

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

CRISLEY APARECIDA MORETE

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE CEPAS NATIVAS DE *LACTOBACILLUS*  
*PLANTARUM* E *LACTOBACILLUS PENTOSUS* ISOLADAS DE  
SALAMES ARTESANAIS**

PROBIOTIC POTENTIAL OF NATIVE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* AND  
*LACTOBACILLUS PENTOSUS* STRAINS ISOLATED FROM ARTISANAL SALAMI

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2015

**CRISLEY APARECIDA MORETE**

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE CEPAS NATIVAS DE *LACTOBACILLUS*  
*PLANTARUM* E *LACTOBACILLUS PENTOSUS* ISOLADAS DE  
SALAMES ARTESANAIS**

PROBIOTIC POTENTIAL OF NATIVE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* AND  
*LACTOBACILLUS PENTOSUS* STRAINS ISOLATED FROM ARTISANAL SALAMI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Ernlund Freitas de Macedo.

Co-orientador: Prof Dr Fernando Bittencourt Luciano

**SÃO JOSÉ DOS PINHAIS**

**2015**

**TERMO DE APROVAÇÃO**  
**(Responsabilidade da Secretaria do PPGCA)**

**(Entregue pela secretaria)**

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	vii
<b>FORMATO DA DISSERTAÇÃO</b> .....	viii
<b>RESUMO GERAL</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xi
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
2.1 Alimentos funcionais: probióticos.....	4
2.2 Benefícios dos probióticos a saúde humana.....	6
2.3 Probióticos em produtos cárneos.....	8
2.4 Critérios de seleção para bactérias lácticas probióticas.....	10
2.4.1 Resistência a antibióticos.....	11
2.4.2 Resistência aos sais biliares e baixo pH.....	13
2.4.3 Capacidade de autoagregação e coagregação.....	13
2.4.4 Capacidade de crescimento na presença de prebióticos.....	15
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>3 Potencial probiótico de cepas nativas de <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Lactobacillus pentosus</i> isoladas de salames artesanais</b> .....	17
Resumo.....	17
Abstract.....	18
3.1 INTRODUÇÃO.....	19
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.2.1 Bactérias Lácticas .....	20

3.2.2 Determinação da resistência microbiana fenotípica à ampicilina, eritromicina e tetraciclina .....	22
3.2.3 Determinação de genes de resistência microbiana para ampicilina, eritromicina e tetraciclina nas cepas de <i>L. plantarum</i> e <i>L. pentosus</i> .....	22
3.2.4 Capacidade de crescimento na presença de carboidratos prebióticos .....	25 26
3.2.5 Capacidade de autoagregação e coagregação.....	27
3.2.6 Avaliação da capacidade de resistência ao baixo pH.....	27
3.2.7 Avaliação da capacidade de resistência aos sais biliares.....	28
3.2.8 Análises estatísticas.....	
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
3.3.1 Resistência fenotípica das cepas de BALS a ampicilina, eritromicina e tetraciclina.....	28
3.3.2 Determinação de genes de resistência microbiana para ampicilina, eritromicina e tetraciclina.....	30
3.3.3 Capacidade de crescimento na presença de carboidratos prebióticos.....	33 37
3.3.4 Capacidade de autoagregação e coagregação.....	41
3.3.5 Avaliação da capacidade de resistência ao baixo pH.....	44
3.3.6 Avaliação da capacidade de resistência aos sais biliares.....	
3.4 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	51

Dedico essa conquista aos anjos da minha vida, meus pais Helio e Marli Morete  
e a minha avó Judite Rodrigues.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora pelas graças alcançadas e pelas oportunidades a mim concedidas.

Agradeço em especial aos meus pais Helio e Marli Morete, pois sem o apoio, amor, companheirismo e compreensão que sempre me dedicaram, com toda a certeza eu não teria chegado até aqui. A minha avó Judite por ser sempre minha fada madrinha e a todos os meus familiares que estiveram ao meu lado.

Agradeço a minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Ernlund Freitas de Macedo pela oportunidade e dedicação.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Fernando Bittencourt Luciano por toda a disponibilidade em ajudar.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Sotomaior, pelo apoio e dedicação e a Caroline Nocera, secretária do mestrado, pela gentileza, amizade e por sempre estar disposta a ajudar.

Aos amigos que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e confiando em mim quando até eu mesma não acreditava que poderia continuar.

As amigas e responsáveis pelos laboratórios Hanna Wolupeck e Marlise Mauerwerk pelo comprometimento, disponibilidade e apoio.

Agradeço a Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

E a todos os mestres que tive a honra de encontrar em meu caminho, com todos aprendi algo que levarei para toda a vida.

## **FORMATO DA DISSERTAÇÃO**

A presente dissertação é composta por capítulos. O capítulo 1 apresenta uma introdução geral dos objetivos de estudo desta dissertação. O capítulo 2 trata-se de revisão de literatura. O capítulo 3 refere-se ao projeto de dissertação realizado para futura publicação em periódicos científicos. Esta dissertação é finalizada com conclusões gerais deste trabalho e com sugestões para estudos futuros. As referências de todos os capítulos se encontram em lista única ao final da dissertação.

## RESUMO GERAL

A crescente preocupação dos consumidores em conhecer as características dos alimentos tem conduzido ao desenvolvimento de produtos funcionais como os probióticos, que promovem a saúde e o bem-estar, além da nutrição. Os critérios de seleção de bactérias lácticas probióticas compreendem entre outras características, a resistência ao baixo pH, aos sais biliares, a capacidade de autoagregação e coagregação e a inexistência ou a baixa frequência de resistência adquirida a antibióticos. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus pentosus* isoladas de salames obtidos por fermentação natural, com perspectiva à sua utilização como cultura *starter* em produtos cárneos probióticos. Para tanto, 54 cepas de *L. plantarum* e *L. pentosus* foram submetidas aos seguintes testes: resistência fenotípica à ampicilina, eritromicina e tetraciclina pelo método de disco difusão; presença de genes de resistência para esses antibióticos por reação de polimerização em cadeia, utilizando *primers* específicos; capacidade de crescimento na presença dos prebióticos inulina e oligofrutose; capacidade de autoagregação e de coagregação com *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111), *Escherichia coli* (O157:NM 02-1840) e *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028); resistência às concentrações de 0,15% e 0,30% de sais biliares e ao baixo pH. A resistência microbiana fenotípica foi observada em maior frequência para tetraciclina e a presença de genes de resistência não foi observada com os *primers* utilizados. A capacidade máxima de autoagregação verificada em 24 horas foi de 64,61%, enquanto a média de coagregação observada com *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) foi de 7,02%, com *E. coli* (O157: NM02-1840) de 6,23% e com *S. Typhimurium* (ATCC 14028) de 4,92%. Do total de cepas de *Lactobacillus*, nove apresentaram maior crescimento na presença de inulina em comparação aos meios controle (glicose e sacarose) após 24 h. Entre as cepas testadas, cinco cepas de *Lactobacillus plantarum* (131, 192, 341, 343 e 442) demonstraram potencial probiótico e podem ser candidatas a uso como *starter* de produtos cárneos fermentados probióticos.

**Palavras-chave:** Probióticos. Produto cárneo fermentado. *Lactobacillus plantarum*. *Lactobacillus pentosus*.

## ABSTRACT

The growing concern of consumers to know the characteristics of food has led to the development of functional products that promote health and well-being such as the probiotic food. The criteria for selection of probiotic lactic acid bacteria comprise among other characteristics, the resistance to low pH, the resistance to bile salts, the ability to auto and to coaggregate and the absence or the low frequency of acquired resistance to antibiotics. This study aimed to evaluate the probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus* strains isolated from artisanal salami, for their future use as probiotic starter culture in meat products. For this purpose, 54 strains of *L. plantarum* and *L. pentosus* were subjected to the following tests: phenotypic resistance to ampicillin, erythromycin and tetracycline by the disk diffusion method; genotypic resistance to those antibiotics by polymerase chain reaction; ability to grow in the presence of prebiotic carbohydrates (inulin and oligofructose); autoaggregation capacity and coaggregation capacity with *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111), *Escherichia coli* (O157: NM 02-1840) and *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028); resistance to concentrations of 0.15% and 0.30% bile salts and to low pH. The phenotypic antimicrobial resistance was observed in a higher frequency to tetracycline. However, the presence of resistance gene was not observed with the primers used. The maximum autoaggregation capacity after 24 hours was 64.61%, whereas the average coaggregation capacity was 7.02% with *E. coli* (O157: NM 02-184), 6.23% with *Listeria monocytogenes* (ATCC 191110) and 4.92% with *S. Typhimurium* (ATCC 14028). Among the strains of *Lactobacillus*, 9 strains showed higher growth in the presence of inulin compared to the control carbohydrates (glucose and sucrose) after 24 h. Among 54 strains of *Lactobacillus*, five strains of *L. plantarum* (131, 192, 341, 343 and 442) demonstrated probiotic potential and may be candidates for their use as probiotic in fermented meat products.

**Keywords:** Probiotic. Product fermented meat. *Lactobacillus plantarum*. *Lactobacillus pentosus*.

## LISTA DE TABELA

	<b>Página</b>
Tabela 1. Benefícios dos alimentos funcionais contendo agentes probióticos.....	7
Tabela 2. Procedência das amostras de embutidos fermentados dessecados e semi-dessecados nos estados do PR e SC e das quais as cepas de <i>L. plantarum</i> e <i>L. pentosus</i> foram isoladas.....	21
Tabela 3. <i>Primers</i> utilizados para detecção por PCR de genes de resistência a ampicilina, eritromicina e tetraciclina, com suas respectivas sequências e pares de bases .....	24
Tabela 4. Formulação do meio MRS modificado para utilização como meio de cultura base (branco) para adição dos carboidratos glicose e sacarose (controle), inulina e oligofrutose.....	25
Tabela 5. Cepas de <i>L. plantarum</i> e <i>L. pentosus</i> , isoladas de salames artesanais resistentes à ampicilina, eritromicina e tetraciclina, pelo método de disco difusão.....	28
Tabela 6. Porcentagem de Autoagregação de 54 cepas de <i>L. plantarum</i> e <i>L. pentosus</i> após 24 horas de incubação e coagregação das cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 19111), <i>Escherichia coli</i> (O157: NM 02-1840) e <i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028) após 4 horas de incubação a 37 °C (média ± desvio padrão).....	38
Tabela 7. Avaliação da capacidade de resistência ao baixo pH das 54 cepas de <i>L. plantarum</i> e <i>L. pentosus</i> em pH 3,0 e pH 4,0 (média ± desvio padrão), após 4 h de incubação.....	42
Tabela 8. Resistência aos sais biliares das 54 cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Lactobacillus pentosus</i> em concentração de 0,15% e 0,3% de sais biliares (média ± devio padrão), após 4 h de incubação.....	46

Tabela 9. Resultado de resistência aos antibióticos, capacidade de crescimento na presença de carboidratos prebióticos (24 h), agregação (4 h) e resistência aos sais biliares e pH (4 h), expresso como positivo (+) ou negativo (-) e para agregação os resultados foram expressos em porcentagem (%). .....	48
--	----

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Gel de extração de DNA genômico de 24 cepas de <i>L. plantarum</i> e <i>L. pentosus</i> resistentes a tetraciclina.....	31
Figura 2. Evolução da densidade óptica (600nm) de cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> (cepas 22, 44, 61, 103, 204, 229, 271 e 485) e de <i>L. pentosus</i> (cepa 32) crescidas em caldo MRS adicionado de diferentes fontes de carboidrato.....	33

## **CAPÍTULO 1**

### **1 INTRODUÇÃO**

Produtos cárneos são alimentos ricos em proteínas, vitaminas e minerais, que são nutrientes desejáveis em alimentos e que podem ser um incentivo ao seu consumo. No entanto, outras características como teor de gordura, de sal, a adição de conservantes e outros aditivos podem influenciar o consumo de alimentos como embutidos cárneos, pois podem ser considerados pouco saudáveis por uma parcela da população preocupada com a relação alimentação x saúde (TOLDRA et al., 2011).

Uma das estratégias para mudar esse conceito seria a inclusão de ingredientes funcionais nesses alimentos, que poderiam promover a saúde e prevenir o risco de enfermidades. No setor cárneo, essa tendência se manifestou pela inclusão de ácido linoleico conjugado, vitamina E, ácidos graxos da família ômega 3 e selênio na dieta dos animais visando o aumento da qualidade nutricional da carne e a adição de ingredientes como proteínas vegetais, fibras dietéticas, ervas, especiarias e probióticos em produtos cárneos (ZHANG et al., 2010; KHAN et al., 2011).

O reconhecimento dos alimentos contendo probióticos como alimentos funcionais, que promovem benefícios para a saúde do consumidor, têm incentivado a divulgação e o consumo desses produtos. Na indústria cárnea, o uso de probióticos mostra-se mais promissor nos produtos crus fermentados como os salames, pois são fabricados com carne crua e consumidos sem prévio aquecimento, pois altas temperaturas poderia causar a morte das bactérias lácticas (BALs) probióticas (AMMOR et al., 2007).

Embora a inclusão de probióticos em produtos cárneos não seja um conceito inteiramente novo, ainda é incipiente a utilização de embutidos fermentados como veículos de probióticos. Isto se deve, em parte, à adição de BALs isoladas de fontes não cárneas, principalmente de origem láctea. Contudo, micro-organismos não são adaptados ao ambiente cárneo, o que resulta na redução de sua viabilidade e funcionalidade no produto (DE VUYST et al., 2008; RIVERA-ESPINOZA et al., 2010; TOLDRA et al., 2011).

Devido às condições adversas inerentes dos produtos cárneos fermentados, como a baixa atividade de água, a presença de aditivos conservantes e de especiarias, a pesquisa de propriedades probióticas em bactérias isoladas da microbiota nativa de produtos cárneos fermentados é uma estratégia para aumentar sua sobrevivência e viabilidade nos produtos e contribuir para o aumento do consumo destes alimentos, devido à ação funcional (RIVERA-ESPINOZA et al., 2010).

Entre os critérios para a classificação de uma cepa láctica como probiótica estão a capacidade de resistência ao processo digestivo e de crescimento no trato gastrintestinal, que podem ser verificadas mediante testes *in vitro* ou *in vivo* (LÜCKE, 2000; PAPAMANOLI et al., 2003; DE VUYST, 2008; RUIZ-MOYANO et al., 2008). Uma condição indispensável para uma cepa ser considerada probiótica é ser reconhecida como segura (GRAS – *Generally recognized as safe*). Mais recentemente, o conceito de segurança passou a incluir também a inexistência de resistência a antibióticos avaliada pelo Programa Qualificado de Previsão de Segurança sugerido pela EFSA (Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar). Esse é um importante critério para a seleção de probióticos para alimentos, visto que a capacidade de resistir a alguns antibióticos pode ser geneticamente transmitida à microbiota natural do trato gastrintestinal (PAN et al., 2009).

Dessa forma, a seleção de bactérias lácticas com características probióticas da microbiota natural de salames que estão adaptadas a esse ambiente, possibilita o desenvolvimento de produtos cárneos probióticos com características sensoriais semelhantes aos produtos tradicionais. Diante desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial probiótico de bactérias lácticas isoladas de salames produzidos por fermentação espontânea, com perspectivas à sua futura utilização como cultura *starter* em produtos cárneos probióticos.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- avaliar a resistência microbiana fenotípica e genotípica das bactérias lácticas a antibióticos comumente usados na terapêutica humana,
- verificar a resistência das cepas ao baixo pH e à presença de sais biliares,
- avaliar a capacidade de autoagregação e de coagregação das cepas lácticas com cepas de bactérias patogênicas

- avaliar a capacidade das cepas lácticas em crescer na presença de carboidratos prebióticos.

## CAPÍTULO 2

### 2 REVISÃO DA LITERATURA

#### 2.1 Alimentos funcionais: probióticos

A crescente preocupação dos consumidores em conhecer as características benéficas à saúde e inocuidade dos alimentos, tem conduzido ao desenvolvimento de produtos que, além de sua função de nutrição, promovem a saúde e o bem-estar (TYÖPPÖNEN et al., 2003).

De acordo com a Resolução nº 18 de 30 de abril de 1999, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde no Brasil, alimento funcional é todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo, sem supervisão médica (ANVISA, 1999).

Em julho de 2008, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) revisou a lista de ingredientes com alegação de propriedade funcional no Brasil e aprovou os seguintes ingredientes: os ácidos graxos (ômega 3), carotenoides (licopeno, luteína, zeaxantina), fibras alimentares (beta glucana, dextrina resistente, frutooligossacarídeo, goma guar parcialmente hidrolisada, inulina, lactulose, polidextrose, *Psyllium*, quitosana), fitoesteróis, polióis (manitol, xilitol, sorbitol) e os probióticos como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei Shirota*, *Lactobacillus casei* subespécie *rhamnosus*, *Lactobacillus casei variedade defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *Bifidobacterium lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium* (ANVISA, 2008).

Os probióticos são definidos como micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (ZHANG et al., 2010; KHAN et al., 2011). No Brasil, todos os probióticos reconhecidos

são pertencentes ao grupo das bactérias lácticas, caracterizado por micro-organismos, cujo principal produto de fermentação é o ácido láctico (CARR et al., 2002).

A ANVISA (2008) estabelece que a quantidade mínima viável de probióticos em alimentos com essa alegação no Brasil deve ser de  $10^8$  a  $10^9$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na porção diária do produto pronto para o consumo recomendada pelo fabricante.

Alguns mecanismos são sugeridos para explicar os benefícios que os probióticos podem trazer à saúde do hospedeiro, os quais são divididos em três categorias: 1) probióticos têm atividade antimicrobiana e podem excluir ou inibir o crescimento de patógenos; 2) bactérias probióticas podem gerar uma barreira protetora no epitélio intestinal contra patógenos; e 3) bactérias probióticas podem estimular a resposta imune do hospedeiro (JENSEN et al., 2012).

Os micro-organismos probióticos consistem na grande maioria de cepas de bactérias lácticas dos gêneros *Lactobacillus* sp e *Bifidobacterium* sp, (DE VUYST et al., 2008; KOMOTSU et al., 2008; PRADO et al., 2008; RUIZ-MOYANO et al., 2009; RANADHEERA et al. 2010).

Espécies do gênero *Lactobacillus* são filogeneticamente diversas e são encontradas naturalmente no leite, plantas, carnes, e nas superfícies da mucosa oral, intestinal, e do sistema reprodutivo de seres humanos e animais (GOH et al., 2010). Nesse grupo, as espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, e *Lactobacillus zeae* destacam-se entre os micro-organismos que compõem a microbiota humana. Os *Lactobacillus* são descritos como um grupo heterogêneo de bastonetes regulares, Gram-positivos, incapazes de formar esporos, desprovidos de flagelo, anaeróbios aerotolerantes (STEFE, 2008).

O gênero *Bifidobacterium* sp é composto por micro-organismos Gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos e anaeróbios. As espécies desse gênero mais utilizadas como probióticos são *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. infantis* e *B. breve* (RIVERA-ESPINOZA et al., 2009).

Os probióticos representam uma grande parcela do mercado de alimentos funcionais, sendo aplicados principalmente em bebidas lácteas, iogurtes, produtos à

base de cereais, fórmulas para alimentação infantil, sucos de frutas e sorvetes (ARIHARA, 2006; LEROY et al., 2006; DE VUYST et al., 2008).

