

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

Jéssica Nastácia Pires Kurtz

**AVALIAÇÃO *in vitro* DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE *Enterococcus faecium*
ISOLADOS DE LEITE BUBALINO**

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

Jéssica Nastácia Pires Kurtz

AVALIAÇÃO *in vitro* DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE *Enterococcus faecium* ISOLADOS DE LEITE BUBALINO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre(a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Amanda de Souza da Motta

Coorientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Márcia Monks Jantzen

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Pires Kurtz, Jéssica Nastácia
AVALIAÇÃO in vitro DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE
Enterococcus faecium ISOLADOS DE LEITE BUBALINO /
Jéssica Nastácia Pires Kurtz. -- 2019.
76 f.
Orientadora: Amanda de Souza da Motta.

Coorientadora: Márcia Monks Jantzen.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Bactérias ácido lácticas. 2. Enterococcus. 3.
Leite de búfala. 4. Microencapsulação. 5. Probióticos.
I. de Souza da Motta, Amanda, orient. II. Monks
Jantzen, Márcia, coorient. III. Título.

“Não é a morte que me importa, porque ela é um fato. O que me importa é o que eu faço da minha vida, enquanto a minha morte não acontece, para que essa vida não seja banal, superficial, fútil e pequena”.

Mário Sérgio Cortella

AGRADECIMENTOS

Gratidão é um dos sentimentos mais importantes que podemos expressar e não poderia deixar de agradecer a tantas pessoas que tornaram a conclusão deste ciclo possível. Primeiramente agradeço a Deus, por permitir que eu permanecesse forte e saudável durante estes dois anos.

Agradeço imensamente às pessoas que mais amo: meus pais, Geci e Nauri. Muito obrigada por todo amor e apoio que recebo diariamente, desde meu nascimento. Obrigada por sempre estarem ao meu lado em todas as situações e me perdoe pelos momentos de ausência ou nos quais eu não fui a pessoa que vocês mereciam que eu fosse. Assim como, também agradeço ao meu namorado, Juliano, pelo incentivo em meus estudos. Pelo amor, paciência e compreensão quando eu precisava estudar, estava cansada, com sono, ou me sentia triste.

A minha orientadora Profa. Amanda de Souza da Motta e a minha co-orientadora Márcia Monks Jantzen pelos ensinamentos e paciência durante estes dois anos. A pesquisa me possibilitou aprendizados que eu não teria em outro local.

Quero agradecer também a duas grandes amigas que são extremamente importantes e me apoiaram muito durante esta jornada: Priscila Jankoski e Luciani Cavalini. Muito obrigada por todo carinho, apoio e cumplicidade. Espero que nossa amizade perdure por toda a vida. Agradeço também aos amigos que fiz no laboratório 222-C: Gabriella Araújo, Alberto, Tiela e Letícia. Obrigada pelos momentos de convivência, auxílios, abraços, palavras de carinho. Quero muito que nossa amizade perpetue e possamos manter a convivência.

Aos demais colegas e pessoas especiais que conheci no laboratório 222-C: Ingrid, Maya, Daniel, Rosana, Dejô, Dai, Fran, Júlia, Ludi, Natasha, Nati, Luana, Salise, Vanise, Gabriela Breyer, Melina e Renata. Muito obrigada por todo auxílio, conversas, sorrisos, cafés, caronas na autoclave e na lavagem de vidrarias. Agradeço às “vizinhas” do laboratório: Mari, Amanda e Alice pelos momentos de descontração e materiais emprestados.

Às técnicas de laboratório Tai, Ana e Giovana, por sempre terem sido gentis comigo, prestando auxílio quando possível. Muito obrigada também a Eladir (secretária do PPGMAA) por sempre ter me recebido com um sorriso e me ajudado em todas as ocasiões.

Ao Prof. Canal e ao doutorando William do laboratório de Virologia Animal

da Faculdade de Medicina Veterinária, por todo o auxílio na execução dos ensaios com as células Vero. Agradeço a Profa. Marisa Cardoso, ao técnico Gustavo e a doutoranda Tatiana do Setor de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária, pelo empréstimo de equipamentos e espaço para a realização dos ensaios com as células Vero. Obrigada ao servidor Gilberto Mesquita do Núcleo de Assessoria Estatística por todo auxílio e ensinamentos com as análises estatísticas.

A minha família, principalmente as minhas afilhadas pela paciência, compreensão quando eu estava ausente e pelas palavras de incentivo. Assim como as minhas amigas por compreender minha ausência.

Às Profas. Ana Paula Folmer Corrêa, Fabiane Picinin de Castro Cislighi, Gertrudes Corção e Graziela Bruschi Brinques por aceitarem o convite para participar como membros da Banca Examinadora.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

AVALIAÇÃO *in vitro* DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE *Enterococcus faecium* ISOLADOS DE LEITE BUBALINO

Autor: Jéssica Nastácia Pires Kurtz

Orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Amanda de Souza da Motta

Co-orientador(a): Prof^(a). Dr^(a). Márcia Monks Jantzen

RESUMO

O leite de búfala constitui-se de uma matriz alimentar pouco explorada funcionalmente, entretanto, alguns autores demonstraram resultados promissores através da sua utilização em derivados lácteos. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial probiótico de bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de leite de búfala cru resfriado, assim como a manutenção de sua viabilidade em uma matriz alimentar. As BAL foram identificadas através de sequenciamento do gene 16S rRNA como pertencentes ao gênero *Enterococcus*, sendo que dois isolados foram classificados como *E. faecalis* e três como *E. faecium*. Todas as BAL tiveram atividade hemolítica classificada como gama hemólise (ausência de hemólise) e apresentaram resultados negativos para a hidrólise de gelatina. Após a avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos, *E. faecium* M7AN7-1 e *E. faecium* M7AN10 mostraram-se susceptíveis a todos os antimicrobianos testados, sendo selecionadas para a realização de ensaios que avaliaram a manutenção da viabilidade celular em diferentes condições, assim como o potencial probiótico de ambas. *E. faecium* M7AN10 apresentou as maiores concentrações de células viáveis em relação a *E. faecium* M7AN7-1, após 180 min em contato com o fluido gástrico simulado (FGS), obtendo $7,19 \pm 0,59 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$. Por esta razão, essa BAL foi selecionada para ser microencapsulada em alginato de sódio. As microcápsulas contendo *E. faecium* M7AN10 foram aplicadas em bebida láctea UHT, observando-se a manutenção da viabilidade celular e sua liberação neste meio durante 30 dias. No 30º dia em contato com este derivado lácteo, $7,37 \pm 0,45 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ haviam sido liberados nesta matriz alimentar. Os resultados obtidos na avaliação *in vitro* demonstraram que *E. faecium* M7AN10 apresentou a inocuidade e viabilidade necessárias para ser sugerida como uma cultura potencialmente probiótica, obtendo contagens de células viáveis iguais ou superiores a $6 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$.

Palavras-chave: Bactérias ácido lácticas; *Enterococcus*; leite de búfala; microencapsulação; probióticos.

In vitro EVALUATION OF THE PROBIOTIC POTENTIAL OF *Enterococcus faecium*
ISOLATED OF BUFFALO MILK¹

Author: Jéssica Nastácia Pires Kurtz

Advisor: Prof. Dr. Amanda de Souza da Motta

Co-Advisor: Prof. Dr. Márcia Monks Jantzen

ABSTRACT

Buffalo milk is a poorly functionally exploited food, however, some authors have shown promising results through their use in dairy products. The aim of the present study was to evaluate the probiotic potential of lactic acid bacteria (LAB), isolated from cooled raw buffalo milk, as well as the evaluation of the maintenance of its viability in a food matrix. The LAB were identified by sequencing the 16S rRNA gene as belonging to the genus *Enterococcus*, where two isolates were classified as *E. faecalis* and three as *E. faecium*. All LAB had hemolytic activity classified as hemolysis γ (non-hemolytic) and presented negative results for the hydrolysis of gelatin. After the antimicrobial susceptibility assessment, *E. faecium* M7AN7-1 and *E. faecium* M7AN10 were susceptible to all the antimicrobials tested, being selected to carry out tests that evaluated the maintenance of cell viability in different conditions, as well as potential probiotic of both LAB. *E. faecium* M7AN10 presented the highest concentrations of viable cells in relation to *E. faecium* M7AN7-1, after 180 min in contact with simulated gastric fluid (SGF), obtaining $7.19 \pm 0.59 \text{ Log}_{10} \text{ CFU mL}^{-1}$. For this reason, this LAB was selected to be microencapsulated in sodium alginate. The microcapsules containing *E. faecium* M7AN10 were applied in UHT milk beverage, observing the maintenance of cell viability and its release in this medium for 30 days. On the 30th day in contact with this dairy derivative, $7.37 \pm 0.45 \text{ Log}_{10} \text{ CFU mL}^{-1}$ had been released in this food. The results obtained in the *in vitro* evaluation demonstrated that *E. faecium* M7AN10 presented the innocuity and viability necessary to be suggested as a potential probiotic culture, obtaining viable cell counts equal to or greater than $6 \text{ Log}_{10} \text{ CFU mL}^{-1}$.

Keywords: Lactic acid bacteria; *Enterococcus*; buffalo milk; microencapsulation; probiotics.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (76 p.)
March, 2019.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	2
2.1	Objetivo Geral.....	2
2.2	Objetivos Específicos.....	2
3.	REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1	Leite de búfala (<i>Bubalus bubalis</i>).....	3
3.2	Bactérias ácido lácticas - BAL.....	4
3.2.1	Gênero <i>Enterococcus</i>	5
3.3	Potencial probiótico das BAL.....	6
3.4	Alimentos probióticos produzidos com leite de búfala.....	7
3.5	Desenvolvimento de novos produtos contendo culturas probióticas.	8
3.6	Microencapsulação como alternativa para a manutenção da viabilidade das culturas robióticas.....	9
4.	MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1	Reativação das culturas de bactérias ácido lácticas.....	12
4.2	Identificação das bactérias ácido lácticas.....	12
4.2.1	Extração de DNA.....	12
4.2.2	Amplificação do gene 16S rRNA.....	13
4.2.3	Sequenciamento do gene 16S rRNA.....	13
4.3	Avaliação da produção de substâncias antimicrobianas por bactérias ácido lácticas pelo método de difusão em ágar com discos.....	13
4.4	Avaliação dos aspectos de inocuidade das bactérias ácido lácticas.....	14
4.4.1	Atividade hemolítica.....	14
4.4.2	Hidrólise de gelatina.....	15
4.4.3	Avaliação da susceptibilidade das bactérias ácido lácticas aos antimicrobianos.....	15
4.5.	Avaliação da estabilidade das bactérias ácido lácticas em diferentes temperaturas.....	16
4.5.1	Preparo do inóculo bacteriano.....	16
4.5.2	Avaliação da manutenção e viabilidade das bactérias ácido lácticas	

	através da contagem em placa.....	16
4.5.3	Avaliação da tolerância das bactérias ácido lácticas a refrigeração...	17
4.5.4	Avaliação da tolerância das bactérias ácido lácticas ao congelamento.....	17
4.5.5	Avaliação da tolerância das bactérias ácido lácticas a liofilização....	17
4.6	Avaliação do potencial probiótico das bactérias ácido lácticas.....	18
4.6.1	Avaliação da tolerância das bactérias ácido lácticas aos sais biliares..	18
4.6.2	Avaliação da tolerância das bactérias ácido lácticas ao fluido gástrico simulado.....	18
4.6.3	Avaliação da tolerância das bactérias ácido lácticas ao fluido intestinal simulado.....	19
4.6.4	Avaliação das propriedades de adesão das bactérias ácido lácticas	19
4.7	Avaliação dos genes de resistência e virulência das bactérias ácido lácticas.....	20
4.7.1	Detecção dos genes relacionados a resistência antimicrobiana.....	20
4.7.2	Detecção dos genes relacionados a virulência.....	22
4.8	Seleção da bactéria ácido láctica com potencial probiótico para microencapsulação.....	23
4.8.1	Avaliação da eficiência de encapsulação das bactérias ácido lácticas.....	24
4.9	Avaliação da manutenção das culturas de bactérias ácido lácticas encapsuladas.....	24
4.10	Avaliação da viabilidade da bactéria ácido láctica encapsulada e aplicada em bebida láctea UHT.....	25
4.11	Análise estatística.....	25
5.	RESULTADOS	26
5.1	Caracterização das bactérias ácido lácticas e identificação através de sequenciamento do gene 16S rRNA.....	26
5.2	Produção de substâncias antimicrobianas pelas bactérias ácido lácticas.....	26
5.3	Avaliação da inocuidade das bactérias ácido lácticas.....	27
5.3.1	Atividade hemolítica e hidrólise de gelatina.....	27

5.3.2	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	28
5.4	Determinação da estabilidade das bactérias ácido lácticas em diferentes temperaturas.....	28
5.4.1	Tolerância a refrigeração.....	28
5.4.2	Tolerância ao congelamento.....	29
5.4.3	Tolerância a liofilização.....	30
5.5	Determinação do potencial probiótico das bactérias ácido lácticas.	31
5.5.1	Tolerância aos sais biliares.....	31
5.5.2	Tolerância ao fluido gástrico simulado.....	32
5.5.3	Tolerância ao fluido intestinal simulado.....	33
5.5.4	Propriedades de adesão das bactérias ácido lácticas.....	34
5.6	Detecção dos genes de virulência e resistência a antimicrobianos nas bactérias ácido lácticas.....	35
5.7	Seleção da bactéria ácido láctica com potencial probiótico para microencapsulação.....	35
5.7.1	Eficiência de encapsulação das bactérias ácido lácticas.....	36
5.8	Manutenção das culturas de bactérias ácido lácticas encapsuladas.....	36
5.9	Viabilidade de <i>E. faecium</i> M7AN10 encapsulada e aplicada em bebida láctea UHT.....	38
6.	DISCUSSÃO	40
7.	CONCLUSÃO	50
8.	REFERÊNCIAS	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos iniciadores e os produtos gerados na PCR para a detecção dos genes de resistência a antimicrobianos nas BAL.....	21
Tabela 2 - Condições utilizadas para a amplificação de genes relacionados a resistência a antimicrobianos nas BAL.....	22
Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores e os produtos gerados na PCR para a detecção de genes relacionados a fatores de virulência nas BAL.....	22
Tabela 4 – Condições utilizadas para a amplificação de genes relacionados a fatores de virulência nas BAL.....	23
Tabela 5 - Identificação das BAL M2A4, M2AN5, M7AN7, M7AN7-1 e M7AN10 através do sequenciamento do gene 16S rRNA.....	26
Tabela 6 - Média dos halos de inibição em mm, formados pelas BAL frente a indicadora <i>C. fimi</i> NCTC 7547, através dos sobrenadantes livres de células com pH neutro (6) e ácido (4-5), obtidos de inóculos com incubação de 24 e 48 h.....	27
Tabela 7 - Viabilidade de <i>E. faecium</i> M7AN7-1, <i>E. faecium</i> M7AN10 e <i>L. rhamnosus</i> ao resfriamento em leite em pó desnatado 10% durante 7, 14, 21 e 30 dias.....	29
Tabela 8 - Viabilidade de <i>E. faecium</i> M7AN7-1, <i>E. faecium</i> M7AN10 e <i>L. rhamnosus</i> ao congelamento em leite em pó desnatado 20% durante 30, 60 e 90 dias.....	30
Tabela 9 - Viabilidade de <i>E. faecium</i> M7AN7-1, <i>E. faecium</i> M7AN10 e <i>L. rhamnosus</i> ao processo de liofilização em leite em pó desnatado 20%, durante 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.....	31
Tabela 10 - Viabilidade de <i>E. faecium</i> M7AN7-1, <i>E. faecium</i> M7AN10 e <i>L. rhamnosus</i> , a 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1% de sais biliares pelo período de 4 h.....	32
Tabela 11 - Viabilidade de <i>E. faecium</i> M7AN7-1, <i>E. faecium</i> M7AN10 e <i>L. rhamnosus</i> ao fluido gástrico simulado (FGS) durante 60, 90 e 180 min.....	33

Tabela 12 - Viabilidade de <i>E. faecium</i> M7AN7-1, <i>E. faecium</i> M7AN10 e <i>L. rhamnosus</i> ao fluído intestinal simulado (FIS) pelo período de 60, 90, 180 e 240 min.....	34
Tabela 13 - Medições de pH do leite integral UHT e caldo MRS com microcápsulas de <i>E. faecium</i> M7AN10 e <i>L. rhamnosus</i> , durante o período de 30 dias.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Contagem de células viáveis de <i>E. faecium</i> M7AN7-1, <i>E. faecium</i> M7AN10 e <i>L. rhamnosus</i> antes e após 4 h em contato com as células Vero.....	35
Figura 2 - Contagem de células viáveis de <i>L. rhamnosus</i> e <i>E. faecium</i> M7AN10 antes e após a microencapsulação. Resultados se apresentam em média \pm desvio padrão.....	36
Figura 3 - Microcápsulas contendo <i>E. faecium</i> M7AN10 e <i>L. rhamnosus</i> aplicadas em caldo MRS e leite integral UHT.....	37
Figura 4 - Contagem de células viáveis de <i>E. faecium</i> M7AN10 e <i>L. rhamnosus</i> liberadas das microcápsulas em leite integral UHT e caldo MRS durante 7, 15, 20 e 30 dias. Resultados se apresentam em média \pm desvio padrão.....	38
Figura 5 - Microcápsulas contendo <i>E. faecium</i> M7AN10 e <i>L. rhamnosus</i> aplicadas em bebida láctea UHT.....	39
Figura 6 - Contagem de células viáveis de <i>E. faecium</i> M7AN10 liberadas das microcápsulas em bebida láctea UHT durante 7, 15, 20 e 30 dias. Resultados se apresentam em média \pm desvio padrão.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAL	Bactéria Ácido Láctica
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
COOPERBÚFALO	Cooperativa Sulriograndense de Bubalinocultores
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESD	Extrato Seco Desengordurado
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FGI	Fluído Gástrico Simulado
FIS	Fluído Intestinal Simulado
HCl	Ácido clorídrico
LPSN	<i>List of prokaryotic names with standing in nomenclature</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MEM	Meio Essencial Mínimo
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MRS	<i>Man, Rogosa and Sharpe</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
rpm	Rotações por minuto
SAA	Secretaria de Agricultura e Abastecimento

SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SPSS	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
TAE	Tris-Acetato-EDTA
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

1. INTRODUÇÃO

O leite de búfala é uma matriz alimentar que possui altos teores de cálcio, fósforo e vitamina A, além de possuir teor nutricional mais elevado do que o leite bovino, apresentando maiores índices proteicos e de sólidos totais. Gradualmente, o leite bubalino vem ganhando espaço no desenvolvimento de novos produtos alimentícios, devido a se mostrar como uma excelente fonte para a elaboração de derivados lácteos. Entretanto, pouco se conhece a respeito da microbiota ácido láctica presente neste alimento.

As bactérias ácido lácticas produzem ácido láctico como o principal produto final da fermentação de carboidratos, sendo muito apreciadas pelas indústrias alimentícias. Isso se deve a sua capacidade de atribuir aos alimentos características como aroma, melhoria das propriedades sensoriais, proteção contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes, além de muitas delas possuírem propriedades probióticas.

A busca por alimentos funcionais, com características benéficas à saúde humana está em ascensão, pois além de auxiliarem na regulação da microbiota intestinal, podem exercer funções importantes na redução do risco de doenças. Atualmente existem diversos produtos contendo probióticos, sendo a maioria composta pelos derivados lácteos como iogurtes e leites fermentados. Porém, é necessária a avaliação das características dessas culturas nesses alimentos, com o objetivo de verificar se as mesmas continuam viáveis.

