

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

HANNA LETHYCIA WOLUPECK

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE
BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS NATIVAS ISOLADAS DE EMBUTIDOS FERMENTADOS**

*Molecular identification and evaluation of probiotic potential of indigenous lactic acid
bacteria isolated from fermented sausages*

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2013

HANNA LETHYCIA WOLUPECK

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE
BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS NATIVAS ISOLADAS DE EMBUTIDOS FERMENTADOS**

*Molecular identification and evaluation of probiotic potential of indigenous lactic acid
bacteria isolated from fermented sausages*

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^a. Dr^a. Renata Ernlund
Freitas de Macedo

Co-orientador: Prof. Dr. Humberto Maciel
França Madeira

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2013

TERMO DE APROVAÇÃO
(Responsabilidade da Secretaria do PPGCA)

(Entregue pela secretaria)

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	viii
FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....	ix
RESUMO GERAL.....	x
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2	
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Classificação científica de bactérias ácido lácticas.....	3
2.2 Alimentos funcionais e probióticos.....	4
2.3. Critérios para seleção de bactérias probióticas.....	6
2.3.1. Características tecnológicas dos probióticos para aplicação em produtos cárneos.....	7
2.3.1.1. Produção de ácido láctico.....	7
2.3.1.2. Resistência aos sais de cura.....	8
2.3.1.3. Produção de bacteriocinas.....	8
2.3.1.3.1. Classificação e mecanismo de ação das bacteriocinas.....	9
2.3.2. Características fisiológicas de culturas lácticas probióticas para aplicação em produtos cárneos.....	10
2.3.2.1. Capacidade de resistência ao pH ácido e aos sais biliares.....	10
2.3.3 Resistência antimicrobiana.....	11

2.4. Métodos de identificação molecular de bactérias probióticas.....	13
2.4.1 PCR em tempo real.....	14
2.4.2 Multiplex PCR.....	14
2.4.3 DNA Polimórfico Amplificado Arbitrariamente.....	15
2.4.4 Análise do Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição	15

CAPÍTULO 3

3. Identificação molecular e avaliação do potencial probiótico de bactérias ácido lácticas nativas isoladas de embutidos fermentados.....	16
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
3.1 INTRODUÇÃO.....	18
3.2 OBJETIVOS DO ESTUDO.....	19
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.3.1 Isolamento bacteriano	20
3.3.2 Identificação das bactérias lácticas.....	21
3.3.2.1 Extração de DNA das bactérias ácido lácticas.....	21
3.3.2.2 Amplificação do gene <i>recA</i>	22
3.3.2.3 Sequenciamento dos amplicons.....	22
3.3.2.4 Análise das sequências.....	23
3.4 Resistência microbiana.....	23
3.4.1 Método de disco difusão (Kirby Bauer)	23
3.4.2 Método de Gradiente para determinação da CIM em escala.....	24
3.5 Atividade antimicrobiana por difusão por cavidade em ágar.....	25
3.6 Capacidade de crescimento na presença de carboidrato prebiótico.....	26

3.7 Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Caracterização molecular.....	27
4.2. Resistência microbiana.....	29
4.3 Atividade antimicrobiana por difusão por cavidade em ágar.....	36
4.4. Crescimento na presença de carboidrato prebiótico.....	38
5. CONCLUSÃO.....	41
CAPÍTULO 4	
6. CONCLUSÃO GERAL.....	42
7. REFERÊNCIAS.....	43

Dedico essa vitória aos meus filhos Giovanni W. A. Barbosa e Luiz Eduardo Wolupeak, que são a razão do meu viver. E ao meu marido Alessandro Araújo Barbosa, que está sempre ao meu lado me apoiando em minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas bênçãos e oportunidades, que Ele coloca em meu caminho.

Agradeço em especial a minha família pela compreensão e paciência pelas horas em que estive ausente, ocupada e um tanto estressada.

Agradeço infinitamente a minha orientadora Prof.^a Dr.^a Renata Ernlund Freitas de Macedo pela oportunidade e confiança em mim depositada.

E ao meu co-orientador Prof. Dr. Humberto Maciel França Madeira pela disponibilidade em me auxiliar.

A Prof.^a Dr.^a Cristina Sotomaior, coordenadora do Programa de PGCA, pelo apoio e gentileza em me auxiliar sempre que precisei e a Caroline Nocera, secretária do mestrado, que esteve sempre disposta a me atender e ajudar.

As minhas amigas Luciane Rossa e Lye Miague pelo apoio e conforto nas horas difíceis.

Agradeço a Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

E a todos aqueles, que me ensinaram, auxiliaram, me conduziram nesta caminhada, minha gratidão.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos. O capítulo 1 apresenta uma introdução geral do tema e os objetivos de estudo desta dissertação. O capítulo 2 trata-se de revisão de literatura. O capítulo 3 se refere ao projeto de dissertação realizado para futura publicação em periódicos científicos. O Capítulo 4 finaliza esta dissertação 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

Atualmente é praticamente inexistente a utilização de embutidos fermentados como veículos de probióticos, uma vez que as bactérias probióticas são veiculadas, em geral, em produtos lácteos. Para a aplicação em produtos cárneos, é essencial que as bactérias probióticas sobrevivam ao processo de fabricação e aos ingredientes normalmente empregados nesses produtos. Neste contexto, o uso de bactérias nativas de produtos cárneos é uma estratégia para garantir a viabilidade e a funcionalidade dos probióticos veiculados por esse tipo de alimento. Além da viabilidade no alimento, para serem consideradas probióticas, as bactérias devem apresentar características fisiológicas de resistência ao baixo pH e aos sais biliares, para possibilitar sua viabilidade durante a digestão. A capacidade de produção de compostos antimicrobianos e a capacidade de crescimento na presença de carboidratos prebióticos também são características fisiológicas importantes nas bactérias probióticas, pois simulam sua capacidade de inibição da microbiota competitiva e do uso de substratos não digeríveis pelo hospedeiro. Outro importante critério de seleção de bactérias probióticas, recentemente considerado, é a baixa capacidade de transferência de resistência antimicrobiana a outros micro-organismos. Este trabalho teve como objetivo identificar taxonomicamente e avaliar características probióticas de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. isoladas de embutidos fermentados. Foram testadas 54 cepas nativas de *Lactobacillus* sp. isolados de produtos fermentados comercializados na região Sul do país provenientes de 16 municípios dos estados de Santa Catarina e Paraná. A identificação das cepas foi realizada mediante técnica de Multiplex PCR com primers específicos. A resistência microbiana foi testada pelos métodos de disco difusão e de gradiente para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) utilizando-se fitas de Etest®. Os antibióticos testados foram ampicilina, cloranfenicol; eritromicina; estreptomina, penicilina G e tetraciclina para ambas as metodologias e ainda ciprofloxacina, gentamicina, norfloxacina, vancomicina e trimetoprima somente por disco difusão. A capacidade de ação antimicrobiana relacionada a produção de metabólitos, como bacteriocinas foi testada frente à *L. monocytogenes* e *S. aureus* pela técnica de difusão por cavidade em ágar. A capacidade de crescimento na presença de carboidrato prebiótico inulina foi avaliada em comparação ao crescimento medido em DO na presença de glicose, sacarose e sem adição de açúcar (branco). Foi possível identificar genotipicamente 44 das 54 cepas como *L. plantarum* e 3 como *L. pentosus*. As maiores frequências de resistência observadas em ambas as metodologias foram para ampicilina e estreptomina. Nenhuma das cepas mostrou multirresistência aos antibióticos considerados de resistência adquirida para o gênero. Na avaliação comparativa entre as metodologias de disco difusão e Etest® verificou-se equivalência estatística pelo teste de Qui-quadrado χ^2 ($p > 0,05$) para ampicilina, cloranfenicol, eritromicina e penicilina G. Pela técnica de difusão em ágar não foi verificada a ação antimicrobiana das 54 cepas contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*. As cepas foram capazes de utilizar a inulina como substrato para o crescimento, porém em menor velocidade e com menor crescimento em relação à glicose e sacarose. Cinco das 54 cepas testadas tiveram

melhor crescimento na presença de inulina. Portanto pode-se concluir que as cepas possuem características fisiológicas para permanecerem em estudo visando a seleção de probióticos para produtos cárneos.

Palavras-chave: probióticos, produto cárneo fermentado, salame, critérios de seleção.

ABSTRACT

Currently the use of fermented sausages as vehicles for probiotic bacteria is rare since those bacteria are usually added to dairy products. The application of fermented sausages as carriers of probiotics, since dairy products are the most popular probiotic food carrier. For the application in meat products, it is essential that the probiotic bacteria survive the manufacturing process and ingredients commonly employed in such products. In this context, the use of indigenous bacteria of meat products is a strategy to ensure the viability and functionality of probiotics in this type of food. Besides its viability in the food, to be considered as probiotic, bacteria must present physiological characteristics as the resistance to the low pH and to bile salts in order to survive during the digestion process. The ability to produce antimicrobial compounds and the ability to grow in the presence of prebiotic carbohydrates are also important as physiological characteristics of probiotic bacteria. Another important criteria for the selection of probiotic bacteria, that has been recently included in the list of criteria, is the low capacity to transfer antibiotic resistance to other microorganisms. This study aimed to identify and to assess probiotic characteristics of *Lactobacillus* sp strains isolated from artisan fermented sausages. Fifty four (54) *Lactobacillus* sp. strains isolated from fermented sausages marketed in the southern region of Brasil, from 16 city of the Santa Catarina and Paraná State were assessed. The identification of the strains was performed by Multiplex PCR. Microbial resistance was tested by the disk diffusion method and minimum inhibitory concentration (MIC) using Etest® strips. The antibiotics tested were ampicillin, chloramphenicol, erythromycin, streptomycin, penicillin G and tetracycline by both methodologies and ciprofloxacin, gentamicin, norfloxacin, trimethoprim and vancomycin only by disc diffusion. The ability of antimicrobial action has been tested against *L. monocytogenes* and *S. aureus* by the agar well diffusion technique. The ability to grow in the presence of inulin was evaluated in DO and compared with growth in the presence of glucose, sucrose and no added sugar (white). It was possible to identify 44 of 54 strains as *L. plantarum* and 3 as *L. pentosus*. The highest frequencies of resistance in both methodologies were to ampicillin and streptomycin. None of the isolates showed acquired multidrug. Disk diffusion and MIC were statistically equivalence for the resistance evaluation of *Lactobacillus* to ampicillin, chloramphenicol, erythromycin and penicillin G. None of the strains showed antimicrobial production capacity against *L. monocytogenes* and *S. aureus* tested by the agar well diffusion technique. The strains were able to use inulin as a substrate for growth, but at a lower speed as compared to glucose and sucrose and five of them were rated best probiotic potential. We conclude that the tested strains possess physiological characteristics to remain under consideration for the selection of probiotics for meat products.

Keywords: probiotics, fermented meat product, sausage, selection criteria.

LISTA DE ABREVIATURAS

BAL	Bactérias Ácido Lácticas
BHI	Brain Heart Infusion Broth
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DO	Densidade Óptica
LSM	<i>(LAB susceptibility test medium)</i>
MRS	De Man, Rogosa and Sharpe
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RAPD	DNA Polimórfico Amplificado Arbitrariamente (<i>Random Amplified Polymorphic</i>)
RFLP	Análise do Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Procedência das amostras de embutidos fermentados dessecados e semi-dessecados nos estados do PR e SC e das cepas de BAL isoladas.....	20
Tabela 2. Comparação da frequência (%) e concordância (%) de resistência e sensibilidade de bactérias ácido lácticas isoladas de embutidos fermentados aos antibióticos testados pelos métodos de disco difusão e de gradiente para determinação da CIM em escala utilizando fitas de Etest®.....	32
Tabela 3. Distribuição dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) de seis antibióticos para cepas de <i>Lactobacillus</i> sp. isoladas de embutidos fermentados.....	35
Tabela 4. Crescimento das melhores cepas de <i>Lactobacillus</i> sp. ($DO_{600} \pm DP$) na presença de 2% de inulina entre os tempos 0 e 24 h.....	40

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Organograma da classificação científica de bactérias ácido lácticas.....	3
Figura 2. Amplificação das cepas de bactérias ácido lácticas em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.....	28
Figura 3. Amplificação das cepas de bactérias ácido lácticas em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.....	29
Figura 4. Frequência de resistência e sensibilidade microbiana das cepas de <i>Lactobacillus</i> sp. isoladas de embutidos fermentados pelo método de gradiente para determinação da CIM em escala.....	30
Figura 5. Frequência de resistência e sensibilidade microbiana das cepas de <i>Lactobacillus</i> sp. isoladas de embutidos fermentados pelo método de disco difusão (Kirby Bauer).....	31
Figura 6. Cepas de <i>Lactobacillus</i> sp. com melhor desempenho de crescimento em meio contendo inulina (prebiótico) na concentração de 2% após 24 h em relação aos açúcares controle (glicose e sacarose) e meio sem adição de carboidrato (branco).....	38

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Os produtos cárneos têm sido reconhecidos como fontes de proteínas de alto valor biológico, vitaminas e minerais. No entanto, recentemente, a reputação dos produtos cárneos tornou-se relativamente negativo para uma parcela da população devido ao seu conteúdo de gordura e à utilização de aditivos em suas formulações. Além disso, alguns estudos apontam que o consumo de carnes e derivados está supostamente envolvido com a ocorrência de doenças altamente prevalentes em países ocidentais, tais como as doenças cardiovasculares, câncer e obesidade. Portanto, muita atenção tem sido dada ao desenvolvimento de alimentos funcionais, que promovem a saúde e previnem o risco de enfermidades. Esta tendência repercutiu no setor cárneo com a inclusão de ácido linoleico conjugado, vitamina E, ácidos graxos da família ômega 3 e selênio na dieta dos animais, com vistas ao aumento da qualidade nutricional da carne e a adição de ingredientes como proteínas vegetais, fibras dietéticas, ervas, especiarias e bactérias lácticas durante o processamento de produtos cárneos para aumentar seu valor funcional para os consumidores. Bactérias ácido lácticas são adicionadas nos produtos com a função probiótica de promover benefícios à saúde do hospedeiro, devendo ser ingeridas de forma viável e em níveis adequados. Nos produtos cárneos, a inclusão de probióticos também pode contribuir para sua segurança e inocuidade por inibir o crescimento de micro-organismos indesejáveis. Embutidos cárneos fermentados como o salame são os produtos cárneos mais adequados para a incorporação de probióticos, visto que seu processo de fabricação não envolve tratamento térmico, proporcionando as condições requeridas para a sobrevivência dessas bactérias. Embora a inclusão de probióticos em produtos cárneos não seja um conceito inteiramente novo, é praticamente inexistente o comércio nacional e internacional de embutidos fermentados como veículos de probióticos. Isto se deve em parte, à adição em produtos cárneos de bactérias lácticas isoladas de fontes não cárneas, principalmente as lácteas, que por não estarem bem adaptadas ao produto

cárneo, não são capazes de manter sua viabilidade e funcionalidade no produto. Normalmente, as bactérias probióticas são sensíveis às condições adversas dos produtos cárneos fermentados, como a baixa atividade de água, a presença de aditivos conservantes e especiarias. Por isso, a pesquisa de propriedades probióticas em bactérias isoladas da microbiota nativa de produtos cárneos fermentados é uma estratégia para aumentar a chance de sobrevivência e viabilidade dos probióticos nesse tipo de produto. Além disso, esse tipo de estudo pode ser uma oportunidade para iniciar o desenvolvimento de linhagens probióticas nacionais para produtos cárneos. Diante do contexto apresentado, o objetivo do presente estudo foi identificar em nível molecular bactérias lácticas isoladas de salames obtidos por fermentação natural e avaliar o potencial probiótico dessas culturas, bem como a produção de compostos com atividade inibitória com perspectivas à sua utilização como cultura “*starter*” em produtos cárneos probióticos. Os objetivos específicos foram identificar as cepas de bactérias lácticas mediante técnica molecular de Multiplex PCR, avaliar a resistência microbiana dessas cepas mediante método qualitativo e quantitativo, e avaliar a presença de características probióticas fisiológicas das bactérias ácido lácticas isoladas de embutidos fermentados.