No mercado norte-americano, os probióticos para a nutrição humana são comercializados por cerca de 150 empresas, gerando receita de cerca de US\$ 1,3 bilhão (Rajagopal, 2012). Segundo o relatório *Global Industry Analysis*, feito pelo *Transparency Market Research (TMR) (Milk Point, 2013)*, o mercado de alimentos probióticos movimentou mundialmente US\$ 27,9 bilhões em 2011, com previsão de alcançar US\$ 44,9 bilhões em 2018, sendo estimulado principalmente pela crescente conscientização dos consumidores com relação à saúde intestinal. O relatório também destacou que os principais alimentos de interesse para a inclusão de probióticos são os produtos lácteos, cereais, produtos fermentados de carne e alimentos desidratados.

## **2.2 Benefícios dos probióticos a saúde humana**

Os principais benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas estão apresentados na Tabela 1.

Os probióticos também podem exercer efeitos hipocolesterolêmicos mediante mecanismos que ainda permanecem em estudo. Algumas hipóteses têm sido propostas, como a utilização do colesterol no intestino, diminuindo a absorção; aumentando a excreção de sais biliares e produzindo ácidos graxos voláteis no cólon que são absorvidos e interferem no metabolismo dos lipídeos no fígado. Esse efeito hipocolesterolêmico é provavelmente exercido pela inibição da 3-hidroxi 3-metilglutaril (HMG) COA redutase, enzima que participa da via metabólica produtora do colesterol (STEFE et al., 2008; MANZONI et al., 2008; KIM et al.; 2008).

Os probióticos também podem ser capazes de proteger o hospedeiro contra atividades carcinogênicas, principalmente de adenomas e carcinomas do cólon, pois estimulam a resposta imune, inibem diretamente a formação de células tumorais e podem alterar a atividade de enzimas fecais, como por exemplo, beta-glicuronidase, azorreductase e nitrorreductase, as quais desempenham um papel no desenvolvimento de câncer de cólon (STEFE, 2008; DAVIS et al., 2009; THIRABUNYANON et al., 2009; DENIPOTE et al., 2010).

**Tabela 1.** Benefícios dos alimentos funcionais contendo agentes probióticos.

Efeito benéfico	Autor (ano)
Controle da microbiota intestinal através de competição por sítios de adesão, nutrientes e produção de compostos antimicrobianos;	Nogueira et al. (2011)
Promoção da resistência gastrintestinal à colonização por patógenos;	Raizel et al. (2011)
Diminuição da população de patógenos através da produção de ácidos acético, láctico, bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos;	Saad (2006)
Melhor digestão da lactose beneficiando indivíduos intolerantes;	Varavallo et al. (2008)
Estímulo à produção de células de defesa no sistema imunológico;	Oelschlaeger (2010)
Aumento da absorção de minerais como o cálcio;	Varavallo et al. (2008)
Diminuição de incidência de doenças coronárias;	Stefe (2008)
Estímulo de atividades antitumorais e antimutagênicas;	Ranadheera et al. (2010)
Produção de vitaminas B1, B6 e B12;	Decker et al. (2010)
Tratamento e prevenção de diarreias;	Schlee et al. (2008)
Inibição do crescimento de <i>Helicobacter pylori</i> ;	Reiff et al. (2010)

Vários probióticos como *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* foram associados a efeitos terapêuticos nos casos de encefalopatia hepática, com resultados superiores quando comparados aos tratamentos convencionais, diminuindo a pressão do sistema porta e com isso, reduzindo o risco de hemorragia. O tratamento para pancreatite aguda também pode ser beneficiado com o uso de probióticos, pois pacientes que fizeram uso de *L. plantarum* 299v mostraram diminuição na ocorrência de infecção pancreática, de abscessos e menor tempo de internação em decorrência da doença (JAIN et al., 2014).

Souza et al. (2010) relatam que, apesar de haver evidências dos benefícios da suplementação precoce de probióticos na prevenção da dermatite atópica em crianças de alto risco para alergias, e do uso de probióticos no tratamento das dermatites atópicas moderadas e graves mediadas por IgE, há necessidade de ampliar os estudos

quanto ao tempo de observação dos indivíduos suplementados, quanto à segurança e aos efeitos em longo prazo.

De acordo com Varavallo et al. (2008) existem várias espécies de bactérias probióticas em uso atualmente que proporcionam a melhoria e o bem estar do hospedeiro. A curto ou médio prazo uma maior variedade de alimentos probióticos poderá estar disponível ao consumidor, com linhagens que desempenhem funções específicas, trazendo benefícios a saúde do consumidor.

### **2.3 Probióticos em produtos cárneos**

Embora a inclusão de probióticos em produtos cárneos não seja um conceito inteiramente novo, apenas alguns fabricantes consideraram o uso de embutidos fermentados como veículos para probióticos, com a utilização de culturas de origem láctea (DE VUYST et al. 2008; RIVERA-ESPINOZA et al., 2010). Em 1998, foi comercializado na Alemanha um tipo de salame contendo três bactérias lácticas (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* e *Bifidobacterium* spp.) e, neste mesmo ano, foi desenvolvido no Japão um patê de carne contendo *L. rhamnosus* FERM P-15120, sendo estes, os primeiros relatos de produtos cárneos probióticos (ARIHARA et al., 2006; TOLDRA et al., 2011).

A incorporação de bactérias probióticas aos produtos cárneos representa um grande desafio tecnológico devido à conhecida sensibilidade desses micro-organismos ao sal, às especiarias e às demais substâncias utilizadas em sua formulação. Além disso, essa adição pressupõe o uso de micro-organismos que resistam ao processo de fermentação da carne, que permaneçam viáveis durante à passagem pelo estômago e intestino delgado, para que possa exercer suas ações benéficas no organismo (LÜCKE, 2000).

Considerando que o ambiente cárneo pode ser hostil para grande parte das culturas lácticas já caracterizadas como probióticas, é necessário o isolamento e a verificação do potencial probiótico de BALs da microbiota natural de produtos cárneos, sem a adição de cultura *starter* comercial, podendo ser uma estratégia interessante

para o desenvolvimento de culturas probióticas para o setor cárneo (PAPAMANOLI et al., 2003; VILLANI et al., 2005; KLINGBERG et al., 2005; REBUCCI et al., 2007; DE VUYST et al., 2008).

Tendo em vista as características adversas do meio cárneo aos probióticos, vários estudos sugerem a seleção de propriedades probióticas em BALs de cultura *starter* comercial, tradicionalmente empregada nos produtos cárneos fermentados industriais e, portanto, já adaptadas a essas condições de crescimento. Essas culturas comerciais, que são geralmente obtidas de fabricantes multinacionais de inóculos para alimentos, poderiam proporcionar ao produto cárneo as mesmas características sensoriais e tecnológicas que as culturas *starter* tradicionais, além das ações funcionais benéficas à saúde (LÜCKE, 2000; MARAGKOUDAKIS et al., 2009).

As culturas *starter* são fundamentais na fabricação de produtos cárneos fermentados, que a partir de açúcares presentes na massa cárnea produzem ácido láctico, com conseqüente redução do pH. A queda do pH para valores próximos ao ponto isoelétrico das proteínas reduz a capacidade de retenção de água, favorecendo a secagem e a perda de peso do produto cárneo fermentado. Essas alterações conferem uma textura firme (consistência) e fatiabilidade ao produto final. Além dessas vantagens tecnológicas, a acidez resultante dificulta o desenvolvimento de muitos micro-organismos patogênicos e deteriorantes (AMMOR et al., 2007; CAMPAGNOL et al., 2007).

De acordo com Leroy et al. (2006), *L. sakei* é a espécie de bactéria probiótica mais competitiva, representando frequentemente metade a dois terços de todos os isolados de bactérias lácticas probióticas de produtos cárneos fermentados espontaneamente, enquanto *L. curvatus* é frequentemente encontrado em quantidades de até um quarto de todas as bactérias lácticas isoladas. Outros *Lactobacillus* que podem ser encontrados, geralmente em níveis menores incluem *L. plantarum*, *L. bavaricus*, *L. brevis*, *L. buchneri* e *L. paracasei*.

De Vuyst et al. (2008) cita que a adição de BALs probióticas como *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* E- 97800, e *L. plantarum* E- 98098 não afetaram negativamente as propriedades tecnológicas e sensoriais de embutido cárneo, como sabor, cor e textura.

Em trabalho realizado por Macedo et al. (2008), embutidos cárneos receberam a adição das culturas de *Lactobacillus*, que demonstraram a redução acentuada do pH durante o processamento, devido à atividade fermentativa desses micro-organismos associada à acidificação causada pelas BALs da cultura *starter*. A redução de pH verificada nos embutidos adicionados de culturas probióticas influenciou a acidez sensorial dos produtos, que apresentaram sabor notadamente mais ácido do que o tratamento controle, principalmente o tratamento que recebeu a adição de *L. rhamnosus*. No entanto, as culturas probióticas de *L. paracasei* e *L. casei* preservaram as características tecnológicas e sensoriais esperadas no produto.

Em pesquisa realizada por Zhang et al. (2010), o potencial probiótico de culturas para embutidos fermentados tiveram resultados positivos contendo *L. casei*, *L. paracasei paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. sakei*, *L. plantarum* e *L. pentosus*, não havendo diferença significativa na avaliação sensorial e apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas como *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* ssp. entérica (sorotipo Typhimurium). O mesmo foi relatado por Muthukumarasamy et al. (2007) com cepas de *L. reuteri* e *Bifidobacterium longum* em embutidos fermentados que inibiram o crescimento de bactérias patogênicas, podendo ser consideradas como conservantes naturais destes produtos.

Gonçalves (2009) detectou a capacidade inibitória de diversas cepas de *L. plantarum* isoladas de embutido cárneo fermentado contra agentes patogênicos, como *Listeria monocytogenes* e *Streptococcus aureus*, o que sugere a capacidade de produção de substâncias bacteriostáticas por essas cepas lácticas.

## **2.4 Critérios de seleção para bactérias lácticas probióticas**

Alguns critérios de seleção para bactérias probióticas são necessários para garantir a segurança dos consumidores, dentre eles estão: o gênero ao qual pertence a bactéria, ser encontradas em humanos; apresentar estabilidade frente aos sucos digestivos; ter capacidade de aderir à mucosa intestinal; ter a capacidade de colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrintestinal humano; ter a capacidade de

produzir compostos antimicrobianos; e ser metabolicamente ativo no intestino (OLIVEIRA, 2002; ZOUMPOPOULOU, 2008; NOGUEIRA et al., 2011);

Além dos citados anteriormente, de acordo com Collins et al. (1998) e Saad (2006), os principais critérios de seleção para uma bactéria potencialmente probiótica estão relacionados à segurança para uso alimentar em humanos e destaca-se: o histórico de não patogenicidade e não estarem relacionadas a outras doenças, como por exemplo, a endocardite, além da ausência de genes determinantes da resistência aos antibióticos.

#### **2.4.1 Resistência aos antibióticos**

Para que as BALs possam ser utilizadas como probióticas, devem atender aos requisitos de biossegurança para serem aptas ao consumo por humanos (*GRAS – Generally Recognized as Safe*). O conceito de segurança inclui a resistência aos antibióticos, tendo em vista que a capacidade de resistência apresentada pelas bactérias utilizadas na fermentação de produtos cárneos pode ser transmitida geneticamente a outros micro-organismos (AMMOR et al. 2007).

A determinação da susceptibilidade a antibióticos é importante para verificar se as bactérias possuem genes de resistência transferíveis, já que essas bactérias não devem ser utilizadas como probióticos, devido à possibilidade de transferência de tais genes para bactérias comensais e para as potencialmente patogênicas presentes no trato gastrointestinal (LIU et al., 2009).

Essa resistência se refere àqueles micro-organismos que não são inibidos pelas concentrações habitualmente alcançadas no sangue ou tecidos do correspondente antimicrobiano, ou àqueles que apresentam mecanismos de resistência específicos para antibióticos, gerando uma resposta clínica inadequada (MOTA et al., 2005).

A resistência a um determinado antibiótico pode ser inerente à espécie bacteriana ou gênero, classificada como intrínseca ou adquirida. Resistência intrínseca é uma resistência natural presente em todas as cepas de uma espécie bacteriana, mas embora intrínseca, a resistência geralmente é intransferível. Enquanto que a resistência adquirida é muitas vezes identificada como uma resistência encontrada em apenas

certo número de membros de uma determinada espécie e ocorre por meio de aquisição de DNA exógeno ou por mutação de genes selvagens (MATHUR et al. 2005; ROSANDER et al. 2008; EFSA, 2015).

Elementos genéticos, tais como plasmídeos ou transposons quando localizados nas células bacterianas podem transferir características de resistência a antibióticos para a microbiota intestinal humana ou animal e para bactérias patogênicas. Portanto, é muito importante verificar se as cepas probióticas não adquiriram resistência antimicrobiana antes de considerá-las seguras para o consumo (KLARE et al. 2007).

Existem três mecanismos pelos quais é possível ser realizada a transferência gênica horizontal: transdução, transformação e conjugação. A transdução é um mecanismo de transferência gênica entre bactérias mediada por bacteriófagos (fagos), que são vírus especializados em infectar células bacterianas. O processo de transformação é aquele no qual a bactéria é capaz de realizar recombinação genética por meio da absorção ativa de DNA extracelular proveniente de diversas fontes como cromossomos, plasmídeos e fagos dispersos no ambiente. A conjugação é um mecanismo de transferência gênica entre bactérias no qual, contrariamente à transformação, existe a necessidade de um contato entre a célula doadora de material genético e a célula receptora (MOREIRA et al., 2013).

A resistência a beta-lactâmicos como a ampicilina é conferida pela inativação enzimática ( $\beta$ -lactamase), mutações no sítio de ação do antibiótico e também pelo sistema de bomba de efluxo (DEVIRGILIIS et al., 2013).

A resistência bacteriana à tetraciclina é mediada principalmente por dois mecanismos, a proteção dos ribossomos por grandes proteínas no citoplasma, identificada em seis genes *tet* (M), (O), (B), (P), (Q) e (S) e também pelo sistema de bomba de efluxo (AMINOV et al., 2001). A resistência à eritromicina também pode estar ligada ao sistema de bomba de efluxo ou a modificações no ribossomo (TAVARES, 2000; ZETTLER et al., 2005).

#### **2.4.2 Resistência aos sais biliares e baixo pH**

Para que as BALs possam realizar o seu efeito probiótico no intestino, elas devem ser capazes de sobreviver a passagem pelo trato gastrointestinal humano, sendo essencial que obtenham sistemas de proteção para suportar o pH baixo no estômago e aos sais biliares secretados no intestino (JENSEN et al., 2012).

O pH do suco gástrico secretado no estômago é de 0,9, porém a presença do alimento eleva o pH local para valores entre 2,5 e 3,5. Após a ingestão do alimento, o tempo para que o estômago esvazie é de 2 a 4 h (URNAU et al., 2012).

O mecanismo de resistência aos sais biliares ainda não é bem entendido e é complexo, pois a concentração varia em função do tempo e dos diferentes segmentos do intestino. Após uma refeição, a concentração de sais biliares aumenta rapidamente no duodeno, alcançando a concentração de aproximadamente 15 mmol/L e vai diminuindo progressivamente até 5 mmol/L. No jejuno, a concentração de sais biliares é de aproximadamente 10 mmol/L e, no íleo, diminui para 4 mmol/L devido à sua absorção ativa neste segmento intestinal. Deste modo, torna-se perigoso extrapolar os resultados encontrados *in vitro* para *in vivo*, pois *in vivo* os estresses sucessivos (suco gástrico, pH, sais biliares, temperatura, suco pancreático) em conjunto, exercem um efeito antimicrobiano mais potente do que os parâmetros analisados individualmente em experimentos *in vitro* (MARTEAU et al., 1997; MARTINS et al., 2005).

As BALs precisam sobreviver a diversas condições adversas durante o trânsito no trato gastrointestinal. A presença de sais biliares, acidez, micro-organismos concorrentes e a resposta imune do hospedeiro são fatores que desafiam a efetiva colonização. Sendo assim, a tolerância ao ácido gástrico e à bile tornou-se um importante critério de seleção para bactérias potencialmente probióticas (HORN et al., 2013).

#### **2.4.3 Capacidade de autoagregação e coagregação**

A interação de micro-organismos probióticos com a microbiota intestinal natural é essencial para o sucesso da colonização e persistência destes micro-organismos no

intestino a longo prazo, constituindo assim, um importante mecanismo de defesa contra bactérias patogênicas (PERES et al., 2014). Autoagregação se faz necessária para que as bactérias probióticas consigam se aderir às células epiteliais do intestino delgado e a coagregação determina a capacidade de formar biofilmes que possam proteger o hospedeiro, impedindo a colonização por patógenos (NUR et al., 2010; PERES et al., 2014).

A adesão às células do hospedeiro é uma característica desejável dos candidatos a probióticos, uma vez que, com esta habilidade, seus efeitos podem ser mantidos por longo período de tempo, sem a necessidade da contínua administração dos micro-organismos. Essa característica favorece a proteção da mucosa intestinal, pois estes micro-organismos, ao aderirem aos enterócitos, protegem os vilos e as superfícies absorptivas contra toxinas produzidas por micro-organismos indesejáveis (BARBOSA et al., 2011).

A adesão exercida pelas bactérias é um sistema complexo, no qual proteínas da superfície celular de bactérias lácticas possuem mecanismos de adesão ao epitélio intestinal. Outro mecanismo para aderência bacteriana também envolve a ligação de moléculas da superfície celular microbiana com a camada de muco protetor que cobre o epitélio intestinal humano (LUKIC et al., 2012).

A capacidade das bactérias probióticas para formar agregados pode potencialmente inibir a aderência de bactérias patogênicas na mucosa intestinal, formando uma barreira por meio de autoagregação, em que as próprias bactérias lácticas se unem. Por sua vez, a coagregação é formada com a união de bactérias probióticas com micro-organismos comensais a mucosa intestinal que podem ser agentes patogênicos, o que facilita a eliminação destes micro-organismos do organismo humano evitando possíveis processos patológicos. Além disso, a agregação é um mecanismo importante, pois favorece a troca genética, a adesão e colonização no trato gastrointestinal do hospedeiro, bem como a imunomodulação da mucosa intestinal (GOH et al., 2010).

#### 2.4.4 Capacidade de crescimento na presença de prebióticos

De acordo com a Instrução Normativa nº 13 de 30 de novembro de 2004 do MAPA, os prebióticos são ingredientes que não são digeridos pelas enzimas digestivas do hospedeiro, mas que são fermentados pela microbiota bacteriana do trato digestório, originando produtos como o ácido lático que estimulam seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias benéficas e inibem a colonização de bactérias patogênicas ou indesejáveis (BRASIL, 2004).

As fibras consideradas prebióticas contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal, pois são fibras solúveis que não são absorvidas pelo organismo, não alteram o valor calórico do alimento, não aumentam o nível de açúcar no sangue, podem aumentar a absorção de cálcio, além de servir como substrato para o desenvolvimento de bactérias lácticas (GALLINA et al., 2011) e estimulam seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado de bactérias no cólon (HO et al., 2013).

Vários oligossacarídeos são considerados prebióticos, como a inulina, galactooligossacarídeos, frutooligossacarídeos e xilooligossacarídeos. A inulina é o prebiótico mais amplamente estudado, sendo a chicória a sua principal fonte, a partir da qual, frutooligossacarídeos são muitas vezes obtidos por hidrólise enzimática (FRANCK, 2002; GOURBEYRE et al., 2011). Pectina, lactose, lactulose, lactitol, rafinose, sorbitol e o xilitol também são exemplos de prebióticos (MAIA et al.; 2008).