O processo de avaliação das características probióticas de uma bactéria ácido láctica possui várias etapas e demanda tempo. No entanto, torna-se necessário, pois a inocuidade destes micro-organismos, assim como a sua viabilidade são fatores de extrema relevância para a inserção dos mesmos em alimentos, e conseqüentemente, seu consumo.

Diante do exposto, este estudo torna-se importante, pois a avaliação do potencial probiótico de bactérias lácticas isoladas do leite bubalino, pode indicar a existência de culturas com características desejáveis para o desenvolvimento de produtos lácteos, contendo micro-organismos autóctones.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial probiótico de bactérias ácido lácticas isoladas de leite de búfala cru resfriado, assim como a manutenção de sua viabilidade em uma matriz alimentar.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Identificar as bactérias ácido lácticas isoladas de leite bubalino a serem estudadas, quanto ao seu potencial probiótico;
- 2.2.2 Avaliar a inocuidade das bactérias ácido lácticas;
- 2.2.3 Avaliar a estabilidade e viabilidade das bactérias ácido lácticas em condições de simulação do trato gastrointestinal;
- 2.2.4 Promover a microencapsulação das bactérias ácido lácticas selecionadas;
- 2.2.5 Avaliar a viabilidade das bactérias ácido lácticas selecionadas em uma matriz alimentar.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Leite de búfala (*Bubalus bubalis*)

O leite de búfala constitui-se de uma matriz alimentar pouco explorada funcionalmente, entretanto, alguns autores demonstram resultados promissores através da sua utilização em derivados lácteos, desenvolvendo sorvetes e iogurtes (MONTEIRO et al., 2015; GUIMARÃES, 2015; GUIMARÃES e SILVA, 2014). Além disso, produtos como muçarela, requeijão, manteiga, doce de leite e creme de leite pasteurizado, elaborados com leite de búfala, são produzidos e comercializados no Brasil.

Referente à regulamentação desta matéria-prima, o Brasil possui apenas uma legislação que estabelece diretrizes sobre o leite bubalino. Trata-se da Resolução SAA - 24, de 01 de agosto de 1994, do Estado de São Paulo, que dispõe sobre normas técnicas de produção e classificação dos produtos de origem animal e as relativas às atividades de fiscalização e inspeção destes produtos. Os parâmetros exigidos para que o leite bubalino seja considerado normal, presentes nessa legislação são: características organolépticas normais para a espécie; teor de gordura mínimo de 4,5%; acidez em graus Dornic entre 14 e 23, com pH entre 6,40 e 6,90; extrato seco desengordurado (E.S.D.) mínimo de 8,57%; densidade a 15 °C entre 1,028 e 1,034 e índice crioscópico entre -0,520 °C e -0,570 °C. Porém, nos demais estados do país não há nenhuma norma que inclua orientações específicas sobre o leite de búfala. A alternativa nesta situação é consultar a Instrução Normativa Nº 76/2018 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que estabelece as diretrizes a respeito do leite bovino (BRASIL, 2018).

De acordo com dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, no ano de 2017 o rebanho bubalino no Brasil era composto por 1.351.631 animais, sendo o Pará o estado com maior representatividade. No Rio Grande do Sul existem aproximadamente 58.148 cabeças de búfalos (MAPA, 2018).

Apesar da produção leiteira bubalina ocorrer em menor escala, quando comparada com a bovina, a mesma está em expansão. A Embrapa Gado de Leite demonstrou que em termos mundiais, no ano de 2017 foram produzidos 120.353.075 litros de leite bubalino, enquanto que em 1991 a produção era de 44.400.899 litros (EMBRAPA, 2019). No Brasil, a produção do leite de búfala obteve registros de aproximadamente 92,3 milhões de litros de leite ao ano (SILVA, 2015).

Segundo Damé e Silva (2003), o estado do Rio Grande do Sul possui condições para usufruir do potencial leiteiro destes animais, o que é corroborado pelos dados apresentados pela Cooperativa Sulriograndense de Bubalinocultores (COOPERBÚFALO-RS), demonstrando que são produzidos em torno de 130 mil litros de leite de búfala por ano no Estado (DAMÉ et al., 2010).

O leite bubalino possui menor teor de colesterol, maior índice proteico e de sais minerais, quando comparado ao leite bovino, podendo ser utilizado para o desenvolvimento de produtos lácteos de maior qualidade nutricional (PRICHULA et al., 2013; DAMÉ e SILVA, 2003). Além disso, este leite contém alto teor de lactose, sólidos totais e gordura, o que aumenta seu rendimento na elaboração de derivados com maior valor nutritivo (SILVA e NARDI JUNIOR, 2014). Os sólidos totais são definidos como todos os componentes do leite, exceto a água, e nestes componentes estão incluídas as proteínas, que são produtos dotados de alto valor nutricional, contribuindo para a estabilidade das características físico-químicas dos alimentos, assim como, para suas propriedades nutricionais (BRITO et al., 2017; GALLO, 2017).

Além das características citadas anteriormente, o leite de búfala possui sabor adocicado e coloração branca devido à ausência de pigmentos carotenóides e ainda, constitui-se fonte de vitamina A, apresentando elevada quantidade de cálcio e fósforo em sua composição (DAMÉ et al., 2010; MONTEIRO et al., 2015).

3.2 Bactérias ácido lácticas - BAL

As bactérias ácido lácticas (BAL) são classificadas como gram-positivas, catalase negativa, não esporuladas, que produzem ácido láctico como produto final da fermentação de carboidratos (POFFO e SILVA, 2011). Possuem morfologia de cocos ou bastonetes, sendo encontradas em uma ampla variedade de habitats que vão desde o sistema urogenital, respiratório e digestivo de animais, além de produtos cárneos, legumes, bebidas e derivados lácteos (NASCIMENTO 2017; SILVA, 2015). Hill et al. (2017) atribuem como os principais representantes das BAL os gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*.

Algumas espécies destes micro-organismos são capazes de produzir compostos aromáticos através da utilização de citrato, função muito apreciada pelas indústrias alimentícias na produção de derivados lácteos. Além disso, a qualidade

sanitária dos alimentos, sua vida útil e características sensoriais podem ser beneficiadas através de determinadas vias metabólicas (NASCIMENTO, 2017). Segundo Gaspar et al. (2013), devido a sua rápida capacidade de produzir ácidos, como o láctico e o acético, as BAL são muito importantes na prevenção de microorganismos patogênicos e deteriorantes em alimentos, dificultando o seu estabelecimento através da produção desses ácidos orgânicos. O ácido láctico é o principal produto final, obtido a partir da fermentação de carboidratos, o que juntamente com os processos de redução de lactose, e melhora das características físicas, químicas e sensoriais, garante a essas bactérias, elevada importância para a indústria de alimentos (JERONYMO-CENEVIVA et al., 2014).

O leite bubalino possui uma alta diversidade de BAL que conferem sabor e aroma a seus derivados, dentre outros atributos importantes, como a produção de compostos antimicrobianos, que atuam na inibição de patógenos (PAULA et al., 2014; SHIBY e MISHRA, 2013). Silva et al. (2015) encontraram representantes das espécies *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* e *Streptococcus thermophilus* em soro de queijo muçarela de búfala ao avaliar a sua microbiota láctica autóctone.

3.2.1 Gênero *Enterococcus*

Os *Enterococcus* spp. são bactérias gram-positivas, catalase negativa, que possuem morfologia de cocos, podendo apresentar-se aos pares, em cadeias curtas ou com células isoladas. De acordo com Giraffa (2003), estes microorganismos suportam amplas faixas de temperatura (entre 10 e 45 °C), pH (de 4 a 9,6) e sais (6,5% de NaCl), sendo capazes de tolerar a bile e fermentar manitol (SHERMAN, 1937).

Segundo a *List of prokaryotic names with standing in nomenclature*, 58 espécies de *Enterococcus* foram descritas na literatura (LPSN, 2019). Os principais representantes do gênero, que vêm sendo isolados de alimentos são *E. faecium*, *E. faecalis* e *E. durans* (OLVERA-GARCÍA et al., 2018; MAIA et al., 2017; SILVA et al., 2015). Além disso, *E. faecium* e *E. durans* têm sido avaliados quanto ao seu potencial probiótico, demonstrando aptidão para este uso (BAGCI et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2018; PIENIZ et al., 2014).

3.3 Potencial probiótico das BAL

Os probióticos são micro-organismos vivos que quando ingeridos em quantidades adequadas, podem conferir efeitos benéficos para a saúde do indivíduo, possuindo a capacidade de se aderir às células intestinais humanas, produzir substâncias antimicrobianas que inibam patógenos, tolerar os sais biliares e os fluídos gastrintestinais (FAO/WHO, 2001).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), as bactérias reconhecidas como probióticas são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei rhamnosus*, *Lactobacillus casei defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *Bifidobacterium lactis*), *Bifidobacterium longum* e *E. faecium*, sendo que a quantidade mínima viável deve ser de 10^8 a 10^9 UFC (unidades formadoras de colônia) na recomendação diária de produtos prontos para o consumo (BRASIL, 2008).

No entanto, a Gerência Geral de Alimentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária vem elaborando uma lista de linhagens probióticas, e divulgou três novas linhagens que foram consideradas aptas para a inclusão na lista de probióticos autorizados para o uso em suplementos alimentares, sendo elas: *Bacillus coagulans* GBI-30, *Bifidobacterium lactis* HN019 e *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 (ANVISA, 2017).

Atualmente, a Resolução da Diretoria Colegiada RDC N° 241 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos, porém, nesse documento não estão descritos os micro-organismos reconhecidos como probióticos, tampouco sua quantidade mínima viável (BRASIL, 2018).

Hill et al. (2017) atribuem como um fator de interesse em pesquisas envolvendo BAL probióticas, a capacidade destes micro-organismos produzirem substâncias antimicrobianas, as quais, potencialmente apresentam aplicações industriais em diversos segmentos. Essas bactérias exercem efeito benéfico na saúde de quem as consome, utilizando os nutrientes da dieta e impedindo que bactérias patogênicas se estabeleçam. Desta forma, dentre os benefícios atribuídos aos probióticos em relação à saúde humana, pode-se citar a resistência a patógenos, modulação do sistema imune e prevenção a doenças cardíacas, alergias, infecções urogenitais e câncer (RAJOKA et al., 2017).

Relatos sobre a avaliação do potencial probiótico de BAL isoladas de leite cru de búfala são escassos na literatura. Quando os trabalhos se referem a esta matriz, estes utilizam em sua maioria o próprio queijo muçarela de búfala ou então o soro deste queijo. Jeronymo-Ceneviva et al. (2014) avaliaram as propriedades probióticas de BAL isoladas do soro de muçarela de búfala utilizando ensaios que observavam seu comportamento em condições gastrintestinais simuladas, a presença de genes de virulência e a capacidade de auto agregação e co-agregação. Estes micro-organismos foram identificados como *L. casei* SJRP35, *Leuconostoc citreum* SJRP44, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SJRP57 e *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* SJRP58.

Ao avaliar o potencial probiótico de uma bactéria, vários ensaios devem ser realizados a fim de se comprovar se a mesma atende a critérios específicos para ser considerada como uma cultura probiótica. De acordo com Vandemplas et al., (2015), o micro-organismo deve ser capaz de resistir ao fluído gástrico, assim como ao fluído intestinal e sais biliares, chegando ao intestino em quantidades viáveis que sejam estabelecidas para produtos probióticos. Ainda assim, a Organização Mundial da Saúde estabelece diretrizes para a avaliação do potencial probiótico de bactérias, em que devem ser levados em consideração aspectos como adesão às células intestinais e atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas, de forma a reduzir a adesão dessas bactérias através da produção de compostos, como as bacteriocinas, por exemplo (FAO/WHO, 2002). Além das características citadas anteriormente, a cultura probiótica não deve apresentar resistência a antimicrobianos. É necessário que o micro-organismo apresente tolerância ao frio, mantendo-se estável no produto sem diminuir drasticamente a contagem de células viáveis e seja inócuo (NASCIMENTO, 2017).

Meira et al. (2012) avaliaram o potencial probiótico de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo produzido com leite cru de ovelha e verificaram que nem todas as bactérias possuíam as características necessárias, sendo estas características variáveis entre as cepas, mesmo pertencendo a mesma espécie.

3.4 Alimentos probióticos produzidos com leite de búfala

O atual consumo de alimentos funcionais e suplementos que contenham probióticos, tem como objetivo a promoção do bem-estar e cuidados com a saúde, de modo a se reduzir o risco de doenças, ao invés de tratá-las posteriormente

(FOLIGNÉ et al., 2013). Porém, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), salienta que para a obtenção de efeitos benéficos e equilíbrio da microbiota intestinal, promovidos por probióticos, devem estar associados hábitos de vida saudáveis e a alimentação equilibrada (BRASIL, 2008).

A maneira mais comum de se ingerir probióticos em uma dieta é através do consumo de produtos lácteos, visto que estes são os veículos mais utilizados para a incorporação de culturas probióticas, devido ao fato de serem armazenados geralmente em temperaturas de refrigeração e por possuírem características próprias que contribuem com a manutenção e a viabilidade destes micro-organismos (SONG et al., 2012).

Conforme citado anteriormente, são escassos os trabalhos que envolvam o isolamento de bactérias probióticas de leite bubalino. O que há disponível na literatura, refere-se à produção de alimentos com esta matriz, mas através da adição de bactérias probióticas comerciais, e não com as autóctones (MURTAZA et al., 2017). Um exemplo trata-se do sorvete de iogurte simbiótico produzido com leite de búfala e enriquecido com açaí desenvolvido por Monteiro et al. (2015), em que os autores utilizaram como culturas probióticas *Bifidobacterium* spp. e *L. acidophilus* adquiridas comercialmente.

Semelhante à pesquisa citada acima, ao produzirem queijo cheddar probiótico, utilizando leite bubalino pasteurizado, juntamente com culturas *starter* e bactérias probióticas adquiridas comercialmente, Murtaza et al. (2017) observaram que este queijo pode ser utilizado como um veículo para a inclusão de probióticos, visto que a temperatura de maturação utilizada (12 – 14 °C) não afetou a viabilidade dos micro-organismos.

Da mesma forma, Faria et al. (2006) produziu leite de búfala fermentado com a cultura comercial de *L. casei* subsp. *casei*. Os autores observaram que durante o período de 30 dias, e armazenamento em temperaturas de 5 e 10 °C, esse micro-organismo manteve sua viabilidade em leite fermentado garantindo o potencial probiótico.

3.5 Desenvolvimento de novos produtos contendo culturas probióticas

O desenvolvimento de novos produtos contendo culturas probióticas vem se tornando uma realidade, entretanto, a maioria dos itens que contêm micro-organismos probióticos são derivados lácteos. Porém, com o objetivo de conquistar

novos consumidores, a indústria de alimentos está diversificando estes produtos e incluindo culturas probióticas em chocolate, sucos de frutas e barras de cereais (SILVA, 2016).

Os produtos lácteos mais utilizados para a incorporação de culturas probióticas são queijos, iogurtes, leites fermentados e bebidas lácteas (MURTAZA et al., 2017; PATRIGNANI et al., 2017; CAPITANI et al., 2014). Contudo, essas culturas poderiam ser incorporadas em outros derivados lácteos menos convencionais como manteigas, sorvetes, sobremesas lácteas, requeijão, creme e doce de leite. Monteiro et al. (2015) desenvolveram e avaliaram a qualidade de sorvete de iogurte simbiótico, demonstrando que além de atender aos padrões microbiológicos estabelecidos pela RDC 12/2001, legislação que aprova o Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos, este sorvete também obteve características sensoriais satisfatórias e qualidade nutricional, evidenciada através dos teores lipídicos e proteicos.

Ainda, sobre a incorporação de culturas probióticas em derivados lácteos não tradicionais, Aragon-Alegro et al. (2007) elaboraram mousse de chocolate potencialmente probiótico, armazenando-o por 28 dias em temperatura de 4 ± 1 °C. Os autores observaram que a cultura probiótica de *L. paracasei* subsp. *paracasei* manteve sua viabilidade, permanecendo com contagens acima de $7 \text{ Log}_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ durante todo o período de armazenamento. Resultados semelhantes foram encontrados por Rosa et al. (2016), que produziram sobremesa láctea de chocolate probiótica com a cultura de *L. acidophilus*, sendo as mesmas armazenadas em temperatura de 8 °C por 28 dias. Ao final desse período, a viabilidade da cultura probiótica manteve-se acima de $8 \text{ Log}_{10} \text{ UFC g}^{-1}$.

A diversificação de produtos contendo culturas probióticas é uma maneira de atrair novos consumidores, visto que a busca por alimentos funcionais, o cuidado com a saúde e o bem-estar estão cada vez mais em evidência.

3.6 Microencapsulação como alternativa para a manutenção da viabilidade das culturas probióticas

O processo de microencapsulação é utilizado para aprisionar micro-organismos em uma matriz encapsulante, que ofereça proteção à cultura de interesse (KRASAEKOOPT et al., 2003). A microencapsulação de culturas probióticas tem como finalidade a manutenção da viabilidade destes micro-

organismos durante o trânsito gastrointestinal, até sua chegada ao intestino, assim como a proteção contra as injúrias causadas pelos processos de produção, logística e armazenamento dos alimentos (PATRIGNANI, 2017; BARBOSA e TEIXEIRA, 2017).

Os principais métodos de microencapsulação são conhecidos como extrusão e emulsificação, porém há outras técnicas que podem ser utilizadas, como atomização, coacervação complexa e leite fluidizado (SARAO e ARORA, 2017; AZEREDO, 2005). A técnica de extrusão consiste em utilizar um agente encapsulante que será adicionado a uma suspensão bacteriana, para que esta mistura possa ser ejetada em uma solução catiônica. Dentre os encapsulantes e soluções catiônicas amplamente utilizados, encontram-se o alginato de sódio e o cloreto de cálcio, respectivamente (KRASAEKOOPT et al., 2003).

O alginato de sódio é um polissacarídeo oriundo de algumas espécies de algas, sendo muito apreciado pela indústria de alimentos devido a ser atóxico, possuir baixo custo, fácil manuseio e resistência ao aquecimento (SURONO et al., 2018). Sua utilização para a microencapsulação de probióticos tem sido descrita na literatura, demonstrando resultados promissores. Todorov et al. (2012) encapsularam *L. plantarum* ST16Pa em alginato de sódio nas concentrações de 2, 3 e 4% através do método de extrusão e avaliaram a exposição de culturas livres e encapsuladas, em condições gástricas simuladas. Os autores verificaram que o alginato protegeu a cultura bacteriana independente da concentração utilizada e que o decréscimo na viabilidade dos micro-organismos encapsulados foi de 1,2 logs, enquanto a cultura livre teve sua contagem reduzida em 5 logs. De maneira semelhante, Sousa et al. (2012) encapsularam *L. paracasei* L26, *L. casei*-01, *L. acidophilus* Ki e *B. animalis* BB-12 em alginato 2% armazenando as microcápsulas em temperaturas de 21, 4, -20 e -80 °C por um período de seis meses. Os resultados apresentados pelos autores demonstraram que a perda de viabilidade foi menor nas microcápsulas armazenadas em temperaturas de congelamento.

A viabilidade dos micro-organismos encapsulados pode ser aumentada através da utilização de oligossacarídeos como agentes co-encapsulantes em combinação com o alginato. Recentemente Liao et al. (2019), através do método de extrusão, avaliaram a encapsulação de *L. fermentum* L17 utilizando como co-encapsulantes galacto-oligossacarídeos, isomalto-oligossacarídeos, fruto-oligossacarídeos e xilo-oligossacarídeos, combinando-os com alginato e

compararam a utilização deste polímero de forma isolada, na concentração de 2% em todos os tratamentos. Os autores observaram que os micro-organismos tinham sua viabilidade elevada quando o alginato era combinado com oligossacarídeos, do que quando o mesmo era utilizado isoladamente.

