C. **Food Microbiology**, London, v. 20, n. 2, p. 259-265, 2003.

MATHARA, J. M.; SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; FRANZ, C.; KUTIMA, P. M.; MBUGUA, S. K.; SHIN, H. K.; HOLZAPFEL, W.H. Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional maasai fermented milk products in Kenya. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 126, n. 1-2, p. 57–64, 2008.

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

MERK, K.; BORELLI, C.; KORTING, H. C. *Lactobacilli* – bacteria–host interactions with special regard to the urogenital tract. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 295, n. 1, p. 9-18, 2005.

MORAES, P. M.; PERIN, L. M.; TODOROV, S. D.; SILVA JR, A.; FRANCO, B. D. G. M.; NERO, L. A. Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 113, n. 2, p. 318-328, 2012.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Applicability of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as adjunct starter in Minas Frescal cheesemaking. **International Journal of Dairy Technology**, London, v. 61, n. 4, p. 352-357, 2008a.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Bacteriocinas em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 11, n. 320, p. 120-127, 2008b.

NES, I. F.; DIEP, D. B.; HAVARSTEIN, L. S.; BRURBERG, M. B.; EIJSINK, V.; HOLO, H. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 70, n. 2-4, p.113-128, 1996.

O'FLAHERTY, S.; KLAENHAMMER, T. R. The role and potential of probiotic bacteria in the gut, and the communication between gut microbiota and gut/host. **International Dairy Journal**, Barking, v. 20, n. 4, p. 262-268, 2010.

ORNDORFF, P. E.; HAMRICK, T. S.; SMOAK, I. W.; HAVELL, E. A. Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 1-2, p. 1-15, 2006.

PARADA, J. L.; CARON, C. R.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 3, p. 521-542, 2007.

PAULA, A. T. **Atividade antimicrobiana de microrganismos probióticos em bebidas lácteas fermentadas**. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

PAULA, A. T. **Bactérias lácticas isoladas de mussarela de búfala: perfil bacteriocinogênico e probiótico**. 2012. 81 f. Qualificação (Doutorado)-Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2012.

PINGITORE, E. V.; TODOROV, S. D.; SESMA, F.; FRANCO, B. D. G. M. Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. **Food Microbiology**, London, v. 32, n. 1, p. 38-47, 2012.

RAMIAH, K.; VAN REENEN, C. A. DICKS, L. M. Expression of the mucus adhesion genes Mub and MapA, adhesion-like factor EF-Tu and bacteriocin gene plaA of

Lactobacillus plantarum 423, monitored with real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 116, n. 3, p. 405-409, 2007.

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

RAY, B.; DAESCHEL, M. **Food Biopreservatives of Microbial Origin**, CRC Press, Boca Raton, FL, 1992.

REID, G.; BURTON, J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. **Microbes and Infection**, Paris, v. 4, n. 3, p. 319-324, 2002.

REIS, J. A.; PAULA, A. T.; CASAROTTI, S. N.; PENNA, A. L. B. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial compounds: characteristics and applications. **Food Engineering Reviews**, New York, v. 4, n. 2, p. 124–140, 2012.

REIS; J. A; CASAROTTI, S. N.; DE PAULA, A. T.; PENNA, A. L. B. Probióticos e seus efeitos terapêuticos na saúde humana. UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto: Laboratório Editorial, 96p, 2011.

RILLA, R.; MARTINEZ, B.; RODRIGUES, A. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in Afuega'I Pitu cheese by the nisin Z producing strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IPLA729. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, n. 1, p. 928-933, 2004.

ROJAS, M.; ASCENCIO, F.; CONWAY, P. L. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2330-2336, 2002.

ROMANO, A.; TRIP, H.; LOLKEMA, J. S.; LUCAS, P. M. A three-component lysine/ornithine decarboxylation system in *Lactobacillus saerimneri* 30a. **Journal of Bacteriology**, Washington, 2013. doi:10.1128/JB.02070-12

ROOS, S.; JONSSON, H. A high-molecular mass cell surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. **Microbiology**, Reading, v. 148, n. 2, p. 433–442, 2002.

ROSENBLATT-FARRELL, N. The landscape of antibiotic resistance. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 117, n. 6, p. 245–250, 2009.

RUSSO, P.; SPANO, G.; ARENA, M. P.; CAPOZZI, V.; FIOCCO, D.; GRIECO, F.; BENEDEUCE, L. Are consumers aware of the risks related to Biogenic Amines in food? **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. Ed. A. Mendes-Vilas, pp. 1087-1095, 2010.

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

SALMINEN, S.; WON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. CRC Press, 3^{ed.}, 2004.

SALYERS, A. A.; GUPTA, A.; WANG, Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. **Trends Microbiology**, Cambridge, v. 12, n. 9, p. 412–416, 2004.

SANCHEZ, B.; REYES-GAVILÁN, C.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M. Probiotic fermented milks: present and future. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 62, n. 4, p. 472- 483, 2009.

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, New York, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.

SAULNIER, D. M.; GIBSON, G. R.; KOLIDA, S. In vitro effects of selected synbiotics on the human faecal microbiota composition. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 66, n. 3, p. 516-527, 2008.

SCHAR-ZAMMARETTI, P.; UBBINK, J. The cell wall of lactic acid bacteria: surface constituents and macromolecular conformations. **Biophysical Journal**, New York, v. 85, n. 6, p. 4076-4092, 2003.

SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; HOLZAPFEL, W. H. *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. **International Dairy Journal**, Barking, v. 15, n. 12, p. 1289-1297, 2005.

SILVA, L. F. **Identificação e Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo mussarela de búfala**. 2010, 153 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)- Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2010.