CAPÍTULO 2

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação científica de bactérias ácido lácticas

As bactérias lácticas (BAL) se apresentam na forma de cocos ou bacilos. Pertencem a uma larga família de bactérias Gram-positivas fermentadoras, não formadoras de esporos, catalase e oxidase negativas, anaeróbias, anaeróbias aero tolerantes ou microaerófilas, que tem como principal ou único produto, o ácido láctico proveniente do metabolismo de carboidratos (WOOD, 1995; AXELSSON, 2004). O grupo das bactérias ácido lácticas é composto por espécies dos gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (STILES & HOLZAPFEL, 1997).

Dentre os gêneros mencionados, aqueles pertencentes ao Filo Firmicutes, Classe Bacilli, Ordem Lactobacillales, são os *Lactobacillus* pertencentes à Família Lactobacillaceae; *Lactococcus* e *Streptococcus* pertencem à família Streptococcaceae e o gênero *Leuconostoc* à família Leuconostocaceae (BERGEY'S, 2002), como pode ser observado na Figura 1.

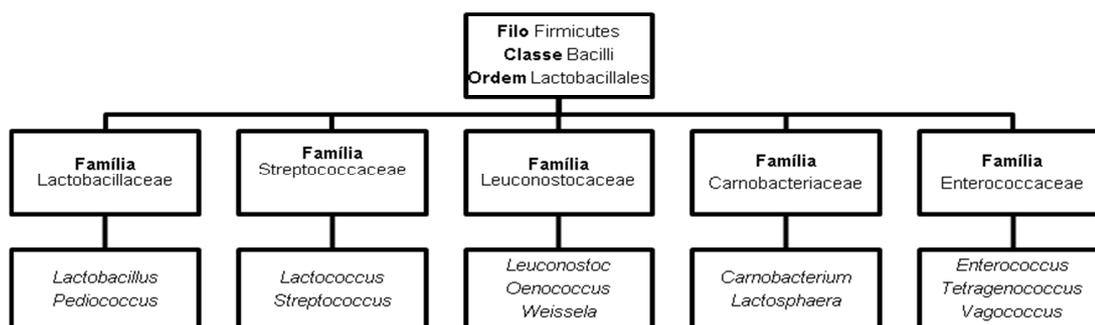


Figura 1. Organograma da classificação científica de bactérias ácido lácticas.

Todas as BAL produzem ácido láctico a partir de hexoses, obtendo a energia pela fosforilação de substratos, pois em sua maioria, exceto para o gênero *Streptococcus* não possuem a cadeia transportadora de elétrons e o ciclo de Krebs (WOOD; HOLZAPFEL, 1995). As vias pelas quais as hexoses são metabolizadas dividem as bactérias lácticas em dois grupos: homo e heterofermentativas.

As bactérias homoláticas metabolizam os carboidratos pela via Embden-Meyerhof-Parnas utilizando a glicose para gerar lactato. Os membros dos gêneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Vagococcus* são homofermentativos, assim como alguns *Lactobacillus*. Já as bactérias heteroláticas utilizam a via das pentoses ou via das hexoses monofosfato, produzindo lactato, gás carbônico (CO₂) e etanol. São considerados heterofermentadores os gêneros *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* e alguns *Lactobacillus* (AXELSSON, 2004; JAY, 2005).

2.2 Alimentos funcionais e probióticos

Os alimentos denominados funcionais geram efeitos benéficos à saúde aliados a sua função nutricional. Esse efeito se deve à adição de ingredientes ativos e ou à remoção ou substituição de substâncias indesejáveis em sua composição (ERKKILÄ et al., 2001). Os probióticos fazem parte deste grupo de alimentos benéficos à saúde. Segundo Schrezenmeier & De Vrese (2001) o termo probiótico é definido como uma preparação ou produto elaborado com micro-organismos viáveis e em número suficiente, que alteram o balanço da microbiota intestinal do hospedeiro e devido a isso trazem benefícios à saúde do mesmo. Alguns dos efeitos benéficos atribuídos às bactérias probióticas são a manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal, alívio da constipação, estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, produção de compostos antimicrobianos e, conseqüente redução de patógenos. Além disso, esses organismos diminuem os sintomas relacionados à intolerância a lactose, estimulam o sistema imune, suprimem o câncer de colón, reduzem o colesterol, diminuem o risco de doença cardiovascular, detoxificam aminas biogênicas, previnem afecções do trato urogenital, aumentam a absorção de minerais e produzem vitaminas,

entre outros (KLAENHAMMER, 2001; SAAD, 2006; LEROY et al., 2006; AMOR & MAYO, 2007; BARRONS & TASSONE, 2008; KUMAR et al., 2010).

As principais bactérias empregadas atualmente nos alimentos funcionais probióticos são do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (CHARTERIS, 1998; VINDEROLA, 2011). O gênero *Lactobacillus* é representativo das bactérias produtoras de ácido láctico, importantes para a indústria e ao contrário da maioria dos anaeróbios obrigatórios, é capaz de crescer na presença de oxigênio. Sendo isolado do trato intestinal de humanos para utilização comercial na elaboração de produtos lácteos, assim como na produção de repolho azedo e pickles (TORTORA et al., 2005). As bifidobactérias pertencem ao filo Actinobacteria, Classe Actinobacteria, Ordem Bifidobacteriales e a família Bifidobacteriaceae (BERGEY, 2002).

O uso de probióticos mostra-se promissor em produtos cárneos crus fermentados como o salame, por serem fabricados com carne crua e consumidos sem prévio aquecimento, o que não causaria a morte dos micro-organismos (ERKKILÄ et al, 2001a). No entanto, a incorporação de bactérias probióticas a produtos cárneos também representa um grande desafio tecnológico devido à conhecida sensibilidade dos micro-organismos ao sal, especiarias e demais substâncias utilizadas em sua formulação (ANDERSEN, 1998; SAMESHIMA, et al., 1998). A qualidade dos embutidos fermentados está relacionada ao processo de maturação, que lhes confere características específicas de cor, sabor, aroma e textura desenvolvidas pela interação de reações químicas e físicas associadas à microbiota fermentativa. Nos processos artesanais de fabricação, a fermentação ocorre espontaneamente por meio das bactérias nativas presentes na carne (LEROY et al., 2006). Já as culturas *starter* são definidas como preparações que contêm micro-organismos vivos capazes de desenvolver atividade metabólica desejável na carne. Estas bactérias são utilizadas para aumentar a segurança microbiológica, manter a estabilidade mediante a inibição do crescimento de micro-organismos indesejáveis e melhorar as características sensoriais dos embutidos fermentados (TYÖPPÖNEN et al., 2003).

De acordo com Guarner e Malagelada (2003), a ação probiótica de uma bactéria é específica de cada cepa e essa ação não deve ser extrapolada às demais cepas da

mesma espécie. As bactérias probióticas podem inibir a colonização intestinal por patógenos utilizando diferentes mecanismos, como produção de compostos com atividade antimicrobiana, competição por nutrientes e sítios de adesão, e alteração do metabolismo microbiano pela secreção de enzimas (FULLER, 1989; DE VRESE, 2001; TRAVERS, 2011).

Um dos fatores que influencia a funcionalidade de bactérias probióticas é a sua concentração. Em geral, culturas probióticas são adicionadas aos alimentos na concentração de 10^8 a 10^9 UFC/g ou mL (BRASIL, 2008). E as culturas *starter*, que tem a capacidade de inibir patógenos e aumentar a vida de prateleira do produto também devem estar entre 10^8 a 10^9 UFC/g ou mL (VINDEROLA, 2011). Rivera-Espinoza & Gallardo-Navarro (2008) recomendam que a concentração de células viáveis em produtos cárneos também seja de ao menos 10^8 a 10^9 UFC/g para a obtenção da funcionalidade fisiológica associada ao consumo dos alimentos probióticos.

2.3 Critérios para seleção de bactérias probióticas

Para que possam ser utilizadas como probióticas, as cepas devem ser originadas da microbiota intestinal de humanos saudáveis e satisfazer os requisitos de biossegurança quanto ao consumo por humanos (*GRAS – Generally Recognized as Safe*) (FULLER et al., 1989; PAN et al, 2009). Conforme Lee et al. (1999) os critérios biológicos compreendem resistência ao baixo pH, suco gástrico, bile e suco pancreático e também a atividade e viabilidade da cepa nas condições providas pelo intestino, resultando na capacidade de colonizar o trato intestinal humano por meio de mecanismos de aderência às células intestinais (LÜCKE, 2000; PIDCOCK et al, 2002; PAPAMANOLI et al, 2003; DE VUYST 2008; RUIZ-MOYANO et al, 2008). O conceito de segurança inclui também 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 e MAYO, 2007).

No entanto, o principal critério a ser avaliado para seleção de bactérias lácticas probióticas é a capacidade das cepas em conferir efeito benéfico ao hospedeiro,

mediante interação probiótico/hospedeiro e prevenção do risco de doenças (FAO/WHO, 2001). Esses efeitos sobre a saúde humana podem ocorrer de diferentes formas de acordo com a especificidade da cepa: sendo algumas delas pela ação antagonista contra outros micro-organismos presentes no intestino (competição por nutrientes, produção de bacteriocinas ou exclusão competitiva); pelo reforço do efeito barreira na mucosa intestinal e/ou por efeito sobre o sistema imune do hospedeiro (VUYST et al., 2008; PAN et al., 2009).

2.3.1 Características tecnológicas dos probióticos para aplicação em produtos cárneos

As culturas probióticas quando empregadas em produtos alimentícios também devem ser selecionadas com base em critérios tecnológicos de produção e com isso é desejável que essas apresentem boa multiplicação no produto a ser elaborado, promovam propriedades sensoriais adequadas ou que não alterem as características sensoriais do produto e ainda que estejam estáveis e viáveis durante o armazenamento e tempo de vida de prateleira do produto (OLIVEIRA et al., 2002).

2.3.1.1 Produção de ácido láctico

A produção de ácido láctico é uma característica importante na fabricação de embutidos fermentados, pois a acidificação além de possuir efeitos positivos quanto à segurança alimentar ainda atua sobre as características sensoriais do produto, pois propicia a coagulação das proteínas miofibrilares ocasionando um aumento na firmeza e coesividade do produto final e baixa atividade de água. A redução do pH inibe o crescimento de micro-organismos deterioradores e patogênicos, e durante a fermentação contribui para a prevenção do acúmulo de aminas biogênicas prejudiciais a saúde (AMMOR & MAYO, 2007).

2.3.1.2 Resistência aos sais de cura

Os produtos cárneos recebem a adição de cloreto de sódio (NaCl) e nitrito de sódio (NaNO₂) para a manutenção da segurança microbiológica (ARIHARA & ITOH, 2000). Sendo assim, a resistência de culturas aos sais de cura é uma condição essencial para o uso na produção de embutidos cárneos com propriedades probióticas (PAPAMANOLI et al., 2003). Conhecidamente, as BAL são sensíveis ao sal e as especiarias adicionadas em produtos fermentados. Portanto, é necessário que culturas nativas desses produtos sejam selecionadas como inóculo por já se apresentarem adaptadas a esse meio adverso e para que estejam viáveis durante todo o processo de maturação desses produtos.

2.3.1.3 Produção de bacteriocinas

As bactérias probióticas auxiliam na prevenção de doenças diminuindo a carga bacteriana por exclusão competitiva ou pela produção de substâncias com capacidade de inibição bacteriana (VERSCHUERE et al., 2000). A utilização das BAL se deve em parte à sua capacidade de produzir compostos inibidores de bactérias patogênicas, como bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, ácido láctico e reuterina, essa produzida pelo *L. reuteri* (FULLER, 1989). Estudos têm indicado que as bacteriocinas são as principais substâncias responsáveis pela atividade antimicrobiana mediada por bactérias lácticas e tem recebido ampla atenção pela indústria alimentícia devido a sua potencial aplicação na preservação de alimentos como substituto de conservantes químicos (SANTOS, 1993). Hernández (2005) as define como sendo peptídeos ou proteínas liberadas no meio extracelular, que apresentam atividade bactericida ou bacteriostática, sobretudo em bactérias gram-positivas.

Dentre os micro-organismos inibidos pela ação das bacteriocinas de BAL encontram-se importantes patógenos alimentares como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (SCHILLINGER & HOLZAPFEL, 1996). Um grande número de bacteriocinas são produzidas pela maioria das espécies de BAL envolvidas na fermentação de salame, incluindo *Enterococcus*

faecalis, *Pediococcus pentosaceus*, *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum* e *P. acidilactici* (TICHACZEK et al., 1992; FOEGEDING et al., 1992; ENAN et al., 1996; MACEDO et al., 2013). Muitas das bacteriocinas produzidas pelas BAL inibem *Listeria*, mas somente algumas poucas são efetivas contra *Bacillus*, *Clostridium* e *Staphylococcus* (HUGAS, 1998).