De acordo com os estudos relatados acima, os probióticos estão em plena ascensão e sua utilização em derivados lácteos é extremamente promissora. A pesquisa com micro-organismos autóctones possui grande relevância, visto que o leite possui uma microbiota com potencial de aplicação biotecnológico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reativação das culturas de bactérias ácido lácticas

Para a realização dos ensaios iniciais, foram utilizados cinco isolados de bactérias ácido lácticas (BAL) de leite de conjunto cru resfriado, da espécie bubalina, obtidos previamente de um laticínio localizado no município de Cassino/RS. Estes isolados estavam sendo mantidos sob congelamento a -20 °C em leite desnatado e glicerol, ambos na concentração de 10%. O isolamento e a caracterização preliminar através de testes bioquímicos foram realizados em trabalho anterior por Gomes (2013).

A reativação das BAL foi realizada utilizando-se o meio de cultura caldo MRS (*Man, Rogosa and Sharpe*), com incubação a 30 °C durante 48 h. Após esse período, as culturas foram semeadas em meio ágar MRS e a incubação das placas foi feita a 30 °C por 48 h. Para a confirmação da pureza, os micro-organismos foram avaliados quanto as suas propriedades morfotintoriais (coloração de Gram) e a prova da catalase.

4.2 Identificação das bactérias ácido lácticas

4.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada através do método de lise térmica, de acordo com Donato (2007). As BAL foram previamente cultivadas em ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubadas a 30 °C por 24 h. Posteriormente, algumas colônias isoladas foram inoculadas em caldo BHI para serem incubadas nas mesmas condições citadas anteriormente. Após o período de incubação, 1 mL do crescimento bacteriano foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e centrifugado a 13.000 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e 40 µL de solução de lise (solução alcalina contendo SDS - dodecyl sulfato de sódio) foram adicionados ao precipitado, sendo este homogeneizado em vórtex e aquecido por 15 min a 100 °C. Em seguida, foram adicionados 460 µL de tampão TE (que contém 10 mM de Tris para estabilizar o pH e EDTA que sequestra o cálcio; o magnésio preserva o DNA), seguido de homogeneização e centrifugação a 13.000 rpm por 5 min.

4.2.2 Amplificação do gene 16S rRNA

A PCR (reação em cadeia da polimerase) foi realizada em volume total de 25 µL, contendo 1x de tampão de reação da *Taq* (4G®), 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen®), 1,5 mM de MgCl₂ (4G®), 200 µM de dNTPs (Ludwig Biotecnologia®), 1U de *Taq* DNA polimerase (4G®), 100 ng de DNA e água MilliQ estéril para completar o volume da reação. Essa etapa foi conduzida nas condições de 5 min a 94 °C, seguida por 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min e 30 s a 53 °C e 1 min e 30 s a 72 °C, com extensão final de 4 min a 72 °C, através de um Termociclador – 2720 *Thermal Cycler*® (*Applied Biosystems*, Califórnia, EUA), utilizando o oligonucleotídeo iniciador com sequências F C27 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e R 530 5'-CCGCGGCTGCTGGCACGTA-3' (GONTANG et al., 2007). *E. faecalis* ATCC 29212 foi utilizada como controle positivo.

A visualização dos produtos amplificados na PCR foi realizada aplicando 8 µL de cada amostra em gel de agarose na concentração de 1,5%, dissolvido em tris-acetato-EDTA 1x (TAE) e corado com *Blue Green Loading Dye I* (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil), sendo submetidas a uma tensão de 50 volts por 75 min para a migração dos amplicons. A visualização dos fragmentos foi realizada em Transiluminador L.Pix (*Loccus Biotecnologia*®, *Molecular Imaging*).

4.2.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA

Os produtos da PCR foram sequenciados na empresa ACTGene Análises Moleculares (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador ABI-Prism 3500 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*). Os eletroferogramas obtidos foram interpretados através do programa Chromas versão 2.6.4 (Technelysium Pty Ltd) e comparados ao banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

4.3 Avaliação da produção de substâncias antimicrobianas pela bactérias ácido lácticas pelo método de difusão em ágar com discos

No preparo dos pré-inóculos, as BAL foram inoculadas em 4 mL de caldo MRS e incubadas a 30 °C durante 24 h. Após este período, foram retirados 500 µL deste pré-inóculo e adicionados em frascos do tipo Erlenmeyer que continham 50 mL de caldo MRS. Estes frascos foram incubados novamente por 24 h a 30 °C.

Decorrido este tempo, 1000 μL de cada inóculo foram colocados em microtubos de 1,5 mL e centrifugados durante 15 min a 10.000 rpm. Os sobrenadantes livres de células foram retirados e transferidos para novos microtubos, para serem aquecidos durante 10 min a 90 °C. Após, o pH dos sobrenadantes foi aferido e neutralizado com NaOH 0,1N.

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada conforme descrito por Motta e Brandelli (2002) pelo método de difusão em ágar com discos. Alíquotas de 20 μL dos sobrenadantes livres de células, com o pH neutralizado, foram aplicadas sobre discos de papel filtro (6 mm) dispostos em placas de ágar Mueller-Hinton, que haviam sido previamente semeadas com uma suspensão das culturas de *Corynebacterium fimi* NCTC 7547, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Estas suspensões bacterianas foram preparadas de acordo com a escala de turbidez 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). A capacidade de produzir substâncias antimicrobianas também foi avaliada contra as culturas comerciais de *Lactobacillus rhamnosus* (probiótico) e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (starter). A seguir, as placas foram incubadas a 30 °C por 24 h e a medição dos halos de inibição foi expressa em mm.

Este teste também foi realizado com os sobrenadantes livres de células de inóculos incubados na mesma temperatura, mas com período de 48 h de incubação, a fim de se avaliar se a produção de substâncias antimicrobianas ocorreria de forma semelhante ao período de 24 h. Além disso, foram utilizados os sobrenadantes livres de células com o pH ácido (sem neutralizar), com o objetivo de comparar se os resultados seriam análogos aos sobrenadantes livres de células neutralizados. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.4 Avaliação dos aspectos de inocuidade das bactérias ácido lácticas

4.4.1 Atividade hemolítica

A avaliação da atividade hemolítica foi realizada conforme descrito por Maragkoudakis et al. (2009), com modificações. A hemólise de eritrócitos foi observada em placas de ágar Columbia suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, onde as culturas bacterianas foram semeadas em forma de picada e incubadas por 48 h a 35 ± 1 °C. Após esse período, as placas foram

analisadas para avaliar a presença de alfa hemólise (parcial), beta hemólise (total) e gama hemólise (ausência de hemólise). *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo e o teste foi realizado em triplicata.

4.4.2 Hidrólise de gelatina

Para determinar a hidrólise de gelatina, foi realizada a metodologia proposta por Marra et al. (2007), com modificações. As culturas bacterianas foram semeadas em tubos contendo 6 mL de extrato de carne, peptona bacteriológica e gelatina a 12%. Os tubos foram incubados por 48 h a 30 °C e após, levados ao refrigerador a 4 °C por 30 min, para posterior avaliação dos resultados. Nos tubos com micro-organismos que não produzem a enzima gelatinase, o meio permanece sólido e o resultado é negativo. Caso os micro-organismos produzam esta enzima, o meio fica liquefeito e o resultado é positivo. Este ensaio foi realizado em duplicata e *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo. Para o controle negativo foram utilizados apenas os tubos com o meio de cultivo aplicado no teste.

4.4.3 Avaliação de susceptibilidade das bactérias ácido lácticas aos antimicrobianos

A susceptibilidade das BAL aos antimicrobianos foi avaliada através da realização do antibiograma, de acordo com método de Kirby-Bauer. Esta metodologia avalia o grau de susceptibilidade de uma bactéria aos diferentes antimicrobianos, pela técnica de difusão com discos de antibióticos. Para realizar este ensaio, as BAL foram previamente cultivadas em ágar MRS e incubadas a 30 °C por 24 h. Após o crescimento, cada micro-organismo foi transferido para um tubo de ensaio contendo 4 mL de solução salina 0,85%, padronizando-se a sua concentração de acordo com a Escala 0.5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹). A seguir, as culturas foram semeadas em placas de ágar Mueller Hinton utilizando-se um suabe estéril. Os discos de antibióticos foram distribuídos sobre as placas de forma equidistante e as mesmas foram incubadas a 30 °C por 18-24 h, para a avaliação dos halos de inibição.

A escolha dos antimicrobianos levou em consideração as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018), com modificações. Os antimicrobianos utilizados neste ensaio foram: ampicilina 10 µg, vancomicina 30 µg, eritromicina 15 µg, tetraciclina 30 µg, ciprofloxacino 5 µg, norfloxacino 10 µg,

nitrofuratoína 300 µg, cloranfenicol 30 µg e linezolida 30 µg. Além disso, foram utilizados gentamicina 120 µg e estreptomicina 300 µg para avaliar elevados níveis de resistência aos aminoglicosídeos. Os controles de qualidade utilizados para avaliar o desempenho dos discos de antibióticos foram *S. aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

4.5 Avaliação da estabilidade das bactérias ácido lácticas em diferentes temperaturas

Após a identificação das BAL, através do sequenciamento do gene 16S rRNA, e também devido aos resultados obtidos no teste de susceptibilidade a antimicrobianos, foram escolhidos dois isolados de BAL para dar continuidade aos testes que avaliam a estabilidade das culturas, em diferentes temperaturas.

4.5.1 Preparo do inóculo bacteriano

Antes de cada teste, as BAL foram previamente inoculadas em caldo MRS e incubadas a 35 ± 1 °C durante 24 h. Após o período de incubação, a densidade óptica dos inóculos foi aferida em espectrofotômetro Bioespectro SP-220, em comprimento de onda de 600 nm. Para todos os ensaios realizados, foi utilizada como controle a cultura probiótica comercial de *Lactobacillus rhamnosus* e os inóculos iniciais foram padronizados em aproximadamente $8,00 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$.

4.5.2 Avaliação da manutenção e viabilidade das bactérias ácido lácticas através da contagem em placa

A manutenção e viabilidade das BAL, nos testes realizados, foi avaliada através do método descrito por Miles e Misra (1938), com modificações. Ao início e fim de cada ensaio, foi realizada a determinação das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC mL^{-1}) das BAL. Para isso, realizaram-se microdiluições seriadas em solução de NaCl 0,85%, onde 20 µL de cada diluição foram distribuídos sobre placas de Petri contendo meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA), conforme o método de *drop plate*. Feito isso, as placas foram incubadas a 35 ± 1 °C por 24 h para posterior contagem. Os resultados foram expressos em UFC mL^{-1} e transformados em $\text{Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$.

4.5.3 Avaliação da tolerância das bactérias ácido lácticas à refrigeração

Para avaliar a tolerância à refrigeração, foi realizado o método descrito por Zacarías et al. (2011), com modificações. Preparou-se uma solução estéril de água destilada e leite em pó desnatado na concentração de 10%. Após, em criotubos autoclavados, foram distribuídos 500 µL desta solução, nos quais, também foram adicionados 500 µL dos inóculos bacterianos, preparados conforme descrito no item 4.5.1. Os criotubos foram homogeneizados e 100 µL de cada criotubo foram retirados para realizar a contagem inicial de células viáveis através do método de microdiluição (item 4.5.2). As placas com meio de cultura PCA foram incubadas a 35 ± 1 °C por 24 h. A seguir, os criotubos foram levados ao refrigerador por um período de 30 dias, sendo a sua temperatura monitorada diariamente utilizando um termômetro. A manutenção da viabilidade celular foi avaliada semanalmente e este ensaio foi realizado em duplicata.

4.5.4 Avaliação da tolerância das bactérias ácido lácticas ao congelamento

Foi preparada uma solução estéril de água destilada e leite em pó desnatado na concentração de 20%. Após, foram distribuídos 500 µL desta solução e 500 µL dos inóculos bacterianos em criotubos previamente autoclavados, sendo retirados 100 µL de cada criotubo a fim de se realizar a contagem inicial de células viáveis através do método de microdiluição (item 4.5.2). As placas foram incubadas a 35 ± 1 °C por 24 h. Os criotubos foram levados ao congelador e a manutenção da viabilidade celular foi avaliada durante o período de 90 dias, sendo as culturas descongeladas e submetidas à contagem de células viáveis mensalmente. Os criotubos descongelados foram descartados. O teste foi realizado em duplicata, sendo utilizada a metodologia proposta por Zacarías et al. (2011), com modificações.

4.5.5 Avaliação da tolerância das bactérias ácido lácticas à liofilização

Da mesma forma como no item anterior, preparou-se uma solução com água destilada e leite em pó desnatado a uma concentração de 20%. Os inóculos bacterianos foram centrifugados a 8.000 rpm, durante 15 min a uma temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi descartado e a solução de água destilada e leite em pó desnatado foi adicionada ao precipitado, sendo o mesmo ressuspensionado e a contagem inicial de células viáveis realizada (item 4.5.2). Em microtubos de 1,5 mL

previamente autoclavados, foram colocados 300 µL da solução de leite em pó desnatado 20% contendo o inóculo bacteriano. Os microtubos foram levados ao congelador por 24 h e posteriormente ao *freezer* de ultra-congelamento por mais 24 h, para permanecerem no liofilizador durante 48 h até que toda a umidade fosse retirada. Após o processo de liofilização, foi realizada novamente a contagem de células viáveis e as placas foram incubadas a 35 ± 1 °C por 24 h.

Os microtubos contendo as culturas liofilizadas foram estocados em congelador pelo período de seis meses, sendo a manutenção da viabilidade celular avaliada mensalmente através da contagem de células viáveis pelo método de microdiluição. Este experimento foi realizado em duplicata de acordo com Zacarías et al., (2011), com modificações.

4.6 Avaliação do potencial probiótico das bactérias ácido lácticas

Devido aos resultados obtidos nos testes de avaliação da estabilidade das culturas bacterianas, ambos os isolados de BAL foram utilizados na realização dos ensaios que avaliam o potencial probiótico.

4.6.1 Avaliação da tolerância das bactérias ácido lácticas aos sais biliares

Para esta determinação foi realizada a metodologia proposta por Meira et al. (2010), com modificações. Foram preparadas soluções contendo caldo MRS e sais biliares nas concentrações de 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1%. Após, 1000 µL destas soluções foram transferidos para microtubos de 1,5 mL, e cada um destes microtubos recebeu 100 µL de inóculo bacteriano, para serem incubados a 35 ± 1 °C por 4 h. O tratamento controle recebeu caldo MRS sem a adição de sais biliares. A contagem de células viáveis (item 4.5.2) foi realizada no início do teste e após o período de 4 h, sendo as placas incubadas a 35 ± 1 °C por 24 h. Este ensaio foi realizado em triplicata.

4.6.2 Avaliação da tolerância das bactérias ácido lácticas ao fluido gástrico simulado

A tolerância ao fluido gástrico simulado (FGS) foi realizada de acordo com Charteris et al. (1998) com modificações. Este fluido foi preparado utilizando-se uma solução de NaCl na concentração de 0,5% e 0,3 g mL⁻¹ de pepsina, sendo o seu pH ajustado para 2 com HCl 0,1N. Em microtubos de 1,5 mL foram adicionados 300 µL

de uma solução de NaCl 0,5% e 200 μ L dos inóculos bacterianos. A seguir, 500 μ L do FGS foram colocados nestes mesmos microtubos. Porém, o tratamento controle recebeu 500 μ L de solução de NaCl 0,5%, em substituição ao FGS. Os microtubos foram incubados a 35 ± 1 °C durante 180 min e alíquotas de 100 μ L foram retiradas no início do teste e nos tempos 60, 90 e 180 min, a fim de se obter a contagem de células viáveis (item 4.5.2) nos diferentes períodos. As placas foram incubadas a 35 ± 1 °C por 24 h e o ensaio foi realizado em triplicata.

4.6.3 Avaliação da tolerância das bactérias ácido lácticas ao fluido intestinal simulado

O fluido intestinal simulado (FIS) foi composto por uma solução contendo NaCl 0,5% e 0,1 g mL⁻¹ de pancreatina, sendo o pH ajustado para 8 com NaOH 0,1N. Adicionou-se 300 μ L de uma solução de NaCl 0,5% e 200 μ L dos inóculos bacterianos, em microtubos de 1,5 mL. Após, foram acrescentados 500 μ L de FIS nestes mesmos microtubos. O tratamento controle recebeu 500 μ L de solução de NaCl 0,5%, em substituição ao FIS e os microtubos foram incubados a 35 ± 1 °C durante 240 min. A contagem das células viáveis (item 4.5.2) foi realizada no início do teste e após 60, 90, 180 e 240 min, sendo as placas incubadas a 35 ± 1 °C por 24 h. O experimento foi realizado em triplicata, conforme Charteris et al. (1998) com modificações.

4.6.4 Avaliação das propriedades de adesão das bactérias ácido lácticas

Para esta determinação foram seguidos os protocolos propostos por Abbasiliasi et al. (2017), Mousavi et al. (2016) e Todorov e Dicks (2008), com modificações. As BAL foram submetidas a testes de adesão frente as células Vero (células renais de macaco verde africano *Cercopithecus aethiops*). Estas células foram mantidas em Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10.000 U mL⁻¹ de penicilina e 10.000 U mL⁻¹ de estreptomicina, incubadas a 37 °C e atmosfera de CO₂ a 5%. Após as células Vero atingirem a confluência, as mesmas foram adicionadas a uma microplaca de 96 poços para cultivo celular, na concentração de 2×10^5 células e incubadas nas mesmas condições citadas anteriormente, para serem submetidas aos testes no próximo dia.

No dia dos ensaios, o MEM foi retirado dos poços e os mesmos foram lavados três vezes com 200 μ L de PBS pH 7,2 (solução salina tamponada com

fosfato) para retirar os resíduos de antimicrobianos. As culturas de BAL submetidas ao teste foram previamente inoculadas em caldo MRS por 24 h a 35 ± 1 °C, antes de serem utilizadas no experimento. Após o período de incubação, estas culturas foram centrifugadas a 4.000 rpm, a uma temperatura de 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com PBS para ser ressuscitado em MEM livre de antibióticos; 100 µL de cada cultura foram inoculados nos poços contendo células Vero e a microplaca foi incubada a 37 °C durante 4 h. Após esse período, a microplaca foi retirada da estufa e a suspensão bacteriana foi removida. Os poços foram lavados três vezes com 200 µL de PBS de modo a remover as células bacterianas que não estavam aderidas. Em seguida, a adesão foi interrompida pela adição de 200 µL de Triton X-100 0,5%. Microdiluições decimais foram feitas para a determinação do número de células bacterianas aderidas às células Vero. As mesmas foram inoculadas em PCA e as placas foram incubadas a 35 ± 1 °C por 24 h.

O percentual de células bacterianas aderidas às células Vero foi obtido através da relação entre as bactérias que se mantiveram aderidas e as que foram adicionadas no início do teste. Este ensaio foi realizado em triplicata.

4.7 Avaliação da presença de genes de resistência e virulência nas bactérias ácido lácticas

Devido aos resultados obtidos nos ensaios que avaliaram o potencial probiótico das culturas bacterianas, ambas BAL foram selecionadas para a realização de testes que avaliam a presença de genes relacionados a virulência e resistência a antimicrobianos.