A inulina e os frutooligossacarídeos são os únicos prebióticos reconhecidos e utilizados na indústria alimentar de produtos funcionais. Esses prebióticos não aumentam a viscosidade da solução, não alteram a composição alimentar no intestino delgado e, aparentemente, não se ligam aos sais biliares. Estimulam o crescimento intestinal das bifidobactérias do cólon, que agem suprimindo a atividade putrefativa de outras bactérias, como *Escherichia coli*, *Streptococcus fecalis* e *Proteus spp*, atuando também no aumento do bolo fecal no intestino delgado (ANJO, 2004).

A inulina é um polissacarídeo linear, composto por ligações  $\beta$  (2-1), de frutose e uma terminação de glicose, podendo obter de 2 a 60 unidades de frutose ligadas entre si. A oligofrutose é obtida por hidrólise parcial da própria inulina, podendo ser uma

mistura de ambas as moléculas, variando de 2 a 10 ligações, dependendo da marca e origem do produto (SAMANTHA et al., 2013).

Gourbeyre et al. (2011) citam que se nenhuma fibra dietética está presente no cólon, as bactérias probióticas extraem sua energia a partir da degradação de proteínas. Este metabolismo leva à produção de substâncias tóxicas e potencialmente carcinogênicas, como por exemplo, amoníaco ou compostos fenólicos. Em contraste, a fermentação de carboidratos, tais como fibras dietéticas, geram ácidos graxos de cadeia curta, como o acetato, propionato, ou butirato, que não são tóxicos para o hospedeiro e contribuem como um combustível potencialmente energético para as células epiteliais intestinais (KOLIDA et al., 2002).

Uma possibilidade adicional para o melhor desempenho da microbiota probiótica no trato gastrintestinal é o uso de simbióticos, ou seja, a combinação de probióticos e prebióticos. Esta simbiose afeta benéficamente o hospedeiro, melhorando a sobrevivência e estimulando seletivamente o crescimento e/ou ativação do metabolismo de um ou de um número limitado de bactérias promotoras da saúde, assim melhorando o bem-estar do hospedeiro (DEPEINT et al., 2008; INDRIIO et al., 2009).

O uso de prebióticos em produtos cárneos pode trazer benefícios, pois esses ingredientes, além de promover benefícios à saúde, possuem baixos valores calóricos. Estes, podem ser utilizados como substitutos parciais de gorduras, possuem excelente capacidade de retenção de água, odor neutro, favorecem o fatiamento de produtos e constituem-se em ingredientes com propriedades funcionais reconhecidas. A adição de fibras alimentares em alimentos consumidos frequentemente, como os produtos cárneos, pode ajudar a aumentar a ingestão diária de fibras (FILHO et al., 2012).

## CAPÍTULO 3

### 3 POTENCIAL PROBIÓTICO DE CEPAS NATIVAS DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* E *LACTOBACILLUS PENTOSUS* ISOLADAS DE SALAMES ARTESANAIS

#### RESUMO

A crescente preocupação dos consumidores em conhecer as características dos alimentos tem conduzido ao desenvolvimento de produtos funcionais, como os probióticos, que promovem a saúde e o bem-estar, além da nutrição. Os critérios de seleção das bactérias lácticas probióticas compreendem entre outras características, a resistência ao baixo pH, aos sais biliares, a capacidade de autoagregação e coagregação e a inexistência ou a baixa frequência de resistência adquirida a antibióticos. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus pentosus* isoladas de salames obtidos por fermentação natural, com perspectiva à sua utilização como cultura *starter* em produtos cárneos probióticos. Para tanto, 54 cepas de *L. plantarum* e *L. pentosus* foram submetidas aos seguintes testes: resistência fenotípica à ampicilina, eritromicina e tetraciclina pelo método de disco difusão; presença de genes de resistência para esses antibióticos por reação de polimerização em cadeia, utilizando *primers* específicos; capacidade de crescimento na presença dos prebióticos inulina e oligofrutose; capacidade de autoagregação e de coagregação com *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111), *Escherichia coli* (O157:NM 02-1840) e *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028); resistência às concentrações de 0,15% e 0,30% de sais biliares e ao pH 3. A resistência microbiana fenotípica foi observada em maior frequência para tetraciclina e a presença de genes de resistência não foi observada com os *primers* utilizados. A capacidade de autoagregação, após 24 horas atingiu 64,61% e a média de coagregação observada com *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) foi de 7,02%, com *E. coli* (O157: NM02-1840) de 6,23% e com *S. Typhimurium* (ATCC 14028) de 4,92%. Entre as 54 cepas de BALs, 9 cepas apresentaram maior crescimento na presença de inulina em comparação aos meios controle (glicose e sacarose) após 24 h. Portanto,

conclui-se que cinco cepas de *Lactobacillus plantarum* (131, 192, 341, 343 e 442) possuem potencial probiótico e são candidatas a uso como *starter* de produtos cárneos fermentados probióticos.

**Palavras-chave:** Probióticos. Produto cárneo fermentado. *Lactobacillus plantarum*. *Lactobacillus pentosus*.

## ABSTRACT

The growing concern of consumers to know the characteristics of food has led to the development of functional products that promote health and well-being such as the probiotic food. The criteria for selection of probiotic lactic acid bacteria comprise among other characteristics, the resistance to low pH, the resistance to bile salts, the ability to auto and to coaggregate and the absence or the low frequency of acquired resistance to antibiotics. This study aimed to evaluate the probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus pentosus* strains isolated from artisanal salami, for their future use as probiotic starter culture in meat products. For this purpose, 54 strains of *L. plantarum* and *L. pentosus* were subjected to the following tests: phenotypic resistance to ampicillin, erythromycin and tetracycline by the disk diffusion method; genotypic resistance to those antibiotics by polymerase chain reaction; ability to grow in the presence of prebiotic carbohydrates (inulin and oligofructose); autoaggregation capacity and coaggregation capacity with *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111), *Escherichia coli* (O157: NM 02-1840) and *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028); resistance to concentrations of 0.15% and 0.30% bile salts and to low pH. The phenotypic antimicrobial resistance was observed in a higher frequency to tetracycline. However, the presence of resistance gene was not observed with the primers used. The maximum autoaggregation capacity after 24 hours was 64.61%, whereas the average coaggregation capacity was 7.02% with *E. coli* (O157: NM 02-184), 6.23% with *Listeria monocytogenes* (ATCC 191110) and 4.92% with *S. Typhimurium* (ATCC 14028). Among the strains of *Lactobacillus*, 9 strains showed higher growth in the presence of inulin compared to the control carbohydrates (glucose and sucrose) after 24 h. Among 54 strains of *Lactobacillus*, five strains of *L. plantarum* (131, 192, 341, 343 and 442)

demonstrated probiotic potential and may be candidates for their use as probiotic in fermented meat products.

**Keywords:** Probiotic. Product fermented meat. *Lactobacillus plantarum*. *Lactobacillus pentosus*.

### 3.1 INTRODUÇÃO

A maioria dos probióticos comercialmente disponíveis pertence ao grupo das bactérias lácticas (BALs) dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Os *Lactobacillus* fazem parte da microbiota intestinal humana e animal e são considerados como indicadores de saúde, uma vez que esses micro-organismos são considerados como seguros e normalmente usados como probióticos em alimentos para promover bem estar (CHANG et al., 2011).

De acordo com Saad (2006) os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas que mais se destacam são: controle da microbiota intestinal; estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; promoção da resistência gastrintestinal à colonização por patógenos por meio da produção de ácidos acético e láctico, bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos; promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes; estimulação do sistema imune; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas.

Para que os probióticos exerçam apenas benefícios à saúde, alguns fatores devem ser abordados para avaliar a segurança, incluindo a patogenicidade, potencial infeccioso, virulência, toxicidade, atividade metabólica e as propriedades intrínsecas dos micro-organismos. As normas utilizadas para assegurar a segurança alimentar de uma BAL probiótica compreendem estudos *in vitro*, estudos utilizando animais e posteriormente ensaios clínicos em humanos (NAGPAL et al., 2013).

Um dos fatores para a segurança e utilização de bactérias probióticas em produtos alimentícios é a determinação da susceptibilidade a antibióticos, sendo

importante para verificar se as BALs possuem genes de resistência a antibióticos que podem ser transferidos para bactérias comensais e para as potencialmente patogênicas presentes no trato gastrointestinal. Por isso, visando à segurança alimentar, as linhagens selecionadas devem ser avaliadas antes da utilização em alimentos (LIU et al., 2009).

Além disso, para a seleção de micro-organismos probióticos, deve-se avaliar sua capacidade em crescer na presença de carboidratos prebióticos (INDRIO et al., 2009) e sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal humano, sendo essencial que obtenham resistência ao pH baixo no estômago e a presença dos sais biliares secretados no intestino (JENSEN et al., 2012). Do mesmo modo, é desejável que esses micro-organismos formem uma barreira no trato gastrointestinal, aderindo à mucosa intestinal, colonizando-a ao menos temporariamente, para que possa exercer as funções benéficas ao organismo humano (AMMOR et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus pentosus* isolados de salames obtidos por fermentação natural, com perspectiva à sua utilização como cultura *starter* em produtos cárneos.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Bactérias lácticas**

Foram utilizadas 54 cepas de bactérias lácticas, previamente isoladas por Dalla Santa et al. (2012). Esses micro-organismos são provenientes de 50 salames produzidos por fermentação espontânea em pequenas indústrias de produtos cárneos localizadas em 16 municípios dos estados do Paraná e Santa Catarina, conforme Tabela 2.

Em estudo anterior, as cepas foram caracterizadas por métodos fenotípicos e genotípicos, sendo identificadas como pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, das espécies *L. plantarum* e *L. pentosus* (WOLUPECK, 2013). As cepas 32, 123 e 201 foram classificadas como *L. pentosus* e as demais cepas como *L. plantarum*.

Tabela 2. Procedência das amostras de embutidos fermentados dessecados e semi-dessecados nos estados do PR e SC, das quais as cepas de *L. plantarum* e *L. pentosus* foram isoladas

<b>Município de procedência/estado</b>	<b><i>Lactobacillus plantarum</i></b>	<b><i>Lactobacillus pentosus</i></b>
Nova Santa Rosa /PR	22	
Porto Vitória /PR	35	32
Araucária /PR	44, 282, 283, 284 e 285	
Quatro Barras /PR	53	
Curitiba /PR	61, 192, 194, 195, 221, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 271, 341, 342, 343 e 433	
Sulina/PR	102, 103 e 104	
São José dos Pinhais /PR	131, 323, 411 e 442	123
Santa Izabel do Oeste /PR	175	
Guarapuava /PR	202 e 204	201
Rio Negrinho /SC	211, 212, 213, 214 e 215	
Concórdia /SC	231	
Rio Branco do Sul /PR	251	
Japurá /PR	293	
São João do Triunfo /PR	364	
Campo Largo /PR	385	
Prudentópolis /PR	484, 485, 501, 502, 503, 504 e 505	

As cepas foram mantidas em caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (HIMEDIA, Mumbai, Índia) com adição de 20% (v/v) de glicerol estéril e armazenadas a -20 °C em microtubos estéreis até o momento do uso. A ativação das cepas foi realizada adicionando-se 100 µL da cultura em glicerol em tubos contendo 8 mL de caldo MRS incubados a 37 °C por 24 h.

### **3.2.2 Determinação da resistência microbiana fenotípica à ampicilina, eritromicina e tetraciclina nas cepas de *L. plantarum* e *L. pentosus***

Ampicilina, eritromicina e tetraciclina são antibióticos usualmente empregados na terapêutica humana e são considerados antibióticos de resistência adquirida para o gênero *Lactobacillus*. Por isso, esses antibióticos foram escolhidos para a avaliação da resistência fenotípica e genotípica nas cepas de *L. plantarum* e *L. pentosus*.

A resistência à ampicilina (10 µg), eritromicina (15 µg) e tetraciclina (30 µg) (Laborclin, Pinhais-PR, Brasil) foi avaliada pelo método de disco-difusão. As cepas foram previamente cultivadas em caldo MRS, centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos e ressuspenso em solução salina (9 mL) com turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland foi espalhada em três direções em ágar MRS, com auxílio de uma alça de Drigalski. Logo após, os discos de antibióticos foram aplicados e as placas identificadas com as cepas correspondentes e incubadas a 37 °C por 24 h. Para interpretação dos resultados de tetraciclina ( $\leq 14$  mm) e eritromicina ( $\leq 13$  mm), foram utilizados os pontos de corte de resistência propostos para *Lactobacillus* sp. por Charteris et al. (1998). Para ampicilina ( $\leq 16$  mm), foi utilizado critério proposto para *Enterococcus* sp., preconizado pela norma M100-S21 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012).

### **3.2.3 Determinação de genes de resistência microbiana para ampicilina, eritromicina e tetraciclina nas cepas de *L. plantarum* e *L. pentosus***

Primeiramente, as cepas foram cultivadas em caldo MRS a 37 °C por 48 h. O volume de 1,5 mL de caldo cultivado foi centrifugado a 12.000 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi removido e completamente descartado. O precipitado foi submetido à extração de DNA utilizando o Kit HiPura™ para extração de DNA genômico de múltiplas amostras (HIMEDIA, Mumbai, Índia), seguindo o protocolo descrito a seguir. O precipitado foi ressuspenso em 200 µL de solução de lisozima e incubado a 37 °C por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 20 µL de solução de

proteínase K e 200 µL de solução de lise (detergente e sal) na amostra sob agitação por 10 segundos, seguida de incubação a 55 °C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de etanol (96-100%) ao lisado obtido, que foi transferido para a Coluna Spin Miniprep HiElute e submetido à nova centrifugação a 6.500 x g por 1 minuto. Após o descarte do sobrenadante, a Coluna Spin foi transferida para um tubo de coleta e pré-lavada com 500 µL de solução de pré-lavagem, seguida de nova centrifugação a 6.500 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e a coluna vazia foi centrifugada por mais 1 minuto na mesma velocidade. Novamente, o sobrenadante foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo de coleta, onde foi realizada a separação do DNA. Para isso, 100 µL de tampão de eluição foram pipetados no centro da Coluna. Após 1 minuto de descanso a temperatura ambiente, o material foi centrifugado a 6.500 x g por 1 minuto, repetindo-se o procedimento para obtenção de quantidade adequada de DNA.

O DNA foi armazenado a -20 °C para posterior reação de polimerase em cadeia (PCR). A presença de DNA nas amostras foi confirmada pela visualização em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

Para a verificação de genes de resistência à ampicilina, eritromicina e tetraciclina foram testados os genes mais frequentemente citados em literatura para a resistência em *Lactobacillus*, com exceção do *BlaZ*, para o qual, utilizou-se *primer* recomendado para *Staphylococcus sp.* conforme apresentado na Tabela 3.

A técnica de PCR foi realizada seguindo recomendações do fabricante (Invitrogen, São Paulo-SP, Brasil) para cada *primer*. Os *primers ermA*, *ermB*, *ermC*, *tetL* e *tetM* utilizaram o mesmo programa de PCR, com a desnaturação inicial a 95 °C por 1 minuto, seguidos de 30 ciclos de amplificação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, seguidos de uma extensão final durante 4 minutos a 72 °C. Para o *tetS*, a desnaturação inicial ocorreu a 94 °C por 5 minutos, seguidos de 25 ciclos a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 50 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, seguido de uma extensão final durante 7 minutos a 72 °C. Para o *tetW*, as condições de PCR foram: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguidos de 25 ciclos de amplificação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 64 °C por 30 segundos e

extensão a 72 °C por 30 segundos, seguidos de uma extensão final durante 7 minutos a 72 °C. O volume final de cada reação foi de 25 µL, sendo que os reagentes (Invitrogen, São Paulo-SP, Brasil) utilizados foram: 2,5 µL de tampão de PCR 10X, 1 µL de cloreto de magnésio 50mM, 4 µL de deoxirribonucleotídeos trifosfato 1,25 mM, 1,25 µL de cada um dos *primers* com concentração de 10 pmol/µL, 0,4 µL de Taq DNA polimerase 5U, 10,1 µL de água ultra pura estéril e 2 µL da amostra de DNA.

Tabela 3. *Primers* utilizados para detecção por PCR de genes de resistência à ampicilina, eritromicina e tetraciclina, com suas respectivas sequências e pares de bases.

<i>Primers</i>		Sequência	PB	Referência
<i>ermA</i>	<i>ermA1</i>	5'-AAGCGGTAAACCCCTCTGA-3'	190	Klare et al., 2007
	<i>ermA2</i>	5'-TTCGCAAATCCCTTCTCAAC-3'		
<i>erm B</i>	<i>ermB1</i>	5'-TTTTGAAAGCCGTGCGTCTG-3'	202	Klare et al., 2007
	<i>ermB2</i>	5'-CTGTGGTATGGCGGGTAAGTT-3'		
<i>erm C</i>	<i>ermC1</i>	5'-AATCGTCAATTCCTGCATGT-3'	299	Klare et al., 2007
	<i>ermC2</i>	5'-TAATCGTGGAATACGGGTTTG-3'		
<i>tet (L)</i>	<i>tetL FW</i>	5'-TGGTCCTATCTTCTACTCATTC-3'	385	Klare et al., 2007
	<i>tetL RV</i>	5'-TTCCGATTCGGCAGTAC-3'		
<i>tet (M)</i>	<i>tetM FW</i>	5'-GGTGAACATCATAGACACGC-3'	401	Klare et al., 2007
	<i>tetM RV</i>	5'-CTTGTTGAGTTCCAATGC-3'		
<i>tet (S)</i>	<i>tetS FW</i>	5'-GAAAGCTTACTATACAGTAGC-3'	169	Comunian et al., 2010
	<i>tetS RV</i>	3'- AGGAGTATCTACAATATTTAC-5'		
<i>tet (W)</i>	<i>tetW FW</i>	5'-GAGAGCCTGCTATATGCCAGC-3'	168	Comunian et al., 2010
	<i>tetW RV</i>	3'-GGGCGTATCCACAATGTAAAC-5'		
<i>BlaZ</i>	<i>BlaZ FW</i>	5'- TAAGAGATTTGCCTATGCTT-3'	377	Olsen et al., 2006
	<i>BlaZ RV</i>	5'- TTAAAGTCTTACCGAAAGCAG-3'		

Após a técnica de PCR, a amplificação dos genes foi verificada em gel de agarose (Invitrogen, Carsbad-Califórnia, EUA) 1,5% corado com brometo de etídeo (Invitrogen, São Paulo-SP, Brasil).

### 3.2.4 Capacidade de crescimento na presença de carboidratos prebióticos

Para avaliar a capacidade de crescimento na presença de prebióticos foram testados os carboidratos oligofrutose (Beneo Orafit, Oreye, Bélgica), inulina (Beneo Orafit, Oreye, Bélgica), glicose (NEON, São Paulo, Brasil) e sacarose (LabMaster, BIOTEC, Pinhais-PR, Brasil). Glicose e sacarose foram usadas como carboidratos controle. As cepas foram pré-ativadas em caldo MRS a 37 °C com incubação por 24 h. A partir dessa cultura, 1 mL foi transferido para tubo estéril e centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 50 mL de caldo MRS modificado (pH 6,2) contendo 2% (p/p) de um dos carboidratos citados acima, conforme descrito na Tabela 4. O crescimento das culturas foi monitorado após 0, 4, 8 e 24 h de incubação a 37 °C pela medida da densidade óptica ( $DO_{600nm}$ ) em espectrofotômetro (Wavelength-1105, São Paulo, Brasil) (PENNACCHIA et al., 2006). Um teste em branco foi realizado seguindo o mesmo procedimento, com as culturas cultivadas no caldo MRS formulado sem a adição de carboidratos. Todos esses testes foram realizados em triplicata.