A primeira bacteriocina a ser isolada e aprovada para o uso em alimentos foi a nisina, a qual começou a ser aplicada para controlar a proliferação de esporos de *Clostridium botulinum* em queijos (CHUNG, 1989). Sendo a única aprovada para uso como aditivo em alimentos (HANSEN, 1994; AL-HOLY et al., 2012).

2.3.1.3.1 Classificação e mecanismo de ação das bacteriocinas

Em 1993, Klaenhammer propôs a classificação das bacteriocinas em quatro classes. No entanto, Cotter, Hill & Ross propuseram em 2005 uma nova classificação, na qual as bacteriocinas são subdivididas em duas categorias: os lantibióticos (classe I) e os não lantibióticos (classe II) e os peptídeos de alta massa molar, pertencentes à classe III passariam a ser denominadas bacteriolisinas. Sugerem ainda que a 4ª classe seja extinta, pois alguns autores como Cleveland (2001) acreditam que estes grandes complexos peptídicos são na verdade artefatos de purificação parcial. A classe I, dos lantibióticos é subdividida em tipo A e tipo B. Os lantibióticos do tipo A são alongados, catiônicos e formadores de poros. Os do tipo B são compactos, com estrutura globular, inibidores enzimáticos e com atividade imunológica (VUYST, 1994). O principal representante dessa classe é a nisina produzida por *Lactococcus* subsp. *lactis*, amplamente utilizada pela indústria de alimentos. Essa bacteriocina apresenta amplo espectro de ação sobre *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *B. cereus* (RILLA et al., 2004), e possui duplo mecanismo de ação interferindo na síntese da parede celular e promovendo a formação de poros acarretando em alteração da permeabilidade celular com efluxo de moléculas essenciais e consequente morte celular (BREUKINK et al., 1999).

A classe II é composta por pequenos peptídeos, menores que 10 kDa, termoestáveis, geralmente com estrutura anfifílica, permitindo a inserção na membrana

plasmática da célula alvo, promovendo despolarização da membrana. São subdivididos em 3 grupos: IIa, IIb e IIc de acordo com Drider et al., (2006). A subclasse IIa é composta por bacteriocinas denominadas tipo-pediocina (pediocina-like), que possuem alta especificidade contra o gênero *Listeria monocytogenes*. Seu mecanismo de ação envolve a porção C-terminal responsável pela inserção na membrana celular do micro-organismo alvo e desta forma promove a formação de poros e dissipação da força próton-motriz (KAISER & MONTVILLE, 1996). Em 1996, Ennahar e colaboradores isolaram de queijo *Munster* uma linhagem de *L. plantarum* produtora de pediocina AcH pertencente ao grupo IIa, com alta especificidade contra *L. monocytogenes* sendo que a transferência genética por conjugação entre *Pediococcus* e *Lactobacillus* spp. pode ter ocorrido. A subclasse IIb é formada por bacteriocinas heterodiméricas que referem a ação combinada de dois peptídeos distintos, se empregados individualmente apresentam atividade muito baixa (GARNEAU et al., 2002). As bacteriocinas da classe IIc apresentam uma união covalente das terminações C e N resultando em uma estrutura cíclica (KAWAI et al., 2004). Um dos principais representantes desse grupo é a reutericina 6 produzida por *L. reuteri*, esta atua alterando a permeabilidade da membrana por dois mecanismos distintos.

A terceira e última classe é composta por proteínas >30 kDa, termolábeis, com atividade e estrutura proteica complexas. Difere das demais bacteriocinas em seu mecanismo de ação, pelo qual promove lise celular através da lise da parede celular. Apresenta porção C-terminal responsável pelo reconhecimento da célula alvo e porção N-terminal responsável pela catálise da parede celular (LAI et al., 2002).

2.3.2 Características fisiológicas de culturas lácticas probióticas para aplicação em produtos cárneos

2.3.2.1 Capacidade de resistência ao baixo pH e sais biliares

Duas das propriedades fisiológicas fundamentais a uma cepa com potencial uso probiótico são a resistência à acidez e à bile, visto que as BAL precisam sobreviver a

passagem através do trato gastrintestinal (ANNUK et al., 2003). Quando ocorre a excreção do ácido clorídrico, o pH estomacal fica em torno de 0,9. No entanto, durante o processo digestivo, devido a presença dos alimentos ocorre um aumento do pH para níveis próximos de 3,0 permanecendo nesta faixa por 2 a 4 horas (TYÖPPÖNEN et al., 2003).

Tendo em vista a conhecida sensibilidade da maioria das bactérias aos baixos valores de pH, Collado & Sanz (2006) enfatizam que bactérias probióticas devem ser ingeridas juntamente com os alimentos para que esses atuem como um tampão para acidez estomacal.

A bile destrói a camada lipídica e os ácidos graxos da membrana celular dos micro-organismos exercendo importante papel no mecanismo de defesa intestinal. Sua ação inibitória é dependente da concentração de sais biliares em sua composição (CHARTERIS et al., 2000; PAPAMANOLI et al., 2003). Alguns *Lactobacillus* são capazes de resistir à bile hidrolisando-a por meio da enzima hidrolase e essa resistência também está associada a outros fatores, como o sistema de resposta ao estresse e aos elementos que envolvem a manutenção da parede celular, ao metabolismo energético, ao transporte de aminoácidos e a biossíntese de ácidos graxos (TARANTO et al., 2006).

A concentração média de sais biliares no intestino humano é de 0,3%, sendo essa a concentração crítica utilizada para a seleção de bactérias resistentes à ação da bile segundo Pennacchia et al. (2004). De acordo com Papamanoli et al., 2003 uma redução do número de células viáveis de 10^6 a 10^7 para 10^5 UFC/mL caracterizaria as bactérias como tolerantes aos sais biliares.

2.3.3 Resistência microbiana

As bactérias, em geral, têm apresentado uma relevante resistência aos antibióticos devido ao uso indiscriminado desses na terapêutica humana e como promotores de crescimento na produção animal. A resistência a um determinado antibiótico pode ser inerente à espécie bacteriana ou gênero, classificada como

intrínseca ou natural. A resistência adquirida ocorre por meio de aquisição de DNA exógeno ou por mutação de genes selvagens (EFSA, 2008). Na resistência intrínseca as bactérias transmitem os genes somente a sua prole caracterizando uma transferência vertical. Já a transferência horizontal de genes têm se tornado um problema, visto que bactérias benéficas, como por exemplo as BAL, podem transferir esses genes a bactérias potencialmente patogênicas implicando em uma restrição no uso de antibióticos com eficácia na terapêutica humana. Além disso, cepas portadoras de resistência em seus plasmídeos são consideradas impróprias para o uso em produtos probióticos tanto para humanos quanto para animais (SAARELA et al, 2000).

O contato das BAL com outras bactérias do trato gastrintestinal humano possibilita a transferência horizontal de genes por meio diversos mecanismos entre os quais, a conjugação. Essa ocorre através de elementos móveis, como transposons e plasmídeos (TEUBER, 1999; HUMMEL, 2007).

Entre as décadas de 1960 a 1980 foram descobertos diversos antibióticos através de triagens de produtos naturais microbianos, sendo a maioria destes eficazes contra bactérias gram-positivas (FERNANDES, 2006). Dentre os grupos de antibióticos relevantes para o tratamento de micro-organismos gram-positivos está a tetraciclina; macrolídeos (eritromicina); glicopeptídeos (vancomicina), β -lactâmicos (ampicilina, penicilina G); cloranfenicol; antibióticos sintéticos (trimetoprima); e fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina). Cada um destes grupos difere no mecanismo de ação de inibição bacteriana. Os β -lactâmicos atuam na enzima transpeptidase, existente unicamente em bactérias, inibindo a formação de ligação cruzada entre as cadeias de peptideoglicano e conseqüentemente a síntese correta da parede celular (WALSH, 2003). Os macrolídeos agem na subunidade 50S ribossomal inibindo a síntese proteica bacteriana. Os aminoglicosídeos e tetraciclina também inibem a síntese proteica bacteriana, mas com alvo na subunidade 30S ribossômica. Já o grupo dos glicopeptídeos age no dipeptídeo terminal D-Ala-D-Ala do peptideoglicano (CORDEIRO, 2010). Desta forma, ocorre uma complexação com as cadeias peptídicas não ligadas e bloqueio da transpeptidação, impedindo a formação da parede celular bacteriana (PACE & YANG, 2006). As fluoroquinolonas atuam na enzima DNA girase, também

conhecida como topoisomerase IV em bactérias gram-positivas apresentando seletividade mil vezes maior para enzimas bacterianas que para as enzimas correspondentes em células humanas (DRLICA, 2008).

Vários estudos têm reportado resistência a antibióticos de BAL isoladas de produtos cárneos; algumas poucas espécies envolvidas na fermentação de salames, como *L. sakei*, *L. curvatus* e *L. plantarum*. Entretanto, a maior parte dessa resistência tem sido caracterizada como intrínseca e alguns determinantes genéticos e genes de resistência têm sido identificados para cloranfenicol, eritromicina e tetraciclina. Esses estudos sugerem que a transferência horizontal de genes possa ter ocorrido (AHN et al., 1992; LIN et al., 1996; GEVERS et al., 2003).

2.4 Métodos de identificação e caracterização molecular de bactérias probióticas

A identificação bacteriana tradicional, com base em características fenotípicas não é precisa como a identificação por métodos genotípicos. A sequência do RNA ribossômico (rRNA) 16S com 1550 pb (pares de base) e é composta por regiões variáveis e conservadas. Essa região já foi determinada para um grande número de cepas e por ser uma região conservada em grande parte dos micro-organismos é comumente utilizada para identificação bacteriana (CLARRIDGE, 2004). Sondas de oligonucleotídeos complementares às regiões 16S ou 23S do rRNA têm sido utilizadas com sucesso para identificação de BAL, e por isso, são consideradas ferramentas confiáveis e rápidas para a identificação bacteriana (AMOR et al., 2007). A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi uma técnica desenvolvida por Kary Mullis em 1983 e é hoje a técnica mais utilizada para identificação molecular de micro-organismos. Essa técnica consiste na amplificação de uma região selecionada do DNA pela adição um par de oligonucleotídeos (*primers*) para que se inicie a síntese de DNA a partir das fitas simples geradas pelo aquecimento do DNA do genoma completo. São necessários cerca de 20-30 ciclos de reação, em que os produtos de cada ciclo servem como DNA - molde para a síntese subsequente (ALBERTS et al., 2010). Primers sintetizados a partir

de sequências do gene da proteína recA também têm sido utilizados para diferenciação de espécies de *Lactobacillus* com alta similaridade em seu genoma (TORRIANI et al., 2001; PENNACCHIA et al., 2006; COSTA et al., 2011; ADIMPONG et al., 2012). Diversas técnicas moleculares têm sido amplamente aplicadas para genotipagem de bactérias ácido lácticas e bífidas isoladas a partir de produtos alimentícios fermentados, bem como do trato gastrintestinal de humanos (McCARTNEY, 2002), como as descritas a seguir.

2.4.1 PCR em tempo-real

Outra técnica descrita para caracterização de bactérias probióticas é a PCR em tempo-real, que se baseia no monitoramento da amplificação do DNA alvo, por meio de fluorescência. É uma técnica que serve para quantificação de bactérias isoladas de diferentes amostras, na qual os processos de amplificação, detecção e quantificação de DNA são realizados em uma única etapa diminuindo os riscos de contaminação da amostra e otimizando os resultados (SAUNDERS, 2004; MOHANIA et al., 2008). Em 2007, Kao e colaboradores identificaram várias espécies de *Lactobacillus* em produtos probióticos utilizando essa técnica.

2.4.2 PCR Multiplex

A PCR Multiplex é uma reação de amplificação desenhada para detecção de múltiplas sequências alvo em uma mesma amostra (MOLINA e TOBO, 2004). A partir do experimento realizado por Sul et al. (2007) foi possível identificar duas espécies de *Lactobacillus* e duas de *Bifidobacterium* utilizando essa técnica. Com uma única reação se distinguiram 4 diferentes espécies de BAL, proporcionando redução do tempo de experimento e de custo comparado à reação de PCR convencional ou duplex.

2.4.3 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

A “Random Amplified Polymorphic DNA” (RAPD) ou “DNA Polimórfico Amplificado Arbitrariamente” consiste na utilização de apenas um primer que se liga a múltiplos locais ao longo de um genoma sem a necessidade de conhecimento prévio da sequência que se pretende analisar. Sendo a PCR uma reação enzimática, as concentrações de DNA molde, dos componentes da PCR e o ciclo empregado pode influenciar grandemente o resultado. Por conseguinte, a técnica de RAPD é considerada laboratório-dependente e necessita de protocolos cuidadosamente desenvolvidos para que seja reprodutível (WILLIAMS et al., 1990; SANTOS, 2003).

2.4.4 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

A “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP) ou “Análise do Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição” envolve a digestão do DNA genômico por enzimas de restrição e o polimorfismo pode ser evidenciado por hibridização desses fragmentos com sequências homólogas de DNA marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiem uma reação de luminescência (SAMBROOK et al., 1989). Giraffa e Neviani (2000) em estudo sobre a caracterização molecular de *Lactobacillus* associados a alimentos identificaram cepas de *L. pentosus*, *L. plantarum* e *L. pseudopantarum* por meio da técnica RFLP.