4.7.1 Avaliação da presença de genes relacionados à resistência antimicrobiana

As BAL foram selecionadas para caracterização genética de resistência antimicrobiana, independentemente dos resultados obtidos no teste de susceptibilidade a antimicrobianos. A partir das amostras de DNA já extraídas, foram realizadas as PCRs para avaliação da presença dos seguintes genes: *ermB* e *msrC* (resistência à eritromicina), *tetL*, *tetM*, *tetS* (resistência à tetraciclina) e *vanA*, *vanB*, *vanC*₁ e *vanC*₂₋₃ (resistência à vancomicina). Na Tabela 1 é possível visualizar os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR, os genes avaliados, as

sequências iniciadoras de cada oligonucleotídeo, o tamanho do fragmento gerado, assim como as referências consultadas e controles utilizados.

Tabela 1: Oligonucleotídeos iniciadores e os produtos gerados na PCR para a avaliação da presença dos genes de resistência a antimicrobianos nas BAL.

Oligonucleotídeos	Gene	Sequência (5'- 3')	Produto (pb)	Referência	Cepa controle
erm(B)_F erm(B)_R	<i>ermB</i>	GAAAAGGTAAGTCAACCAATA AGTAACGGTACTTAAATGTTTAC	547	Sutcliffe et al. 1996	485 (Medeiros, 2011)
msrC 3 msrC 4	<i>msrC</i>	AAGGAATCCTTCTCTCCG GTAAACAAAATCGTTCCCG	343	Werner et al. 2001	P6.7 (Prichula, 2015)
tet(L)_F tet(L)_R	<i>tetL</i>	ACTCGTAATGGTGTAGTTGC TGTAACCTCCGATGTTTAAACACG	625	Frazzon et al. 2010	P4.1 (Prichula, 2015)
tet(M)_F tet(M)_R	<i>tetM</i>	GTTAAATAGTGTCTTGGAG CTAAGATATGGCTCTAACAA	657	Aarestrup et al. 2000	P6.7 (Prichula, 2015)
tet(S)_F tet(S)_R	<i>tetS</i>	TGGAACGCCAGAGAGGTATT ACATAGACAAGCCGTTGACC	720	Aarestrup et al., 2000	C12 (Medeiros, 2011)
van(A)_F van(A)_R	<i>vanA</i>	TAATTGAGCAGGCTGTTTCG TACTGCAGCCTGATTTGGTC	80	Moura et al. 2015	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212
vanB vanB	<i>vanB</i>	ATGGGAAGCCGATAGTC GATTTCTGTTCTCGACC	635	Dutka-Malen et al. 1995	<i>E. faecalis</i> ATCC 700802
vanC₁ vanC₁	<i>vanC₁</i>	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	822	Dutka-Malen et al. 1995	<i>E. gallinarum</i> 11 (Medeiros, 2011)
vanC₂₋₃ vanC₂₋₃	<i>vanC₂₋₃</i>	CTCCTACGATTCTCTTG CGAGCAAGACCTTTAAG	439	Dutka-Malen et al. 1995	<i>E. casseliflavus</i> J21 (Santestevan et al., 2015)

Pb: pares de base.

As reações de PCR foram realizadas conforme citado anteriormente (item 4.2.2), com exceção dos oligonucleotídeos iniciadores e as condições para a amplificação de cada gene. A visualização dos produtos amplificados em cada PCR, foi realizada conforme descrito no item 4.2.2, sendo interpretadas como positivas as amostras que amplificaram fragmentos nos tamanhos citados na Tabela 1.

Na Tabela 2 é possível observar as temperaturas, a quantidade de ciclos e os tempos utilizados em cada fase da PCR para cada gene avaliado, assim como as referências consultadas.

Tabela 2: Condições utilizadas para a amplificação de genes relacionados à resistência a antimicrobianos nas bactérias ácido lácticas.

Gene	Início		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão final		Referência	
	T	°C	Ciclos	°C	T	°C	T	°C	T	°C		
<i>ermB</i>	3min	93	35	93	1min	52	1min	72	1min	72	5min	Sutcliffe et al. 1996
<i>msrC</i>	5min	94	35	94	1min	52	1min	72	1min	72	5min	Werner et al. 2001
<i>tetL</i>	5min	94	35	94	1min	58	1min	72	1min	72	5min	Frazzon et al. 2010
<i>tetM</i>	5min	94	35	94	1min	52	1min	72	1min	72	5min	Aarestrup et al. 2000
<i>tetS</i>	5min	94	35	94	1min	58	1min	72	1min	72	5min	Choi & Woo, 2015
<i>vanA</i>	5min	94	35	94	1min	56	1min	72	1min	72	10min	Moura et al. 2015
<i>vanB</i>	2min	94	30	94	1min	54	1min	72	1min	72	10min	Dutka-Malen et al. 1995
<i>vanC₁</i>	2min	94	30	94	1min	54	1min	72	1min	72	10min	Dutka-Malen et al. 1995
<i>vanC_{2/3}</i>	2min	94	30	94	1min	54	1min	72	1min	72	10min	Dutka-Malen et al. 1995

T: tempo; °C: temperatura.

4.7.2 Avaliação da presença de genes relacionados à virulência

A presença dos genes de virulência *ace* (adesina de colágeno), *agg* (substância de agregação), *esp* (proteína de superfície de enterococos), *cylA* (citolisina) e *geE* (gelatinase) foi avaliada, independentemente dos resultados obtidos nos testes fenotípicos (para hidrólise da gelatina e atividade hemolítica). As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR, os genes avaliados, o tamanho do fragmento gerado, assim como as referências consultadas e controles utilizados, estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Oligonucleotídeos iniciadores e os produtos gerados na PCR para a avaliação de genes relacionados a fatores de virulência nas bactérias ácido lácticas.

Oligonucleotídeos	Gene	Sequência (5' - 3')	Produto (pb)	Referência	Cepa controle
<i>ace1_F</i> <i>ace2_R</i>	<i>ace</i>	AAAGTAGAATTAGATCACAC TCTATCACATTCCGGTTGCG	320	Mannu et al. 2003	C12 (Medeiros, 2011)
<i>cylA_TE17</i> <i>cylA_TE18</i>	<i>cylA</i>	TGGATGATAGTGATAGGAAGT TCTACAGTAAATCTTTTCGTCA	517	Eaton & Gasson, 2001	14 (Medeiros, 2011)
<i>ESP46</i> <i>ESP47</i>	<i>esp</i>	TTACCAAGATGGTTCTGTAGGCAC CCAAGTATACTTAGCATCTTTTGG	913	Shankar et al. 1999	14.3 (Huff, 2018)
<i>gelE_F</i> <i>gelE_R</i>	<i>geE</i>	ACCCCGTATCATTGGTTT ACGCATTGCTTTTCCATC	402	Eaton & Gasson, 2001	C12 (Medeiros, 2011)
<i>agg TE3</i> <i>agg TE4</i>	<i>agg</i>	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC AAACGGCAAGACAAGTAAATA	1553	Eaton & Gasson, 2001	M2.15 (Costa, 2018)

Pb: pares de base.

As reações de PCR foram realizadas conforme citado anteriormente (item 4.2.2), com exceção dos oligonucleotídeos iniciadores e as condições para a amplificação de cada gene. Para a detecção do gene *agg*, foi necessário utilizar 200 ng de DNA. A visualização dos produtos amplificados em cada PCR, foi realizada

conforme descrito no item 4.2.2, sendo interpretadas como positivas as amostras que amplificaram fragmentos nos tamanhos citados na Tabela 3.

Na Tabela 4 é possível observar as temperaturas, a quantidade de ciclos e os tempos utilizados em cada fase da PCR para cada gene avaliado, assim como as referências consultadas.

Tabela 4: Condições utilizadas para a amplificação de genes relacionados a fatores de virulência nas bactérias ácido lácticas.

Gene	Início		Desnaturação		Anelamento		Extensão		Extensão final		Referência	
	T	°C	Ciclos	°C	T	°C	T	°C	T	°C		T
ace	5min	94	35	94	1min	57	1min	72	1min	72	5min	Mannu et al. 2003
agg	5min	94	30	94	1min	62	1min	72	1min	72	10min	Eaton & Gasson, 2001
cylA	5min	94	35	94	1min	54	1min	72	1min	72	5min	Shankar et al. 1999
esp	3min	94	35	94	1min	64	1min	72	1min	72	5min	Eaton & Gasson, 2001
gelE	5min	94	35	94	1min	50	1min	72	1min	72	5min	Eaton & Gasson, 2001

T: tempo; °C: temperatura.

4.8 Microencapsulação de bactéria ácido láctica com potencial probiótico

De acordo com os melhores resultados obtidos na avaliação do potencial probiótico, um dos isolados de BAL foi escolhido para ser submetido ao processo de microencapsulação através da técnica de extrusão. Para este procedimento, 15 mL do inóculo bacteriano foram centrifugados a 2.000 rpm, durante 10 min a 4 °C. Após, as células foram lavadas duas vezes com água peptonada 0,1% estéril e ressuspensas em 15 mL da mesma solução. A fim de determinar as células viáveis no início do teste, 100 µL foram retirados desta suspensão e realizada a diluição seriada.

Foi preparada uma solução de alginato de sódio 2% e água destilada com volume de 15 mL, sendo a mesma adicionada às células que foram anteriormente ressuspensas. Após isso, esse conteúdo foi homogeneizado em vórtex e transferido para uma seringa estéril equipada com agulha de 0,45 mm de diâmetro. O líquido foi lentamente ejetado dentro de uma solução estéril com 100 mL de CaCl₂ 0,05M suplementada com Tween 80 0,1% e aguardaram-se 30 min para a estabilização. Foram retirados 100 µL da solução onde as microcápsulas se encontravam, para realizar a diluição seriada, com o objetivo de se avaliar a contagem de BAL que não foram encapsuladas.

Em seguida, a solução com as microcápsulas foi centrifugada em 350

rpm, a 4 °C por 10 min. O CaCl₂ 0,05M foi descartado e as microcápsulas foram lavadas três vezes com água peptonada estéril 0,1% para serem filtradas através de papel filtro Grade 1 Whatman. As microcápsulas foram transferidas para um frasco contendo 100 mL de água peptonada 0,1% estéril para posterior avaliação da eficiência de encapsulação. Este ensaio foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Todorov et al. (2012). Foi utilizada como controle a cultura probiótica comercial de *L. rhamnosus*.

4.8.1 Avaliação da eficiência de encapsulação das bactérias ácido lácticas

Para a realização da contagem dos micro-organismos que estavam encapsulados, foi utilizada a metodologia proposta por Sousa et al. (2012), com modificações. Em 9 mL de uma solução de citrato de sódio 2%, foi adicionado 1 g de microcápsulas de alginato de sódio. Este conteúdo foi centrifugado a 300 rpm, na temperatura de 17 °C, durante 10 min para liberação da cultura microbiana. Feito isso, foi realizada a diluição seriada a fim de se determinar as UFC g⁻¹.

A eficiência de encapsulação é representada em percentual e pode ser obtida aplicando-se a seguinte fórmula: Eficiência= [(Y-Z)/X] x 100 onde X é a contagem inicial de micro-organismos antes da encapsulação; Y é a contagem de micro-organismos encapsulados e Z é a contagem de micro-organismos no fluido externo ao redor das cápsulas, ou seja, na solução de CaCl₂ 0,05M. Esta determinação foi realizada de acordo com Capela et al. (2007).

4.9 Avaliação da manutenção das culturas de bactérias ácido lácticas microencapsuladas

Para esta determinação, as culturas de BAL microencapsuladas foram aplicadas em leite UHT integral e caldo MRS. Este experimento foi realizado em tubos de ensaio com 1 g de microcápsulas, 9 mL de leite UHT integral e 9 mL de caldo MRS, separadamente, sendo levados ao refrigerador. A liberação da cultura microbiana das BAL foi avaliada no momento em que as microcápsulas foram adicionadas a estes meios (tempo zero) e após 7, 15, 20 e 30 dias de aplicação no leite e caldo MRS. Cada tubo foi levado ao vórtex por cinco segundos para homogeneização, e em seguida, realizada a diluição seriada, juntamente com a aferição do pH. As placas foram incubadas a 35 ± 1 °C por 48 h. O objetivo deste experimento, além de avaliar a liberação das culturas microbianas e sua viabilidade,

foi observar a capacidade de acidificação do leite e caldo MRS. Este ensaio foi realizado em triplicata.

4.10 Avaliação da viabilidade da bactéria ácido láctica microencapsulada em bebida láctea UHT

Neste ensaio, as microcápsulas de BAL foram aplicadas em bebida láctea UHT comercial, sabor chocolate. Em tubos de ensaio foram colocados 1 g de microcápsulas e 9 mL de bebida láctea citada acima, para serem levados ao refrigerador. A liberação da cultura microbiana foi avaliada no momento em que as microcápsulas foram adicionadas à bebida láctea (tempo zero) e após 7, 15, 20 e 30 dias em contato com a mesma. Cada tubo foi levado ao vórtex por cinco segundos para homogeneização, e em seguida, realizada a diluição seriada, juntamente com a aferição do pH. As placas foram incubadas a 35 ± 1 °C por 48 h. O objetivo deste experimento, além de avaliar a liberação da BAL e sua viabilidade, foi observar a variação de pH da bebida láctea. Este ensaio foi realizado em triplicata.

4.11 Análise estatística

A variação das médias dos logs de crescimento das BAL foi estatisticamente avaliada através da análise de variância de medidas repetidas (ANOVA), via modelos lineares generalizados, utilizando o programa SPSS versão 18 (SPSS Inc., Somers, NY, USA). Quando encontrada diferença significativa, aplicou-se o teste de comparações múltiplas de Bonferroni, adotando como nível de significância $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização das bactérias ácido lácticas e identificação através de sequenciamento do gene 16S rRNA

As BAL M2A4, M2AN5 e M7AN7 apresentaram morfologia de cocos, enquanto M7AN7-1 e M7AN10 foram morfológicamente caracterizadas como cocobacilos, sendo todos os cinco isolados distribuídos em células individuais, aos pares e em cadeias curtas. Todas as BAL citadas acima foram classificadas como gram-positivas e catalase negativa. De acordo com os resultados obtidos através de sequenciamento do gene 16S rRNA, as cinco BAL foram identificadas como pertencentes ao gênero *Enterococcus* (Tabela 5).

Tabela 5: Identificação das BAL M2A4, M2AN5, M7AN7, M7AN7-1 e M7AN10 através do sequenciamento do gene 16S rRNA.

BAL	Identificação 16S rRNA
M2A4	<i>Enterococcus faecalis</i>
M2AN5	<i>Enterococcus faecium</i>
M7AN7	<i>Enterococcus faecalis</i>
M7AN7-1	<i>Enterococcus faecium</i>
M7AN10	<i>Enterococcus faecium</i>

Os isolados M7AN7-1 e M7AN10 foram identificados como *Enterococcus faecium* M7AN7-1 e *Enterococcus faecium* M7AN10, tendo suas sequências depositadas no *Standard Nucleotide BLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) sob os códigos MH723756 e MH723757, respectivamente. Somente essas duas sequências foram depositadas, pois são referentes aos isolados que haviam sido previamente selecionados para a realização dos demais testes de manutenção da estabilidade das BAL e avaliação do potencial probiótico.

5.2 Produção de substâncias antimicrobianas pelas bactérias ácido lácticas

A capacidade de produzir substâncias antimicrobianas pelas BAL foi avaliada utilizando-se como indicadores as culturas de *C. fimi* NCTC 7547, *E. coli* ATCC 10536, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. Enteritidis* ATCC 13076 e *S. aureus* ATCC 25923. Porém, todas as cinco BAL apresentaram atividade antimicrobiana apenas contra *C. fimi* NCTC 7547. Estes

resultados foram obtidos através da utilização dos sobrenadantes livres de células com o pH neutro (6), e pH ácido (4-5), com inóculos possuindo 24 e 48 h de incubação (Tabela 6).

A média dos halos de inibição formados pelos sobrenadantes livres de células com pH neutro (6), variou de 8 a 9 mm para todas as BAL. Resultados semelhantes foram obtidos utilizando os sobrenadantes livres de células com pH ácido, exceto *E. faecium* M7AN7-1, que produziu halos com média de 10 mm.

Esses dados demonstram que as cinco BAL avaliadas possuem potencial de produção de atividade antimicrobiana como verificado contra *C. fimi* NCTC 7547, porém as demais indicadoras utilizadas não foram inibidas nas condições experimentais testadas.

Tabela 6: Média dos halos de inibição (em mm), formados pelas BAL frente a indicadora *C. fimi* NCTC 7547, através dos sobrenadantes livres de células com pH neutro (6) e ácido (4-5), obtidos de inóculos com incubação de 24 e 48 h.

BAL	pH Neutro (6)		pH Ácido (4-5)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
<i>E. faecalis</i> M2A4	8 ± 0,70	9 ± 0,00	9 ± 0,70	8 ± 0,70
<i>E. faecium</i> M2AN5	8 ± 0,00	9 ± 0,00	8 ± 0,70	8 ± 0,70
<i>E. faecalis</i> M7AN7	8 ± 0,70	8 ± 0,00	9 ± 0,00	9 ± 0,00
<i>E. faecium</i> M7AN7-1	9 ± 1,41	9 ± 0,00	10 ± 0,00	9 ± 1,41
<i>E. faecium</i> M7AN10	8 ± 1,41	8 ± 0,00	9 ± 0,00	8 ± 0,00

5.3 Avaliação da inocuidade das bactérias ácido lácticas

5.3.1 Atividade hemolítica e hidrólise de gelatina

Quanto à hemólise dos eritrócitos do sangue de carneiro desfibrinado, todas as cinco BAL tiveram sua atividade hemolítica classificada como gama hemólise (ausência de hemólise) e apresentaram resultados negativos para a hidrólise de gelatina. Apenas *S. aureus* ATCC 25923 obteve resultado positivo para a hidrólise de gelatina e atividade hemolítica avaliada como beta hemólise (hemólise total), como era previsto, devido a mesma ter sido utilizada como controle positivo em ambos os testes.

5.3.2 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade das BAL aos antimicrobianos foi avaliado através da realização de antibiograma utilizando: ampicilina 10 µg, vancomicina 30 µg, eritromicina 15 µg, tetraciclina 30 µg, ciprofloxacino 5 µg, norfloxacino 10 µg, nitrofuratoína 300 µg, cloranfenicol 30 µg, linezolida 30 µg, gentamicina 120 µg e estreptomicina 300 µg. Ao comparar os resultados obtidos, com as informações contidas no CLSI (2018), dentre as cinco BAL avaliadas, *E. faecium* M7AN7-1 e *E. faecium* M7AN10 apresentaram-se susceptíveis a todos os antimicrobianos utilizados neste experimento. No entanto, *E. faecalis* M2A4, *E. faecium* M2AN5 e *E. faecalis* M7AN7 apresentaram perfil de resistência intermediária à eritromicina.

5.4 Determinação da estabilidade das bactérias ácido lácticas em diferentes temperaturas

De acordo com a identificação obtida através do sequenciamento do gene 16S rRNA, e dos resultados do teste de avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos, *E. faecium* M7AN7-1 e *E. faecium* M7AN10 foram selecionadas para a realização dos ensaios que avaliaram a estabilidade das BAL, em diferentes temperaturas.

5.4.1 Tolerância à refrigeração

E. faecium M7AN7-1, *E. faecium* M7AN10 e *L. rhamnosus* (bactéria probiótica comercial utilizada como controle positivo) foram submetidas a avaliação de sua tolerância à refrigeração em leite em pó desnatado (na concentração de 10%) pelo período de 30 dias, em que a temperatura média do refrigerador durante a realização deste ensaio foi de $6,6 \pm 1,5$ °C. As contagens, realizadas semanalmente, demonstraram que estas três BAL não tiveram sua viabilidade reduzida ao serem comparados os resultados obtidos no pré-resfriamento e após 30 dias em refrigerador (Tabela 7).