Tabela 4. Formulação do meio MRS modificado para utilização como meio de cultura base (branco) para adição dos carboidratos glicose e sacarose (controle), inulina e oligofrutose.

<b>Composição</b>	<b>Quantidade (%)</b>
Peptona bacteriológica (Himedia, Mumbai-India)	10
Extrato de carne (Kasvi-Itália)	10
Extrato de levedura (Himedia, Mumbai-India)	5
Citrato de amônio (LabSynth, Diadema-SP, Brasil)	2
Acetato de sódio (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro-RJ, Brasil)	5
Magnésio (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro-RJ, Brasil)	0,2
Manganês (LabSynth, Diadema-SP, Brasil)	0,05
Fosfato Dipotássio (LabMaster, Curitiba-PR, Brasil)	2

### 3.2.5 Capacidade de autoagregação e coagregação

A capacidade de autoagregação e de coagregação das cepas de bactérias lácticas foi avaliada conforme procedimento descrito por Ekmekçi et al. (2009). Para a avaliação da capacidade de autoagregação, as cepas foram previamente cultivadas em caldo MRS a 37 °C com incubação por 24 h. Em seguida, esse caldo foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos. O precipitado lavado duplamente com solução salina tampão fosfato contendo 8 g/L de NaCl, 0,34 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1,21 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 6,0). As células foram ressuspensas em solução tampão fosfato para atingir valor de DO<sub>600nm</sub> de 0,60, sendo esse valor considerado para o tempo 0 h. Posteriormente, as suspensões foram incubadas a 37 °C por 24 h para nova medida da DO<sub>600nm</sub> (tempo 24h).

A capacidade de autoagregação foi calculada pela seguinte fórmula:

Autoagregação (%) = [(DO1 - DO2)/(DO1) x 100], onde DO1 é a densidade óptica da suspensão da cepa de bactéria láctica e DO2 é a densidade óptica da suspensão da cepa de bactéria láctica após 24 h de incubação.

Para avaliar a capacidade de coagregação, cada cepa de *Lactobacillus* previamente crescida em caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth, Himedia, Mumbai-India) a 37 °C por 24 h, e culturas de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111), *Escherichia coli* (O157: NM 02-1840) e *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), crescidas em caldo TSB (Caldo Triptona de Soja, Himedia, Mumbai-India) a 37 °C por 24 h, foram centrifugadas e ressuspensas em solução tampão fosfato, conforme descrito anteriormente. A DO<sub>600nm</sub> das suspensões de cada cepa de *Lactobacillus* e de cada uma das cepas patogênicas foram medidas para atingir valor de DO<sub>600nm</sub> de 0,60, sendo os valores considerados como tempo 0 h. Posteriormente, volumes de 2 mL das suspensões de *Lactobacillus* e de cada uma das cepas patogênicas foram misturados por 10 segundos e incubados a 37 °C por 4 h. Após esse período, a DO<sub>600nm</sub> de cada suspensão foi determinada (tempo 4 h). Esses testes foram realizados em triplicada.

A capacidade de coagregação foi calculada pela seguinte fórmula: Coagregação (%): [(DO3 + DO4) - 2 (DO5)/(DO3 + DO4) x 100], onde: DO3 é a densidade óptica da suspensão da cepa de bactéria láctica, DO4 é a densidade óptica da suspensão da

bactéria patogênica e DO5 é a densidade óptica da mistura das suspensões das cepas citadas anteriormente após 4 h de incubação.

### **3.2.6 Avaliação da capacidade de resistência ao baixo pH**

O efeito do baixo pH sobre a viabilidade dos *L. plantarum* e *L. pentosus* foi verificado mediante adaptação da técnica descrita por ERKKILÄ et al. (2001) que consiste na inoculação de 1 mL da cultura ativada em caldo MRS a 37 °C por 48 h, em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina estéril com pH ajustado para os valores 3, 4, e 5 pelo emprego de solução de ácido clorídrico a 8 M. A solução salina foi preparada pela dissolução de 9 g/L de cloreto de sódio (NaCl), 9 g/L de fosfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ) e 1,5 g/L de fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) em água destilada, com posterior esterilização em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Os tubos de ensaio foram incubados em estufa bacteriológica a 37 °C e a contagem do número de células viáveis de bactérias lácticas realizada após a exposição da cepa à solução salina ácida pelo período de 0, 1, 2,5 e 4 h. A contagem das células viáveis foi realizada em ágar MRS, mediante semeadura em profundidade, após incubação a 37 °C por 48 h e o resultado expresso em UFC/mL. A viabilidade celular observada em solução salina com pH 5,0 foi utilizado como controle para a comparação dos resultados por ser o pH ideal para o crescimento de *Lactobacillus*.

### **3.2.7 Avaliação da capacidade de resistência aos sais biliares**

A resistência dos *Lactobacillus* aos sais biliares foi verificada pela inoculação de 1 mL das cepas pré-ativadas em 9 mL de caldo MRS, adicionado de 0,15% ou 0,30% de sais biliares (SIGMA-Aldrich, St Louis-USA). Os tubos foram incubados a 37 °C e a contagem das células viáveis realizada após 0, 1, 2,5 e 4 h de exposição em ágar MRS a 37 °C por 48 h. Para a comparação dos resultados foi considerado como controle o crescimento das bactérias lácticas no tubo de ensaio contendo caldo MRS sem a adição de sais biliares (ERKKILA et al., 2001).

### 3.2.8 Análises estatísticas

Os dados foram analisados estatisticamente pela descrição das frequências absolutas e relativas. A capacidade de crescimento de cada cepa nos diferentes carboidratos em cada período de tempo foi analisada por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Em todas as análises utilizou-se o nível de significância de 5% e o programa *Statgraphics Centurion XVI Version 16.1.11*©.

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1 Resistência fenotípica das cepas de BALs à ampicilina, eritromicina e tetraciclina

Para a resistência fenotípica, das 54 cepas de BALs avaliadas, 44,44% (24) foram resistentes à tetraciclina, 29,62% (16) à eritromicina e 7,4% (4) à ampicilina, conforme a Tabela 5.

Tabela 5. Cepas de *L. plantarum* e *L. pentosus* isoladas de salames artesanais resistentes à ampicilina, eritromicina e tetraciclina pelo método de disco difusão.

Antibiótico	<i>L. plantarum</i>	<i>L. pentosus</i>
Ampicilina	229, 231, 485, 502;	
Eritromicina	35, 194, 201, 202, 211, 227, 271, 293, 342, 385, 484, 501, 502, 503, 504, 505;	
Tetraciclina	44, 53, 202, 204, 212, 214, 225, 226, 227, 228, 229, 231, 251, 271, 282, 283, 293, 485, 502, 503, 504, 505;	123, 201

Das 54 cepas de *Lactobacillus* spp. 1,85% (1) apresentou resistência fenotípica aos três antibióticos testados, 7,40% (4) apresentaram resistência à ampicilina e à

tetraciclina, 14,81% (8) foram resistentes à eritromicina e à tetraciclina e 37,03% (20) apresentaram resistência a apenas um dos antibióticos testados. De acordo com Nota Técnica nº 1-2010 da Anvisa (2010) micro-organismos multirresistentes são aqueles resistentes a diferentes classes de antimicrobianos testados em exames microbiológicos. Portanto, as cepas 201, 202, 227, 229, 231, 271, 293, 485, 502, 503, 504 e 505 podem ser consideradas multirresistentes, pois apresentaram resistência a pelo menos dois antibióticos de classes diferentes analisadas neste estudo e não devem ser utilizadas como probióticos.

Tetraciclina, eritromicina e ampicilina são antibióticos muito utilizados na clínica humana e animal (COMUNIAN et al., 2010; MAYHOFER et al., 2010). A tetraciclina é utilizada para o tratamento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bactérias intracelulares e para infecções por protozoários (ROBERTS, 2005). Portanto, a verificação da resistência para esses antibióticos é de extrema importância em bactérias probióticas para garantir a inocuidade alimentar.

Das 54 cepas de *Lactobacillus* testadas, 7,4% (4) apresentaram resistência à ampicilina. O mesmo foi relatado em trabalho realizado por Cordeiro et al. (2010), com cepas comerciais de três gêneros diferentes, sendo eles *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Staphylococcus* e apenas o *L. plantarum* com 7,14% (2) apresentou resistência a esse antibiótico.

De acordo com pesquisa realizada por Comunian et al., (2010) para a suscetibilidade à tetraciclina e à eritromicina em cepas de *L. paracasei* isoladas de alimentos fermentados, das 121 cepas analisadas, 22,3% apresentaram resistência à tetraciclina e 5,8% à eritromicina. No entanto, no presente estudo, a resistência a esses antibióticos foi mais frequente, com 44,44% dos micro-organismos apresentando resistência à tetraciclina e 29,62% à eritromicina. No entanto, em trabalho realizado por Justo et al. (2013), a resistência à tetraciclina foi de 100% e 97,77% à eritromicina em *Lactobacillus sp* isolados de salames.

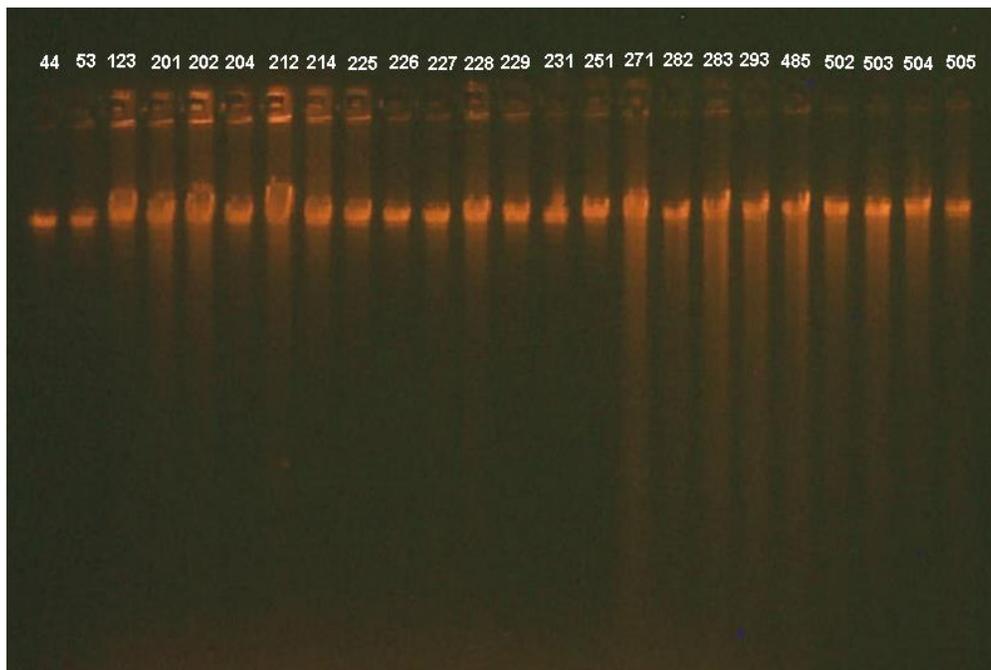
Muitas BALs são resistentes a antibióticos, mas essa resistência é frequentemente intrínseca e não transmissível (ZHOU et al., 2005). De acordo com Pozza et al. (2011) os *Lactobacillus sp.* possuem resistência intrínseca à bacitracina, kanamicina, gentamicina, metronidazol, estreptomicina, trimetoprima e vancomicina.

Esse gênero não possui resistência intrínseca à ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, penicilina G e tetraciclina (KLARE et al., 2007).

### 3.3.2 Determinação de genes de resistência microbiana para ampicilina, eritromicina e tetraciclina

Na avaliação de genes de resistência, a extração de DNA genômico das cepas de *L. plantarum* e *L. pentosus* foi realizada e em todas as amostras foi encontrado o DNA correspondente, evidenciando extração bem sucedida e que as amostras estavam aptas a serem utilizadas para realização da PCR (Figura 1).

Figura 1. Gel de extração de DNA genômico de 24 cepas de *L. plantarum* e *L. pentosus* resistentes à tetraciclina.



As amostras de DNA genômico das cepas resistentes à ampicilina, eritromicina e tetraciclina foram testadas para o gene *BlaZ* que confere resistência à beta-lactâmicos como a ampicilina, *ermA*, *ermB*, *ermC* para eritromicina e *tet(L)*, *tet(M)*,

*tet(S)* e *tet(W)* para tetraciclina. Todas as amostras de DNA genômico extraídas das bactérias resistentes fenotipicamente à ampicilina, eritromicina e tetraciclina apresentaram resultados negativos na técnica de PCR para os genes de resistência, não havendo amplificação dos *primers* pesquisados nas amostras.

Os resultados encontrados no presente estudo são semelhantes aos relatados por Cordeiro et al. (2010) e por Hummel et al. (2007) em cepas de *Lactobacillus* sp. e de *Pediococcus* sp. resistentes fenotipicamente à eritromicina e à tetraciclina, mas que não demonstraram amplificação dos genes *ermA*, *ermB*, *ermC*, *tet(L)*, *tet(M)* e *tet(S)*, além do gene *blaZ* em *L. plantarum*, o que indica que apesar dos genes testados serem os mais pesquisados, a resistência fenotípica encontrada pode ser codificada por outros genes não testados ou estar presentes em outras sequências dos mesmos genes.

Ouoba et al., (2008) determinaram a transferência de genes de resistência a *L. reuteri* 12002, *L. paraplantarum*, *L. fermentum*, *L. salivarius* e *Weissella confusa* e relataram que em testes fenotípicos as cepas demonstraram resistência a antibióticos de diferentes classes, mas que nas análises genotípicas, apenas o gene *ermB*, que confere resistência à eritromicina, apresentou amplificação específica.

Ammor et al., (2007) avaliaram a resistência fenotípica e genotípica de lactobacilos e de bifidobactérias e encontraram similaridade de resultados apenas para *L. johnsonii*, que apresentou resistência fenotípica à eritromicina e amplificação específica para o gene *ermB*.

De acordo com Comunian et al., (2010), que avaliaram a resistência à tetraciclina e à eritromicina em *L. paracasei*, os genes que codificam resistência a esses antibióticos em *Lactobacillus* são raramente encontrados e quando localizados, estão associados com a presença dos genes *tet (M)*, *tet (W)* e *ermB*, respectivamente.

Klare et al., (2007) também não identificaram a presença dos genes *ermA*, *ermB* ou *ermC* em cepas de *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Lactococcus* resistentes fenotipicamente à eritromicina. No entanto, identificaram a presença do gene *tet (W)* em duas cepas de *L. johnsonii* resistentes à tetraciclina em teste fenotípico.

Gevers et al., (2003) pesquisaram a presença dos genes de resistência à tetraciclina, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(K)* e *tet(L)*, em 24 cepas de *L. plantarum*, *L. sakei*

*carneus*, *L. sakei sakei*, *L. curvatus*, e *L. alimentarius* isolados de embutidos cárneos fermentados e encontraram somente a presença de *tet* (M) em todas as cepas avaliadas. Os demais genes não foram encontrados em qualquer uma das cepas testadas. Por sua vez, Chang et al., (2011) avaliaram 111 cepas, entre elas *L. reuteri*, *L. amylovorus*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. ruminis*, *L. kefir*, *L. fermentum*, *L. sakei*, *L. coryniformis*, *L. parabuchneri* e *L. letivaz* e verificaram a presença do gene *tet* (W) em 82% das cepas. Os genes *tet* (L), *tet* (K) e *tet* (Q) estavam presentes em 14,4%, 8,1% e 0,9% das cepas, respectivamente.

Rosander et al., (2008) citam que em *L. reuteri* ATCC 55730, os genes correspondentes à resistência aos beta-lactâmicos estão todos localizados no cromossomo e não possuem qualquer mecanismo para transferência de resistência para outras bactérias. Sugere-se portanto, que essa resistência é causada por uma série de mutações pontuais em genes que codificam as proteínas PBP1a, PBP2a, que são proteínas de ligação à ampicilina, sendo portanto, não transferíveis a outras bactérias. Esse mesmo fato poderia explicar a baixa frequência de resistência fenotípica à ampicilina e a não amplificação do gene *BlaZ* nas cepas de *Lactobacillus* avaliadas no presente estudo.

Um processo importante de desenvolvimento de resistência antimicrobiana é a aquisição de genes que são transportados por bactérias resistentes, caracterizando a evolução ou transferência horizontal. Quando localizados em elementos genéticos tais como plasmídeos ou transposons, essas características de resistência podem ser transferidas para a microbiota humana ou animal e para bactérias patogênicas que podem estar no trato gastrointestinal (KLARE et al., 2007; MOREIRA et al., 2013).

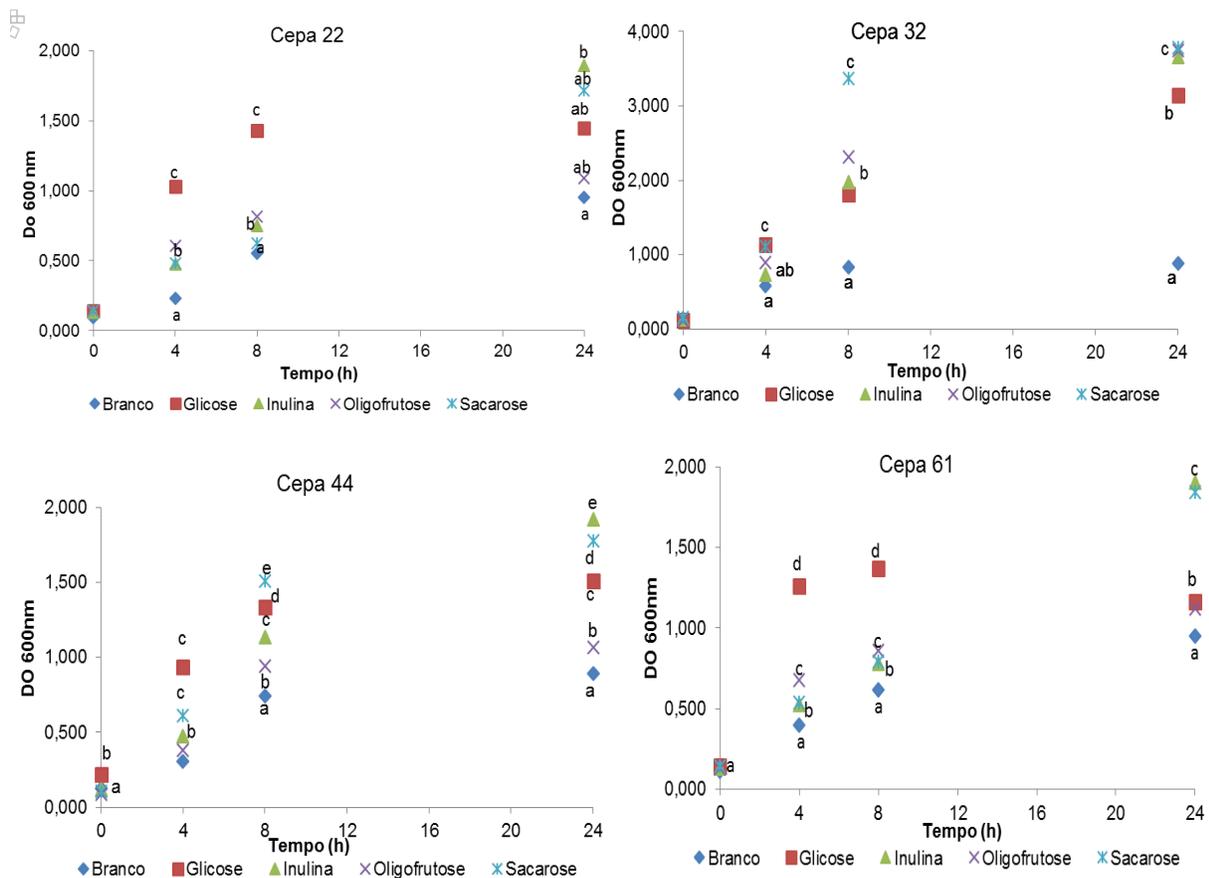
Portanto, se faz necessário verificar se as cepas probióticas possuem resistência a antibióticos considerados de resistência adquirida ao gênero em estudo, antes de considerá-las seguras para serem inoculadas em alimentos. Neste contexto, as cepas de *Lactobacillus plantarum* 22, 61, 102, 103, 104, 131, 175, 192, 195, 213, 215, 221, 224, 284, 285, 323, 341, 343, 364, 411, 433 e 442 e a cepa de *Lactobacillus pentosus* 32 foram susceptíveis aos antibióticos ampicilina, eritromicina e tetraciclina e podem ser consideradas seguras, quanto à transferência de resistência microbiana, para possível inoculação em produtos alimentícios.