CAPÍTULO 3

3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS NATIVAS ISOLADAS DE EMBUTIDOS FERMENTADOS

RESUMO

Devido à busca por uma alimentação mais saudável e que reduza os riscos de doenças, o desenvolvimento de alimentos que promovam a saúde e o bem-estar tem aumentado consideravelmente. Entre esse grupo de alimentos estão os probióticos, que contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal, além de estarem relacionados a outros efeitos benéficos à saúde, como supressão do câncer de colón, redução do colesterol e prevenção de afecções do trato urogenital. Dentre os critérios para a seleção de cepas probióticas estão a capacidade de produção de compostos antimicrobianos, capacidade de crescimento na presença de carboidratos prebióticos e, mais recentemente, a baixa capacidade de transferência de resistência antimicrobiana. Este trabalho teve como objetivo a identificação e avaliação de características probióticas de cepas de *Lactobacillus* sp. isoladas de embutidos fermentados. Foram testadas 54 cepas de *Lactobacillus* sp. isolados de produtos fermentados comercializados na região Sul do País provenientes de 16 municípios dos estados de SC e PR. A identificação das cepas foi realizada mediante técnica de Multiplex PCR com primers específicos. A resistência microbiana foi testada pelos métodos de disco difusão e gradiente para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em escala utilizando-se fitas de Etest®. Os antibióticos testados foram ampicilina, cloranfenicol; eritromicina; estreptomicina, penicilina G e tetraciclina para ambas as metodologias e ainda ciprofloxacina, gentamicina, norfloxacina, vancomicina e trimetoprima somente por disco difusão. A capacidade de ação antimicrobiana foi testada frente à *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* pela técnica de difusão por cavidade em ágar. A capacidade de crescimento na presença de carboidrato prebiótico inulina foi avaliada em comparação ao crescimento medido em DO na presença de glicose, sacarose e branco (sem adição de açúcar). Foi possível identificar genotipicamente 44 das 54 cepas como *L. plantarum* e 3 como *L. pentosus*. As maiores frequências de resistência observadas para os antibióticos testados em ambas as metodologias foram para ampicilina e estreptomicina. Na avaliação comparativa entre as metodologias de disco difusão e Etest® verificou-se equivalência estatística pelo teste de Qui-quadrado χ^2 ($p > 0,05$) para ampicilina, cloranfenicol, eritromicina e penicilina G. Pela técnica de difusão em ágar não foi verificada a ação antimicrobiana das 54 cepas contra *L. monocytogenes* e *S. aureus*. As cepas foram capazes de utilizar a inulina como substrato para o crescimento e cinco delas foram classificadas com melhor potencial probiótico. Conclui-se que as cepas possuem características probióticas para serem utilizadas como inóculo, sendo necessária a continuidade dos testes para seleção e desenvolvimento de inóculo em embutidos carnes.

Palavras-chave: probióticos, produto cárneo fermentado, salame, resistência antimicrobiana.

ABSTRACT

Due to the quest for a more healthy diet and that reduce risk of disease, the development of foods that promote the health and well-being has increased considerably. Among this group of foods are the probiotics that contribute to the balance of the intestinal microbiota, and are related to other beneficial health effects, such as suppression of colon cancer, lowering cholesterol and preventing diseases of the urogenital tract. Among the criteria for the selection of probiotic strains are the ability to produce antimicrobial compounds, ability to grow in the presence of prebiotic carbohydrates and, more recently, low ability to transfer antibiotic resistance. This study aimed to identify and evaluate characteristics of probiotic strains of *Lactobacillus* sp. isolated from fermented sausages. Fifty-four strains of *Lactobacillus* sp. strains isolated from fermented products marketed in the southern region of the country, from 16 municipalities of the states of Santa Catarina and Paraná were tested. The identification of the strains was performed by Multiplex PCR. Antibiotic resistance was tested by disk diffusion method and the minimal inhibitory concentration (MIC) using Etest® tapes. The antibiotics tested were ampicillin, chloramphenicol, erythromycin, streptomycin, penicillin G and tetracycline for both methodologies and still ciprofloxacin, gentamicin, norfloxacin, trimethoprim and vancomycin only by disc diffusion. The ability of antimicrobial action has been tested against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by diffusion technique in agar per well. The ability to grow in the presence of inulin prebiotic carbohydrate was evaluated in comparison measured in terms of growth in the presence of glucose and sucrose. So, it was possible to identify genotypically 44 of 54 strains as *L. plantarum* and 3 as *L. pentosus*. The highest frequencies of resistance observed for the antibiotics tested in both methodologies were to ampicillin and streptomycin. In benchmarking methodologies between disk diffusion and Etest® statistical equivalence was found by chi-square χ^2 ($p > 0.05$) to ampicillin, chloramphenicol, erythromycin and penicillin G. For the diffusion technique in agar was not observed antimicrobial action of 54 strains against *L. monocytogenes* and *S. aureus*. The strains were able to use inulin as a substrate for growth and five of them were rated best probiotic potential. It was concluded that the probiotic strains have characteristics to be used as inoculum but was necessary to continue the test for selection and development of inoculum meat sausages.

Keywords: probiotics, fermented meat product, sausage, antimicrobial resistance.

3.1 INTRODUÇÃO

A crescente busca por uma alimentação mais saudável e que reduza os riscos de doenças têm levado pesquisadores de vários âmbitos a incessante procura ou elaboração de produtos alimentícios que proporcionem saúde e bem-estar aos consumidores, além de sua função nutricional (SGARBIERI e PACHECO, 1999; THAMER e PENNA, 2006). Vários micro-organismos têm sido utilizados como probióticos, entre eles bactérias ácido lácticas (BAL), não ácido lácticas e leveduras. Os gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e em menor escala, *Enterococcus faecium* são os mais frequentemente empregados como suplemento probiótico em alimentos, uma vez que têm sido isolados de todas as porções do trato gastrintestinal humano saudável (BIELECKA et al., 2002). A adição de micro-organismos desejáveis em produtos cárneos tem diferentes propósitos, como melhorar a segurança alimentar ocasionando a inativação de patógenos; melhora da estabilidade e promover à diversidade microbiana e efeitos benéficos a saúde (LUCKE, 2000).

A identificação das bactérias em nível de espécie é importante para que se conheçam os micro-organismos e suas características, para sua futura utilização como inóculo no desenvolvimento de produtos com propriedades probióticas.

As BAL comumente empregadas em culturas *starter* em carnes são os *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. casei*, *Pediococcus pentosaceus* e *P. acidilactici* (ERKKILÄ & PETÄJÄ, 2001; PENNACHIA et al., 2004; KLINGBERG et al., 2005). Esses micro-organismos desempenham um importante papel na produção de produtos fermentados e são considerados seguros (GRAS – “*generally recognized as safe*”) (O'BRIEN et al., 1999). Tendo em vista as características adversas do meio cárneo a uma série de micro-organismos, entre eles aqueles considerados probióticos, vários estudos sugerem a seleção de propriedades probióticas em bactérias lácticas nativas presentes nos produtos cárneos fermentados e, portanto, já adaptadas a essas condições de crescimento. As culturas comerciais poderiam proporcionar ao produto cárneo as mesmas características sensoriais e

tecnológicas que as culturas *starter* tradicionais, além de ações benéficas à saúde (HAMMES e HERTEL, 1998; LÜCKE, 2000; MARAGKOUDAKIS et al., 2009).

Para que essas bactérias sejam consideradas probióticas, as mesmas devem atender a uma série de critérios de seleção, dentre estes, critérios biológicos, fisiológicos e tecnológicos (OLIVEIRA, et al. 2002). As bactérias com potencial probiótico precisam necessariamente ser isoladas do trato gastrointestinal de humanos saudáveis, ser tolerantes ao baixo pH e aos sais biliares presentes no trato gastrintestinal, além de possuir capacidade de aderência à mucosa intestinal, produção de compostos antimicrobianos, serem metabolicamente ativas no intestino, e não possuírem genes determinantes da resistência aos antibióticos (LEE et al, 1999; SAARELA et al, 2000). Quanto aos critérios tecnológicos, estas devem promover propriedades sensoriais adequadas ao produto, serem estáveis e viáveis durante o armazenamento resultando em sua funcionalidade em produtos com aroma e textura adequados (OLIVEIRA et al, 2002).

Os mecanismos pelos quais as BAL inibem micro-organismos patogênicos e deteriorantes incluem a produção de ácidos orgânicos, como ácido láctico e acético, produção de peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e substâncias de natureza proteica, denominadas bacteriocinas. As bacteriocinas são compostos peptídicos sintetizados ribossomicamente e que geralmente têm como alvo a membrana celular de bactérias gram-positivas (SAVADOGO et al., 2006).

3.2 OBJETIVOS DO ESTUDO

O presente estudo teve como objetivos identificar genotipicamente as bactérias ácido lácticas, avaliar a resistência microbiana pelo método de Disco Difusão e pela técnica de gradiente para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em escala, fazer a avaliação comparativa entre as metodologias utilizadas para verificação da resistência à antibióticos. Bem como, verificar a produção de compostos antimicrobianos e capacidade de crescimento das bactérias nativas isoladas de embutidos fermentados na presença de carboidrato prebiótico.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Isolamento bacteriano

Foram utilizadas 54 cepas nativas de bactérias lácticas previamente isoladas de embutidos cárneos dessecados, produzidos por fermentação espontânea fabricados por pequenas empresas e comercializados em 16 municípios dos estados do Paraná e Santa Catarina, na região Sul do Brasil, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Procedência das amostras de embutidos fermentados dessecados e semi-dessecados nos estados do PR e SC e das cepas de BAL isoladas.

Procedência	Cepas isoladas
Nova Santa Rosa /PR	22
Porto Vitória /PR	32, 35
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	123, 131, 323, 411 e 442
Santa Izabel do Oeste /PR	175
Guarapuava /PR	201, 202 e 204
Rio Negrinho /SC	211, 212, 213, 214 e 215
Concórdia /PR	231
Rio Branco do Sul /PR	251
Japura /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) (MICROMED, Capivari, Duque de Caxias, RJ) 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, que foram incubados por 18-24 h a 37 °C.

3.3.2 Identificação das bactérias lácticas

3.3.2.1 Extração do DNA das bactérias lácticas

Em estudo realizado por Dalla Santa (2008) foram selecionadas dez do total de cepas trabalhadas para identificação bioquímica pelo sistema API 50CHL® (Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France). Pela análise do perfil bioquímico apresentado, nove das culturas de cepas de lactobacilos foram classificadas como *Lactobacillus plantarum* e uma como possível *Lactobacillus pentosus*. No presente trabalho optou-se por realizar a identificação genotípica das 54 cepas trabalhadas. A extração do DNA foi realizada segundo protocolo descrito por Neumann e Pospiech (1995) com algumas modificações, a partir da obtenção da cultura crescida em caldo MRS (MICROMED, Capivari, Duque de Caxias, RJ), *overnight* a 37 °C. Procedeu-se a coleta de 2 mL do meio de cultura com crescimento e transferência para microtubo (KASVI, China), o qual foi submetido a centrifugação a 3000 G por 10 min e posteriormente o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi ressuspenso em 500 µL de SET (75mM de NaCl; 25 mM EDTA; 20mM Tris pH 7,5); adicionado lisozima na concentração final de 1mg/mL e incubado a 37 °C por 1 h. Após, adicionou-se 1/10 volume de SDS 10% e 0,5 mg/mL de proteinase K; com posterior incubação a 55 °C por 2 h invertendo ocasionalmente. Foi adicionado 1/3 do volume de NaCl 5M e 1 mL de clorofórmio; incubado a temperatura ambiente por 30 min com inversão frequente. Em seguida foi centrifugado a 4500 G por 15 min transferindo a fase aquosa para um novo tubo.

Para precipitação do DNA foi adicionado igual volume de isopropanol gelado com inversão cuidadosa. Incubou-se a -20 °C *overnight*. Para continuação do processo de

extração foi feita centrifugação a 4500 G por 5 min, desprezando-se o sobrenadante e deixando secar a temperatura ambiente. Após, o precipitado foi ressuspensão em 100 µL de TE + RNase e armazenado a -20 °C para posterior PCR. A presença de DNA nas amostras foi verificada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

3.3.2.2 Amplificação do gene *recA*

A amplificação do gene *recA* foi realizada pelo método de Multiplex PCR com a utilização dos *primers* planF (5'-CCG TTT ATG CGG AAC ACC TA-3'), pentF (5'-CAG TGG CGC GGT TGA TAT C-3'), paraF (5'-GTC ACA GGC ATT ACG AAA AC-3') e um único primer reverse para todos pREV (5'-TCG GGA TTA CCA AAC ATC AC-3') objetivando amplificar uma sequência de 318 pares de base (pb) do genoma se *L. plantarum*, 218 pb se *L. pentosus* e 107 pb se *L. paraplantarum* (BRINGEL et al., 2005; PARENTE et al., 2010). O programa de PCR utilizado compreende uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 min seguidos de 30 ciclos de amplificação, incluindo desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 56 °C por 10 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, seguidos de uma extensão final durante 5 min a 72 °C (TORRIANI et al., 2001).

O volume final de cada reação foi de 25 µL, sendo que os reagentes 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.

Após a técnica de Multiplex PCR, a amplificação das cepas foi verificada em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo.

3.3.2.3 Sequenciamento dos amplicons

Após a purificação, foi feita a reação de sequenciamento utilizando os mesmos *primers* e o mesmo programa descrito anteriormente, porém com a concentração dos

iniciadores de 5 pmol/ μ l. Para a reação de sequenciamento foi utilizado 5 μ L do produto amplificado e purificado; 4 μ L de reativo *Dyynamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* da GE Life Science (composto por enzima, dNTPs, ddNTPs marcados com fluorescência e tampões) e 1 μ L de iniciador direto ou reverso, totalizando um volume final de 10 μ L. Após isso, o produto obtido foi purificado por precipitação com acetato de amônia 7,5 M e, em seguida, as amostras foram ressuspensas em 10 μ L de “*loading buffer for MegaBACE*” para posterior análise em sequenciador automático MegaBace 1000. Os parâmetros de injeção dos fragmentos de PCR no sequenciador foram de 3 kV por 80 s, e durante a corrida foram de 9 kV por 120 min a 25 °C.

3.3.2.4 Análise das sequências

Os eletroferogramas gerados pelo sequenciador foram analisados com o uso do software *Chromas lite 201* (Technelysium Pty Ltd), e suas sequências comparadas com sequências depositadas nas bases de dados RDP (<http://rdp.cme.msu.edu>) e BLAST do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.4 RESISTÊNCIA MICROBIANA

3.4.1 Método de disco difusão (Kirby Bauer)

Para verificação da resistência microbiana foram utilizadas 54 cepas de bactérias lácticas (BAL) nativas obtidas de salames coloniais produzidos por fermentação espontânea. As cepas foram crescidas em caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS). Os antibióticos testados foram ampicilina (10 μ g); ciprofloxacina (5 μ g); cloranfenicol (30 μ g); eritromicina (15 μ g); gentamicina (10 μ g); estreptomina (10 μ g); norfloxacina (10 μ g); penicilina G (10U); tetraciclina (30 μ g); vancomicina (30 μ g) (Laborclin; Pinhais/ PR, Brasil) e trimetoprima (5 μ g) (Sensifar; São Paulo/SP, Brasil) foram escolhidos por serem antibióticos clinicamente relevantes na terapêutica humana.