Através do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, foi possível observar que a variação das médias dos logs de crescimento de *L. rhamnosus* diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) de *E. faecium* M7AN10 e *E. faecium* M7AN7-1. Essa variação foi dependente do tempo em que a contagem de células viáveis foi realizada, porém ambas BAL mantiveram a viabilidade necessária para serem sugeridas como culturas potencialmente probióticas, pois apresentaram resultados

superiores a 6 Log₁₀ UFC mL⁻¹ (Tabela 7).

Tabela 7: Viabilidade de *E. faecium* M7AN7-1, *E. faecium* M7AN10 e *L. rhamnosus* ao resfriamento em leite em pó desnatado 10% durante 7, 14, 21 e 30 dias.

BAL	Contagem de células viáveis em Log ₁₀ UFC mL ⁻¹ durante 30 dias				
	Pré-resfriamento	7 dias	14 dias	21 dias	30 dias
<i>E. faecium</i> M7AN7-1	8,53 ± 0,13 ^{abA}	8,70 ± 0,04 ^{aB}	8,59 ± 0,02 ^{aAB}	8,42 ± 0,20 ^{abA}	8,59 ± 0,01 ^{aA}
<i>E. faecium</i> M7AN10	8,46 ± 0,03 ^{aA}	8,48 ± 0,02 ^{bB}	8,44 ± 0,01 ^{bA}	8,30 ± 0,07 ^{aC}	8,46 ± 0,09 ^{aAB}
<i>L. rhamnosus</i>	8,60 ± 0,05 ^{bA}	8,70 ± 0,01 ^{aA}	8,72 ± 0,04 ^{cA}	8,67 ± 0,09 ^{bA}	8,81 ± 0,04 ^{bB}

Resultados se apresentam em média ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma coluna e letras maiúsculas iguais na mesma linha, não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) entre si, de acordo com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

5.4.2 Tolerância ao congelamento

A manutenção da viabilidade de *E. faecium* M7AN7-1, *E. faecium* M7AN10 e *L. rhamnosus* ao congelamento em leite em pó desnatado 20%, foi avaliada durante 90 dias. As contagens realizadas mensalmente demonstraram que as três BAL iniciaram o experimento com viabilidade superior a 8 Log₁₀ UFC mL⁻¹ e que esta foi mantida após 90 dias de congelamento (Tabela 8). A variação das médias dos logs de crescimento de todas as BAL, após 90 dias em condições de congelamento, foi estatisticamente ($p \leq 0,05$) diferente das médias dos logs de crescimento do pré-congelamento. Contudo, apesar dessas variações, *E. faecium* M7AN7-1 e *E. faecium* M7AN10 mantiveram a viabilidade necessária para serem sugeridas como culturas potencialmente probióticas, pois apresentaram resultados superiores a 6 Log₁₀ UFC mL⁻¹.

Tabela 8: Viabilidade de *E. faecium* M7AN7-1, *E. faecium* M7AN10 e *L. rhamnosus* ao congelamento em leite em pó desnatado 20% durante 30, 60 e 90 dias.

BAL	Contagem de células viáveis em Log ₁₀ UFC mL ⁻¹ durante 90 dias			
	Pré-congelamento	30 dias	60 dias	90 dias
<i>E. faecium</i> M7AN7-1	8,88 ± 0,07 ^{aA}	8,54 ± 0,09 ^{aB}	8,58 ± 0,01 ^{aB}	8,50 ± 0,05 ^{aB}
<i>E. faecium</i> M7AN10	8,41 ± 0,01 ^{bA}	8,34 ± 0,01 ^{bB}	8,41 ± 0,05 ^{bAB}	8,16 ± 0,05 ^{bC}
<i>L. rhamnosus</i>	8,83 ± 0,04 ^{aA}	8,53 ± 0,08 ^{aB}	8,57 ± 0,02 ^{aB}	8,23 ± 0,27 ^{abB}

Resultados se apresentam em média ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma coluna e letras maiúsculas iguais na mesma linha, não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) entre si, de acordo com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

5.4.3 Tolerância à liofilização

E. faecium M7AN7-1, *E. faecium* M7AN10 e *L. rhamnosus* foram avaliadas em relação a sua tolerância à liofilização em leite em pó desnatado 20%, pelo período de 180 dias. As contagens foram realizadas mensalmente, sendo a contagem inicial das BAL antes do processo de liofilização, a seguinte: *E. faecium* M7AN7-1 9,14 ± 0,07, *E. faecium* M7AN10 8,50 ± 0,10 e *L. rhamnosus* 9,16 ± 0,01. Mesmo havendo um pequeno decréscimo nas contagens após a liofilização, as BAL permaneceram com contagens superiores a 8 Log₁₀ UFC mL⁻¹ (Tabela 9). Após a aplicação do teste de comparações múltiplas de Bonferroni, foi possível verificar que a variação das médias dos logs de crescimento de *L. rhamnosus* diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) de *E. faecium* M7AN10 em todos os períodos avaliados, porém os resultados atribuídos a esta BAL se encontram dentro das contagens necessárias para sugerir seu emprego como cultura probiótica (iguais ou acima de 6 Log₁₀ UFC mL⁻¹). *E. faecium* M7AN10 também teve sua viabilidade reduzida ao serem comparados os resultados obtidos na pós-liofilização e o período de 180 dias após este processo, porém, essa redução não foi significativa ($p \geq 0,05$).

Tabela 9: Viabilidade de *E. faecium* M7AN7-1, *E. faecium* M7AN10 e *L. rhamnosus* ao processo de liofilização em leite em pó desnatado 20%, durante 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias.

BAL	Contagem de células viáveis em Log ₁₀ UFC mL ⁻¹ durante 180 dias						
	Pós-liofilização	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias
<i>E. faecium</i> M7AN7-1	8,65 ± 0,05 ^{aE}	8,71 ± 0,02 ^{aA}	8,72 ± 0,02 ^{aB}	8,89 ± 0,03 ^{aC}	8,75 ± 0,09 ^{aD}	8,86 ± 0,01 ^{aE}	9,02 ± 0,02 ^{aF}
<i>E. faecium</i> M7AN10	8,49 ± 0,09 ^{aBCDEF}	8,53 ± 0,08 ^{bA}	8,47 ± 0,10 ^{bB}	8,53 ± 0,01 ^{bC}	8,43 ± 0,01 ^{bD}	8,49 ± 0,01 ^{bE}	8,45 ± 0,01 ^{bF}
<i>L. rhamnosus</i>	9,01 ± 0,01 ^{bABE}	9,01 ± 0,20 ^{aA}	9,06 ± 0,11 ^{bB}	9,11 ± 0,01 ^{cC}	9,10 ± 0,05 ^{cD}	8,94 ± 0,21 ^{aE}	9,12 ± 0,05 ^{cF}

Resultados se apresentam em média ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma coluna e letras maiúsculas iguais na mesma linha, não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) entre si, de acordo com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

5.5 Determinação do potencial probiótico das bactérias ácido lácticas

Devido a *E. faecium* M7AN7-1 e *E. faecium* M7AN10 manterem a viabilidade após os testes de avaliação da estabilidade em diferentes temperaturas, ambas BAL foram empregadas para a realização dos ensaios que avaliaram o potencial probiótico, indicados a seguir.

5.5.1 Tolerância aos sais biliares

O presente teste avaliou a tolerância de *E. faecium* M7AN7-1, *E. faecium* M7AN10 e *L. rhamnosus* após 4 h em contato com 0,1, 0,3, 0,5 e 1% de sais biliares. Decorrido o período de exposição, essas três BAL mantiveram resultados acima de 7 Log₁₀ UFC mL⁻¹ ao serem expostas a 0,1% de sais biliares. Porém, somente *E. faecium* M7AN7-1 e *E. faecium* M7AN10 permaneceram viáveis em contato com 0,3 e 0,5% de sais biliares após 4 h, apresentando contagens superiores a 6 Log₁₀ UFC mL⁻¹ (Tabela 10).

E. faecium M7AN10, manteve-se estável a 1% de sais biliares, mesmo perdendo a viabilidade necessária para uma bactéria probiótica (igual ou superior a 6 Log₁₀ UFC mL⁻¹), registrando contagens de 4 Log₁₀ UFC mL⁻¹, diferentemente de *L. rhamnosus* que não tolerou a exposição a 0,3, 0,5 e 1% de sais biliares. No tratamento controle (sem adição de sais biliares), as contagens foram superiores a 8 Log₁₀ UFC mL⁻¹ (Tabela 10). De acordo com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni, a variação das médias dos logs de crescimento de *L. rhamnosus* diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) de *E. faecium* M7AN7-1 e *E. faecium* M7AN10,

entretanto, ambas BAL apresentaram as contagens de células viáveis necessárias para sugerir seu emprego como culturas probióticas. Os resultados obtidos após o período de avaliação em todas as concentrações de sais biliares, com relação ao tratamento controle, diferiram estatisticamente ($p \leq 0,05$).

Tabela 10: Viabilidade de *E. faecium* M7AN7-1, *E. faecium* M7AN10 e *L. rhamnosus*, a 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1% de sais biliares após o período de 4 h.

BAL	Contagem de células viáveis em Log ₁₀ UFC mL ⁻¹ após 4 h					
	Tempo zero	Controle	0,1%	0,3%	0,5%	1%
<i>E. faecium</i> M7AN7-1	7,40 ± 0,03 ^{aB}	8,52 ± 0,08 ^{a+}	7,30 ± 0,05 ^{bA-}	6,33 ± 0,10 ^{aC*}	6,51 ± 0,05 ^{aD/}	0
<i>E. faecium</i> M7AN10	6,99 ± 0,09 ^{bA}	9,02 ± 0,21 ^{b+}	7,02 ± 0,04 ^{bA-}	6,98 ± 0,06 ^{bA-}	6,97 ± 0,03 ^{bA-}	4,42 ± 0,21 ^{B*}
<i>L. rhamnosus</i>	7,67 ± 0,17 ^{cA}	8,26 ± 0,01 ^{c+}	7,58 ± 0,05 ^{cA-}	0	0	0

Resultados se apresentam em média ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma coluna e letras maiúsculas iguais na mesma linha, não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) entre si, de acordo com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Em relação ao tratamento controle: símbolos iguais na mesma linha, não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) entre si.

5.5.2 Tolerância ao fluido gástrico simulado

As BAL foram avaliadas quanto a sua capacidade de tolerar o fluido gástrico simulado (FGS) por um período de 180 min, tendo suas contagens realizadas em diferentes intervalos de tempo, com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento empregado em momentos distintos. *E. faecium* M7AN10 e *L. rhamnosus* mantiveram sua viabilidade durante todo o período de ensaio, apresentando contagens acima de 7 Log₁₀ UFC mL⁻¹ e 8 Log₁₀ UFC mL⁻¹, respectivamente. Entretanto, *E. faecium* M7AN7-1 perdeu sua viabilidade após 90 minutos em contato com o FGS, registrando resultados abaixo de 6 Log₁₀ UFC mL⁻¹ (Tabela 11). Em relação ao tratamento controle (sem adição de FGS), a viabilidade de todas as BAL foi mantida, gerando contagens superiores a 6 Log₁₀ UFC mL⁻¹.

Conforme o teste de comparações múltiplas de Bonferroni, foi possível verificar que a variação das médias dos logs de crescimento de *E. faecium* M7AN10 diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) em relação ao tempo zero e após 180 min em contato com o FGS. Porém, essa redução não impossibilita a sua indicação como cultura potencialmente probiótica. Os resultados encontrados neste experimento, demonstraram que *E. faecium* M7AN7-1 não apresentou as contagens de células

viáveis necessárias para sugerir sua utilização como cultura probiótica (igual ou superior a 6 Log₁₀ UFC mL⁻¹), durante os 180 min em contato com o FGS.

Tabela 11: Viabilidade de *E. faecium* M7AN7-1, *E. faecium* M7AN10 e *L. rhamnosus* ao fluído gástrico simulado (FGS) durante 60, 90 e 180 min.

BAL	Contagem de células viáveis em Log ₁₀ UFC mL ⁻¹ durante 180 min						
	Tempo zero	60 min		90 min		180 min	
		Controle	FGS	Controle	FGS	Controle	FGS
<i>E. faecium</i> M7AN7-1	7,96 ± 0,30 ^{aA+}	8,18 ± 0,05 ^{a+}	7,18 ± 0,29 ^{aA}	8,17 ± 0,02 ^{a+}	5,82 ± 0,48 ^{aB}	8,04 ± 0,16 ^{a+}	3,32 ± 0,49 ^{aC}
<i>E. faecium</i> M7AN10	7,90 ± 0,20 ^{aA+}	7,20 ± 1,12 ^{a+}	7,51 ± 0,18 ^{aB}	6,08 ± 0,96 ^{b-}	7,62 ± 0,35 ^{bAB}	6,87 ± 1,14 ^{a+}	7,19 ± 0,59 ^{bB}
<i>L. rhamnosus</i>	8,15 ± 0,04 ^{aA+}	8,09 ± 0,03 ^{a+}	8,18 ± 0,09 ^{bA}	8,20 ± 0,04 ^{a+}	7,70 ± 0,83 ^{bA}	8,15 ± 0,02 ^{a-}	8,12 ± 0,03 ^{cA}

Resultados se apresentam em média ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma coluna, não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) entre si, de acordo com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Em relação ao tratamento controle: símbolos iguais na mesma linha, não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) entre si.

5.5.3 Tolerância ao fluído intestinal simulado (FIS)

E. faecium M7AN7-1, *E. faecium* M7AN10 e *L. rhamnosus* foram expostas ao FIS por 240 min, com o objetivo de terem sua viabilidade avaliada. As contagens foram realizadas em diferentes intervalos de tempo a fim de se determinar a sua variação. Todas as três BAL permaneceram viáveis após o período de exposição, registrando contagens acima de 8 Log₁₀ UFC mL⁻¹. A viabilidade das BAL também foi mantida no tratamento controle (sem adição de FIS), onde as contagens foram superiores a 7 Log₁₀ UFC mL⁻¹ (Tabela 12).

De acordo com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni, a variação das médias dos logs de crescimento de *L. rhamnosus* diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) de *E. faecium* M7AN7-1 e *E. faecium* M7AN10. Entretanto, ambas BAL apresentaram as contagens de células viáveis necessárias para sugerir sua utilização como culturas probióticas (igual ou superior a 6 Log₁₀ UFC mL⁻¹). No tratamento controle, a variação das médias dos logs de crescimento foi independente do tempo de avaliação, havendo diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre todas as BAL.

Tabela 12: Viabilidade de *E. faecium* M7AN7-1, *E. faecium* M7AN10 e *L. rhamnosus* ao fluido intestinal simulado (FIS) pelo período de 60, 90, 180 e 240 min.

BAL	Contagem de células viáveis em Log ₁₀ UFC mL ⁻¹ durante 240 min								
	Tempo zero	60 min		90 min		180 min		240 min	
		Controle	FIS	Controle	FIS	Controle	FIS	Controle	FIS
<i>E. faecium</i> M7AN7-1	8,31 ± 0,03 ^{AA+}	8,25 ± 0,09 ^{a-}	8,40 ± 0,02 ^{aB}	8,20 ± 0,07 ^{a*}	8,44 ± 0,00 ^{aB}	8,24 ± 0,04 ^{a/}	8,58 ± 0,00 ^{aC}	8,24 ± 0,04 ^{a/}	8,60 ± 0,03 ^{aC}
<i>E. faecium</i> M7AN10	7,98 ± 0,13 ^{bA+}	7,97 ± 0,02 ^{b-}	8,18 ± 0,01 ^{bB}	8,03 ± 0,01 ^{b*}	8,42 ± 0,03 ^{aC}	7,93 ± 0,11 ^{b/}	8,32 ± 0,02 ^{bD}	7,95 ± 0,06 ^{b/}	8,28 ± 0,04 ^{bD}
<i>L. rhamnosus</i>	8,13 ± 0,15 ^{cA+}	7,99 ± 0,05 ^{c-}	8,22 ± 0,09 ^{bA}	8,23 ± 0,02 ^{c*}	8,24 ± 0,04 ^{bA}	8,11 ± 0,05 ^{c/}	8,09 ± 0,09 ^{cA}	8,14 ± 0,08 ^{c/}	8,14 ± 0,13 ^{bA}

Resultados se apresentam em média ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais na mesma coluna, não diferem estatisticamente ($p > 0,05$). entre si, de acordo com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Em relação ao tratamento controle: símbolos iguais na mesma linha, não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) entre si.

5.5.4 Propriedades de adesão das bactérias ácido lácticas

Este ensaio buscou avaliar as propriedades de adesão das BAL às células Vero durante 4 h. As três BAL iniciaram o experimento com contagens superiores a 8 Log₁₀ UFC mL⁻¹, contudo, apenas 5 Log₁₀ UFC mL⁻¹ de *L. rhamnosus* foram capazes de se aderir às células Vero no período avaliado. Resultados mais satisfatórios foram observados para *E. faecium* M7AN7-1 e *E. faecium* M7AN10, visto que 6 Log₁₀ UFC mL⁻¹ aderiram às células Vero, demonstrando uma capacidade de adesão superior à de *L. rhamnosus* (Figura 1). Em termos de percentual de adesão, foram registrados 1,23% para *E. faecium* M7AN7-1 e 0,33% para *E. faecium* M7AN10.

No momento inicial do experimento, a variação das médias dos logs de crescimento de *L. rhamnosus* diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) de *E. faecium* M7AN7-1. Entretanto, após 4 h em contato com as células Vero, a variação das médias dos logs de crescimento de todas as BAL foi diferente estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$). De acordo com os resultados obtidos, *E. faecium* M7AN7-1 e *E. faecium* M7AN10 apresentaram as contagens de células viáveis necessárias para sugerir sua utilização como culturas probióticas (igual ou superior a 6 Log₁₀ UFC mL⁻¹).

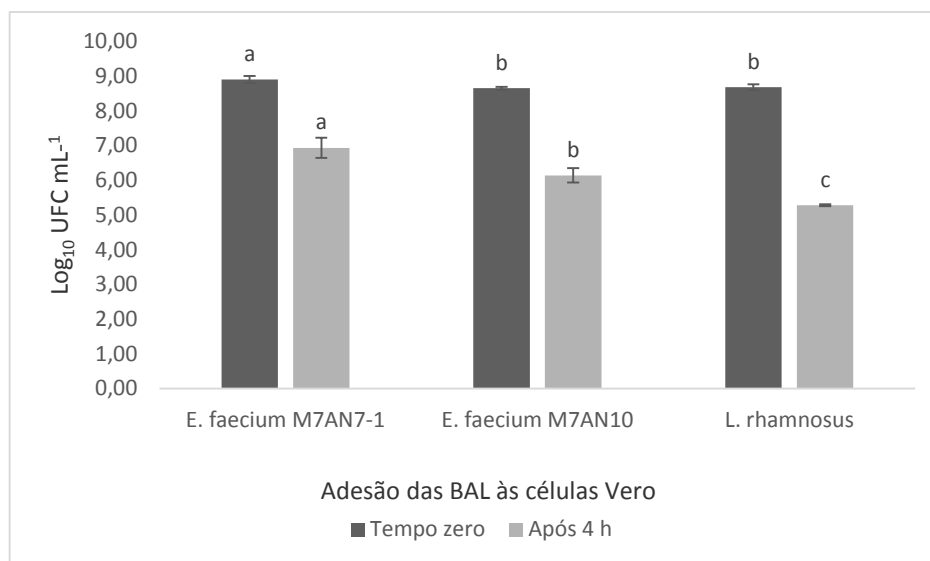


Figura 1: Contagem de células viáveis de *E. faecium* M7AN7-1, *E. faecium* M7AN10 e *L. rhamnosus* antes e após 4 h em contato com as células Vero. Resultados se apresentam em média \pm desvio padrão. Letras minúsculas iguais, para diferentes BAL, em um mesmo momento não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) entre si, de acordo com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

5.6 Presença de genes de virulência e resistência a antimicrobianos nas bactérias ácido lácticas

A presença dos genes de virulência *ace*, *agg*, *esp*, *cylA* e *gelE* foi avaliada em *E. faecium* M7AN7-1 e *E. faecium* M7AN10, independentemente dos resultados obtidos nas avaliações fenotípicas. Porém, nenhum dos cinco genes de virulência foi detectado em ambas BAL.