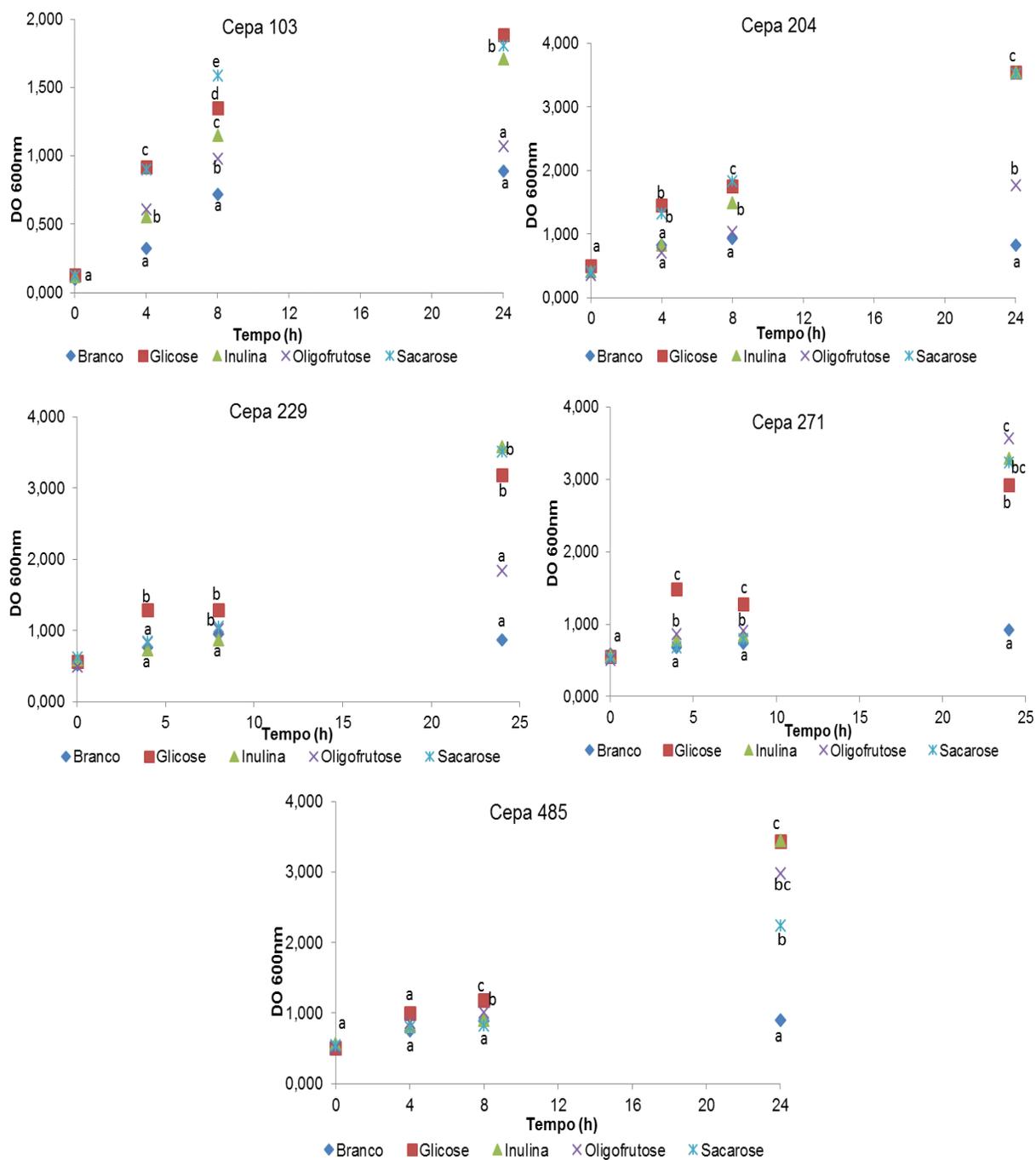
### 3.3.3 Capacidade de crescimento na presença de carboidratos prebióticos

Entre as 54 cepas, 51 (94,44%) utilizaram a inulina como fonte de carboidrato. Dessas, oito cepas de *L. plantarum* (cepas 22, 44, 61, 103, 204, 229, 271 e 485) e uma de *L. pentosus* (cepa 32) foram capazes de utilizar a inulina com crescimento celular semelhante ao obtido nos carboidratos controle (glicose e sacarose) após 24 horas de incubação ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 2).

Entre as cepas avaliadas, 20,37% apresentaram capacidade semelhante de crescer em presença de dois ou mais carboidratos disponíveis no meio ( $P \leq 0,05$ ).

Figura 2. Evolução da densidade óptica (600nm) de cepas de *L. plantarum* (cepas 22, 44, 61, 103, 204, 229, 271 e 485) e de *L. pentosus* (cepa 32) crescidas em caldo MRS adicionado de diferentes fontes de carboidrato





Letras diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos em cada período de tempo analisado ( $P < 0,05$ ).

Adebola et al., (2014) citam que apesar dos relatos de ação prebiótica da inulina e de sua utilização generalizada como prebiótico em formulações comerciais, *L.*

*acidophilus* NCTC 1723, *L. delbrueckii* *bulgaricus* NCTC 12712, *L. acidophilus* NCFM e *L. reuteri* NCIMB 11951 não conseguiram utilizar a inulina como fonte de carbono em comparação com o meio que não possuía carboidrato em sua formulação. Esses autores também observaram que o uso da inulina não trouxe proteção significativa das BALs frente ao pH ácido e que, se houver concentrações elevadas de alguns prebióticos, pode ocorrer diminuição no pH intestinal para valores abaixo de 5,0, com efeito negativo sobre o crescimento de bactérias probióticas.

O meio de cultura contendo oligofrutose foi o meio no qual os *Lactobacillus* testados apresentaram a menor capacidade de crescimento quando comparado aos demais carboidratos. Apenas 3,7% das cepas (cepas 32 e 271) mostraram-se capazes de metabolizar esse carboidrato e utiliza-lo como única fonte de carboidrato adicionada (Figura 2).

De acordo com Gibson et al., (1994), os *Lactobacillus* apresentam desenvolvimento superior em um meio contendo inulina e sacarose do que em meios contendo oligofrutose.

De acordo com trabalho realizado por Kaplan et al., (2000) de 15 cepas de *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. lactis* e *L. casei*, 12 foram capazes de crescer na presença do prebiótico oligofrutose. Todas as cepas de *L. acidophilus*, *L. plantarum* MR240, *L. plantarum* MR191, *L. casei* e *L. casei* 685 foram capazes de fermentar oligofrutose, enquanto que cepas de *L. lactis* e *L. bulgaricus* não foram capazes de utilizar a oligofrutose como fonte de energia. No presente estudo, 35 cepas (64,81%) de *Lactobacillus* foram capazes de utilizar os carboidratos presentes nos meios de cultura como substrato, inclusive quando cultivadas em meio contendo oligofrutose, comparado ao meio sem adição de carboidratos (branco).

No que se refere à sacarose, 27,77% das cepas de *Lactobacillus* apresentaram maior valor de DO quando este carboidrato foi utilizado como substrato após 24 h. Isso pode ser devido ao número de vias de metabolização funcional da sacarose apresentado pelas cepas de *Lactobacillus*, que podem compreender a hidrólise extracelular, o transporte e fosforilação da sacarose pelo sistema fosfotransferase Pts1BCA, e hidrólise da sacarose pela frutofuranosidase Saca/SCRB. Quando as cepas possuem mais de uma dessas três vias, a sacarose passa a ser o substrato de

escolha para a fermentação pelos *Lactobacillus* (REID et al., 2005; GANZLE et al., 2012).

Do total de cepas, 51,85% apresentaram melhor crescimento, com maiores valores de DO ( $P \leq 0,05$ ), quando a glicose estava disponível no meio como o único carboidrato adicionado. A glicose, por ser um monossacarídeo, pode ser mais facilmente metabolizada pelas BALs e utilizada como substrato para seu crescimento (CARABIN, et al., 1999).

O mesmo foi relatado por Huebner et al. (2007), que avaliaram a capacidade de *Bifidobacterium adolescentis* 15706, *B. breve* 15698, *B. infantis* 17930, *B. longum* 15708, *B. bifidum* NCI, *L. acidophilus* 33200, *L. plantarum* 4008; *L. acidophilus* NCFM; *L. paracasei* 1195; *L. plantarum* 12006, *Escherichia coli* ECOR 1, *E. coli* ECOR 2, e *E. coli* ECOR 22 em crescer na presença de prebióticos comerciais, incluindo inulina, oligofrutose e glicose, como o carboidrato controle. Para as 50 combinações desses prebióticos juntamente com as cepas citadas, 37 se desenvolveram melhor quando o carboidrato utilizado como fonte de energia foi a glicose.

No presente trabalho foi observado desenvolvimento significativo de 44,44% das cepas (22, 53, 61, 104, 175, 192, 201, 214, 215, 221, 224, 225, 228, 229, 271, 283, 323, 341, 342, 343, 433, 485, 501 e 502) nas primeiras 8 h de incubação quando a glicose foi utilizada como fonte de energia. Esses resultados indicam que essas cepas apresentam rápida multiplicação nas primeiras horas de incubação, sendo esta uma característica tecnológica desejável, pois apresentam rápida multiplicação desde as primeiras horas de incubação (OLIVEIRA et al., 2002).

Após o período de 8 h, o crescimento na presença de glicose foi desacelerado pela estabilização dos valores de densidade óptica do meio, o que poderia indicar estado de fase estacionária de crescimento pela população bacteriana (CUMMINGS et al., 2011).

Resultado semelhante foi descrito por Hernandez-Hernandez (2012) que testaram seis cepas de *Lactobacillus*, entre elas *L. casei* (ATCC11578) e *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (ATCC4797) e verificaram crescimento elevado quando o meio de cultura foi enriquecido com glicose e lactulose. No entanto, após 20 h de incubação, as taxas de crescimento de todos os *Lactobacillus* diminuíram rapidamente quando foram

cultivados com estes açúcares, enquanto o crescimento foi mantido na presença do prebiótico galactooligossacarídeo. Essa resposta pode ser atribuída ao comprimento da cadeia carbônica dos hidratos de carbono, que quanto maior, são mais lentamente fermentados, levando mais tempo para atingir a mesma densidade óptica (CUMMINGS et al., 2011). Da mesma forma, essa condição poderia explicar o maior crescimento das cepas observado na presença de glicose nas primeiras horas de incubação.

Considerando a capacidade de fermentação de carboidratos prebióticos, as cepas de *L. plantarum* 22, 44, 61, 103, 204, 229, 271 e 485 e a cepa de *L. pentosus* 32, apresentam potencial probiótico, podendo inclusive ser indicadas para uso em formulações simbióticas, adicionadas de inulina ou oligofrutose como prebióticos.

### **3.3.4 Capacidade de autoagregação e coagregação**

A capacidade de autoagregação das 54 cepas avaliadas variou de 0 a 16,11% após 4h de incubação, sendo que 11 cepas apresentaram capacidade de autoagregação superior a 10% nesse período de tempo. Após 24 horas, 10 cepas mostraram capacidade de autoagregação acima de 20%.

Na Tabela 6 apresenta os resultados de autoagregação em 4 h, 8 h e 24 h para as 54 cepas de *L. plantarum* e *L. pentosus* e de coagregação com bactérias patogênicas das cepas de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111), *Escherichia coli* (O157: NM 02-1840) e *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) após 4 horas de incubação.

A cepa 282 apresentou a maior capacidade de autoagregação (16,11%) após 4h e a cepa 44, a maior capacidade de autoagregação após 24h (64,61%).

Tabela 6. Porcentagem de autoagregação de 54 cepas de *L. plantarum* e *L. pentosus* após 4, 8 e 24 horas de incubação e coagregação com cepas de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111), *Escherichia coli* (O157: NM 02-1840) e *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) após 4 horas de incubação a 37 °C (média  $\pm$  desvio padrão).

Cepas	Autoagregação			Coagregação		
	4 h (%)	8 h (%)	24 h (%)	<i>L. monocytogenes</i> (%)	<i>E. coli</i> O 157 (%)	<i>Salmonella</i> (%)
44	11,45 $\pm$ 0,03	19,24 $\pm$ 0,05	64,61 $\pm$ 0,02	9,21 $\pm$ 0,06	8,13 $\pm$ 0,06	10,15 $\pm$ 0,01
341	9,54 $\pm$ 0,06	18,34 $\pm$ 0,01	45,94 $\pm$ 0,03	7,27 $\pm$ 0,07	8,03 $\pm$ 0,01	8,31 $\pm$ 0,01
123	9,50 $\pm$ 0,04	20,22 $\pm$ 0,03	44,56 $\pm$ 0,01	8,79 $\pm$ 0,02	9,74 $\pm$ 0,05	4,17 $\pm$ 0,02
131	7,84 $\pm$ 0,06	17,61 $\pm$ 0,01	37,51 $\pm$ 0,05	7,70 $\pm$ 0,06	7,26 $\pm$ 0,02	4,17 $\pm$ 0,01
342	7,73 $\pm$ 0,06	15,92 $\pm$ 0,02	36,96 $\pm$ 0,02	8,35 $\pm$ 0,01	4,83 $\pm$ 0,02	5,26 $\pm$ 0,08
53	8,47 $\pm$ 0,02	14,06 $\pm$ 0,06	32,39 $\pm$ 0,02	7,14 $\pm$ 0,06	5,51 $\pm$ 0,05	4,33 $\pm$ 0,05
192	6,12 $\pm$ 0,04	12,13 $\pm$ 0,05	29,85 $\pm$ 0,01	10,57 $\pm$ 0,03	9,12 $\pm$ 0,01	6,36 $\pm$ 0,04
283	12,45 $\pm$ 0,02	27 $\pm$ 0,01	24,59 $\pm$ 0,01	9,28 $\pm$ 0,07	9,44 $\pm$ 0,02	3,44 $\pm$ 0,03
343	11,45 $\pm$ 0,01	13,18 $\pm$ 0,04	22,88 $\pm$ 0,03	3,75 $\pm$ 0,02	5,56 $\pm$ 0,01	5,43 $\pm$ 0,01
282	16,11 $\pm$ 0,01	21,61 $\pm$ 0,08	20,43 $\pm$ 0,09	15,21 $\pm$ 0,03	15,40 $\pm$ 0,03	6,19 $\pm$ 0,03
323	7,39 $\pm$ 0,06	9,88 $\pm$ 0,06	18,04 $\pm$ 0,02	5,85 $\pm$ 0,08	5,44 $\pm$ 0,06	7,54 $\pm$ 0,06
284	12,76 $\pm$ 0,01	16,95 $\pm$ 0,01	15,64 $\pm$ 0,02	13,40 $\pm$ 0,01	12,74 $\pm$ 0,03	13,56 $\pm$ 0,08
22	3,15 $\pm$ 0,06	8,51 $\pm$ 0,01	14,92 $\pm$ 0,06	4,18 $\pm$ 0,01	4,66 $\pm$ 0,01	5,02 $\pm$ 0,01
102	6,05 $\pm$ 0,02	9,38 $\pm$ 0,01	14,57 $\pm$ 0,02	5,90 $\pm$ 0,01	2,76 $\pm$ 0,03	1,71 $\pm$ 0,02
213	6,20 $\pm$ 0,04	9,56 $\pm$ 0,01	14,24 $\pm$ 0,04	3,42 $\pm$ 0,06	3,98 $\pm$ 0,01	4,16 $\pm$ 0,01
221	8,75 $\pm$ 0,01	11,64 $\pm$ 0,01	13,92 $\pm$ 0,02	10,07 $\pm$ 0,01	2,18 $\pm$ 0,06	4,05 $\pm$ 0,02
103	5,38 $\pm$ 0,03	8,04 $\pm$ 0,04	13,92 $\pm$ 0,06	3,81 $\pm$ 0,01	4,53 $\pm$ 0,06	2,59 $\pm$ 0,01
227	14,24 $\pm$ 0,03	17,01 $\pm$ 0,03	13,44 $\pm$ 0,08	11,91 $\pm$ 0,01	12,66 $\pm$ 0,01	4,24 $\pm$ 0,06
293	5,13 $\pm$ 0,08	7,98 $\pm$ 0,05	13,44 $\pm$ 0,06	3,77 $\pm$ 0,01	2,71 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,03
61	5,39 $\pm$ 0,01	7,98 $\pm$ 0,04	13,37 $\pm$ 0,02	5,44 $\pm$ 0,08	3,99 $\pm$ 0,06	3,18 $\pm$ 0,09
364	6,14 $\pm$ 0,07	10,52 $\pm$ 0,03	13,02 $\pm$ 0,03	4,82 $\pm$ 0,06	2,48 $\pm$ 0,01	6,78 $\pm$ 0,01
175	3,99 $\pm$ 0,04	2,25 $\pm$ 0,04	12,48 $\pm$ 0,04	6,4 $\pm$ 0,08	4,17 $\pm$ 0,03	3,75 $\pm$ 0,06
228	14,75 $\pm$ 0,03	16,95 $\pm$ 0,05	12,04 $\pm$ 0,06	11,79 $\pm$ 0,01	12,01 $\pm$ 0,01	9,3 $\pm$ 0,01
285	12,53 $\pm$ 0,01	19,63 $\pm$ 0,02	11,96 $\pm$ 0,03	14,63 $\pm$ 0,03	15,5 $\pm$ 0,03	8,56 $\pm$ 0,01
231	14,42 $\pm$ 0,04	17,61 $\pm$ 0,05	11,85 $\pm$ 0,03	12,86 $\pm$ 0,05	11,23 $\pm$ 0,02	4,67 $\pm$ 0,09
212	3,32 $\pm$ 0,01	7 $\pm$ ,4 $\pm$ 0,05	11,55 $\pm$ 0,01	14,64 $\pm$ 0,06	4,89 $\pm$ 0,09	3,5 $\pm$ 0,04
214	5,82 $\pm$ 0,01	6,21 $\pm$ 0,02	11,53 $\pm$ 0,01	7,4 $\pm$ 0,05	5,11 $\pm$ 0,01	4,48 $\pm$ 0,01
433	7,85 $\pm$ 0,02	3,55 $\pm$ 0,06	11,30 $\pm$ 0,08	6,64 $\pm$ 0,09	5,68 $\pm$ 0,01	7,58 $\pm$ 0,01
251	14,09 $\pm$ 0,05	17,51 $\pm$ 0,01	10,97 $\pm$ 0,06	12,41 $\pm$ 0,08	13,72 $\pm$ 0,09	9,12 $\pm$ 0,01
215	3,86 $\pm$ 0,04	6,45 $\pm$ 0,04	9,85 $\pm$ 0,03	2,16 $\pm$ 0,01	0,94 $\pm$ 0,01	4,28 $\pm$ 0,01
194	0,00 $\pm$ 0,04	5,67 $\pm$ 0,04	9,71 $\pm$ 0,01	12,31 $\pm$ 0,08	11,47 $\pm$ 0,03	6,00 $\pm$ 0,01
411	6,95 $\pm$ 0,06	11,1 $\pm$ 0,09	9,60 $\pm$ 0,03	3,87 $\pm$ 0,08	8,45 $\pm$ 0,01	7,52 $\pm$ 0,02
225	4,71 $\pm$ 0,04	9,25 $\pm$ 0,01	9,57 $\pm$ 0,01	8,58 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,02	4,36 $\pm$ 0,03