Uma suspensão com densidade equivalente a 0,5 na Escala de McFarland em solução salina (9 mL) foi espalhada em três direções em ágar MRS, girando a placa 90° a cada passo. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. O ágar MRS foi utilizado com intuito de promover um bom crescimento dos lactobacilos, pois o meio Mueller-Hinton, preconizado para testes de resistência antimicrobiana não promoveu um bom crescimento dos micro-organismos. Para interpretação dos dados foram utilizados os pontos de corte de resistência propostos para *Lactobacillus* sp. por Charteris et al., (1998) para os seguintes antibióticos: penicilina G (≤ 19 mm), vancomicina (≤ 14 mm), tetraciclina (≤ 14 mm), cloranfenicol (≤ 13 mm) e eritromicina (≤ 13 mm). Para ampicilina foi utilizado critério proposto para *Enterococcus* sp. e para trimetoprima foi utilizado critério para *Staphylococcus* sp., ambos preconizados pela norma M100-S21 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2011). Para os demais antibióticos, norfloxacin, estreptomicina, gentamicina e ciprofloxacina, as cepas foram consideradas resistentes, pois os halos de inibição formados foram inferiores a 9 mm (CLSI, 2011).

3.4.2 Técnica de gradiente para determinação da CIM em escala

Para avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) também foram testadas as mesmas 54 cepas bacterianas nativas isoladas de embutidos produzidos por fermentação espontânea. Os antibióticos testados foram: ampicilina; estreptomicina, cloranfenicol; eritromicina; penicilina G e tetraciclina utilizando-se fitas de Etest® nas concentrações de 0,016 a 256 µg/mL (bioMérieux; Marcy-l'Etoile, France). Como critério de interpretação foram utilizadas as normas M45-A2 do CLSI (2010) para penicilina G e da *Technical Guidance – Update of antibiotic resistance criteria* do *European Food Safety Authority* (EFSA, 2008) para ampicilina, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol e estreptomicina. Esses critérios, propostos especificamente para o gênero *Lactobacillus* sp.

Em todas as análises foi utilizada como controle a cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922. Essa cepa foi ativada em caldo tripticase de soja (TSB) a 37 °C por 24 h.

Para o teste de resistência, os discos ou fitas de antibióticos foram aplicados sobre ágar Mueller Hinton previamente semeado com cepa de *E. coli*.

3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR DIFUSÃO POR CAVIDADE EM ÁGAR

As bactérias lácticas foram cultivadas em 50 mL de caldo MRS a 37 °C por 48 h. O caldo foi centrifugado a 4500 G por 15 min e o sobrenadante foi filtrado por filtração em membrana com poros de 0,22 µm (GVWP Durapore, Millipore). O pH do sobrenadante foi ajustado em 6,5 utilizando NaOH 1N para eliminar a inibição causada pela presença de ácido láctico. Em seguida 40 µl do sobrenadante foram tratados com catalase (300 U.mL⁻¹) (C1345 Sigma-Aldrich) com o objetivo de evitar a inibição pela presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Staphylococcus aureus (ATCC 25923) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 19117) foram cultivadas em tubos com 10 mL de caldo tripticase de soja (TSB) e “Brain Heart Infusion” (BHI), respectivamente a 37 °C por 18 h. Posteriormente, 100 µL de cada uma das estirpes foram transferidas separadamente a *Erlenmeyers* contendo caldo BHI semi sólido (adicionado de 0,8% de ágar bacteriológico) a fim de se obter uma concentração de 5 a 6 log UFC/mL⁻¹. O ágar semi-sólido (20 mL) foi transferido para uma placa de Petri e após a solidificação foram feitos dois poços de 8 mm de diâmetro. Foram adicionados 40 µL do sobrenadante neutralizado no primeiro poço, e no segundo 40 µL do sobrenadante neutralizado contendo catalase. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por 4 h, para permitir a difusão do sobrenadante no ágar e posteriormente foram incubadas a 37 °C por 24 h (HARRIS et al., 1989). Os halos de inibição foram medidos em milímetros e a inibição foi considerada positiva quando a largura medida da borda da colônia à borda do halo de inibição foi superior a 0,5 mm (SCHILLINGER; LÜCKE, 1989).

3.6 CAPACIDADE DE CRESCIMENTO NA PRESENÇA DE CARBOIDRATO PREBIÓTICO

O carboidrato prebiótico inulina (Orafti®) foi utilizado para o teste da capacidade de crescimento das bactérias lácticas em comparação com glicose e sacarose, utilizados como carboidratos controle e um teste em branco, sem adição de carboidrato. As cepas foram cultivadas em caldo MRS a 37 °C por 18 h. A partir dessa cultura, 1 mL foi transferido para tubo estéril e cetrifugado a 4500 G por 10 min. O precipitado foi ressuspenso em 20 mL de caldo MRS (pH 6,2) preparado sem a adição de glicose e contendo 2% de inulina ou dos carboidratos controle. O crescimento das culturas foi monitorado após 0, 4, 8 e 24 h de incubação a 37 °C pela medida da absorbância a 600 nm (PENNACCHIA et al., 2006).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente pela descrição das frequências absolutas e relativas. As frequências de resistência e sensibilidade antimicrobiana das cepas de *Lactobacillus* spp. foram expressas em porcentagem e a comparação dos resultados obtidos pela técnica de disco difusão e gradiente para determinação de CIM em escala (Etest®) foi realizada pelo teste de qui-quadrado (χ^2) com nível de significância de 5%.

A comparação do crescimento das cepas de *Lactobacillus* na presença de carboidrato prebiótico nos intervalos de tempo inicial (0h) e final (24h) foi realizada pelo teste t com nível de significância de 5% utilizando o programa *Statgraphics Centurion XVI Version 16.1.11*©. E para comparação do crescimento entre os açúcares testados foi realizada análise de variância nos tempos inicial (0h) e final (24h) utilizando-se o mesmo programa estatístico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Pela técnica de Multiplex PCR seguida de corrida eletroforética para verificação da amplificação das cepas observou-se que 41 cepas resultaram na presença de bandas com 318 pb para a espécie *L. plantarum* conforme escala do marcador molecular de 50 pb (Invitrogen), 3 cepas foram classificadas como *L. pentosus* pela presença de bandas com 218 pb. Algumas amostras foram sequenciadas e três das cepas (225, 227 e 285) que não haviam amplificado no gel foram classificadas como *L. plantarum*. A não amplificação de algumas das cepas pode ter sido ocasionada por quantidade insuficiente de DNA na reação e ainda por não pertencerem às espécies, para as quais foram utilizados primers específicos. Duas amostras tiveram um padrão inespecífico de amplificação, com aparecimento de duas bandas (103 e 282) como representado nas Figuras 2 e 3.

Outros autores têm reportado a utilização de *primers* sintetizados a partir de sequências do gene da proteína *recA* para diferenciação entre espécies próximas de *Lactobacillus*, como *L. plantarum*, *L. paraplantarum* e *L. pentosus* (TORRIANI et al., 2001; COSTA et al., 2011; ADIMPONG et al., 2012). Pennacchia e colaboradores em 2006 também utilizaram iniciadores baseados no gene *recA* com a técnica de Multiplex PCR, que possibilita a detecção de múltiplas sequências alvo em uma mesma amostra e através desta puderam identificar as espécies *L. plantarum*, *L. paraplantarum* e *L. pentosus* isoladas de embutidos fermentados demonstrando que os primers selecionados são eficazes para identificação de espécies de *Lactobacillus* sp.

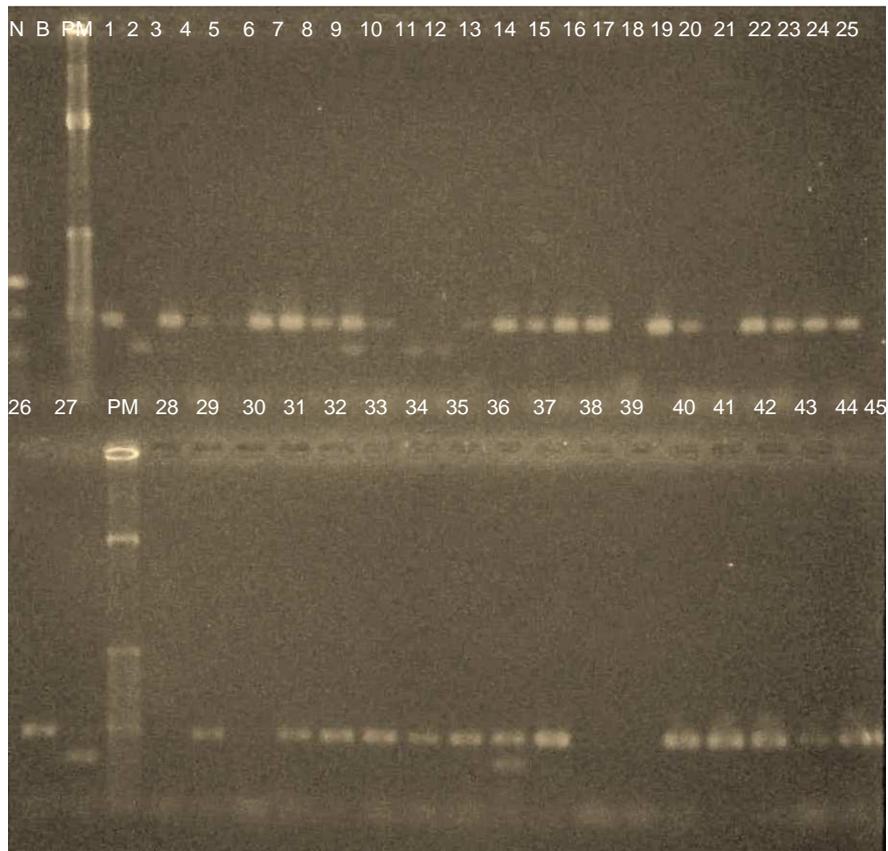


Figura 2 – Amplificação das cepas de bactérias ácido lácticas em gel de agarose 1,5% do produto de PCR corado com brometo de etídeo N - E.coli, B - branco, PM (Padrão de Peso Molecular) 1 (cepa 22), 2 (32), 3 (35), 4 (44), 5 (53), 6 (61), 7 (61), 8 (102), 9 (103), 10 (104), 11 (123), 12 (123), 13 (131), 14 (175), 15 (192), 16 (194), 17 (195), 18 (201), 19 (202), 20 (204), 21 (211), 22 (212), 23 (213), 24 (214), 25 (215), 26 (221), 27 (224), PM, 28 (225), 29 (226), 30 (227), 31 (228), 32 (229), 33 (231), 34 (251), 35 (271), 36 (282), 37 (283), 38 (284), 39 (285), 40 (293), 41 (323), 42 (341), 43 (342), 44 (343) e 45 (364).

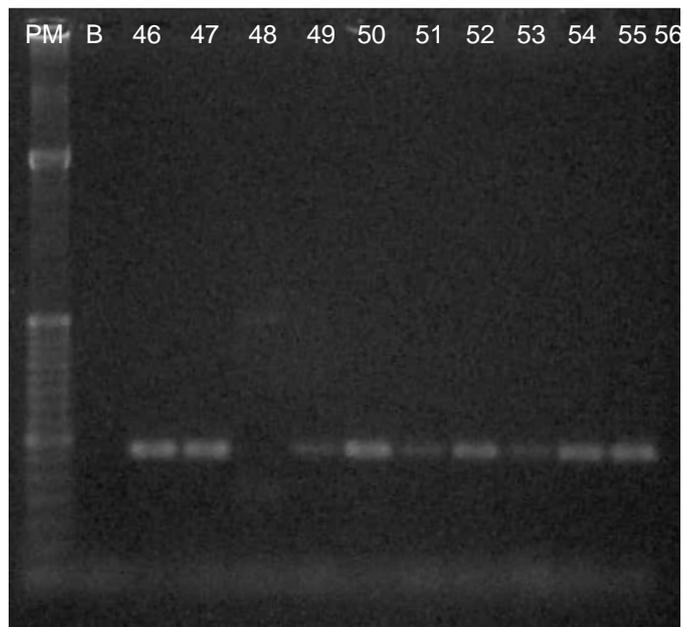


Figura 3 - Amplificação das cepas de bactérias ácido lácticas em gel de agarose 1,5% do produto de PCR corado com brometo de etídeo: PM (Padrão de Peso Molecular), B (Branco), 46 (cepa 385), 47 (411), 48 (433), 49 (442), 50 (484), 51 (485), 52 (501), 53 (502), 54 (503), 55 (504) e 56 (505).

4.2 RESISTÊNCIA MICROBIANA

Do total de cepas testadas pela técnica de gradiente para determinação de CIM em escala verificou-se resistência a 4 dos 6 antibióticos testados. As maiores frequências observadas foram para ampicilina, com 58,8% das cepas resistentes e estreptomicina, com 54,2% das cepas resistentes a esse antibiótico. Também houve resistência à eritromicina e ao cloranfenicol com menor frequência, de 7,69% e 1,92%, respectivamente. Todas as cepas foram sensíveis à tetraciclina e à penicilina G por esse método como demonstrado na Figura 4.

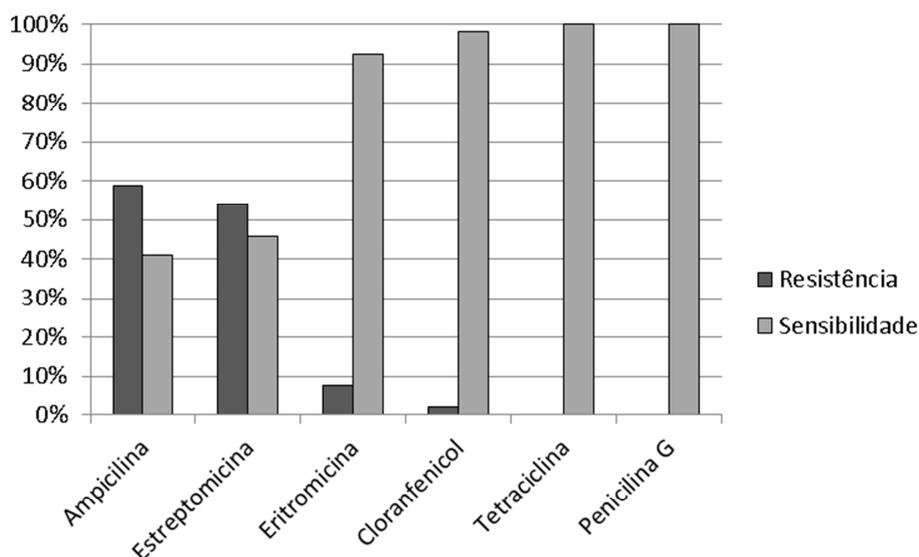


Figura 4 - Frequência de resistência e sensibilidade microbiana das cepas de *Lactobacillus* sp. isoladas de embutidos fermentados pelo método de gradiente para determinação da CIM

Pelo método de disco difusão foram testados 11 antibióticos e verificou-se que houve resistência a 9 antibióticos. Todas as cepas foram resistentes à vancomicina, norfloxacina, estreptomina, gentamicina e ciprofloxacina, 92,6% foram resistentes à trimetoprima, 59,3% à ampicilina, 42,6% à tetraciclina e 5,56% à eritromicina. Contudo, 100% das cepas foram susceptíveis ao cloranfenicol e à penicilina G (Figura 5).