SIP, A.; WIECKOWICZ, M.; OLEJNIC-SCHMIDT, A.; GRAJEC, W. Anti-*Listeria* activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland. **Food Control**, Guildford, v. 26, n. 1, p. 117-124, 2012.

SULLIVAN, L.; ROSS, R.; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, Paris, v. 84, n. 5-6, p. 593-604, 2002.

TAMANG, B.; TAMANG, J. P. Lactic acid bacteria isolated from indigenous fermented bamboo products of Arunachal Pradesh in India and their functionality. **Food Biotechnology**, New York, v. 23, n. 2, p. 133-147, 2009.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, New York, v. 119, n. 6, p. 3-10, 2006.

THARMARAJ, N.; SHAH, N. Antimicrobial effects of probiotic bacteria against selected species of yeast and moulds in cheese based dips. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 44, n. 10, p. 1916-1926, 2009.

THERON, N. M.; LUES, J. F. R. Organic acids and meat preservation: A Review. **Food Reviews International**, New York, v. 23, n. 2, p. 141-158, 2007.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. T. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ST34BR, a strain isolated from barley beer. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 44, n. 4, p. 305-316, 2004.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. Parameters affecting the adsorption of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423 isolated from sorghum beer. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 1, n. 4, p. 405-409, 2006a.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria: Comparison of the bacteriocins. **Process Biochemistry**, London, v. 41, n. 1, p. 11-19, 2006b.

TODOROV, S. D.; DANOVA, S. T.; VAN REENEN, C. A.; MEINCKEN, M.; DINKOVA, G.; IVANOVA, I. V.; DICKS, L. M. Characterization of bacteriocin HV219, produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HV219 isolated from human vaginal secretions. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 46, n. 3, p. 226-238, 2006c.

TODOROV, S. D.; BOTES, M.; GUIGAS, C.; SCHILLINGER, U.; WIID, I.; WACHSMAN, M. B.; HOLZAPFEL, W. H.; DICKS, L. M. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 2, p. 465-477, 2008a.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. Evaluation of lactic acid bacteria from kefir, molasses and olive brine as possible probiotics based on physiological properties. **Annals of Microbiology**, London, v. 58, n. 4, p. 661-670, 2008b.

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.; DICKS, L. M. T. Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 132, n. 2-3, p. 117-126, 2009.

TODOROV, S. D. Diversity of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from boza, a cereal-based fermented beverage from Bulgaria. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 3, p. 1011-1021, 2010a.

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**, Barking, v. 84, n. 3, p. 334-343, 2010b.

TODOROV, S. D.; WACHSMAN, M.; TOMÉ, E.; DOUSSET, X.; DESTRO, M. T.; DICKS, L. M. T.; FRANCO, B. D. G. M.; VAZ-VELHO, M.; DRIDER, D. Characterization of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. **Food Microbiology**, London, v. 27, n. 7, p. 869-879, 2010c.

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**, Oxford, v. 110, n. 5, p. 971-986, 2011a.

TODOROV, S. D.; PRÉVOST, H.; LEBOIS, M.; DOUSSET, X.; LEBLANC, J. G.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*) - From isolation to application: Characterization of a bacteriocin. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 5, p. 1351-1363, 2011b.

TODOROV, S. D.; FURTADO, D. N.; SAAD, S. M. I.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocin production and resistance to drugs are advantageous features for *Lactobacillus acidophilus* La-14, a potential probiotic strain. **New Microbiologica**, Pavia, v. 34, n. 4, p. 357-370, 2011c.

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.

TOMÉ, E.; TODOROV, S. D.; GIBBS, P. A.; TEIXEIRA, P. C. Partial characterization of nine bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from cold-smoked salmon with activity against *Listeria monocytogenes*. **Food Biotechnology**, New York, v. 23, n. 1, p. 50-73, 2009.

TOOMEY, N.; MONAGHAN, Á.; FANNING, S.; BOLTON, D. Transfer of antibiotic resistance marker genes between lactic acid bacteria in model rumen and plant environments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 10, p. 3146-3152, 2009.

TUROVSKIY, Y.; KASHTANOV, D.; PASKHOVER, B.; CHIKINDAS, M. L. Quorum sensing: Fact, fiction, and everything in between. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v. 62, n. 1, p. 191–234, 2007.

VANDERPOOL, C.; YAN, F.; POLK, D. B. Mechanisms of probiotic action: implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. **Inflammatory Bowel Diseases**, New York, v. 14, n. 11, p. 1585-1596, 2008.

VANKERCKHOVEN, V.; VAN AUTGAERDEN, T.; VAEL, C.; LAMMENS, C.; CHAPELLE, S.; ROSSI, R.; JABES, D.; GOOSSENS, H. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in enterococci and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 10, p. 4473-4479, 2004.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics: from Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, Barking, v. 18, n. 7, p. 714-728, 2008.

VIMALA, Y.; DILEEP, P. Some aspects of probiotics. **Indian Journal of Medical Microbiology**, Numbai, v. 46, n. 2, p. 1-7, 2006.

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**, Barking, v. 36, n. 2, p. 895–904, 2003.

VON MOLLENDORFF, J. W.; TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. Factors affecting the adsorption of bacteriocins to *Lactobacillus sakei* and *Enterococcus* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 142, n. 2, p. 209-220, 2007.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. Dairy Science and Technology. 2ed. New York: CRC Press, 2006, 782p.

YANG, H.; ADAMS, M. C. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 91, n. 3, p. 253-260, 2004.

ZOUHIR, A.; HAMMAMI, R.; HAMIDA, J. B. A new structure-based classification of gram-positive bacteriocins. **Protein Journal**, Dordrecht, v. 29, n. 6, p. 432-439, 2010.