202	3,98±0,05	6,5±0,01	9,55±0,01	0,91±0,01	3,15±0,02	3,67±0,01
502	3,75±0,06	8,79±0,02	9,17±0,06	7,03±0,01	5,86±0,08	3,97±0,02
104	3,03±0,03	5,05±0,02	9,05±0,03	7,74±0,05	1,97±0,01	0,48±0,02
501	3,62±0,07	7,13±0,01	8,80±0,02	5,42±0,07	6,94±0,03	0,51±0,02
211	5,69±0,05	6,5±0,04	8,59±0,01	1,96±0,02	5,83±0,04	1,67±0,01
201	3,35±0,05	6,99±0,03	8,57±0,05	3,02±0,08	3,17±0,01	5,91±0,01
442	5,57±0,01	8,4±0,03	8,52±0,01	5,26±0,03	5,35±0,04	1,59±0,03
271	14,74±0,02	19±0,06	8,48±0,03	12,51±0,06	13,28±0,07	1,58±0,01
224	3,43±0,08	6,21±0,06	8,35±0,04	3,71±0,01	3,81±0,03	5,72±0,03
204	3,07±0,05	5,17±0,01	8,34±0,02	3,13±0,01	1,89±0,07	5,4±0,01
504	5,08±0,05	7,8±0,05	8,30±0,05	7,48±0,07	5,48±0,06	2,33±0,03
505	5,52±0,04	8,27±0,08	8,22±0,01	6,52±0,01	4,01±0,01	3,57±0,08
229	5,24±0,04	9,72±0,02	8,14±0,02	1,06±0,02	4,31±0,02	4,94±0,01
503	4,21±0,03	6,56±0,01	7,47±0,04	7,1±0,01	5,06±0,05	2,33±0,06
485	1,07±0,03	4,82±0,08	7,31±0,03	4,56±0,03	3,71±0,09	0,56±0,04
385	4,05±0,01	4,62±0,08	6,75±0,02	2,73±0,02	4,35±0,01	7,35±0,05
35	5,46±0,03	7,48±0,07	6,57±0,01	3,01±0,01	4,13±0,02	2,81±0,01
226	11,31±0,02	15,22±0,03	6,55±0,01	9,9±0,01	9,87±0,01	8,52±0,06
484	2,00±0,04	5,89±0,01	4,89±0,01	5,27±0,02	1,58±0,01	13,55±0,09
32	5,12±0,02	7,86±0,02	4,88±0,01	5,28±0,02	6,05±0,09	5,3±0,01
195	2,76±0,0	2,96±0,03	3,17±0,09	1,82±0,03	2,48±0,03	2,53±0,01

Capacidade de autoagregação em cepas de *Lactobacillus* superior às encontradas no presente trabalho foram relatadas por Sabir et al. (2010), que avaliaram cinco espécies de *Lactobacillus spp* isolados de kefir turco artesanal, *L. acidophilus* Z1L, *L. helveticus* Z5L, *L. casei* Z7L, *L. cremoris* Z11S e *L. lactis* Z3S. Esses autores verificaram que *L. acidophilus* Z1L apresentou a maior capacidade de autoagregação, com 88% após 4h de incubação em solução salina tamponada e a cepa *L. helveticus* Z5L com 35% como sendo o menor valor de autoagregação. Por sua vez, Saran et al. (2012), também trabalhando com cepas de *L. acidophilus* (NCDC 13 e NCDC 291), observaram capacidade de autoagregação de apenas 19% após 3 h de incubação, utilizando meio mais rico nutricionalmente (caldo MRS) do que solução salina.

As variações para a capacidade de autoagregação em diferentes linhagens de bactérias probióticas pode ser explicada por habilidades específicas da espécie ou também indivíduo específicas (SCHREZENMEIR e VRESE, 2001). A grande variedade de espécies, as características de formação e o habitat devem ser considerados para

comprovar determinadas características probióticas em uma cepa ou em espécies (WINE et al., 2009), sendo possível que as diferenças na capacidade de adesão de *Lactobacillus* possam ser resultantes dessa especificidade (MACKENZIE et al., 2010).

Um dos fatores que influenciam a adesão de BALs ao epitélio intestinal é a capacidade de autoagregação, mas a adesão é difícil de mensurar, pois é um processo afetado por múltiplas variáveis, tanto por proteínas da superfície celular das bactérias, quanto pelo crescimento e condições ambientais (disponibilidade de nutrientes, pH, etc) (DEL RE et al., 1998). A adesão é dependente não só da interação entre autoagregação e propriedades físico-químicas (hidrofobicidade), como também de mecanismos mais específicos envolvendo composição química intestinal e das superfícies das células microbianas (COLLADO et al., 2008; MARTINS et al., 2009; MEIRA et al., 2012).

Para a capacidade de coagregação, verificou-se maior média das cepas lácticas com *L. monocytogenes* (7,02%) em relação aos demais patógenos testados, *E. coli* (O157: NM 02-1840) (6,23%) e *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) (4,92%).

Do total de cepas avaliadas, 12 cepas de *L. plantarum* (282, 212, 285, 284, 231, 271, 251, 194, 227, 228, 192, 221) mostraram capacidade de coagregação com *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) acima de 10%, sendo a cepa 282 a que apresentou a maior capacidade, com 15,2%. Por sua vez, a cepa de *L. plantarum* 202 apresentou a menor capacidade de coagregação com esse patógeno (0,91%).

Das 54 cepas de *Lactobacillus* testadas, sete cepas (285, 282, 251, 271, 284, 194 e 231) apresentaram capacidade de coagregação com *Escherichia coli* (O157: NM 02-1840) maior que 10%, sendo as cepas 285 e 282 as que apresentaram os maiores valores (15,51 e 15,4%, respectivamente).

A capacidade coagregativa com *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) foi superior a 10% em apenas duas cepas, 284 e 44, com 13,55% e 10,15%, respectivamente.

Dias et al. (2013) também observaram maior capacidade coagregativa de *L. plantarum* isolados de linguiças suínas com *Listeria monocytogenes* (34,7%) em relação à *E. coli* (27,71%) e à *Salmonella* Typhi (25,07%).

Em trabalho realizado por Peres et al. (2014), com cepas de *L. paraplantarum* e *L. plantarum* isolados de olivas em Portugal, as capacidades de coagregação com *Listeria monocytogenes* variaram de 10 e 20%, os quais são valores próximos aos encontrados no presente estudo.

Nikolic et al. (2010) avaliaram a capacidade de coagregação de *L. casei*, *L. paracasei* e *L. delbrueckii* com *Listeria innocua* (ATCC 33090), *E. coli* (ATCC 25922) e *S. Typhimurium* (TR25) e verificaram maior coagregação com *E. coli* ATCC2 5922 de até 60% e menor com a *S. Typhimurium* (TR25) com 30%. No presente estudo também foi verificada maior capacidade de coagregação com *E. coli* em relação à *Salmonella*. Ekmekçi et al. (2009) relataram capacidades de coagregação de cepas de *Lactobacillus* com *E. coli* ATCC 11229 que variaram de 14% (*L. crispatus* O3) a 71% (*L. acidophilus* S1) após 4 h, enquanto Sabir et al. (2010) observaram capacidades que variaram de 18% (*L. casei* Z7L) a 80% (*L. acidophilus* Z1L). Esses resultados corroboram a afirmação de que a capacidade de auto e de coagregação das bactérias lácticas é uma característica individual de cada cepa, não estando completamente relacionada ao gênero ou à espécie.

### 3.3.5 Avaliação da capacidade de resistência ao baixo pH

Das 54 cepas de *L. plantarum* e *L. pentosus*, 51 mostraram resistência ao pH 3,0 durante 4 h de exposição *in vitro*. Essa resistência foi definida como o aumento, manutenção ou redução na contagem celular em até 1,0 log UFC/ mL em relação ao meio controle (pH 5,0). Dessas, 13 cepas (24,07%) apresentaram capacidade de multiplicação, com aumento no número de células viáveis nessas condições, demonstrando adaptação ao baixo pH (Tabela 7). Ainda no que se refere ao pH 3,0, a menor frequência de sobrevivência foi de 50% (cepa 271) e a maior de 104,97% (cepa 227), sendo que 32 cepas (59,25%) apresentaram essa proporção superior a 97%.

Esses resultados foram superiores aos encontrados por Sabir et al. (2010), que verificaram o valor de 96% como a maior frequência de sobrevivência em pH 3,5 em cepas de *L. acidophilus* Z1L, *L. helveticus* Z5L, *L. casei* Z7L, *Pediococcus dextrinicus* ZN1P, *P. acidilactici* ZN10P, *P. pentosaceus* ZN13P, *Lactococcus cremoris* Z11S e *L.*

*lactis* Z3S. Nur e Aslim (2010) também encontraram menores frequências de sobrevivências (76% a 92%) em cepas de *Pediococcus* isoladas de salames na Turquia. Cepas de *L. plantarum* e *L. pentosus* testadas por Klingberg et al. (2005) também mostraram resistência ao pH 2,5.

A tolerância a valores baixos de pH e sais biliares é vital para que as bactérias possam ser consideradas probióticas (HAVENAAR et al., 1992; RAMIREZ-CHAVARIN et al., 2013). As cepas candidatas à probióticos devem apresentar sobrevivência *in vitro* em condições de pH 3,0, por um período de incubação de 3 h, uma vez que simula o tempo de permanência do alimento no estômago, para provar sua resistência à passagem estomacal (LIONG et al., 2005; SAHADEVA et al., 2011).

No que se refere ao pH 4, a maior frequência de sobrevivência foi de 111,71% para a cepa 229 e a menor, de 75,27% para a cepa 35. Ramirez-Chavarin et al. (2013) também relataram alta proporção em *L. plantarum* após 4h de incubação em pH 4,0.

Tabela 7. Avaliação da capacidade de resistência de cepas de *L. plantarum* e *L. pentosus* aos valores de pH 3,0 e 4,0 (média  $\pm$  desvio padrão), após 4 h de incubação.

Cepas	pH 3,0			pH 4,0		
	log UFC/ mL *	Alteração da contagem celular log **	Frequência de Sobrevivência %	log UFC/ mL *	Alteração da contagem celular log **	Frequência de Sobrevivência %
227	7,61 $\pm$ 0,23	0,36	104,97	7,22 $\pm$ 0,06	-0,03	99,59
364	7,45 $\pm$ 0,05	0,32	104,49	6,86 $\pm$ 0,02	-0,27	96,21
385	7,3 $\pm$ 0,06	0,22	103,11	7,36 $\pm$ 0,59	0,28	103,95
226	7,75 $\pm$ 0,0	0,23	103,06	7,24 $\pm$ 0,28	-0,28	96,28
201	7,41 $\pm$ 0,57	0,21	102,92	7,08 $\pm$ 0	-0,12	98,33
229	7,74 $\pm$ 0,53	0,18	102,48	8,11 $\pm$ 0,0	0,85	111,71
175	6,71 $\pm$ 0,1	0,07	101,05	6,6 $\pm$ 0,17	-0,04	99,40
225	7,04 $\pm$ 0,2	0,04	100,57	7,64 $\pm$ 0,12	0,64	109,14
224	6,68 $\pm$ 0,11	0,03	100,45	6,67 $\pm$ 0,1	0,02	100,30
102	7,01 $\pm$ 0,2	0,02	100,29	6,81 $\pm$ 0,15	-0,18	97,42
221	7,16 $\pm$ 0,23	0,02	100,28	7,33 $\pm$ 0,41	0,19	102,66
503	7,6 $\pm$ 0,04	0,01	100,13	7,55 $\pm$ 0,01	-0,04	99,47
502	7,64 $\pm$ 0,06	0,01	100,13	7,58 $\pm$ 0,03	-0,05	99,34

505	7,58±0,02	-0,02	99,74	7,37±0,01	-0,23	96,97
343	6,95±0,06	-0,04	99,43	6,86±0,07	-0,13	98,14
504	6,89±0,15	-0,04	99,42	7,13±0,18	0,20	102,89
228	7,35±0,10	-0,06	99,19	7,58±0,17	0,17	102,29
433	7,83±0,45	-0,08	98,99	7,91±0,28	0	100,00
442	7,04±0,1	-0,08	98,88	6,82±0,12	-0,3	95,79
323	7,33±0,07	-0,09	98,79	7,18±0,0	-0,24	96,77
212	7,74±0,01	-0,12	98,47	7,84±0,01	-0,02	99,75
211	7,36±0,05	-0,13	98,26	7,35±0,07	-0,14	98,13
22	7,64±0,27	-0,14	98,20	7,63±0,24	-0,15	98,07
231	7,35±0,16	-0,14	98,13	7,49±0,02	0	100,00
411	6,99±0,02	-0,15	98,59	6,3±0,0	-0,79	88,86
342	7,57±0,05	-0,15	98,06	7,55±0,04	-0,17	97,80
194	7,22±0,02	-0,15	97,96	7,18±0,04	-0,19	97,42
103	7,04±0,0	-0,15	97,91	7,29±0,08	0,10	101,39
32	7,53±0,17	-0,17	97,79	7,58±0,04	-0,12	98,44
484	6,57±0,05	-0,19	97,19	6,72±0,03	-0,04	99,41
293	7,99±0,0	-0,21	97,44	8,15±0,0	-0,05	99,39
284	7,5±0,02	-0,22	97,15	7,53±0,0	-0,19	97,54
131	7,02±0,03	-0,26	96,43	7,08±0,05	-0,20	97,25
485	7,49±0,02	-0,27	96,52	7,57±0,05	-0,19	97,55
192	7,12±0,12	-0,27	96,35	7,2±0,04	-0,19	97,43
61	6,71±0,01	-0,27	96,27	7,48±0,67	0,40	107,32
285	7,19±0,02	-0,33	95,61	7,4±0,02	-0,12	98,40
204	7,19±0,02	-0,35	95,36	7,23±0,04	-0,31	95,89
341	7,48±0,0	-0,36	95,41	7,67±0,0	-0,17	97,83
213	6,96±0,04	-0,37	94,95	7,13±0,02	-0,20	97,27
251	6,67±0,18	-0,37	94,74	6,82±0,06	-0,22	96,88
282	7,11±0,05	-0,41	94,55	7,31±0,32	-0,21	97,21
214	6,92±0,06	-0,43	94,15	7,13±0,07	-0,22	97,01
123	7,32±0,03	-0,44	94,33	7,57±0,02	-0,19	97,55
283	6,89±0,07	-0,44	94,00	6,99±0,07	-0,34	95,36
104	7,2±0,04	-0,46	93,99	7,36±0,05	-0,30	96,08
501	7,34±0,06	-0,49	93,74	7,32±0,0	-0,51	93,49

195	6,75±0,13	-0,54	92,59	7,06±0,16	-0,23	96,84
202	6,5±0,34	-0,54	92,33	6,54±0,1	-0,50	92,90
215	7,41±0,04	-0,66	91,82	7,47±0,03	-0,60	92,57
44	5,78±0,0	-0,97	85,63	6,79±0,0	0,04	100,59
35	5,54±0,0	-1,82	75,27	5,54±0,0	-1,82	75,27
53	5±0,0	-2,08	70,62	7,23±0,12	0,15	102,12
271	7,73±0,12	-3,86	50,06	7,44±0,07	-0,29	96,25

\* Contagem celular após 4h de incubação a 37 °C, \*\* redução da contagem celular em relação à contagem celular em pH 5,0

### 3.3.6 Avaliação da capacidade de resistência aos sais biliares

Segundo Papamanoli et al. (2003), as cepas de *Lactobacillus* são consideradas tolerantes aos sais biliares quando uma população de 6-7 log UFC/mL é reduzida para  $\geq 5$  log UFC/mL após quatro horas de exposição.

Considerando a redução de até 1 log UFC/mL na contagem celular em presença de sais biliares como tolerância a esses sais, das 54 cepas de *Lactobacillus* testadas, 37 cepas (68,51%) mostraram tolerância à concentração de 0,3% de sais biliares.

Desse total, três cepas (5,55%) frequência de sobrevivência acima de 100% (cepas 271, 212 e 505) em meio contendo 0,3% de sais biliares, indicando que são capazes de crescer nessa concentração de sais biliares, com aumento de até 0,66 log UFC/mL em comparação ao meio controle (0% de sais biliares). A menor frequência de sobrevivência foi apresentada pela cepa 35 com 66,49%, com redução de 2,52 log UFC/mL em comparação ao meio controle (0% de sais biliares).

Com relação à concentração de 0,15% de sais biliares, 22 cepas apresentaram frequência de sobrevivência superior a 97% e somente 2 cepas apresentaram redução superior a 1,0 log UFC/mL em comparação ao meio controle (0% de sais biliares). Seis cepas (504, 505, 231, 175, 213 e 484) foram capazes de aumentar a contagem celular nessa concentração de sais biliares, com frequência de sobrevivência de até 105,31%.

Algumas espécies de *Lactobacillus* são capazes de sobreviver a altas concentrações de sais biliares e podem, portanto, adaptar-se às condições do trato gastrointestinal e tornar-se ativa trazendo benefícios ao hospedeiro. A concentração de

0,3% de sais biliares é considerada padrão para averiguar a resistência de bactérias candidatas a probióticos, pois essa é a concentração normalmente encontrada durante o processo digestivo humano (RAMIREZ-CHAVARIN et al., 2013).

Nur e Aslim (2010) verificaram menor frequência de sobrevivência na presença de sais biliares, com valores de 17 a 78% na concentração de 0,15% de sais biliares e de 6 a 65% na concentração de 0,3% de sais biliares em BAL isoladas de salame turco. Por sua vez, Muñoz-Quezada et al. (2013) verificaram frequência de sobrevivência em 0,3% de sais biliares variando de 57,8 a 114,7% para cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, comerciais e isoladas de ambiente intestinal humano.

Klingberg et al. (2005) verificaram que de 27 cepas de BALs isoladas de embutidos fermentados, 86% foram capazes de sobreviver ao tratamento biliar a 0,3% de sais biliares após 4 horas de incubação e apenas a cepa de *L. plantarum* conseguiu crescer nessas condições.