Semelhante ao teste citado acima, foi realizada a caracterização genética de resistência antimicrobiana de *E. faecium* M7AN7-1 e *E. faecium* M7AN10, independentemente dos resultados obtidos no teste de susceptibilidade a antimicrobianos. Avaliou-se a detecção dos genes *ermB*, *msrC*, *tetL*, *tetM*, *tetS*, *vanA*, *vanB*, *vanC*₁ e *vanC*_{2/3}. A presença do gene *msrC* foi detectada nas duas BAL, sendo o mesmo responsável por conferir resistência antimicrobiana à eritromicina. Os demais genes avaliados não foram detectados.

5.7 Microencapsulação de bactéria ácido láctica com potencial probiótico

O desempenho, com vistas ao potencial probiótico, de *E. faecium* M7AN7-1 e *E. faecium* M7AN10 foi avaliado nos testes anteriores, sendo *E. faecium* M7AN10 escolhida para ser submetida ao processo de microencapsulação. O ensaio determinante para a realização desta escolha, foi a avaliação da tolerância

ao fluido gástrico simulado (FGS), onde esse micro-organismo obteve contagens superiores a $7 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$, após 180 min em contato com o FGS.

5.7.1 Eficiência de encapsulação das bactérias ácido lácticas

Após a microencapsulação de *E. faecium* M7AN10 e *L. rhamnosus* em alginato 2%, foi avaliada a eficiência do processo, sendo a mesma de 80,74% para *E. faecium* M7AN10 e de 87,32% para *L. rhamnosus*. Antes de realizar a microencapsulação, as duas BAL possuíam contagens acima de $8 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$, contudo, houve uma redução na viabilidade de ambas após esse procedimento, onde as contagens registraram $7 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ para *L. rhamnosus* e $6 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ para *E. faecium* M7AN10 (Figura 2).

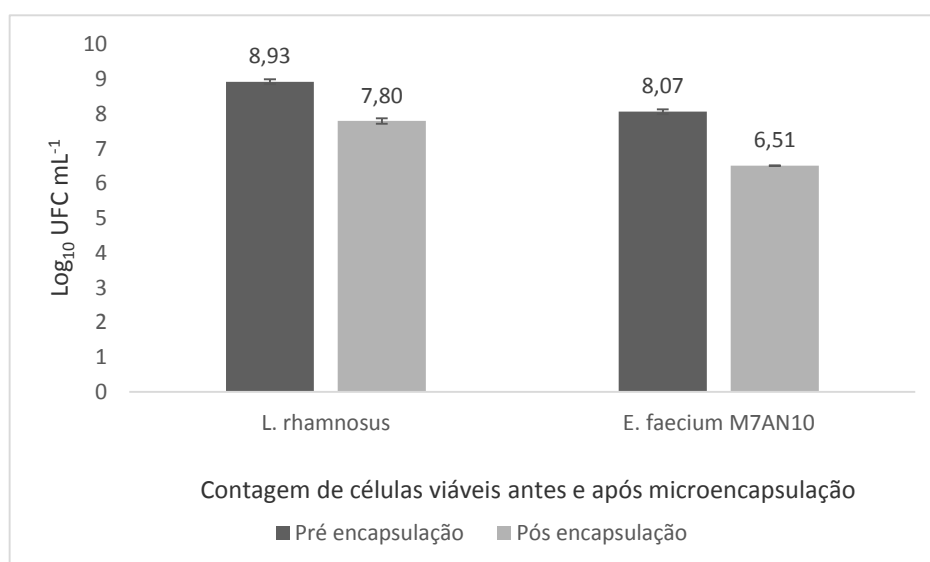


Figura 2: Contagem de células viáveis de *L. rhamnosus* e *E. faecium* M7AN10 antes e após a microencapsulação. Resultados se apresentam em média \pm desvio padrão.

5.8 Manutenção das culturas de bactérias ácido lácticas encapsuladas

As culturas de BAL microencapsuladas aplicadas em leite integral UHT e caldo MRS (Figura 3), foram monitoradas em relação a sua liberação nestes meios e ao seu pH. Tais parâmetros foram aferidos no momento em que as microcápsulas foram adicionadas aos meios (tempo zero) e após 7, 15, 20 e 30 dias de aplicação no leite e caldo MRS. Os resultados obtidos demonstraram que o pH do leite permaneceu em 6 durante os 30 dias, tanto em contato com as microcápsulas contendo *L. rhamnosus*, quanto as que continham *E. faecium* M7AN10. Porém, até o 30º dia, o pH do caldo MRS foi reduzido para 4, seja em contato com as microcápsulas de *E. faecium* M7AN10, assim como, de *L. rhamnosus* (Tabela 13).



Figura 3: Microcápsulas contendo *E. faecium* M7AN10 e *L. rhamnosus* aplicadas em caldo MRS e leite integral UHT.

Tabela 13: Medições de pH do leite integral UHT e caldo MRS com microcápsulas de *E. faecium* M7AN10 e *L. rhamnosus*, durante o período de 30 dias.

Isolados	pH do leite integral UHT e caldo MRS durante 30 dias									
	Tempo zero		Dia 7		Dia 15		Dia 20		Dia 30	
	L	C	L	C	L	C	L	C	L	C
<i>E. faecium</i> M7AN10	6	6	6	5	6	5	6	5	6	4
<i>L. rhamnosus</i>	6	5	6	5	6	4	6	4	6	4

L: leite integral UHT; C: caldo MRS.

A liberação das culturas bacterianas que estavam inseridas dentro das microcápsulas ocorreu de forma distinta para cada uma das BAL. A liberação de *L. rhamnosus* ocorreu somente a partir do 15º dia em leite integral UHT e a partir do 7º dia em caldo MRS, sendo que ao final do ensaio, apenas 5 Log₁₀ UFC mL⁻¹ haviam sido liberados em ambos os meios. Contudo, *E. faecium* M7AN10 foi liberado das microcápsulas no tempo zero, tanto em leite integral UHT, quanto em caldo MRS. Um aspecto que possa explicar os resultados obtidos no tempo zero, é a possibilidade de células viáveis de *E. faecium* M7AN10 estarem aderidas ao redor das cápsulas, e serem contabilizadas nas contagens. Após 30 dias, a viabilidade desta BAL registrou valores de 8 Log₁₀ UFC mL⁻¹ em leite e 6 Log₁₀ UFC mL⁻¹ em caldo MRS (Figura 4).

A variação das médias dos logs de crescimento de *E. faecium* M7AN10 diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) de *L. rhamnosus*, tanto em contato com o leite integral UHT, quanto em caldo MRS, independentemente do tempo da contagem de células viáveis. Esses dados demonstraram que apesar desta variação, *E. faecium* M7AN10 manteve a viabilidade celular necessária para ser sugerida como uma

cultura potencialmente probiótica (igual ou superior a 6 Log₁₀ UFC mL⁻¹).

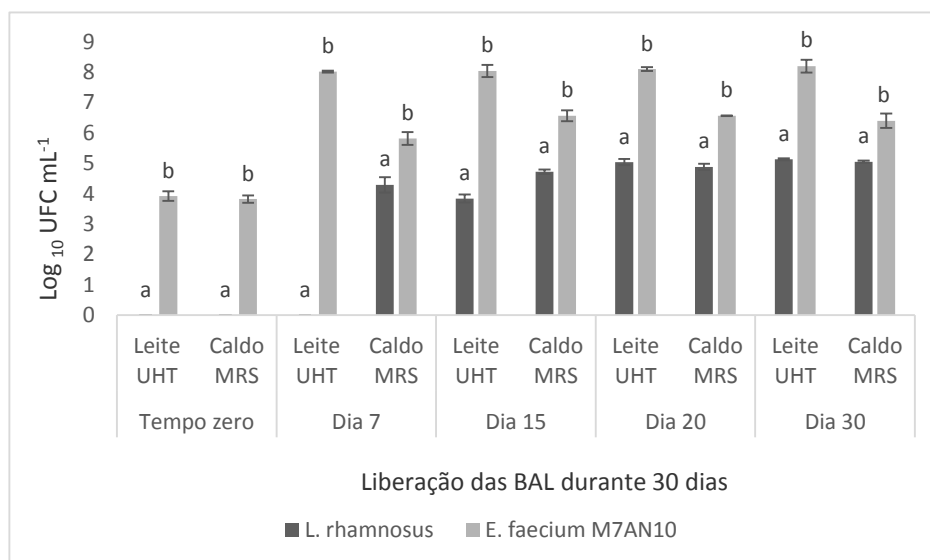


Figura 4: Contagem de células viáveis de *E. faecium* M7AN10 e *L. rhamnosus* liberadas das microcápsulas em leite integral UHT e caldo MRS durante 7, 15, 20 e 30 dias. Resultados se apresentam em média \pm desvio padrão. Letras minúsculas iguais, para diferentes BAL, nos mesmos momentos e tratamentos, não diferem estatisticamente ($p > 0,05$) entre si, de acordo com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

5.9 Viabilidade de *E. faecium* M7AN10 microencapsulada em bebida láctea UHT

As microcápsulas de alginato 2% contendo *E. faecium* M7AN10 ($6,51 \pm 0,04$ Log₁₀ UFC mL⁻¹) foram aplicadas em bebida láctea UHT comercial, sabor chocolate (Figura 5), sendo a liberação desta cultura avaliada durante 30 dias. No início do teste (tempo zero), $3,97 \pm 0,65$ Log₁₀ UFC mL⁻¹ desta BAL já haviam sido liberados na bebida láctea UHT, porém no 30º dia, a contagem de células viáveis nesta matriz alimentar aumentou para $7,37 \pm 0,45$ Log₁₀ UFC mL⁻¹ (Figura 6). Uma possibilidade que possa explicar os resultados obtidos no tempo zero, é a de que eventuais células viáveis de *E. faecium* M7AN10 pudessem estar aderidas ao redor das cápsulas, e serem contabilizadas nas contagens. O pH também foi aferido durante este experimento, sendo registrado como 6 no tempo zero, entretanto, a partir do 7º até o 30º dia, o mesmo havia sido reduzido para 5.

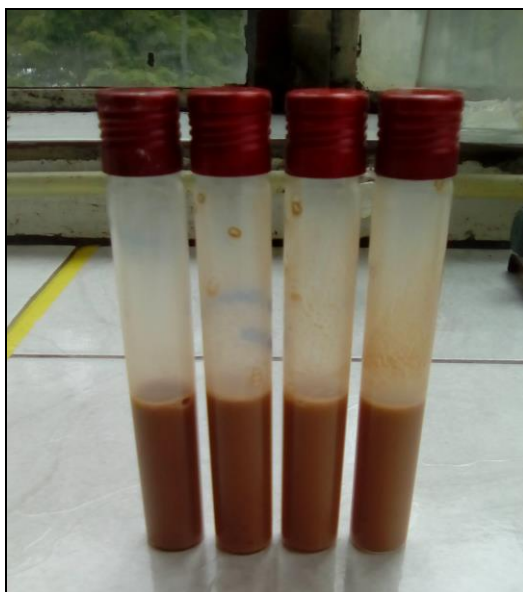


Figura 5: Microcápsulas contendo *E. faecium* M7AN10 e *L. rhamnosus* aplicadas em bebida láctea UHT.

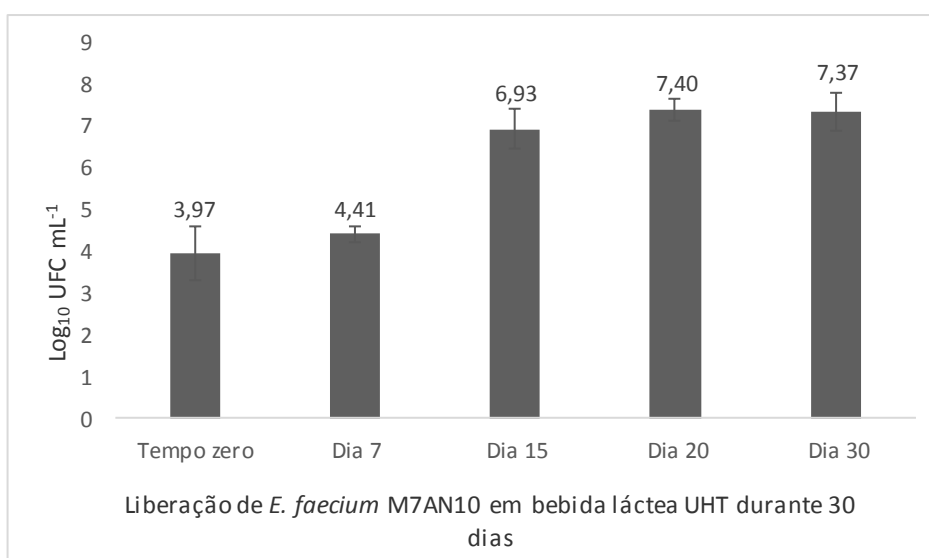


Figura 6: Contagem de células viáveis de *E. faecium* M7AN10 liberadas das microcápsulas em bebida láctea UHT durante 7, 15, 20 e 30 dias. Resultados se apresentam em média \pm desvio padrão.

Apesar de haver diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$) entre *L. rhamnosus* e *E. faecium* M7AN10, demonstradas através dos resultados dos testes realizados, estas não impedem que a BAL isolada de leite bubalino possa ser sugerida como uma cultura potencialmente probiótica, visto que a mesma manteve a viabilidade necessária após os tratamentos empregados, apresentando concentrações de células viáveis iguais ou superiores a 6 Log₁₀ UFC mL⁻¹.

6. DISCUSSÃO

O gênero *Enterococcus* tem sido frequentemente isolado de amostras de leite e seus derivados (SILVETTI et al., 2019; ISPIRLI et al., 2017; SILVA et al., 2015; PRICHULA et al., 2013). Conforme os resultados obtidos no presente trabalho, todas as cinco BAL isoladas de leite bubalino foram identificadas como pertencentes a esse gênero, sendo dois isolados identificados como *E. faecalis* e três como *E. faecium*. Prichula et al. (2013), ao isolarem bactérias do gênero *Enterococcus* de leite de búfala obtiveram como resultados 63,75% de *E. faecalis* e 28,75% de *E. faecium*. Recentemente Bagci et al. (2019), isolaram *E. faecium* (57,5%) e *E. faecalis* (15%) de amostras de leite e colostro humano, objetivando a avaliação do potencial probiótico de *E. faecium*. A respeito dos derivados lácteos, Silva et al. (2015) isolaram *E. durans* e *E. faecium* de soro de muçarela de búfala nas proporções de 35% e 15%, respectivamente. Assim como Olvera-García et al., (2018) avaliaram as propriedades de adesão de *E. faecium* e *E. faecalis* isolados de queijo Cotija, o qual é produzido com leite cru. A presença de representantes do gênero *Enterococcus* foi demonstrada como um fator importante relacionado à segurança dos alimentos, pois algumas cepas são capazes de produzir enterocinas, atuando como biopreservantes (MAIA et al., 2017; OGAKI et al., 2016).

Na presente pesquisa, as BAL foram avaliadas quanto a sua capacidade de produzirem substâncias com potencial antimicrobiano. Porém, as BAL foram capazes de exercer algum efeito antagonista somente contra *C. fimi* NCTC 7547, dentre os patógenos testados. Em trabalho realizado por Oliveira et al. (1998) essa bactéria indicadora demonstrou-se susceptível a todos os tipos de bacteriocinas avaliadas. Resultados contrários foram encontrados por Bagci et al. (2019), onde os quatro isolados de *E. faecium* avaliados foram capazes de demonstrar atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC 6538, produzindo halos entre 13 e 17 mm, respectivamente.

De acordo com Gaspar et al. (2013), as BAL são capazes de produzir ácidos, como o láctico e o acético, atuando na prevenção de micro-organismos patogênicos e deteriorantes. Essas informações podem subsidiar os resultados obtidos neste trabalho, quando a avaliação da produção de substâncias antimicrobianas foi realizada, mediante a utilização do sobrenadante livre de células com o pH ácido. Portanto, a neutralização do pH foi realizada de modo a minimizar

este efeito, sendo observado que a resposta das BAL se manteve semelhante, de forma que o efeito antimicrobiano desempenhado, pode estar relacionado a produção de enterocinas. Segundo Ogaki et al. (2016), as enterocinas são peptídeos antimicrobianos produzidos por *Enterococcus* spp. que podem apresentar um amplo ou restrito espectro de ação.

Além de auxiliar na inibição de patógenos e micro-organismos deteriorantes, os aspectos de inocuidade relativos à ausência de fatores de virulência, como a produção da enzima gelatinase e a atividade hemolítica, também são relevantes para que uma BAL possa ser sugerida como probiótica, visto que a hemólise dos eritrócitos pode ser causada por micro-organismos patogênicos (GUERRA et al., 2018). A atividade hemolítica pode variar entre cepas de uma mesma espécie, como apontam os resultados encontrados por Ispirli et al. (2017). Os autores avaliaram a atividade hemolítica de *Enterococcus* spp. isolados de queijo branco, e constataram que *E. faecalis* BP2 e *E. faecalis* PY99 apresentaram atividade hemolítica parcial, enquanto o isolado *E. faecalis* PY44 não apresentou atividade hemolítica.

Algumas pesquisas que objetivam a avaliação do potencial probiótico realçam os benefícios atribuídos a estes micro-organismos, mas exploram de forma limitada seus aspectos de inocuidade (TODOROV et al., 2017). Em algumas situações os testes genotípicos revelam resultados que não foram expressos nos testes fenotípicos, onde, *E. faecium* CGLBL203 não produziu a enzima gelatinase, mas teve detectado o gene *geE* (GAGLIO et al., 2016). No presente trabalho uma situação semelhante ocorreu, onde as BAL *E. faecium* M7AN7-1 e *E. faecium* M7AN10 não expressaram perfil de resistência à eritromicina, porém nos testes para determinação de genes de resistência a antimicrobianos, foi detectada a presença do gene *msrC* em ambas BAL.

Uma particularidade importante a ser considerada, é o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, pois os micro-organismos podem atuar como reservatórios de genes de resistência. Segundo Silvetti et al. (2019), *E. faecalis* desempenha uma função importante na disseminação de genes de resistência dentro do próprio gênero *Enterococcus*, para além deste. Os autores ainda ressaltam que o perfil genotípico e fenotípico de isolados clínicos e de alimentos pode ser distinto, porém que estes podem atuar como rotas na propagação desses genes.

De acordo com Silveti et al. (2019), dentre os quarenta isolados de *E. faecalis* obtidos de diferentes queijos produzidos com leite caprino e bovino crus, trinta apresentaram perfil de resistência intermediária à eritromicina. Os dados obtidos pelos autores assemelham-se aos encontrados por Prichula et al. (2013), ao avaliarem o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *Enterococcus* spp. isolados de leite bubalino. No trabalho citado, 52,9% dos isolados de *E. faecalis* apresentaram resistência intermediária para eritromicina, e 65,2% dos isolados de *E. faecium* apresentaram este mesmo perfil.