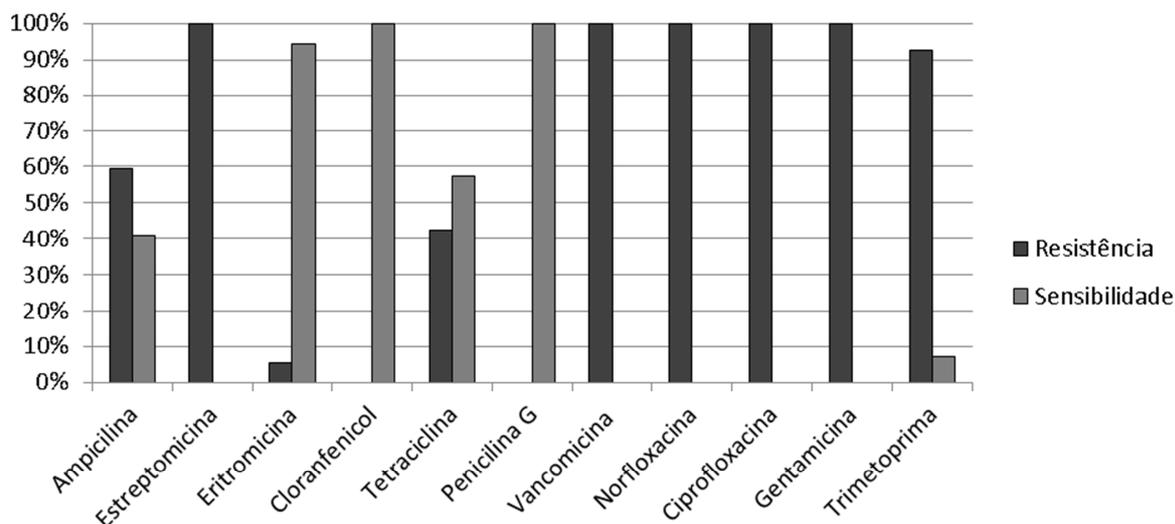


Figura 5 - Frequência de resistência e sensibilidade microbiana das cepas de *Lactobacillus* sp. isoladas de embutidos fermentados pelo método de disco difusão (Kirby Bauer)

Em ambas as técnicas foram testados 6 antibióticos: ampicilina, estreptomicina, eritromicina, cloranfenicol, tetraciclina e penicilina G. Considerando a resistência para os antibióticos testados pelos dois métodos, as maiores frequências observadas foram para estreptomicina e ampicilina. Na avaliação comparativa das metodologias utilizadas, Etest® e disco difusão, para a resistência e sensibilidade microbiana das cepas de *Lactobacillus* sp, verificou-se equivalência estatística pelo teste de qui-quadrado ($p \geq 0,05$) para 4 dos 6 antibióticos testados (Tabela 2). Para estreptomicina e tetraciclina foi observada diferença entre os dois métodos ($p < 0,05$), sendo verificada maior frequência de resistência pelo método de disco difusão em comparação ao Etest®, 100% contra 54,2% e 42,6% contra 0%, respectivamente.

Para ampicilina, cloranfenicol e eritromicina não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre as metodologias e para penicilina G, as metodologias tiveram frequências numéricas iguais de resistência, com 100% de concordância.

Tabela 2. Comparação da frequência (%) e concordância (%) de resistência e sensibilidade de bactérias ácido lácticas isoladas de embutidos fermentados aos antibióticos testados pelos métodos de disco difusão e de gradiente para determinação da CIM em escala utilizando fitas de Etest®.

Antibiótico	Resistência			Sensibilidade		
	DD	Etest®	Concord.%	DD	Etest®	Concord.%
AMP	59,3%	58,8%	99,15	40,7%	41,2%	98,78
EST*	100%	54,2%	54,2	0%	45,8%	***
ERI	5,56%	7,69%	72,3	94,44%	92,31%	97,74
CLO	0%	1,92%	***	100%	98,08%	98,08
TET*	42,6%	0%	***	57,40%	100%	57,40
PEN	0%	0%	100	100%	100%	100

AMP (Ampicilina), EST (Estreptomicina), ERI (Eritromicina), CLO (Cloranfenicol), TET (Tetraciclina), PEN (Penicilina G) na concentração de 0,016 a 256 µg/mL

DD = disco difusão; Concord. = concordância (%) entre as metodologias

*p<0,05 *** = número de resultados insuficiente para aplicação do teste

Apesar de ambas as técnicas usadas se basearem na formação de halos de inibição, elas diferem no fato da disco difusão ser uma metodologia qualitativa, que fornece uma classificação de acordo com o tamanho do halo formado, em milímetros, podendo ser resistente, intermediário ou sensível a determinado antibiótico. Por sua vez, o Etest® é um teste quantitativo, pelo uso de um gradiente pré-formado e estável do antimicrobiano, que permite determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do antibiótico para cada micro-organismo testado. O método de disco difusão se mostrou efetivo para testes de triagem da resistência microbiana, sendo que a técnica de gradiente para determinação da CIM se torna onerosa devido ao alto custo das fitas de Etest®, principalmente quando se trabalha com grande número de amostras. Na literatura consultada verificou-se poucos trabalhos relacionados à comparação de resistência antimicrobiana pelo método de disco difusão e de concentração inibitória mínima por Etest® para o gênero *Lactobacillus* sp. Entre esses trabalhos, Mayrhofer et al. (2008) verificou alto coeficiente de correlação ($r = 0,84$ a $0,98$) entre esses métodos para a sensibilidade de *Lactobacillus acidophilus* frente à eritromicina, estreptomicina e

tetraciclina, e coeficiente de correlação moderado ($r = 0,63$ a $0,83$) para ampicilina, gentamicina e vancomicina. No presente trabalho observou-se diferença significativa entre os métodos testados para estreptomicina e tetraciclina, diferindo do relatado pelos autores citados.

Swenson (1990) descreve concordância de 82,1% para penicilina, 64,3% para tetraciclina, 85,7% para cloranfenicol e 81 % para eritromicina entre os métodos de microdiluição e disco difusão em estudo com espécies de *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactobacillus*. Thornsberry (1985) em publicação sobre procedimentos automatizados para testes de susceptibilidade antimicrobiana sugere que a concordância entre as metodologias de disco difusão e microdiluição seja superior a 90%. No presente estudo as porcentagens de concordância de sensibilidade para ampicilina, eritromicina, cloranfenicol e penicilina G estiveram acima de 90%.

De modo geral, os lactobacilos possuem resistência intrínseca à bacitracina, kanamicina, gentamicina, metronidazol, estreptomicina, trimetoprima e vancomicina (POZZA et al., 2011). Então, apesar de ter ocorrido uma alta frequência de resistência aos agentes antimicrobianos testados (vancomicina, ciprofloxacina, norfloxacina, gentamicina, estreptomicina e trimetoprima), o gênero *Lactobacillus*, conhecidamente apresenta resistência natural a estes antibióticos e devido a isso, os isolados não podem ser considerados multirresistentes, o que se caracterizaria caso as cepas fossem resistentes a quatro ou mais dos antibióticos testados.

Quanto à multirresistência, considerando somente os antibióticos para os quais o gênero *Lactobacillus* não possui resistência intrínseca (ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, penicilina G e tetraciclina) (KLARE et al., 2007; FLÓREZ et al., 2006) pela técnica de disco difusão 48,1% das cepas avaliadas foram resistentes a apenas um dos antibióticos testados, 29,6% a dois antibióticos e 22,2% não foram resistentes a nenhum dos cinco antibióticos.

Na técnica de Gradiente para determinação da CIM, 60,8% das cepas apresentaram resistência a um antibiótico, 3,92% a dois dos antibióticos e 35,3% não apresentaram resistência aos cinco antibióticos testados.

Zhou et al. (2005) menciona que muitas BAL são resistentes a antibióticos. No entanto, essa resistência é frequentemente intrínseca e não transmissível. Os resultados obtidos neste trabalho são condizentes com outros estudos, nos quais a resistência intrínseca à vancomicina e à ciprofloxacina foram reportadas para *Lactobacillus* sp. (CHARTERIS et al., 1998; GEVERS et al, 2000). A resistência à vancomicina de *Lactobacillus* heterofermentativos é intrínseca devido à presença de D-Ala-D-lactato em sua camada de peptidoglicano em lugar do dipeptídeo normal D-Ala-D-Ala (KLEIN et al., 2000).

Considerando a CIM obtida para cada um dos antibióticos, 29% das cepas foram inibidas com 3 µg/mL de tetraciclina; para eritromicina 35% das cepas apresentaram CIM de 0,38 µg/mL; para cloranfenicol e ampicilina, 52% e 51% das cepas, respectivamente, tiveram seu crescimento inibido com a concentração de 3 µg/mL. Com o uso da penicilina G, 36% das cepas foram inibidas com CIM de 0,38 µg/mL e com estreptomicina, 38% das cepas foram inibidas com concentração de 24 µg/mL, como demonstrado na Tabela 3.

A EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) em compilação de dados de diversos estudos sobre a distribuição dos valores de CIM da espécie *L. plantarum* relata que das 120 cepas testadas 38,33% (46) foram inibidas com a concentração de 0,25 µg/mL de ampicilina, 73,33% (88) com 1 µg/mL de eritromicina, 65,83% (79) foram inibidas com 128 µg/mL de estreptomicina e 87,5% (105) tiveram seu crescimento inibido com a concentração de 16 µg/mL de tetraciclina (EUCAST, 2013). No presente estudo a maior parte das cepas foi inibida com menor valor de CIM para os antibióticos tetraciclina, eritromicina e estreptomicina. Somente para ampicilina o valor referido de inibição foi maior do que o relatado pela EUCAST.

Tabela 3. Distribuição dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) de seis antibióticos para cepas de *Lactobacillus* sp. nativas isoladas de embutidos fermentados

Antibiótico	Isolados (%) e seus respectivos valores de CIM ($\mu\text{g/mL}$)																	
	0,094	0,125	0,19	0,25	0,38	0,50	0,75	1	1,5	2	3	4	6	8	12	16	24	32
Tetraciclina									4	8	29	15	19	13	10	2		
Eritromicina		4	2	11	35	28	8	4		4				2	2			
Cloranfenicol										17	52	21	8		2			
Ampicilina	4								2	35	51	8						
Penicilina G		2	9	9	36	26	2	7	7									2
Estreptomicina												8			4	33	38	17

Ammor et al. (2007) em estudo sobre resistência intrínseca e adquirida de BAL e bifidobactérias reportam que 34,48% (10) das cepas de *L. plantarum* foram inibidas com concentração de 16 µg/mL com uso de tetracilcina, 44,83% (13) tiveram seu crescimento inibido com 0,5 µg/mL de eritromicina e 32 µg/mL de estreptomicina; e 55,17% (16) com concentração de 4 µg/mL com uso de cloranfenicol. As concentrações de inibição do citado estudo e no presente trabalho se assemelham para os antibióticos cloranfenicol e eritromicina e em menor grau, para estreptomicina.

Em estudo sobre a sensibilidade antimicrobiana de *L. plantarum*, Florez et al. (2006) descreveram que 59,1% (39) das cepas foram inibidas com concentração de 0,25 µg/mL de ampicilina, 34,7% (42) com CIM de 1 µg/mL para eritromicina, 25,6% (31) das cepas foram inibidas com concentração > 128 µg/mL de estreptomicina e 42,1% (51) com 16 µg/mL de tetraciclina. Os resultados para estreptomicina desses autores foram superiores aos do presente estudo em que a maior CIM obtida foi de 32 µg/mL. No estudo mencionado o meio utilizado foi o "LSM" (*LAB susceptibility test medium*), meio proposto para testes de susceptibilidade para bactérias ácido lácticas por KLARE et al., 2005.

Zarazaga et al. (1999) em estudo *in vitro* sobre a ação de antibióticos contra *Lactobacillus* relataram alto índice de resistência da espécie *L. plantarum* à penicilina. Esse resultado contrapõe o resultado obtido no presente trabalho onde 100% das cepas testadas foram susceptíveis à penicilina G.

A distribuição dos valores de CIM é importante, pois possibilita aos autores propor o estabelecimento de pontos de corte para *Lactobacillus* sp. para os antibióticos testados e para os quais não há definição de pontos de corte. Uma vez que, o próprio CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) recomenda pontos de corte de outros gêneros e espécies em testes de resistência microbiana para *Lactobacillus* sp. devido a inexistência de pontos de corte para o gênero.

4.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR DIFUSÃO EM CAVIDADE DE ÁGAR

Autores têm reportado efeito bactericida do extrato livre de células de isolados de *L. plantarum* frente a bactérias gram negativas, o que é bastante interessante,

visto que poucos extratos de BAL demonstraram atividade antimicrobiana frente a esse grupo de bactérias atuando, sobretudo em bactérias gram positivas. Como exemplo, a plantaricina 35d (MESSI et al., 2001) e bacteriocinas produzidas pelas cepas ST194BZ, ST414BZ e ST664BZ de *L. plantarum* (TODOROV & DICKS, 2005), que foram capazes de inibir *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Considerando que a confirmação de atividade antimicrobiana é definida pela formação de halo de inibição com medida superior ou igual a 0,5 mm para técnica de difusão em poços (SCHILLINGER; LÜCKE, 1989), nenhum dos 54 isolados produziu halo com medida acima da citada para ambos os patógenos testados (*Listeria monocytogenes* - ATCC 19117 e *Staphylococcus aureus* - ATCC 25923).