Tabela 8. Resistência de cepas de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus pentosus* às concentrações de 0,15% e 0,3% de sais biliares (média ± desvio padrão), após 4 h de incubação

Cepas	0,15%			0,30%		
	log UFC/mL*	Alteração da contagem celular log**	Frequência de sobrevivência %	log UFC/mL*	Alteração da contagem celular log**	Frequência de sobrevivência %
271	6,43±0,04	-0,31	95,40	7,4±0,31	0,66	109,79
212	7,06±0,02	-0,74	90,51	7,89±0,06	0,09	101,15
505	7,58±0	0,38	105,28	7,24±0,05	0,04	100,56
231	7,65±0,10	0,37	105,08	7,21±0,09	-0,07	99,04
213	7±0,0	0,11	101,60	6,8±0,14	-0,09	98,69
484	6,62±0,11	0,03	100,46	6,5±0,14	-0,09	98,63
433	7,74±0,18	-0,30	96,27	7,81±0,26	-0,23	97,14
215	7,24±0,01	-0,18	97,57	7,18±0,04	-0,24	96,77
204	6,93±0,08	-0,18	97,47	6,86±0,01	-0,25	96,48
293	8,28±0	-0,08	99,04	8,04±0,0	-0,26	96,17
504	6,94±0,01	0,35	105,31	6,3±0,13	-0,29	95,60
251	7,02±0,02	-0,18	97,50	6,86±0,01	-0,34	95,28
343	6,91±0,05	-0,29	95,97	6,79±0,01	-0,41	94,31
342	7,68±0,05	-0,19	97,59	7,42±0,01	-0,45	94,28
485	7,6±0,0	-0,08	98,96	7,23±0,03	-0,45	94,14
221	7,2±0,11	-0,35	95,36	7,09±0,07	-0,46	93,91
195	7,23±0,32	-0,08	98,91	6,86±0,01	-0,45	93,84
411	7,13±0,06	-0,21	97,14	6,83±0,10	-0,51	93,05
225	7,11±0,09	-0,22	97,00	6,82±0,06	-0,51	93,04
503	7,79±0,11	-0,14	98,23	7,35±0,09	-0,58	92,69
201	7,45±0,02	-0,06	99,20	6,96±0,1	-0,55	92,68
192	6,94±0,08	-0,46	93,78	6,84±0,03	-0,56	92,43
211	7,24±0,05	-0,55	92,94	7,13±0,06	-0,66	91,53
22	7,28±0,23	-0,33	95,66	6,95±0,07	-0,66	91,33
175	7,41±0,57	0,19	102,63	6,58±0,04	-0,64	91,14
501	7,82±0,07	-0,03	99,62	7,15±0,04	-0,7	91,08
442	7,74±0,0	-0,37	95,44	7,38±0,0	-0,73	91,00
502	7,65±0,0	-0,23	97,08	7,17±0,08	-0,71	90,99
104	7,57±0,21	-0,58	92,88	7,40±0,1	-0,75	90,80
341	7,07±0,1	-0,30	95,93	6,67±0,04	-0,70	90,50
214	7,97±0,0	-0,18	97,79	7,37±0,06	-0,78	90,43
385	7,36±0,29	-0,45	94,24	7,04±0,0	-0,77	90,14
227	7,4±0,23	-0,43	94,51	7,05±0,09	-0,78	90,04
224	6,82±0,07	-0,14	97,99	6,25±0,06	-0,71	89,80

61	7,07±0,1	-0,69	91,11	6,91±0,06	-0,85	89,05
284	7,74±0,05	-0,37	95,44	7,13±0,06	-0,98	87,92
131	7,08±0,13	-0,49	93,53	6,65±0,17	-0,92	87,85
282	7,35±0,66	-0,26	96,58	6,59±0,58	-1,02	86,60
229	7,35±0,01	-1,18	86,17	7,36±0,05	-1,17	86,28
283	7,63±0,0	-0,26	96,70	6,73±0,01	-1,16	85,30
228	7,06±0,08	-0,85	89,25	6,72±0,02	-1,19	84,96
44	6,74±0,05	-0,40	94,40	6,06±0,08	-1,08	84,87
323	7,28±0,19	-0,39	94,92	6,44±0,29	-1,23	83,96
123	8,20±0,0	-0,03	99,64	6,89±0,11	-1,34	83,72
103	7,13±0,18	-0,27	96,35	6,16±0,02	-1,24	83,24
53	7,16±0,02	-0,53	93,11	6,40±0,0	-1,29	83,22
194	7,74±0,0	-0,49	94,05	6,74±0,09	-1,49	81,90
364	7,0±0,1,0	-0,41	94,47	5,98±0,0	-1,43	80,70
285	7,41±0,12	-0,99	88,21	6,71±0,14	-1,69	79,88
32	6,82±0,08	-1,50	81,75	6,5±0,21	-1,72	79,08
202	6,79±0,07	-0,29	95,90	5,51±0,26	-1,57	77,82
102	6,88±0,05	-0,58	92,23	5,30±0,0	-2,16	71,05
226	7,15±0,15	-0,26	96,49	5,09±0,43	-2,32	68,69
35	7,41±0,07	-0,11	98,54	5,00±0,0	-2,52	66,49

\* Contagem celular após 4h de incubação a 37 °C, \*\* redução da contagem celular em relação à contagem celular em meio ausente de sais biliares

Após a obtenção dos resultados para cada critério de seleção de probióticos, os resultados foram sintetizados em tabela (Tabela 9) de forma a expor um panorama geral das características de cada cepa e facilitar a seleção das cepas que apresentaram o maior número de características associadas aos probióticos. Os resultados obtidos para resistência microbiana, fermentação de prebióticos, resistência ao pH 3,0 e a concentração de 0,30% de sais biliares foram expressos como positivos (+) ou negativos (-) e os resultados de agregação em porcentagem (%).

Tabela 9. Resistência microbiana, capacidade de fermentação de prebióticos (24 h), resistência aos sais biliares e ao pH 3,0 (4 h) e capacidade de agregação em cepas de *Lactobacillus* sp

Cepas	Resistência			Prebióticos (24 h)		Resistência (4 h)		Agregação % (4h)	
	Amp	Erm	Tet	Inu.	Oligo.	bile 0,3%	pH 3,0	Autoag.	Coag.
L. pl 22	-	-	-	+	+	+	+	3,15	4,62
L. pe 32	-	-	-	+	+	-	+	5,12	5,54
L. pl 35	-	+	-	+	+	-	-	5,46	3,31
L. pl 44	-	-	+	+	+	-	+	11,45	9,16
L. pl 53	-	-	+	+	+	-	-	7,73	5,66
L. pl 61	-	-	-	+	+	+	+	5,39	4,20
L. pl 102	-	-	-	+	+	-	+	6,05	3,45
L. pl 103	-	-	-	+	-	-	+	5,38	3,64
L. pl 104	-	-	-	+	+	+	+	3,03	3,39
L. pe 123	-	-	+	+	-	-	+	9,50	7,56
L. pl 131	-	-	-	+	-	+	+	7,84	6,37
L. pl 175	-	-	-	+	+	+	+	3,99	4,77
L. pl 192	-	-	-	+	+	+	+	6,12	8,68
L. pl 194	-	+	-	+	+	-	+	0,00	9,92
L. pl 195	-	-	-	+	+	+	+	2,76	2,27
L. pe 201	-	+	+	+	+	+	+	3,35	4,03
L. pl 202	-	+	+	+	+	-	+	3,98	2,57
L. pl 204	-	-	+	+	+	+	+	3,07	3,47
L. pl 211	-	+	-	+	+	+	+	5,69	3,15
L. pl 212	-	-	+	+	-	+	+	3,32	7,67
L. pl 213	-	-	-	-	-	+	+	6,20	3,85
L. pl 214	-	-	+	-	-	+	+	5,82	5,66
L. pl 215	-	-	-	+	-	+	+	3,86	2,46
L. pl 221	-	-	-	+	+	+	+	8,75	5,43
L. pl 224	-	-	-	+	+	+	+	3,43	4,41
L. pl 225	-	-	+	+	+	+	+	4,71	4,37
L. pl 226	-	-	+	+	+	-	+	11,31	9,43
L. pl 227	-	+	+	+	+	+	+	14,24	9,60
L. pl 228	-	-	+	+	+	-	+	14,75	11,03
L. pl 229	+	-	+	+	-	-	+	5,24	3,43
L. pl 231	+	-	+	+	+	+	+	14,42	9,58
L. pl 251	-	-	+	-	-	+	+	14,09	11,75
L. pl 271	-	+	+	+	+	+	-	14,74	9,12
L. pl 282	-	-	+	+	-	-	+	16,11	12,26
L. pl 283	-	-	+	+	-	-	+	12,45	7,38
L. pl 284	-	-	-	+	-	+	+	12,76	13,23
L. pl 285	-	-	-	+	-	-	+	12,53	9,58
L. pl 293	-	+	+	+	-	+	+	5,13	2,45
L. pl 323	-	-	-	+	+	-	+	7,39	6,27
L. pl 341	-	-	-	+	+	+	+	9,54	7,87
L. pl 342	-	+	-	+	-	+	+	7,73	6,14
L. pl 343	-	-	-	+	-	+	+	11,45	4,91
L. pl 364	-	-	-	+	+	-	+	6,14	4,69
L. pl 385	-	+	-	+	+	+	+	4,05	4,81
L. pl 411	-	-	-	+	+	+	+	6,95	6,61
L. pl 433	-	-	-	+	+	+	+	7,85	6,63
L. pl 442	-	-	-	+	-	+	+	5,57	4,06
L. pl 484	-	+	-	+	-	+	+	2,00	6,80
L. pl 485	+	-	+	+	+	+	+	1,07	2,94
L. pl 501	-	+	-	+	+	+	+	3,62	4,29
L. pl 502	+	+	+	+	+	+	+	3,75	5,62
L. pl 503	-	+	+	+	+	+	+	4,21	4,83
L. pl 504	-	+	+	+	+	+	+	5,08	5,09
L. pl 505	-	+	+	+	-	+	+	5,52	4,70

L. pl: *Lactobacillus plantarum*. L. pe: *Lactobacillus pentosus*. Amp: ampicilina. Erm: eritromicina. Tet: tetraciclina. Inu: inulina. Autoag.: autoagregação. Coag.: coagregação.

### 3.4 CONCLUSÃO

A determinação da resistência microbiana fenotípica à ampicilina, eritromicina e tetraciclina não foi observada nas cepas 22, 32, 61, 102, 103, 104, 131, 175, 192, 195, 213, 215, 221, 224, 284, 285, 323, 341, 343, 364, 411, 433 e 442 indicando a susceptibilidade a esses antibióticos testados. A maior frequência de resistência fenotípica nas cepas de *Lactobacillus* foi para a tetraciclina, contudo não foi observada a presença de genes de resistência para esse antibiótico ou para ampicilina e eritromicina nas cepas avaliadas.

Das 54 cepas analisadas, 9 obtiveram o melhor desempenho na presença do carboidrato inulina quando comparadas com os carboidratos controle (glicose e sacarose), sendo identificadas como cepas 22, 32, 44, 61, 103, 204, 229, 271 e 485. As cepas 32 e 271 também demonstraram maior crescimento na presença de oligofrutose em comparação aos carboidratos controle.

As cepas 44, 341, 123, 131, 342, 53, 192, 283, 343 realizaram autoagregação maior do que 20% após 24 horas de incubação. Com relação à coagregação os melhores resultados foram encontrados quando as bactérias lácticas foram incubadas juntamente com a *L. monocytogenes*, com 12 cepas (282, 212, 285, 284, 231, 271, 251, 194, 227, 282, 192 e 221) com capacidade de coagregação maior do que 10%. Já a coagregação entre bactérias lácticas probióticas, *E. coli* e *S. typhimurium* os melhores resultados foram com sete (285, 282, 251, 271, 284, 194, 231) e duas cepas (284 e 44) respectivamente.

Das 54 cepas de *L. plantarum* e *L. pentosus*, 51 mostraram resistência ao pH 3,0 durante 4 h de exposição *in vitro*. A menor taxa de sobrevivência em relação à contagem inicial foi de 50% (cepa 271) e a maior de 104,97% (cepa 227), sendo que 32 cepas (59,25%) apresentaram taxa superior a 97%.

Com relação à resistência aos sais biliares, 37 cepas (68,51%) mostraram tolerância à concentração de 0,3% de sais biliares. Desse total, três cepas (5,55%) apresentaram aumento da contagem celular (cepas 271, 212 e 505) após 4 h em meio contendo 0,3% de sais biliares.

Partindo-se da susceptibilidade aos antibióticos e da resistência aos sais biliares e ao pH 3,0 como critérios prioritários para a seleção de probióticos cinco cepas de *Lactobacillus plantarum* 131, 192, 341, 343 e 442 foram identificadas como potenciais probióticas. Dessas, as cepas 131, 192 e 341 também apresentam alta capacidade de autoagregação, a cepa 442 apresentou alta capacidade de crescer na presença de inulina e a cepa 343 apresentou resultados satisfatórios em ambas as determinações citadas anteriormente. Dessa forma, a cepa 343 poderia ser indicada como a de maior potencial probiótico entre as cepas de *Lactobacillus* testadas.

Estudos futuros de avaliação da capacidade tecnológica das cepas, que incluem testes de sensibilidade aos sais de cura (NaCl e NO<sub>2</sub>), de acidificação e posteriormente, a avaliação da viabilidade das cepas e do impacto sensorial de sua adição nos embutidos devem ser realizados para o uso dessas cepas como *starter* em produtos cárneos fermentados probióticos.

## REFERÊNCIAS

ADEBOLA, O. O.; CORCORAN, O.; MORGAN, W. A.; Synbiotics: the impact of potential prebiotics inulin, lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of lactobacilli probiotics. **Journal of Functional Foods**. v. 10, p. 75-84, 2014.

AMINOV, R. I.; GARREGUES-JEANJEAN, N.; MACKIE, R. I.; Molecular ecology of tetracycline resistance: Development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 76, p. 23-33, 2001.

AMMOR, M.; MAYO, B.; Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. **Meat Science**. v. 76, p. 138-146, 2007.

ANJO, D. F. C.; Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**. v. 3, p. 145-154, 2004.

ARIHARA, K.; Strategies for designing novel functional meat products. **Meat Science**. v. 74, p. 219–229, 2006.

ARIHARA, K.; OHATA, M. Functional meat products. In F. TOLDRA, editor. **Handbook of meat processing**. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, p. 423-439, 2010.

BARBOSA, F. H. F.; BARBOSA, L. P. J. L.; BAMBIRRA, L. H. S.; ABURJAILE, F. F.; Probióticos-Micro-organismos a favor da vida. **Revista de biologia e ciência da terra**. v. 11, p. 11-21, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **ANVISA**. Resolução nº18 de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou Saúde alegadas em Rotulagem de Alimentos.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **ANVISA**. Nota técnica nº 1/2010, de 25 de outubro de 2010. Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **ANVISA**. Alegações de propriedade funcional aprovadas 2008. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Alimentos+Com+Alegacoes+de+Propriedades+Funcionais+e+ou+de+Saude/Alegacoes+de+propriedade+funcional+aprovadas>>. Acesso em: 21 de fev. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. **MAPA**. Instrução Normativa nº 13, de 30 de novembro de 2004. Regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal.

CAMPAGNOL, P. C. B.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N.; SANTOS, B. A.; FURTADO, A. S.; Salame elaborado com *Lactobacillus plantarum* fermentado em meio de cultura de plasma suíno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, p. 883-889, 2007.

CARABIN, I. G.; FLAMM, W. G.; Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. *Journal Regulatory Toxicology and Pharmacology*. v. 30, p. 268-282, 1999.

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

CHANG, Y.; TSAI, C.; LIN, C.; YU-CHIH WANG, Y.; WANG, I.; CHUNG, T.; Characterization of tetracycline resistance lactobacilli isolated from swine intestines at western area of Taiwan. **Anaerobe**. v. 17, p. 239-245, 2011.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K.; Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal of Dairy Technology**. v. 51, p. 123-136, 1998.

CLSI (Clinical and laboratory Standards Institute). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, twenty-first informational supplement, M-100-521. **CLSI**. v. 31, p. 1-188, 2012.

COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S.; Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **European Food Research and Technology**. v. 226, p. 1065-1073, 2007.

COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. O.; Selection of probiotic strains for human application. *International Dairy Journal*. v. 8, p. 487-490, 1998.

COMUNIAN, R. A.; DAGA E. A.; DUPRÉ, I. A.; PABA A. A.; DEVIRGILIIS, C. B.; PICCIONI, V. B.; PEROZZI, G. B.; ZONENSCHAIN, D. C.; REBECCHI, A. D.; MORELLI L. C.; ANGELA DE LORENTIIS, A. E.; GIRAFFA, G.; Susceptibility to tetracycline and erythromycin of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p. 151-156, 2010.

CORDEIRO, R. P.; DU, T.; MULVEY, M. R.; KRAUSE, D. O.; HOLLEY, R. A.; Susceptibility of meat starter cultures to antimicrobials used in food animals in Canada. **Journal of Food Protection**. v. 73, p. 1-8, 2010.

CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T.; ENGLYST, H. N.; Prebiotic digestion and fermentation. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 73, p. 415-420, 2011.

DALLASANTA, O. R.; ALVARÉZ, D. C.; SANTA, H. S. D.; ZANETTE, C. M.; FREITAS, R. J. S.; MACEDO, R. E. F.; TERRA, N. N.; Microbiota from sausages obtained through spontaneous fermentation produced in the south of Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, p. 653-660, 2012.

DAVIS, C. D.; MILNER, J. A.; Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 20, p. 743–752, 2009.

DE VUYST, L.; FALONY, G.; LEROY, F. Probiotics in fermented sausages. **Meat Science**. v. 80, p. 75-78, 2008.

DECKER, E. A.; PARK, Y.; Healthier meat products as functional foods. **Meat Science**. v. 86, p. 49-55, 2010.

DEL RE, B.; Busetto, A.; VIGNOLLA, G.; SGORBATTI, B.; PALENZONA, D. L.; Autoaggregation and adhesion ability in a *Bifidobacterium suis* strain. **Microbiology**. v. 27, p. 307-310, 1998.

DENIPOTE, F. G.; TRINDADE, E. B. S. M.; BURINI, R. C. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. **Arquivos de Gastroenterologia**. v. 47, p. 93-98, 2010.

DEPEINT, F.; TZORTZIS, G.; VULEVIC, J.; l'ANSON, K.; GIBSON, G. R.; Prebiotic evaluation of a novel galactooligosaccharide mixture produced by the enzymatic activity of *Bifidobacterium bifidum* NCIMB 41171, in healthy humans: a randomized, double-blind, crossover, placebo-controlled intervention study<sup>1 3</sup>. **American Society for Nutrition**. v.87, p.785–791, 2008.

DEVIRGILIIS, C.; ZINNO, P.; PEROZZI, G.; Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species. **Frontiers in Microbiology**. v. 4, p. 1-13, 2013.

DIAS, F. S.; DUARTE W. F.; SCHWAN, R. F.; Evaluation of adhesive properties of presumptive probiotic *lactobacillus plantarum* strains. **Bioscience Journal**. v. 29, p. 1678-1686, 2013.

ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. **EFSA Journal**. v. 13, p. 1-114, 2015.

ERKKILÄ, S.; SUIHKO, M. L.; EEROLA, S.; PETÄJÄ, E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Dry sausage fermented by *Lactobacillus rhamnosus* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, p. 205-210, 2001.

EKMEKCI, H.; ASLIM B.; OZTURK, S.; Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with *Escherichia coli*. **Microbiology and Immunology**. v. 53, p. 59-65, 2009.

FILHO, R. B.; OLIVEIRA, C. P.; GOMES, Q. O.; Elaboração de hambúrguer bovino adicionado de inulina como ingrediente funcional prebiótico e substituto de gordura. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v. 7, p. 33-37, 2012.