Uma das razões para isso, seria a utilização de antimicrobianos no tratamento de doenças infecciosas em animais, sua utilização como promotores de crescimento e profilaxia (CANTÓN et al., 2013). Em pesquisa realizada por Iweriebor et al. (2016), com o objetivo de avaliar a susceptibilidade a antimicrobianos em *Enterococcus* spp. isolados de suabes retais de bovinos, foram encontrados perfis de resistência à eritromicina em 99% dos isolados. Os autores atribuem tais resultados ao uso da tilosina, um macrolídeo que pode contribuir com a resistência à eritromicina, devido ao alvo celular ser semelhante para a ação de ambos antimicrobianos. Entretanto, neste trabalho, as BAL foram isoladas de leite bubalino que se encontrava em tanques de resfriamento de um laticínio, abastecido por três propriedades distintas. Ou seja, os aspectos ambientais também devem ser levados em consideração como possíveis fontes de *Enterococcus* spp. resistentes à eritromicina.

A resistência à eritromicina, pode ser mediada pela presença do gene *msrC*. Portillo et al. (2000) sugeriram que este gene seja intrínseco em *E. faecium*, pois todos os 23 isolados avaliados (amostras clínicas e de origem animal) com perfis de susceptibilidade, resistência e resistência intermediária, tiveram a presença do mesmo detectada. Os autores avaliaram a ocorrência deste gene em outras seis espécies do gênero *Enterococcus*, mas nenhuma delas obteve resultados positivos.

Resultados idênticos foram encontrados por Singh et al. (2001), quando o gene *msrC* foi detectado em todos os 233 isolados clínicos de *E. faecium* avaliados, mas não nos outros 265 isolados de cinco diferentes espécies do gênero *Enterococcus*. Entretanto, Werner et al. (2001) avaliaram a frequência desse gene em *E. faecium* oriundos de esgoto, alimentos, humanos e animais, incluindo isolados susceptíveis a macrolídeos. A presença do gene *msrC* foi detectada em 121 dos 139 isolados, porém 18 obtiveram resultados negativos incluindo os de fontes humanas,

esgoto e aves domésticas.

Em pesquisa realizada por Todorov et al. (2017) foi detectada a presença de genes que conferem resistência à tetraciclina, gentamicina, cloranfenicol e eritromicina em *L. plantarum* ST8Sh, mas os autores ressaltam que este isolado pode ser considerado seguro para utilização em alimentos fermentados.

Para realizar a aplicação de culturas probióticas em leites fermentados, como no exemplo acima, deve ser avaliada a manutenção da estabilidade das BAL em temperaturas de refrigeração e congelamento, assim como ao processo de liofilização. A capacidade das BAL tolerarem essas condições é muito importante, visto que a grande maioria de produtos contendo culturas probióticas são derivados lácteos e necessitam de armazenamento em baixas temperaturas (ROSA et al., 2016; MURTAZA et al., 2017; PATRIGNANI et al., 2017; AFZAAL et al., 2018; KATARIA et al., 2018; TERPOU et al., 2019). Os resultados desse estudo demonstraram que a viabilidade das BAL submetidas a temperaturas de refrigeração, congelamento e ao processo de liofilização, foi mantida durante todo o período de avaliação, estando de acordo com os dados obtidos por Zacarias et al. (2011). No estudo relatado, foi realizada a avaliação da manutenção da viabilidade de *Bifidobacterium* spp. em temperaturas de refrigeração e congelamento. As contagens de células viáveis expressaram valores entre 8,9 a 9,7 Log₁₀ UFC mL⁻¹ após seis meses em temperatura de -20 °C. Os autores também observaram a viabilidade após quatro semanas em temperatura de 4 °C, onde as contagens de células viáveis obtidas variaram entre 8,2 a 9,1 Log₁₀ UFC mL⁻¹.

A liofilização de BAL é um importante processo, pois muitas indústrias comercializam suas culturas de forma liofilizada. Astesana et al. (2018) avaliaram a tolerância de *L. casei* DSPV 318T e *L. plantarum* DSPV 354T encapsulados ao processo de liofilização e sua estabilidade em temperatura de refrigeração (4 °C). Os autores observaram que a viabilidade dos micro-organismos após a liofilização foi mantida independentemente do crioprotetor utilizado, assim como durante os 84 dias em que as cápsulas liofilizadas foram estocadas em refrigerador. Entretanto, ao submeterem as mesmas à temperatura de congelamento (-20 °C), somente as cápsulas que continham glicerol como agente crioprotetor, mantiveram-se viáveis.

A viabilidade das culturas probióticas inseridas nos alimentos, deve ser a maior possível, uma vez que, para chegar ao intestino e exercer suas funções, uma bactéria probiótica precisa tolerar a ação dos sais biliares, do fluido gástrico e o

fluido intestinal (FAO/WHO, 2001). Por este motivo, os estudos que avaliam o potencial probiótico devem levar em consideração a aptidão dos micro-organismos diante dessas condições adversas. Pieniz et al. (2014) submetem *E. durans* LAB18s, isolado de queijo Minas frescal, a diferentes concentrações de sais biliares (0,1, 0,25, 0,5, 1 e 1,5%) durante 4 h. Esta BAL foi capaz de tolerar todas as concentrações durante o período avaliado obtendo contagens superiores a $8 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$. Os resultados encontrados no presente trabalho demonstram uma viabilidade reduzida nos isolados, pois *E. faecium* M7AN7-1 e *E. faecium* M7AN10 registraram contagens inferiores a $7 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ após 4 h em contato com 0,5% de sais biliares. A diminuição da viabilidade foi menor quando os mesmos foram expostos a 0,1 e 0,3% de sais biliares, mas somente *E. faecium* M7AN10 registrou contagens ($4,42 \pm 0,21 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$) em contato com 1% de sais biliares. Maia et al. (2017) avaliaram a tolerância de *E. faecium* isolados de queijos artesanais, a 0,3% de sais biliares. Os resultados encontrados pelos autores demonstraram que 24, dos 103 isolados avaliados foram capazes de tolerar a referida concentração de sais biliares durante 240 min. Estas BAL alcançaram taxas de sobrevivência entre 81,5 e 98,2%, dependendo do isolado.

Entretanto, os resultados obtidos por Cebrián et al. (2012) demonstraram que *E. faecalis* UGRA10 perdeu sua viabilidade após exposição a 0,3% de sais biliares. O experimento realizado por estes autores foi realizado de forma consecutiva, ou seja, este micro-organismo foi exposto primeiramente ao HCl em pH 3 durante 1 h, e após, diretamente submetido aos sais biliares pelo mesmo período. As contagens de células viáveis revelaram resultados iniciados em $8,55 \pm 0,65 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ após a exposição ao HCl e $4,53 \pm 0,62 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ após o contato com os sais biliares. Porém, neste trabalho, esta avaliação foi realizada de forma independente, em que *L. rhamnosus*, *E. faecium* M7AN7-1 e *E. faecium* M7AN10 foram expostos aos sais biliares, FGS e FIS em ocasiões distintas.

Ao avaliar a tolerância ao fluido gástrico simulado (pH 2) de quatro cepas de *E. faecium* isoladas de leite humano, Bagci et al. (2019), observaram que após 1 h em contato com esta solução, as contagens foram reduzidas de $8 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ para aproximadamente 2 a $3 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ e que após 3 h, as contagens foram <1 . Nossos resultados variaram de acordo com cada BAL, onde *E. faecium* M7AN7-1 registrou contagens de aproximadamente $3 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ perdendo totalmente a sua viabilidade, enquanto *E. faecium* M7AN10 obteve resultados acima de 7 Log_{10}

UFC mL⁻¹ após 3 h. Contudo, Nascimento et al. (2019) obtiveram resultados que demonstraram elevada viabilidade de *E. faecium* SJRP20 e SJRP65. Os autores realizaram a avaliação consecutiva através de simulação da fase gástrica (pH 2,5), seguida da entérica (pH 8). Após a primeira fase, a viabilidade de ambas era superior a 9 Log₁₀ UFC mL⁻¹ e após a segunda fase, a mesma registrou 8 Log₁₀ UFC mL⁻¹, aproximadamente. Os resultados encontrados por Guerra et al. (2018) também se assemelham aos da pesquisa citada acima. Os autores submeteram *L. paracasei* a condições que simularam o trânsito gástrico e intestinal, onde registraram uma viabilidade de aproximadamente 8 Log₁₀ UFC mL⁻¹ e 7 Log₁₀ UFC mL⁻¹ para cada uma das fases.

Porém, a tolerância ao fluido intestinal tem se mostrado mais importante, pois alguns alimentos podem exercer funções de tamponamento no trato gástrico, auxiliando os probióticos na sua chegada ao intestino delgado (PIENIZ et al., 2014). Em estudo realizado por esses autores, as contagens de *E. durans* LAB18s ao colocá-lo em contato com o fluido intestinal por 4 h, registraram uma viabilidade acima de 8,34 Log₁₀ UFC mL⁻¹. A presente pesquisa encontrou resultados similares tanto para *E. faecium* M7AN7-1, quanto para *E. faecium* M7AN10, onde ambas BAL registraram contagens superiores a 8 Log₁₀ UFC mL⁻¹, durante o mesmo período de exposição ao fluido intestinal. Maia et al. (2017) avaliaram a viabilidade de *E. faecium* expostos a 0,1 g mL⁻¹ de pancreatina em pH 8, durante 240 min e observaram que 45% dos isolados mostraram capacidade de tolerar esta condição adversa, onde os mesmos obtiveram taxas de sobrevivência que variaram entre 78,6 a 99,2%, dependendo da cepa. Senter et al. (2015) avaliaram a tolerância de *L. plantarum* BLS29 ao fluido intestinal após 4 h de exposição, onde obtiveram uma viabilidade acima de 8 Log₁₀ UFC mL⁻¹. A manutenção da viabilidade após o trânsito gastrointestinal é um aspecto importante, pois as culturas probióticas precisam chegar ao intestino em condições viáveis para que possam se aderir às células epiteliais do mesmo.

A capacidade de adesão às células epiteliais é de extrema relevância para um probiótico, visto que tal característica vai determinar sua competência para colonizar o intestino. Os resultados encontrados na literatura costumam ser descritos em percentual de adesão. Dutra et al. (2016) avaliaram a capacidade de adesão de *L. plantarum* LB95 e *L. plantarum* LB13 em células HT-29 (células epiteliais de adenocarcinoma humano), e encontraram percentuais de adesão que variaram de

0,7 a 1,8%. Utilizando o mesmo tipo de células avaliado no presente estudo, Abbasiliasi et al. (2017) avaliaram a adesão de *Pediococcus acidilactici* Kp 10 às células Vero, contudo o objetivo de tal estudo não foi uma abordagem quantitativa, mas sim, qualitativa através de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Em algumas situações a capacidade de adesão pode ser distinta entre determinados tipos de células epiteliais, assim como entre diferentes espécies de BAL pertencentes ao mesmo gênero. Mousavi et al. (2016) avaliaram a adesão de *Lactobacillus* spp. em células Vero e células HeLa (células epiteliais de carcinoma humano). Os autores observaram que a adesão era mais eficiente nas células Vero do que nas HeLa. Ainda, sobre os diferentes tipos de células utilizados, Todorov e Dicks (2008) observaram a adesão de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *E. faecium* e seis diferentes isolados de *L. plantarum* em células Caco-2 (células epiteliais de adenocarcinoma do cólon humano), e os resultados demonstraram que os níveis de adesão variaram entre 1,3 e 8%, sendo considerados como uma alta taxa de adesão os valores de 4 e 8%. Contudo, Zommiti et al. (2018) avaliaram a capacidade de adesão de cinco isolados de *E. faecium* às células Caco-2 e TC7 (células epiteliais de adenocarcinoma do cólon humano), e se referiram aos resultados encontrados, de forma diferente dos demais estudos citados. Três isolados tiveram percentuais de adesão de 0,7, 0,9 e 1,4% (considerados como uma adesão muito baixa). Um isolado apresentou 7% de adesão (adesão moderada) e um isolado com 21% de adesão (alta adesão).

Observando o percentual de adesão dos isolados do presente trabalho, foram registrados 1,23% para *E. faecium* M7AN7-1 e 0,33% para *E. faecium* M7AN10. Porém, ao serem avaliados através da contagem de células viáveis, os resultados demonstraram que 6,93 Log₁₀ UFC mL⁻¹ de *E. faecium* M7AN7-1 e 6,14 Log₁₀ UFC mL⁻¹ de *E. faecium* M7AN10 foram capazes de aderir às células Vero.

Para que a cultura probiótica mantenha sua viabilidade após o trânsito gastrointestinal, aderindo ao intestino, e conseqüentemente, colonizando o mesmo, uma estratégia para minimizar os impactos ocasionados por essas condições adversas, é a técnica de microencapsulação. Além de proteger os micro-organismos das injúrias citadas acima, esse processo auxilia na manutenção da viabilidade em situações com oscilações de temperatura e alterações de pH, próprias das tecnologias de produção dos alimentos, assim como de seu armazenamento (PATRIGNANI, 2017; BARBOSA e TEIXEIRA, 2017).

Alguns métodos de encapsulação demonstraram-se eficientes para determinados micro-organismos, e ineficientes para outros. Surono et al. (2018) realizaram a microencapsulação de *E. faecium* IS-27526 e *L. plantarum* IS-10506 em alginato a 4,75%, através de leite fluidizado, inserindo estas microcápsulas em um sistema que simula a passagem através do trato gástrico e intestino delgado. Os resultados encontrados demonstraram que a viabilidade de *L. plantarum* IS-10506 ao tratamento empregado foi de 84,5%, enquanto apenas 15,7% de *E. faecium* IS-27526 se mantiveram viáveis. Neste trabalho foi empregada a técnica de extrusão com alginato a 2% para realizar a encapsulação de *E. faecium* M7AN10, sendo obtida uma eficiência de 80,74%.

Diferentes materiais encapsulantes também podem exercer uma maior manutenção na viabilidade das BAL, em comparação a outros. Afzaal et al. (2018) encapsularam *L. acidophilus* utilizando alginato e carragena, de forma independente, ambos com concentração de 2%, através de um método automatizado de extrusão. A eficiência de encapsulação em carragena foi de 96%, enquanto em alginato foi de 98%.

O uso de micro-organismos encapsulados em alimentos é uma alternativa para que os mesmos tenham sua viabilidade prolongada, em comparação à utilização de probióticos na forma livre (não encapsulada). Patrignani et al., (2017) encapsularam *L. salivarius* CET 4063 e *L. paracasei* A13, utilizando alginato a 3%, através do método de emulsão, para posterior aplicação em leite fermentado. Este derivado lácteo foi armazenado a 4 °C, sendo a manutenção da viabilidade destes micro-organismos avaliada durante 56 dias, demonstrando que as BAL encapsuladas se mantiveram significativamente ($p \leq 0,05$) mais viáveis do que as na forma livre.

Os sorvetes também se demonstraram como uma boa matriz alimentar para a aplicação de probióticos encapsulados. Kataria et al. (2018) encapsularam *B. longum* CFR815j em alginato 3,6%, juntamente com 2% de amido e 6% de glucose (agente crioprotetor) utilizando o processo de emulsão, com objetivo de aumentar sua viabilidade. Após 15 dias de armazenamento em -20 °C, os resultados demonstraram que houve uma redução de 2,5% na viabilidade desse probiótico na forma encapsulada, contra 40% em relação a sua aplicação na forma livre.

Semelhante ao trabalho citado acima, Afzaal et al. (2018) encapsularam *L. acidophilus* utilizando alginato e carragena (de forma isolada), ambos a 2%,

aplicando as microcápsulas em sorvete e monitorando sua viabilidade por 120 dias. Os resultados demonstraram que esta BAL se manteve significativamente ($p \leq 0,05$) mais viável na forma encapsulada, tanto em alginato, quanto em carragena do que em cultura livre. Esses dados confirmaram que a microencapsulação desempenhou de forma eficaz a manutenção da viabilidade dos micro-organismos aplicados em alimentos que precisam ser armazenados em baixas temperaturas.

Ao aplicar a cultura probiótica encapsulada em bebida láctea UHT comercial e leite integral UHT, foi observado que as microcápsulas desempenharam uma função importante na manutenção da viabilidade de *E. faecium* M7AN10. Essa importância foi refletida nas contagens em bebida láctea e leite, pois ao longo dos 30 dias de armazenamento em refrigerador, as mesmas foram superiores a 7 e 8 Log_{10} UFC mL^{-1} , respectivamente, demonstrando a viabilidade necessária para uma bactéria probiótica.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), *E. faecium* está presente na lista de bactérias reconhecidas como probióticas. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que *E. faecium* M7AN10 manteve a viabilidade atribuída a uma cultura probiótica, onde apresentou contagens iguais ou superiores a 6 Log_{10} UFC mL^{-1} . Quando submetido aos testes que avaliaram a manutenção de sua estabilidade em condições de refrigeração, congelamento e liofilização, assim como sua tolerância aos sais biliares e fluídos gástrico e intestinal simulados, este micro-organismo demonstrou-se viável. Além disso, o mesmo aderiu às células Vero e foi encapsulado em alginato, tendo sua viabilidade preservada. Em relação à inocuidade, não apresentou atividade hemolítica, produção da enzima gelatinase e resistência aos antimicrobianos avaliados. Ainda em relação a estes aspectos, não foi observada a detecção dos genes que conferem virulência, investigados neste trabalho, sendo detectado apenas um gene que confere resistência a antimicrobianos, dentre os nove testados. Porém, de acordo com a literatura consultada, o mesmo trata-se de uma característica intrínseca de *E. faecium*. Esta BAL manteve sua viabilidade quando as microcápsulas contendo *E. faecium* M7AN10 foram aplicadas em caldo MRS, leite integral UHT e bebida láctea comercial UHT durante o período avaliado e com armazenamento em refrigerador.

De posse dos dados obtidos na avaliação *in vitro* e após compará-los com as informações encontradas na literatura, *E. faecium* M7AN10 pode ser sugerida

como uma cultura potencialmente probiótica. Entretanto, é necessária a realização de testes *in vivo* de forma a se observar se as características probióticas e sua viabilidade são mantidas.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho identificou as cinco BAL isoladas de leite bubalino através de sequenciamento do gene 16S rRNA, como pertencentes ao gênero *Enterococcus*, sendo as mesmas capazes de produzirem substâncias com potencial antimicrobiano.

Após a avaliação dos aspectos de inocuidade das BAL, *E. faecium* M7AN7-1 e *E. faecium* M7AN10 foram classificadas como inócuas, mediante os testes realizados. Ambas BAL foram selecionadas para a avaliação da estabilidade em diferentes condições de temperatura, assim como de seu potencial probiótico.

As duas BAL permaneceram viáveis após os testes que avaliam a manutenção e estabilidade da viabilidade, em diferentes condições. Contudo, em relação à avaliação do potencial probiótico, somente *E. faecium* M7AN10 se manteve viável após a exposição ao fluído gástrico simulado.

E. faecium M7AN10 foi selecionada para ser microencapsulada em alginato, tendo sua viabilidade avaliada em diferentes meios. Após essa avaliação, *E. faecium* M7AN10 foi aplicada em bebida láctea UHT. A viabilidade dessa BAL na matriz alimentar citada registrou contagens acima de $7 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$ após 30 dias de aplicação neste alimento.

Os resultados obtidos na avaliação *in vitro* demonstraram que *E. faecium* M7AN10 apresentou a inocuidade e viabilidade necessárias para ser sugerida como uma cultura potencialmente probiótica, obtendo contagens de células viáveis iguais ou superiores a $6 \text{ Log}_{10} \text{ UFC mL}^{-1}$.

Mais estudos são necessários com as culturas livres e encapsuladas a fim de se avaliar a eficiência do processo de encapsulação, em comparação com as culturas livres, assim como, testes *in vivo* devem ser realizados com o intuito de observar se a viabilidade é mantida.