Zanette (2010) em estudo sobre os efeitos da adição de cultura *starter* bacteriocinogênica produzida por *L. plantarum* sobre *L. monocytogenes* em linguiça colonial relata que o sobrenadante de 30 das cepas isoladas, que apresentaram inibição bacteriana através da técnica de *spot-on-lawn*, quando submetidos à técnica de difusão em poços, somente quatro apresentaram atividade inibitória frente aos isolados de *L. monocytogenes*. Comparando a largura dos halos de inibição obtidos entre as técnicas mencionadas, a autora verificou que houve redução significativa da atividade antimicrobiana quando utilizados os sobrenadantes livres de células na técnica de difusão em poços em comparação aos halos formados na técnica de *spot-on-lawn*, em que as BAL são semeadas em superfície em placa contendo TSA (Ágar Soja Triptona) adicionado de 0,6% de extrato de levedura e posteriormente incubadas em anaerobiose a 30 °C por 24 h. Após essa etapa, as placas com os cultivos de BAL recebem sobrecamada de 8 mL do ágar BHI semi-sólido contendo *L. monocytogenes*. Então incubadas em anaerobiose a 37 °C por 24 h sendo a inibição verificada pela presença de halo translúcido ao redor da colônia (LEWUS; KAISER; MONTVILLE, 1991).

Carvalho et al. (2006) obtiveram resultados semelhantes evidenciando que das 18 culturas de BAL isoladas de salames obtidos por fermentação espontânea na região Sul do Brasil, apenas uma cultura apresentou atividade antilisteria quando realizado ensaio de difusão em poços. Existem relatos sobre a variação da sensibilidade das cepas de *L. monocytogenes* frente a diferentes bacteriocinas. De acordo com Castellano et al., (2001) essa variação está relacionada à constituição

da membrana celular e à sua composição lipídica. Zanette (2010) avaliando a natureza protéica do composto inibidor relata que os sobrenadantes não tiveram redução significativa da atividade antilisteria quando submetidos a tratamento térmico. No entanto, na presença de enzimas ocorreu a inativação da atividade antimicrobiana determinando que o composto produzido possa ser um peptídeo termoestável e possivelmente classificado como uma bacteriocina da classe IIa com especificidade contra *Listeria monocytogenes*. Prado et al. (2000) reportam atividade inibitória direta frente à *Listeria monocytogenes* Scott A e ATCC 7644 de 32% das bactérias lácticas isoladas de embutidos curados.

4.4 CAPACIDADE DE CRESCIMENTO NA PRESENÇA DE CARBOIDRATO PREBIÓTICO

Comparando o crescimento entre os açúcares no tempo inicial (0h) e final (24h) observou-se que as cepas de bactérias lácticas identificadas como 22, 192, 204, 224 e 225 tiveram melhor desempenho na presença do carboidrato prebiótico inulina, visto que no tempo inicial partiram de valores de DO sem diferença significativa entre os açúcares conforme Figura 6a.

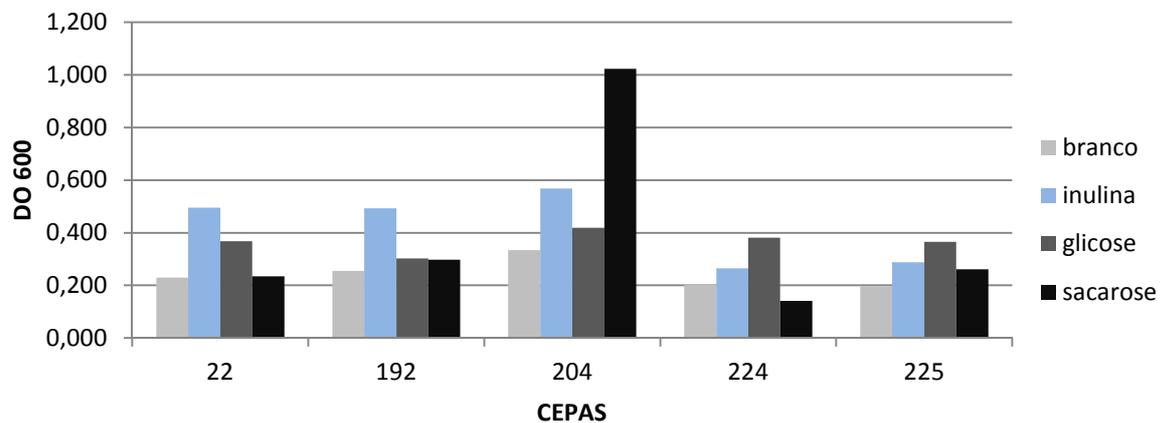


Figura. 6 - Cepas de *Lactobacillus* sp. com melhor desempenho de crescimento em meio contendo inulina (prebiótico) na concentração de 2% após 24 h em relação aos açúcares controle (glicose e sacarose) e meio sem adição de carboidrato (branco)

Na avaliação do crescimento de *Lactobacillus* sp. na presença de inulina, 29,6% (16) dos isolados se mostraram superiores ($p < 0,05$) às demais cepas quanto ao crescimento entre os tempos 0 e 24 horas conforme demonstrado na Tabela 4 demonstrando que as cepas foram capazes de utilizar a inulina como substrato para seu crescimento. A diferença entre o crescimento bacteriano observado na presença dos diferentes açúcares se deve ao fato de a glicose, por tratar-se de um monossacarídeo, ser utilizada prontamente pelas bactérias lácticas. A inulina, por ser um polissacarídeo constituído de uma cadeia de 60 unidades de frutose ligadas entre si e a uma molécula de glicose terminal (CARABIN e FLAMM, 1999), necessita ser degradada previamente à sua utilização.

No presente estudo, 51,8% das cepas tiveram maior DO na presença do carboidrato sacarose em relação aos demais carboidratos, inclusive glicose. utilizado como controle. Hijum et al. (2002) observaram a produção da enzima frutossiltransferase por cepas de *Lactobacillus*, particularmente *L. reuteri*, capaz de sintetizar inulina a partir da sacarose. A presença dessa enzima e a consequente síntese de inulina a partir da sacarose poderiam justificar a maior densidade óptica observada para o meio contendo sacarose nessas cepas de *Lactobacillus*.

Pennacchia et al. (2006) em estudo sobre o potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus* isolados de embutidos fermentados observaram bom crescimento das cepas de *L. plantarum* com valores $>3,0$ (DO_{600}) durante as 30h de incubação na presença dos açúcares glicose e sacarose. Essas cepas foram capazes de fermentar os quatro carboidratos prebióticos testados, (fruto-oligossacarídeo, galacto-oligossacarídeo, isomalto-oligossacarídeo e lactulose). A inulina foi o único carboidrato prebiótico não fermentado por nenhuma das cepas pertencentes à espécie *L. plantarum*, sendo que a única espécie de lactobacilo capaz de fermentar o prebiótico foi a *L. paracasei*.

No entanto, Nagpal e Kaur (2011) em estudo sobre a avaliação do efeito simbiótico de prebióticos sobre a atividade *in vitro* de lactobacilos probióticos relataram que o menor tempo de duplicação durante o armazenamento foi para cepa *L. plantarum* M5 seguida da cepa Ch1 com utilização de inulina. Estes autores concluíram que o crescimento e viabilidade em presença de prebióticos foram encontrados como sendo específicos de cada cepa e que a viabilidade dos

lactobacilos foi maior com a inulina, do que em relação à oligofrutose, lactulose, rafterilose e mel.

Tabela 4. Crescimento das melhores cepas de *Lactobacillus* sp. ($DO_{600} \pm DP$) na presença de 2% de inulina entre os tempos 0 e 24 h.

DO ₆₀₀ nos tempos 0 e 24 h e DP					
Cepa	0	24	Cepa	0	24
22	0,039±0,00 ^a	0,496±0,03 ^b	231	0,111±0,02 ^a	0,199±0,01 ^b
53	0,067±0,00 ^a	0,504±0,00 ^b	282	0,038±0,01 ^a	0,305±0,01 ^b
192	0,102±0,02 ^a	0,493±0,04 ^b	341	0,063±0,03 ^a	0,475±0,07 ^b
202	0,061±0,02 ^a	0,751±0,07 ^b	343	0,088±0,02 ^a	0,475±0,07 ^b
204	0,078±0,03 ^a	0,569±0,05 ^b	411	0,123±0,03 ^a	0,475±0,07 ^b
224	0,084±0,02 ^a	0,441±0,01 ^b	442	0,079±0,03 ^a	0,475±0,07 ^b
225	0,111±0,03 ^a	0,208±0,03 ^b	501	0,079±0,03 ^a	0,475±0,07 ^b
228	0,091±0,02 ^a	0,246±0,08 ^b	503	0,089±0,00 ^a	0,475±0,07 ^b

* médias seguidas por letras diferentes na mesma linha referentes à mesma cepa indicam diferença significativa ($p < 0,05$) DP = desvio padrão

5. CONCLUSÃO

Das 54 cepas isoladas de embutidos fermentados comercializados em 16 municípios dos estados do PR e SC foi possível identificar genotipicamente 44 cepas como *Lactobacillus plantarum* e 3 como *L. pentosus*.

Pela avaliação da CIM, as maiores frequências de resistência microbiana encontradas foram para ampicilina (58,8%) e estreptomicina (54,2%). Pelo método de disco difusão, considerando a resistência adquirida, houve maior frequência à trimetoprima (92,6%), à ampicilina (59,3%), à tetraciclina (42,6%) e à eritromicina (5,56%). Contudo, nenhuma das cepas mostrou multirresistência aos antibióticos considerados de resistência adquirida para o gênero. Os métodos de disco difusão e de gradiente para determinação de CIM em escala não tiveram diferença significativa para ampicilina, cloranfenicol, eritromicina e penicilina G.

Não foi verificada a produção de compostos antimicrobianos contra *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* pelas bactérias lácticas utilizando a técnica de difusão em poços, o que não indica que elas não produzam bacteriocinas.

Dentre as cepas testadas, 5 delas (22, 192, 204, 224 e 225) tiveram melhor desempenho de crescimento na presença do carboidrato prebiótico inulina em relação a um dos açúcares controle. Dessas cepas, a 22 e 204 foram susceptíveis a todos os antibióticos considerados de resistência adquirida (AM, CL, EM, PV e TE) e as demais apresentaram resistência à ampicilina em pelo menos um dos métodos testados. Sendo assim, essas 5 cepas foram classificadas como as com melhor potencial probiótico para continuarem na seleção de cepas para o desenvolvimento de inóculo probiótico.

Dentre as cinco melhores cepas, 4 delas (22, 192, 204 e 225) foram identificadas como *L. plantarum*. E a cepa 224 como *L. pentosus*.

CAPÍTULO 4

6. CONCLUSÃO GERAL

O presente estudo permitiu verificar que as cepas de bactérias ácido lácticas testadas apresentam potencial para serem utilizadas como inóculo probiótico em produtos cárneos, pois não apresentaram multirresistência e foram capazes de crescer na presença de inulina.

Contudo, com vistas a sequência na seleção de cepas para o desenvolvimento de inóculo probiótico, recomenda-se a realização de outros testes para avaliar a capacidade tecnológica das cepas, como os de resistência aos sais de cura e ao processamento de salame, e ainda testes complementares de capacidade fisiológica. Entre esses, destacam-se os testes de identificação de determinantes genéticos de resistência aos antibióticos, possibilitando estimar a possibilidade de transferência de genes a outras bactérias presentes no trato gastrointestinal. Além disso, sugere-se a realização de testes de capacidade de tolerância ao baixo pH, aos sais bilares e de produção de exopolissacarídeos para avaliar a sobrevivência das cepas no processo digestivo e de capacidade de aderência às células do epitélio intestinal.

7. REFERÊNCIAS

- Adimpong DB, Nielsen DS, Sorensen KI, Derkx PMF, Jespersen L. Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products. *BioMed Central Microbiology*, 2012; 12 :75.
- Ahn C, Collins-Thompson D, Duncan C, Stiles ME. Mobilization and location of the genetic determinant of chloramphenicol resistance from *Lactobacillus plantarum* caTC2R. *Plasmid*, 1992; 27(3): 169-76.
- Alberts, B. et al. *Biologia Molecular da Célula*. 5ª. ed, Porto alegre: Artmed, 2010. 1396 p.
- Al-Holy MA, Al-Nabulsi A, Osaili TM, Ayyash MM, Shaker RR. Inactivation of *Listeria innocua* in brined White cheese by a combination of nisin and heat. *Food Control*, 2012, 23(1): 48-53.
- Amor KB, Vaughan, EE, De Vos WM. Advanced Molecular Tools for the Identification of Lactic Acid Bacteria. *The Journal of Nutrition*, 2007, 137: 741-47.
- Ammor MS, Mayo B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science*, 2007; 76(1):138-46.
- Andersen, L. Fermented dry sausages produced with the admixture of probiotic cultures. In: *International commitment of meat science and technology*, 44, Barcelona, 1998. *Anais...* Barcelona: Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries, p.826-827, 1998.
- Annuk H, Shchepetova J, Kullisaar T, Songisepp E, Zilmer M, Mikelsaar, M. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. *Journal of Applied Microbiology*, 2003; 94: 403-412.
- Arihara K, Itoh M. UV-induced *Lactobacillus gasseri* mutants resisting sodium chloride and sodium nitrite for meat fermentation, 2000; 56(2-3):227-30.
- Axelsson, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen's AW, Ouwehand, A. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. 3 ed. New York: Marcel Dekker, 2004.

Barrons R.; Tassone D. Use of *Lactobacillus* probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review. *Clinical Microbiology and Infection*, 2007, 13 (7): 657-64.

Bergey. Classificação das Bactérias de acordo com o Bergey's Manual. *Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd edição, 5 volumes, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. Resolve Aprovar o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. D.O.U - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 03 de maio de 1999. 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: 28 de agosto de 2013.

Breukink E, Wiedemann I, Van Kraaij C, Kuipers OP, Sahl HG, Kruijff B. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*, Washington, 1999; 286 (5448): 2361-2364.

Bringel F, Castioni A, Olukoya DK, Felis GE, Torriani S, Dellaglio F. *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005; 55: 1629-34.

Carvalho AAT, Paula RA, Mantovani HC, Moraes CA. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacteria isolated from Italian salami. *Food Microbiology*, 2006; 23: 213-219.

Castellano P, Farías ME, Holzapfel W, Vignolo G. Sensitivity variations of *Listeria* strains to the bacteriocins, lactocin 705, enterocin CRL35 and nisin. *Biotechnology Letters*, 2001; 23: 605-608.

Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *International Journal of Dairy Technology*, Long Hanborough, 1998, 51(4): 123-136.

Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Effect of conjugated bile salts on antibiotic susceptibility of bile salt-tolerant *Lactobacillus* and *Bifi dobacterium* isolates. *Journal of Food Protection*, 2000; 63(10): 1369-1376.

Chen Y, Ludescher RD, Montville TJ. Electrostatic interactions, but not the YGNGV consensus motif, govern the binding of pediocin PA-1 and its fragments to phospholipid vesicles. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997; 63: 4770-77.

Chung K, Dickson J, Crouse J. Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989; 55 (6): 1329-1333.

Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004; 17(4): 840-62.

Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, 2001; 71 (1): 1-20.

CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria, Approved Guideline. 2th ed. M45 - A2; 2010, 30 (18).

CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Performance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing, Twenty-first Informantional Supplement, M100 - S21, 2011; 31 (1).

Collado MC, Sanz Y. Method for direct selection of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains from human feces based on their acid-adaptation ability. *Journal of Microbiological Methods*, 2006; 66(3): 560-3.

Costa GN, Vilas-Boas GT, Vilas-Boas LA, Miglioranza LHS. *In silico* phylogenetic analysis of lactic acid bacteria and new primer set for identification of *Lactobacillus plantarum* in food samples. *European Food Research Technology*, 2011; 233: 233 – 241.

Cotter PD, Hill C e Ross P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 2005; 3(10): 777-788.

Dalla Santa OR. Avaliação da qualidade de salames artesanais e seleção de culturas *starter* para a produção de salame tipo italiano. Curitiba, 2008. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná.

De Vrese, M et al. Probiotics - compensation for lactase insufficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2001; 73(2): 421-429.

De Vuyst L, Vandamme EJ. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Microbiology, genetics and applications, Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2007; 13:194-199.

De Vuyst L, Vandamme EJ. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis subsp. lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. In: Bacteriocins of lactic acid bacteria, Publishing: 1994; p.151-221.

Drider D, Fimland G, Hechard Y, McMullen LM, Prevost H. The continuing story of class IIa bacteriocins. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2006; 70 (2): 564-582.

Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao X. Quinolone-mediated bacterial death. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008; 52(2): 385-92.

European Food Safety Authority (EFSA). Technical guidance – Update of antibiotic resistance criteria. The EFSA Journal, 2008; 732: 2-15.

Enan G, El-Essawy AA, Uyttendaele M, Debevere J. Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage: characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG1. International Journal of Food Microbiology, 1996; 30(3):189-215.

Ennahar S, Aoude-Werner D, Sorokine O, Dorsselaer AV, Bringel F, Hubert JC, Hasselmann C. Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE92 isolated from cheese. Applied and Environmental Microbiology, 1996; 62 (12): 4381-4387.

Erkkilä S; Petäjä E; Eerola S.; Lilleberg L.; Mattila-Sandholm T.; Suihko ML. Flavour profiles of dry sausages fermented by selected novel meat starter cultures. Meat Science, 2001; 58: 111- 116.

EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Antimicrobial wild type distributions of microorganisms (2013). Disponível em: <http://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=-1&Specium=577>. Acesso em: 19 nov 13.

FAO/WHO. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, 2001. Disponível em:<

http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/>. Acesso em: 17 jun 2013.

Fernandes P. Antibacterial discovery and development - the failure of success? *Nature Biotechnology*, 2006; 24(12): 1497-503.

Flórez AB, Egervärn M, Danielsen M, Tosi L, Morelli L, Lindgren S, Mayo B. Susceptibility of *Lactobacillus plantarum* Strains to Six Antibiotics and Definition of New Susceptibility–Resistance Cutoff Values. *Microbial Drug Resistance*, 2006; 12(4): 252-256.

Foegeding PM, Thomas AB, Pilkington DH, Klaenhammer TR. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992; 58(3):884-90.

Fuller R. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, Oxford, 1989, 66(5): 365-378.

Garneau S, Martin NI, Vederas JC. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 2002; 84 (5): 577-592.

Gevers D, Huys G, Devlieghere F, Uyttendaele M, Debevere J, Swings J. Isolation and identification of tetracycline resistant lactic acid bacteria from pre-packed sliced meat products. *Systematic and Applied Microbiology*, 2000; 23: 279-284.

Gevers D, Masco L, Baert L, Huys G, Debevere J, Swings J. Prevalence and diversity of tetracycline resistant lactic acid bacteria and their tet genes along the process line of fermented dry sausages. *Systematic and Applied Microbiology*, 2003; 26(2): 277-83.

Hammes WP, Hertel C. New developments in meat starter cultures. *Meat Science*. 1998; 49:125-138.

Hansen JN. Nisin as a model food preservative. *Critical reviews in Food Science and nutrition*, 1994. 34: 69-93.

Harris LJ, Daeschel MA, Stiles ME, Klaenhammer TR. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 1989; 52: 384-387.

Hernández D, Cardelle E, Zárata V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF 711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF 711. *Journal of applied microbiology*, 2005; 99(6): 77-84.

Hijum SAFT, Schutten GH, Rahaoui H,

Maarel MJEC, Dijkhuizen L. Characterization of a Novel Fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* That Synthesizes High-Molecular-Weight Inulin and Inulin Oligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, 68(9): 4390-98.

Hugas M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science*, 1998; 49(1):139-50.

Hummel AS, Hertel C, Holzapel WH, Franz CM. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007; 73: 730-739.

Holzapel WH et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2001, 73(2): 365-373.

Hugas M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science*, 1998; 49: 139-150.

JAY JM. *Microbiologia de Alimentos*. Tradução de Eduardo César Tondo, et al. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

Kaiser AL, Montville TJ. Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996; 62 (12): 4529-4535.

Kao YT, Liu YS, Shyu YT. Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. *Food Research International*, 2007, 40: 71–79.

Kawai Y, Ishii Y, Arakawa K, Uemura K, Saitoh B, Nishimura J, Kitazawa H, Yamazaki Y, Tateno Y, Itoh T, Saito T. Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004; 70 (5): 2906-2911.

Klaenhammer, TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 1993, 12(1-3): 39-85.

Klaenhammer TR. Probiotics and prebiotics. In: Doyle MP, Beuchat LR, Ontville TJ. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. 2.ed. Washington: ASM, 2001, 797-811.

Klare I, Konstabel C, Werner G, Huys G, Vankerckhoven V, Kahlmeter G, Hildebrandt B, Müller-Bertling S, Witte W, Goossens H. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended

for probiotic or nutritional use, 2007. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59: 900-912.

Klein G, Hallmann C, Casas IA, Abad J, Louwers J, Reuter G: Exclusion of *vanA*, *vanB* and *vanC* type glycopeptide resistance in strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus* used as probiotics by polymerase chain reaction and hybridization methods. *Journal of Applied Microbiology* 2000; 89: 815–824.

Kumar M et al. Cancer - preventing attributes of probiotics: an update *International Journal of Food Science and Nutrition*, 2010, 61(5): 473-96.

Lai AC, Tran S, Simmonds RS. Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus*. *FEMS Microbiology Letters*, 2002; 215 (1):133-138.

Lee YK, Nomoto K, Salminen S, Gorbach SL. *Handbook of probiotics*. New York: Wiley, 1999. 211p.

Leroy F, Verluyten J, Vuyst L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 2006; 106: 270-285.

Lewus CB, Kaiser A, Montville TJ. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and environmental microbiology*. 1991; 57 (6): 1683-1688.

Lin CF, Fung ZF, Wu CL, Chung TC. Molecular characterization of a plasmid-borne (pTC82) chloramphenicol resistance determinant (*cat-TC*) from *Lactobacillus reuteri* G4. *Plasmid*, 1996; 36(2): 116-24.

Lücke FK. Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*, 2000; 56:105-115.

Macedo REF, Miyague L, Costa LB, Luciano FB. Control of *Listeria monocytogenes* growth by bacteriocin-producing starter cultures in the manufacturing of dry fermented sausage. *African Journal of Microbiology Research*. 2013; 7(9): 710-718.

Maragkoudakis PA, Mountzouris KC, Psyrras D, Cremonese S, Fischer J, Cantor MD, 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*. 2009;130(3):219-26.

Marugg JD et al. Cloning, expression and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0. *Applied and environmental microbiology*. 1992; 58: 2360-2367.

McCartney A. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *The British Journal of Nutrition*, 2002, 88: 29-37.

Messi P, Bondi M, Sabia C, Battini R, Manicardi G. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. *International Journal of Food Microbiology*, 2001; 64(1-2): 193-8.

Mohania D, Nagpal R, Kumar M, Bhardwaj A, Yadav M, Jain S, Marotta F, Singh V, Parkash O, Yadav H. Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of Digestive Diseases*, 2008, 9(4): 190-98.

Molina AL, Tobo PR. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. *Revista Eletrônica Einstein*, 2004, 2(2): 139-142.

O'Brien J, Crittenden R, Ouwehand AC, Salminen S. Safety valuation of probiotics. *Trends Food Science Technology*, 1999, 10: 418-424.

Oliveira MN et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2002, 38(1): 1-21.

Pace JL, Yang G. Glycopeptides: Update on an old successful antibiotic class. *Biochemical Pharmacology*, 2006; 71(7): 968-80.

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*, 2003; 65: 859-867.

Parente E, Ciocia F, Ricciardi A, Zotta T, Felis GE, Torriani S. Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study. *International Journal of Food Microbiology*. 2010; 144: 270-279.

Pennacchia C, Ercolini D, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G, Villani F. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Science*, 2004; 67(2): 309-17.

Pennacchia C, Vaughan EE, Villani F. Potencial probiotic *Lactobacillus* strains from fermented sausages: Further investigations on their probiotic properties. *Meat Science*; 2006; 73: 90 - 101.

Pidcock K, Heard GM, Henriksson A. Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. *International Journal of Food Microbiology*; 2002; 76(1-2): 75-81.

Pozza MSS, et al. Utilização de prebióticos por *Lactobacillus* spp. e resistência antimicrobiana. *Higiene Alimentar*, 2011, 25(196/197): 99-103.

Prado CS, Santos WLM, Carvalho CR, Moreira EC, Costa JO. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas de embutidos curados frente à *Listeria monocytogenes*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 2000; 52 (4): 417-423.

Rilla N, Martinez B, Rodriguez A. Inhibition of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in Afuega'l Pitu cheese by the nisin Z producing strain *Lactococcus lactis lactis* IPLA 729. *Journal of Food Protection*, 2004; 67 (5): 928-933.

Saad SM. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, 42(1).

Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 2000, 84: 197-215.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

Sameshima T, Magome C, Takeshita K, Arihara K, Itoh M, Kondo Y. Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology*, 1998; 41: 1-7.

Santos LR. Standardisation of RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) for fingerprinting of *Salmonella Enteritidis*. *Revista da FZVA*, 2003, 10(1): 144-158.

Santos, WLM. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus* sp. 347, de origem cárnico. Madrid, Espanha (Tese, Doutorado). Universidade Complutense de Madrid, 1993. 294 p.

Saunders NA. Real-time PCR In: *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 2004, 266: 191-211.

Savadogo A, Ouattara CAT, Bassole IHN, Traore SA. Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. *African Journal of Biotechnology*, 2006; 5 (9): 678-683.

Schillinger U, Holzapel WH. Guidelines for manuscripts on bacteriocins of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 1996; 33(2-3):iii-v.

Schrezenmeir J, De Vrese M. Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2001, 73(2), 361-364.

Sgarbieri VC, Pacheco MTB. Revisão: Alimentos funcionais fisiológicos. Brazilian Journal of Food Technology, 1999, 2(1-2): 7-19.

Stiles, ME, Holzapfel WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 1997, 36(1): 1-29.

Sul S et al. Rapid Identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in probiotic products using Multiplex PCR. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 17(3): 490-495.

Swenson JM, Facklam RR, Thornsberry C. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1990; 34(4): 543-9.

Taranto MP, Perez-Martinez G, Valdez GF. Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. Research in Microbiology, 2006; 157: 720-725.

Teuber M, Meile L, Schwarz F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. Antonie Van Leeuwenhoek, 1999; 76: 115-137.

Thamer KG, Penna ALB. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006, 26(3): 589-95.

Thornsberry, C. Automated procedures for antimicrobial susceptibility tests. In: EH. Lenette, A. Balows, WJ Hausler Jr e HJ Shadomy (ed.), Manual of clinical microbiology, 4 ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. 1985, 1015-1018.

Tichaczek PS, Vogel RF, Hammes WP. Cloning and sequencing of curA encoding curvacin A, the bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174. Archives of Microbiology, 1993; 160(4):279-83.

Todorov SD. Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum*: production, genetic organization and mode of action. Brazilian Journal of Microbiology. 2009; 40(2): 209-221.

Tortora JD, Funke RB, Case LC. Microbiologia. 8ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 894p.

Torriani S, Felis EG, Dellaglio F: Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiple PCR

assay with *recA* gene-derived primers. Applied Environmental Microbiology. 2001; 67:3450–54.

Travers MA, Florent I, Kohl L, Grellier P. Probiotics for the control of parasites: an overview. Journal of Parasitology Research, 2011.

Todorov SD, Dicks LMT. Lactobacillus plantarum isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. Enzyme Microb. Technol., 2005; 36: 318-326.

Työppönen S, Petäjä E, Mattilasandholm T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. International Journal of Food Microbiology, 2003; 83: 233-244.

Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2000; 64: 655–671.

Vinderola, G et al. Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. Frontiers in Microbiology, 2011; 2(70): 1-6.

Walsh C. Where will new antibiotics come from? Nature Review Microbiology, 2003; 1(1): 65-70.

Williams JG et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 1990, 18(22): 6531-35.

Wood BJB, Holzapel WH. The genera of lactic acid bacteria. 1^a ed. London: Blackie Acad. & Professional, 1995.

Zanette, C. Efeitos da adição de cultura *starter* bacteriocinogênica produzida por *Lactobacillus plantarum* sobre *Listeria monocytogenes* em Linguiça colonial. Curitiba, 2010. Dissertação de mestrado. Programa de pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná.

Zarazaga M, Saenz Y, Portillo A et al. In vitro activities of ketolide HMR3647, macrolides, and other antibiotics against *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Pediococcus* isolates. Antimicrobial Agents Chemotherapy 1999; 43: 3039–41.

Zhou JS, Pillidge CJ, Gopal PK, Gill HS. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. International Journal of Food Microbiology, 2005; 98: 211-217.