---

FRANCK, A.; Technological functionality of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**. v. 87, p. 287-291, 2002.

GALLINA, D. A.; SILVA E ALVES, A. T.; TRENTOA F. K. S.; CARUSIA, J.; Caracterização de leites fermentados com e sem adição de probióticos e prebióticos e avaliação da viabilidade de bactérias lácticas e probióticas durante a vida-de-prateleira. **Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, p. 239-244, 2011.

GÄNZLE, M. G.; FOLLADOR, R.; Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: a review. **Food and Nutritional Science**. v. 3, p. 1-15, 2012.

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

GIBSON, G.; ROBERFROID M. B.; Dietary modulation of the human colonie microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of nutrition**. v. 125, p. 1401-1412, 1994.

GOH, Y. J.; KLAENHAMMER T. R.; Functional roles of aggregation-promoting-like factor in stress tolerance and adherence of *lactobacillus acidophilus* NCFM. **Applied and environmental microbiology**, v: 76, p. 5005–5012, 2010.

GONÇALVES, S. M. L. Identificação e caracterização de bactérias do ácido láctico isoladas de um produto cárneo fermentado tradicional e do ambiente fabril. 2009. 80 p. **Dissertação**. Dissertação de mestrado (Mestrado em Segurança Alimentar). Universidade Técnica de Lisboa, 2009.

GOURBEYRE, P.; DENERY, S.; BODINIER, M.; Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 89, p. 685- 695, 2011.

HAVENAAR, R.; BRINK, B. T.; HUIS, J. H.; Selection of strains for probiotic use. **Probiotics**. p. 209-224, 1992.

HERNANDEZ-HERNANDEZ, O. A.; MUTHAIYAN A. B.; F.J. MORENO F. J. C.; MONTILLA A. C.; SANZ M. L. A.; RICKE, S. C.; Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. **Food Microbiology**. v. 30, p. 355-361, 2012.

HO, N.; PRASAD, V.; Probiotics, prebiotics, synbiotics and naturally fermented foods: why more may be more. **Annals of Gastroenterology**, v: 26, p. 1-2, 2013.

HORN, N.; WEGMANN, U.; DERTLI, E.; MULHOLLAND, F.; COLLINS, S. R. A.; WALDRON, K. W.; BONGAERTS, R. J.; MAYER, M. J.; NARBAD , A.; Spontaneous mutation reveals influence of exopolysaccharide on lactobacillus johnsonii surface characteristics. **Plos one**. v. 8, p. 1-10, 2013.

HUEBNER, J.; WEHLING, R. L.; HUTKINS R. W.; Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*. v. 17, p. 770-775; 2007.

HUMMEL, A. S.; HERTEL, C.; HOLZAPFEL, W. H.; FRANZ, C. M. A. P.; Antibiotic Resistances of Starter and Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria. **Applied and environmental microbiology**. v.73, p. 730–739, 2007.

INDRIO, F.; RIEZZO, G.; RAIMONDI, F.; BISCEGLIA, M.; CAVALLO, L.; FRANCAVILLA, R.; Effects of probiotic and prebiotic on gastrointestinal motility in newborns. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 60, p. 27-31, 2009.

JAIN, M.; GUPTA, K.; JAIN, P.; Significance of Probiotics and Prebiotics in Health and Nutrition. **Malaya Journal of Biosciences**. v. 3, p.181-195, 2014.

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

JUSTO, T. H.; TUSSOLINI, L.; MACEDO, R. E. F.; WOLUPECK, H. L.; DALLA SANTA, H. S., DALLA SANTA, O. R.; Resistência de *lactobacillus* sp. isolados de salames artesanais produzidos na região sul do brasil a antibióticos. **Veterinária e Zootecnia**. v. 20, p. 285-295, 2013.

KAPLAN, H.; HUTKINS, R. W.; Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**. v.66, p. 2682-2684, 2000.

KHAN, M.I.; ARSHAD, M. S.; ANJUM, F. M.; SAMEEN, A.; ANEEQ-UR-REHMAN, GILL, W. T. Meat as a functional food with special reference to probiotic sausages. **Food Research International**. v. 44, p. 3125-3133, 2011.

KIM, Y.; WHANG, J. Y.; KWANG YOUN WHANG, K. Y.; SEJONG OH, S.; KIM, S. H.; Characterization of the cholesterol-reducing activity in a cell-free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v. 72, p. 1483-1490, 2008.

KLARE, I.; KONSTABEL, C.; WERNER, G.; HUYS, G.; VANESSA VANKERCKHOVEN V.; KAHLMETER, G.; HILDEBRANDT, B.; LLER-BERTLING,S.; WITTE, W.; GOOSSENS W.; Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 900–912, 2007.

KLINGBERG, T. D.; AXELSSON, L.; NATERSTAD, K.; ELSSER, D.; BUDDE, B. B. Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 419-431, 2005.

KOLIDA, S.; TUOHY K.; GIBSON, G. R.; Prebiotic effects of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**. v. 87, p. 193-197, 2002.

KOMOTSU, T. R.; BURITI F. C. A.; SAAD S. M.; Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008.

LEROY, F.; VERLUYTEN, J.; VUYST, L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 270-285, 2006.

LIONG, M. T.; SHAH, N. P.; Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. **Journal of Dairy Science**. v. 88, p. 55–66, 2005.

LIU, C.; ZHANG, Z.; DONG, K.; YUAN, J.; GUO, X. Antibiotic resistance of probiotic strains of latic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. **Biomedical and Environmental Science**. v. 22, p. 401-412, 2009.

LÜCKE, F. K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**. v. 56, p. 105-115, 2000.

LUKIC, J.; STRAHINIC, I.; JOVCIC, B.; FILIPIC, B.; TOPISIROVIC, L.; KOJIC M.; BEGOVIC, J.; Different roles for lactococcal aggregation factor and mucin binding protein in adhesion to gastrointestinal mucosa. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 7993-8000, 2012.

MACEDO, R. E. F.; PFLANZER, S. B. J.; TERRA, N. N.; FREITAS, R. J. S.; Desenvolvimento de embutido fermentado por *Lactobacillus* probióticos: características de qualidade. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**. v. 28, p. 509-519, 2008.

MACKENZIE, D. A.; JEFFERS, F.; PARKER, M. L.; VIBERT-VALLET, A.; BONGAERTS, R. J.; ROOS, S.; WALTER, J.; JUGE, N.; Strain-specific diversity of mucin-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri*. **Journal Microbiology**. v. 156, p. 3368-3378, 2010.

MAIA, M. C. A.; GALVÃO, A. P. G. L. K.; MODESTA, R. C. D.; JÚNIOR, N. P.; Avaliação sensorial de sorvetes à base de xilitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 28, p. 146-151, 2008.

MANZONI, M. S. J.; CAVALLINI, D. C. U.; ROSSI, E. A.; Efeitos do consumo de probióticos nos lipídeos. **Alimentos e Nutrição**. v. 19, p. 351-360, 2008.

MARAGKOUDAKIS, P. A.; MOUNTZOURIS, K. C.; PSYRRAS, D.; CREMONESE, S.; FISCHER, J.; CANTOR, M. D.; TSAKALIDOU, E. Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 130, p. 219-226, 2009.

MARTEAU, P.; MINEKUS, M.; HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, J.H. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. **Journal Dairy Science**. v. 80, p. 1031-1037, 1997.

MARTINS, F. S.; BARBOSA, F. H. F.; PENNA, F. J.; ROSA, C. A.; R. M. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R.; Estudo do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes *in vitro*. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v. 5, p. 1-15, 2005.

MARTINS, F. S.; SILVA, A. A.; VIEIRA, A. T.; BARBOSA, F. H. F.; ARANTES, R. M. E.; TEIXEIRA, M. M.; NICOLI, J. R.; Comparative study of *Bifidobacterium animalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces boulardii* probiotic properties. **Archives of Microbiology**. v. 191, p. 623-630, 2009.

MATHUR, S.; SINGH, R.; Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria a review. **International Journal of Food Microbiology**. v.105, p. 281– 295, 2005

MAYRHOFER, S.; HOEK, A. H. A. M. V.; MAIR, C.; HUYS, G.; HAARTS, H. J. M.; KNEIFEL, W.; DOMIG, K. J.; Antibiotic susceptibility of members of the *Lactobacillus acidophilus* group using broth microdilution and molecular identification of their resistance determinants. **International Journal of Food Microbiology**. v. 144, p. 81-87, 2010.

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

MILK POINT 2013. Mercado global de probióticos crescerá 6,8% anualmente até 2018. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/giro-lacteo/mercado-global-de-probioticos-crescera-68-anualmente-ate-2018-82177n.aspx>. Acesso em: 20 de maio de 2015.

MOREIRA, N. M.; SOLA, M. C.; FEISTEL, J. C.; OLIVEIRA, J. J.; FREITAS, F. A.; Os mecanismos de resistência bacteriana da *Salmonella* sp. frente à utilização de antibióticos. **Enciclopédia biosfera**. v. 9, p. 1131-1153, 2013.

MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G.; Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 42, p. 465-470, 2005.

MUÑOZ-QUEZADA, S.; CHENOLL, E.; VIEITES, J. M.; GENOVE´S, S.; MALDONADO, J.; BERMUDEZ-BRITO, M.; GOMEZ-LLORENTE, C.; MATENCIO, E.; BERNAL, M. J.; ROMERO, F.; SUAREZ, A.; RAMON, D.; GIL, A.; Isolation, identification and characterisation of three novel probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036) from the faeces of exclusively breast-fed infants. **British Journal of Nutrition**. v. 109, p. 51-62, 2013.

MUTHUKUMARASAMY, P.; HOLLEY, R. A. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry fermented sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria. **Food Microbiology**. v. 24, p. 82-88, 2007.

NAGPAL, R.; KUMAR, A.; KUMAR, M.; BEHARE, P.; JAIN, S.; YADAV, H.; Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. **FEMS Microbiology Letters**. v. 334, p.1-15, 2012

NIKOLIC, M.; JOVCIC B.; KOJIC M.; TOPISIROVIC L.; Surface properties of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* isolates from homemade cheeses showing auto-aggregation ability. **European Food Research and Technology**. v. 231, p. 925-931, 2010.

NOGUEIRA, J. C. R.; GONÇALVES, M. C. R.; Probióticos - Revisão da Literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v. 15, p. 487-492, 2011.

NUR, Y. Z.; ASLIM, B.; Assessment of potential probiotic and starter properties of *pediococcus spp.* isolated from turkish-type fermented sausages (Suçuk). **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 20, p. 161–168, 2010.

OELSCHLAEGER, T. A.; Mechanisms of probiotic actions – A review. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 300, p. 57–62, 2010.

OLIVEIRA, M. N.; KÁTIA SIVIERI, K.; JOÃO HENRIQUE ALARCON ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I.; Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 38, p. 1-21, 2002.

OLSEN, J.E.; CHRISTENSEN, H.; AARESTRUP, F. M.; Diversity and evolution of blaZ from *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 57, p. 450-460, 2006.

OUOBA, L. I. I.; VICKI LEI, V.; JENSEN, L. B.; Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. **International Journal of Food Microbiology**. v. 121, p. 217–224, 2008.

PAN, X.; CHEN, F.; WU, T.; TANG, H.; ZHAO, Z.; The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. **Food Control**. v. 20, p. 598-602, 2009.

PAOLILLO, R.; CARRATELLI, C. R.; SORRENTINO, S.; MAZZOLA, N.; RIZZO, A.; Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* on human colon cancer cells. **International Immunopharmacology**. v. 9, p.1265–1271, 2009.

PAPAMANOLI, E.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; KOTZEKIDOU, P. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. **Meat Science**, v. 65, p. 859-867, 2003.

PENNACHIA, C.; VAUGHAN, E. E.; VILLANI, F. Potential probiotic *Lactobacillus* strains from fermented sausages: Further investigations on their probiotic properties. **Meat Science**. v. 73, p. 90–101, 2006.

PERES, C. M.; ALVES, M.; HERNANDEZ-MENDONZA, A.; MOREIRA, L.; SILVA, S.; BRONZE, M. R.; VILAS-BOAS, L.; PERES, C.; MALCATA, F. X.; Novel isolates of *Lactobacilli* from fermented Portuguese olive as potential probiotics. **Food Science and Technology**. v. 59, p. 234-246, 2014.

POZZA, M. S. S.; MIGLIORANZA, L. H. S.; GARCIA, J. E.; POZZA, P. C.; MERGUIZO, R.; Utilização de prebióticos por *Lactobacillus spp* e resistência antimicrobiana. **Higiene Alimentar**. v. 25, p. 99-103, 2011.

PRADO, F. C.; PARADA, J.; PANDEY A.; SOCCOL, C. R.; Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**. v. 41 p. 111–123, 2008.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A. M.; REIS, A. D. F. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Ciência & Saúde**. v. 4, p. 66-74, 2011.

RAJAGOPAL, N. The North American probiotics market. **Natural Products Insider**. v. 17, p. 51, 2012.

RAMIREZ-CHAVARIN, M.L.; WACHER, C.; ESLAVA-CAMPOS, C. A.; PEREZ-CHABELA, M. L. Probiotic potential of thermotolerant lactic acid bacteria strains isolated from cooked meat products. **International Food Research Journal**. v. 20, p. 991-1000, 2013.

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

REBUCCI, R.; SANGALLI, L.; FAVA, M.; BERSANI, C.; CANTONI, C.; BALDI, A. Evaluation of functional aspects in *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. **Journal of Food Quality**. v. 30, p. 187-201, 2007.

REID, S. J.; ABRATT, V. R. Sucrose utilization in bacteria: genetic organization and regulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 67, p. 312-321, 2005.

REIFF, C.; KELLY, D.; Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 300, p. 25–33, 2010.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**. v. 27, p. 1-11, 2010.

ROBERTS, M. C.; Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS Microbiology Letters**. v. 245, p. 195-203, 2005.

ROSANDER, A.; CONNOLLY, E.; ROSS S. Removal of antibiotic resistance gene-carrying plasmids from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and characterization of the resulting daughter strain, *L. reuteri* DSM 17938. **Applied and environmental microbiology**. v. 74, p. 6032–6040, 2008.

RUIZ-MOYANO, S.; MARTÍN, A.; BENITO, M. J.; NEVADO, F. P.; CÓRDOBA, M. G.; Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. **Meat Science**. v. 80 p. 715–721, 2008.

RUIZ-MOYANO, S.; MARTÍN, A.; BENITO, M. J.; NEVADO, F. P.; CASQUETE, R.; Safety and functional aspects of pre-selected lactobacilli for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages. **Meat Science**. v. 83, p. 460-467, 2009.

SAAD, S. M. I.; Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 1-16, 2006.

SABIR, F.; BEYATLI, Y.; COKMUS, C.; ONAL-DARILMAZ, D.; Assessment of potential probiotic properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. strains isolated from kefir. **Journal of Food Science**. v. 75, p. 568-573, 2010.

SAHADEVA, R. P. K.; LEONG, S. F.; CHUA, K. H.; TAN, C. H.; CHAN, H. Y.; TONG, E. V.; WONG, S. Y. W.; CHAN, H. K.; Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. **International Food Research Journal**. v. 18, p.1515-1522, 2011.

SAMANTA, A. K.; JAYAPAL, N.; SENANI, S.; KOLTE, A.P. SRIDHAR, M.; Prebiotic inulin: Useful dietary adjuncts to manipulate the livestock gut microflora. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44, p. 1-4, 2013.

SARAN, S.; BISHT, M. S.; K. SINGH, K.; TEOTIA, U. V. S.; Comparing adhesion attributes of two isolates of *Lactobacillus acidophilus* for assessment of prebiotics, honey and inulin. **International Journal of Scientific and Research Publications**. v. 2, p. 1-7, 2012.

SCHLEE, M.; HARDER, J.; KÖTEN, B.; STANGE, E. F.; WEHKAMP J.; FELLERMANN, K.; Probiotic lactobacilli and VSL3 induce enterocyte b-defensin 2. **Clinical and Experimental Immunology**. v. 151, p. 528-535, 2008.

SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M.; Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 73, p. 361-364, 2001.

SOUZA, F. S.; COCCO, R. R.; SARNI, R. O. S.; MALLOZI, M. C.; DIRCEU SOLÉ, D.; Prebióticos, probióticos e simbióticos na prevenção e tratamento das doenças alérgicas. **Revista Paulista de Pediatria**. v. 28, p. 86-97, 2010.

STEFE, C. A.; ALVES, M. A. R.; RIBEIRO, R. L.; Probiótico, prebióticos e simbióticos. **Saúde e Ambiente**. v. 3, p. 16-33, 2008.

TAVARES, W.; Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 33, p. 281-301, 2000.

THIRABUNYANON, M.; BOONPRASOM, P.; NIAMSUP, P.; Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. **Journal Biotechnology Letters**. v. 31, p. 571–576, 2009.

TOLDRA, F.; REIG, M.; Innovations for healthier processed meats. **Trends in Food Science & Technology**. v.22, p. 517-522, 2011.

TYÖPPÖNEN, S.; PETÄJÄ, E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. **International Journal of Food Microbiology**. v. 83, p. 233-244, 2003.

URNAU, D.; CIROLINI, A.; TERRA, N. N.; CAVALHEIRO, C. P.; MILANI, L. I. G.; FRIES, L. L. M.; Isolamento, identificação e caracterização quanto à resistência ao pH ácido e presença de sais biliares de cepas probióticas de leites fermentados comerciais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Torres**. v. 67, p. 5-10, 2012.

VARAVALLO, M. A.; THOMÉ, J. N.; TESHIMA, E.; Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. **Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 29, p. 83-104, 2008.

VILLANI, F.; MAURIELLO, G.; PEPE, O.; BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D.; CASABURI, A. Technological and probiotic characteristics of *Lactobacillus* and coagulase negative *Staphylococcus* strains as starter for fermented sausage manufacture. **Italian Journal of Animal Science**. v. 4, p. 498, 2005.

ZHANG, W.; XIAO, S.; SAMARAWEEERA, H.; LEE, E. J.; AHN, D. U.; Improving functional value of meat products. **Meat Science**. v. 86, p. 15-31, 2010.

ZETTLER, F. R.; ZETTLER, E. W.; SCHMITT, V. M.; JAHNS, M. T.; ARMÍDIO, C. A. G.; FRITSCHER, C. C.; Estudo fenotípico e genotípico da resistência aos macrolídeos de *Streptococcus pneumoniae* isolados em hospitais de Porto Alegre - RS. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 31, p. 312-317, 2005.

ZHOU, J. S.; PILLIDGE, C. J.; GOPAL, P. K.; GILL, H.S.; Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 98, 211-217, 2005.

ZOUMPOPOULOU, G.; BENOIT FOLIGNE, B.; CHRISTODOULOU K.; GRANGETTE, C.; POT B.; TSAKALIDOU, E. *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. **International Journal of Food Microbiology**. v. 121, p. 18–26, 2008.

WINE, E.; GAREAU, M. G.; JOHNSON-HENRY, K.; SHERMAN, P. M.; Strain specific probiotics (*Lactobacillus helveticus*) inhibition of *Campylobacter jejuni* invasion of

human intestinal epithelial cells. Federation of European Microbiological Societies. v. 300, p. 146-172, 2009.

WOLUPECK, H. L.; Identificação molecular e avaliação do potencial probiótico de bactérias ácido lácticas nativas isoladas de embutidos fermentados. (**Dissertação de mestrado**). São José dos Pinhais, PR: Pontifícia Universidade Católica do Paraná; 2013.