8. REFERÊNCIAS

- Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 37(2):127-37.
- Abbasiliasi S, Tan JS, Bashokouh F, Ibrahim TAT, Mustafa S, Vakhshiteh F, Sivasambo S, Ariff AB. 2017. In vitro assessment of *Pediococcus acidilactici* Kp10 for its potential use in the food industry. *BMC Microbiology*. 17(121):2-11.
- Afzaal M, Saeed F, Arshad MU, Nadeem MT, Saeed M, Tufail T. 2018. The Effect of Encapsulation on The Stability of Probiotic Bacteria in Ice Cream and Simulated Gastrointestinal Conditions. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 10:1-7.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Gerência Geral de Alimentos. 2017. **Probióticos: Construção da Lista de Linhagens Probióticas**. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/3845226/0/An%C3%A1lise+das+Linhagens+de+Probi%C3%B3ticos__23042018.pdf/6e37da13-2151-4330-85b0-0f449dbb0e95>. Acesso em: 28 out. 2018.
- Aragon-Alegro LC, Alegro JHA, Cardarelli HR, Chiu MC, Saad SMI. 2007. Potentially probiotic and synbiotic chocolate mousse. *LWT*. 40:669-75.
- Astesana DM, Zimmermann JA, Frizzo LS, Zbrun MV, Blajman JE, Berisvil AP, Romero-Scharpen A, Signorini ML, Rosmini MR, Soto LP. 2018. Development and storage studies of high density macrocapsules containing *Lactobacillus* spp. strains as nutritional supplement in young calves. *Rev Argent Microbiol*. 50(4):398-07.
- Azeredo HMC. 2005. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alim. Nutr*. 16(1):89-97.
- Bagci U, Togay SO, Temiz A, Ay M. 2019. Probiotic characteristics of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from human milk and colostrum. *Folia Microbiologica*. 64(2):1-16.
- Barbosa J, Teixeira P. 2017 Development of probiotic fruit juice powders by spray drying: a review. *Food Reviews International*. 33(4):335-58.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Disponível em:<http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137>. Acesso em 10 fev. 2019.

- Brasil. Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Probióticos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 21 jun. 2017.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 12, de janeiro de 2001. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/res0012_02_01_2001.html>. Acesso em: 30 jun. 2017.
- Brito MA, Brito JR, Arcuri Edna, Lange C, Silva M, Souza G. 2017. **Composição**. Agência de Informação Embrapa. Agronegócio do leite. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html>. Acesso em: 30 jun. 2017.
- Cantón R, Horcajada JP, Oliver A, Garbajosa PR, Vila J. 2013. Inappropriate use of antibiotics in hospitals: The complex relationship between antibiotic use and antimicrobial resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 31(4):3-11.
- Capela P, Hay TKC, Shah NP. 2007. Effect of homogenisation on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria. *Food Research International* 40:1261-69.
- Capitani C, Hauschild FAD, Friedrich CJ, Lehn DN, 4, Souza CFV. 2014. Caracterização de iogurtes elaborados com probióticos e fibra solúvel. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. 8(2):1285-00.
- Cebrián R, Baños A, Valdivia E, Pérez-Pulido R, Martínez-Bueno M, Maqueda M. 2012. Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. *Food Microbiology*. 30:59-67.
- Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. 1998. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*. 84:759-68.
- Choi JM, Woo GJ. 2015. Transfer of tetracycline resistance genes with aggregation substance in food-borne *Enterococcus faecalis*. *Current Microbiology*. 70(4):476-84.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 28st Informational Supplement M100–S28. Wayne, PA: CLSI; 2018.
- Damé M, Marcondes C, Ribeiro M, Garner A, Santos CDS. 2010. Produção e qualidade de leite de bubalinos no Rio Grande do Sul: dados preliminares. Embrapa Clima Temperado-Documents (INFOTECA-E). 1806-9193:1-16.
- Damé MCF, Silva WP. 2003. **Observações preliminares sobre a produção de**

leite bubalino no Rio Grande do Sul. Embrapa Clima Temperado. 20 p.

Defesa Agropecuária Estado de São Paulo. Resolução SAA-24 de 01, de agosto de 1994. Dispõe sobre as normas técnicas de produção e classificação dos produtos de origem animal e as relativas às atividades de fiscalização e inspeção dos produtos de origem animal. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/resolucao-saa-24-de-01-08-1994,33.html>>. Acesso em 12 dez. 2018.

Donato ST. 2007. **Comparação de métodos convencionais e semi-automatizados para identificação de *Enterococcus* spp. frente à Biologia Molecular em identificação discrepantes.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. 1995. Detection of Glycopeptide Resistance Genotypes and Identification to the Species Level of Clinically Relevant Enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 33(1):24-27.

Dutra V, Silva AC, Cabrita P, Peres C, Malcata X, Brito L. 2016. *Lactobacillus plantarum* LB95 impairs the virulence potential of Gram-positive and Gram-negative food-borne pathogens in HT-29 and Vero cell cultures. *Journal of Medical Microbiology*. 65:28-35.

Eaton TJ, Gasson MJ. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environment Microbiology*. 67(4):1628-35.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2019. **Indicadores Leite e Derivados.** Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1105829/1/Indicadoresleite87fev.pdf>>. Acesso em: 28 fev. 2019.

FAO-WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. 2002. **Report of a joint FAO-WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of the probiotics in food**, 17 p.

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

Faria CP, Benedet HD, Le Guerroue JL. 2006. Parâmetros de produção de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei*. *Pesq. agropec. bras.* 41(3):511-16.

Foligné B, Daniel C, Pot B. 2013. Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. *Current opinion in microbiology*. 16(3): 284-92.

- Frazzon APG, Gama BA, Hermes V, Bierhals CG, Pereira RI, Guedes AG, d'Azevedo PA, Frazzon J. 2010. Prevalence of antimicrobial resistance and molecular characterization of tetracycline resistance mediated by *tet(M)* and *tet(L)* genes in *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26(2):365-70.
- Gaglio R, Couto N, Marques C, Lopes MFS, Moschetti G, Pomba C, Settanni L. 2016. Evaluation of antimicrobial resistance and virulence of enterococci from equipment surfaces, raw materials, and traditional cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 236:107-14.
- Gallo LA. **As proteínas lácteas.** Disponível em:< <http://docentes.esalq.usp.br/luagallo/proteinas2.pdf>>. Acesso em: 28 jun. 2017.
- Gaspar P, Carvalho AL, Vinga S, Santos H, Neves AR. 2013. From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnology advances*. 31(6):764-88.
- Giraffa G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*. 88:215-22.
- Gomes MSM. 2013. **Caracterização tecnológica de bactérias lácticas isoladas de leite cru de búfala para potencial uso como culturas iniciadoras.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- Gontang EA, Fenical W, Jensen PR. 2007. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:3272-82.
- Guerra AF, Lemos Junior WJF, Santos GO, Andrighetto C, Gianomini A, Corich V, Luchese RH. 2018. *Lactobacillus paracasei* probiotic properties and survivability under stress-induced by processing and storage of ice cream bar or ice-lolly. *Ciência Rural*. 48(09):1-9.
- Guimarães DHP, Silva FRSR, Lénthola NM. 2015. Iogurte elaborado à base de leite de búfala sabor queijo com geleia de goiaba. *Brazilian Journal of Food Technology*. 18(1):57-61.
- Guimarães DHP, Silva FRSR. 2014. Dairy Products Production with Buffalo Milk. *International Journal of Applied Science and Technology*. 4(3):14-19.
- Hill D, Sugrue I, Arendt E, Hill C, Stanton C, Ross RP. 2017. Recent advances in microbial fermentation for dairy and health. *F1000Research*. 6(751):1-9.
- Ispirli H, Demirbas F, Dertli E. 2017. Characterization of functional properties of *Enterococcus* spp. isolated from Turkish white cheese. *LWT - Food Science and Technology*. 75:358-65.

- Iweriebor BC, Obi LC, Okoh AI. 2016. Macrolide, glycopeptide resistance and virulence genes in *Enterococcus* species isolates from dairy cattle. *Journal of Medical Microbiology*. 65:641-48.
- Jeronymo-Ceneviva AB, Paula AT, Silva LF, Todorov SD, Franco BDGM, Penna ALB. 2014. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from water-buffalo mozzarella cheese. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 6(3-4):141-56.
- Kataria A, Achi SC, Halami PM. 2018. Effect of Encapsulation on Viability of *Bifidobacterium longum* CFR815j and Physiochemical Properties of Ice Cream. *Indian J Microbiol*. 58(2):248-51.
- Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*. 13:3-13.
- Liao N, Luo B, Gao J, Li X, Zhao Z, Zhang Y, Ni Y, Tian F. 2019. Oligosaccharides as co-encapsulating agents: effect on oral *Lactobacillus fermentum* survival in a simulated gastrointestinal tract. *Biotechnol Lett*. 41:263-72.
- LPSN - List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. All names cited in the List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: List D – L. 2019. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/enterococcus.html>>. Acesso em: 15 fev. 2019.
- Maia LF, Giazzi A, Brandalize C, Katsuda MS, Rocha KR, Terra MR, Furlaneto MC. 2017. Isolation and characterization of potential probiotic enterococci strains from soft cheese flora. *African Journal of Microbiology Research*. 11(12):482-87.
- Mannu L, Paba A, Daga E, Comunian R, Zanetti S, Dupré I, Sechi LA. 2003. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *International Journal of Food Microbiology*. 88(2-3):291-04.
- Maragkoudakis PA, Mountzouris KC, Psyrras D, Cremonese S, Fischer J, Cantor MD, Tsakalidou E. 2009. 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*. 130(3): 219-26.
- Marra A, Dib-Hajj F, Lamb L, Kaczmarek F, Shang W, Beckius G, Milici AJ, Medina I, Gootz TD. 2007. Enterococcal virulence determinants may be involved in resistance to clinical therapy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 58:59-65.
- Medeiros AW. 2011. **Avaliação dos fatores de virulência e a capacidade de formação de biofilme *in vitro* em isolados alimentares e clínicos de *Enterococcus* sp. e utilização de PCR-RFLP para a identificação de**

***Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus gallinarum*.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Meira SMM, Helfer VE, Velho RV, Lopes FC, Brandelli A. 2012. Probiotic potential of *Lactobacillus* spp. isolated from Brazilian regional ovine cheese. *Journal of Dairy Research*. 79(1):119-27.

Meira SMM, Helfer VE, Velho RV, Medina LFC, Brandelli A. 2010. Identificação e resistência a barreiras biológicas de bactérias lácticas isoladas de leite e queijo de ovelha. *Brazilian Journal of Food Technology*. 3:75-80.

Miles AA, Misra SS, Irwin JO. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *The Journal of Hygiene*. 38(6):732-49.

Monteiro RCR, Veloso CR, Neres LS, Lourenço Júnior JB, Pacheco EA, Abe Sato ST, Santos MAS, Nahum BS, Ribeiro IA. 2015. Desenvolvimento e avaliação da qualidade de sorvete de iogurte simbiótico, de leite de búfala enriquecido com polpa de açaí (*Euterpe oleracea*). *Nucleus*. 12(2):237-44.

Motta AS, Brandelli A. 2002. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology*. 92:63-71.

Moura TM, Campos FS, Caierão J, Franco AC, Roehe PM, d'Azevedo PV, Frazzon J, Frazzon APG. 2015. Influence of a subinhibitory concentration of vancomycin on the *in vitro* expression of virulence-related genes in the vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 48(5):617-21.

Mousavi E, Makvandi M, Teimoori A, Ataei A, Ghafari S, Najafian M, Ourang Z, Samarbaft-Zadeh A. 2016. *In vitro* adherence of *Lactobacillus* strains isolated from the vaginas of healthy Iranian women. *Journal of the Chinese Medical Association*. 79:665-71.

Murtaza MA, Huma N, Shabbir MA, Murtaza MS, Anees-ur-Rehman M. 2017. Survival of micro-organisms and organic acid profile of probiotic Cheddar cheese from buffalo milk during accelerated ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 70:1-10.

Nascimento LCS, Casarotti SN, Todorov SD, Penna ALB. 2019. Probiotic potential and safety of enterococci strains. *Annals of Microbiology*. 69:1-12.

Nascimento LCS. 2017. **Seleção de novas linhagens de bactérias ácido-láticas probióticas e aplicação de *E. faecium* em leite.** Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto.

Ogaki MB, Rocha KR, Terra MR, Furlaneto MC, Maia LF. 2016. Screening of the

- Enterocin-Encoding Genes and Antimicrobial Activity in *Enterococcus* Species. J. Microbiol. Biotechnol. 26(6):1026-34.
- Oliveira SS, Abrantes J, Cardoso M, Sordelli D, Bastos MCF. 1998. Staphylococcal strains involved in mastitis are inhibited by *Staphylococcus aureus* antimicrobial peptides. Lett Appl Microbiol. 27:287-91.
- Olvera-García M, Sanchez-Flores A, Baruch MQ. 2019. Genomic and functional characterisation of two *Enterococcus* strains isolated from Cotija cheese and their potential role in ripening. Applied Microbiology and Biotechnology. 102:2251-67.
- Patrignani F, Siroli L, Serrazanetti DI, Braschi G, Betoret E, Reinheimer JA, Lanciotti R. 2017. Microencapsulation of functional strains by high pressure homogenization for a potential use in fermented milk. Food Research International 97:250–57.
- Paula AT, Jeronymo-Ceneviva AB, Silva LF, Todorov SD, de Melo Franco BDG, Choiset Y, Penna ALB. 2014. *Leuconostoc mesenteroides* SJRP55: a bacteriocinogenic strain isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. Probiotics and antimicrobial proteins. 6(3-4):186-97.
- Pieniz S, Andreatza R, Anghinoni T, Camargo F, Brandelli A. 2014. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. Food Control. 37:251-56.
- Poffo F, Silva MAC. 2011. Caracterização taxonômica e fisiológica de bactérias ácido-láticas isoladas de pescado marinho. Ciênc. Tecnol. Aliment. 31(2): 303-07.
- Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Alonso A, Martinez JL, Torres C. 2000. Macrolide Resistance Genes in *Enterococcus* spp. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 44(4):967-71.
- Prichula J. 2015. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Enterococcus* spp. isolados de amostras fecais de pinguins-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus*) encontrados no Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Prichula J, Zvoboda DA, Pereira RI, Santestevan NA, Medeiros AW, Motta AS, Frazzon APG. 2013. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e diversidade das espécies de enterococos isolados de leite cru de búfalas no Sul do Brasil. Revista Brasileira de Ciência Veterinária. 20(2):104-09.
- Rajoka MSR, Shi J, Zhu J, Shao D, Huang Q, Yang H, Jin M. 2017. Capacity of lactic acid bacteria in immunity enhancement and cancer prevention. Applied microbiology and biotechnology. 101(1):35-45.
- Rosa LJB, Esper LMR, Cabral JPLG, Franco RM, Cortez MAS. 2016. Viability of

- probiotic micro-organism *Lactobacillus acidophilus* in dairy chocolate dessert and its action against foodborne pathogens. *Ciência Rural*. 46(2):368-74.
- Santestevan NA, Zvoboda DA, Prichula J, Pereira RI, Wachholz GR, Cardoso LA, Moura TM, Medeiros AW, Amorin DB, Tavares M, d'Azevedo PA, Franco AC, Frazzon J, Frazzon APG. 2015. Antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of *Enterococcus* spp. isolates from wild *Arctocephalus australis* (South America fur seal) and *Arctocephalus tropicalis* (Subantartic fur seal). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 31(12):1935-46.
- Sarao LK, Arora M. 2017. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57(2):344-71.
- Senter L, Pereira JQ, Vieira MA, Michielin EMZ, Tondo EC. 2015. Isolation and characterization of *Lactobacillus plantarum* BLS29 as a potential probiotic starter culture for pork sausage production. *African Journal of Microbiology Research*. 9(32):1887-95.
- Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MLS. 1999. Infection-Derived *Enterococcus faecalis* Strains Are Enriched in *esp*, a Gene Encoding a Novel Surface Protein. *Infection and Immunity*. 67(1):193-00.
- Sherman JM. 1937. The streptococci. *Bacteriological Reviews*. 1(1): 3-97.
- Shiby VK, Mishra HN. 2013. Fermented Milks and Milk Products as Functional Foods-A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 53:482–96.
- Silva MPD. 2016. **Desenvolvimento e caracterização de chocolate meio amargo contendo micro-organismos probióticos na forma livre e encapsulada**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.
- Silva LF, Casella T, Gomes ES, Nogueira MCL, Dea Lindner J, Penna ALB. 2015. Diversity of lactic acid bacteria isolated from Brazilian water buffalo mozzarella cheese. *Journal of food science*. 80(2):411-17.
- Silva SL, Nardi Junior G. 2014. Produção de derivados bubalinos e mercado consumidor. *Tekhne e Logos*. 5(1):15-30.
- Silvetti T, Morandi S, Brasca M. 2019. Does *Enterococcus faecalis* from Traditional Raw Milk Cheeses Serve as a Reservoir of Antibiotic Resistance and Pathogenic Traits? *Foodborne Pathogens and Disease*. 16(5):1-9.
- Singh KV, Malathum K, Murray BE. 2001. Disruption of an *Enterococcus faecium* Species-Specific Gene, a Homologue of Acquired Macrolide Resistance Genes of Staphylococci, Is Associated with an Increase in Macrolide Susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45(1):263-66.
- Song D, Ibrahim S, Hayek S. 2012. Recent application of probiotics in food and

- agricultural science. In Probiotics. InTech. 1-36.
- Sousa S, Gomes AM, Pintado MM, Malcata FX, Silva JP, Sousa JM, Costa P, Amaral MH, Rodrigues D, Rocha-Santos TAP, Freitas AC. 2012. Encapsulation of probiotic strains in plain or cysteine-supplemented alginate improves viability at storage below freezing temperatures. *Eng. Life Sci.* 12(4):457-65.
- Surono I, Verhoeven J, Verbruggen S, Venema K. 2018. Microencapsulation increases survival of the probiotic *Lactobacillus plantarum* IS-10506, but not *Enterococcus faecium* IS-27526 in a dynamic, computer-controlled in vitro model of the upper gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology.* 124:1604-09.
- Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. 1996. Detection of Erythromycin-Resistant Determinants by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 40(11): 2562-66.
- Terpou A, Mantzourani I, Galanis A, Kanellaki M, Bezirtzoglou E, Bekatorou A, Koutinas AA, Plessas S. 2019. Employment of *L. paracasei* K5 as a Novel Potentially Probiotic Freeze-Dried Starter for Feta-Type Cheese Production. *Microorganisms.* 7(1):2-17.
- Todorov SD, Perin LM, Carneiro BM, Rahal P, Holzapfel W, Nero LA. 2017. Safety of *Lactobacillus plantarum* ST8Sh and Its Bacteriocin. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 9:334-44.
- Todorov SD, LeBlanc JG, Franco BDGM. 2012. Evaluation of the probiotic potential and effect of encapsulation on survival for *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya. *World J Microbiol Biotechno.* 28:973-84.
- Todorov SD, Dicks LMT. 2008. Evaluation of lactic acid bacteria from kefir, molasses and olive brine as possible probiotics based on physiological properties. *Annals of Microbiology.* 58(4):661-70.
- Werner G, Hildebrandt B, Witte W. 2001. The Newly Described *msrC* Gene Is Not Equally Distributed among All Isolates of *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 45(12):3672-73.
- Zacarias MF, Binetti A, Laco M, Reinheimer J, Vinderola G. (2011). Preliminary technological and potential probiotic characterization of bifidobacteria isolated from breast milk for use in dairy products. *International Dairy Journal.* 21:548-55.
- Zommiti M, Cambronel M, Maillot O, Barreau M, Sebei K, Feuilloley M, Ferchichi M, Connil N. 2018. Evaluation of Probiotic Properties and Safety of *Enterococcus faecium* Isolated From Artisanal Tunisian Meat "Dried Ossban". *Frontiers in Microbiology.* 9:1-12.