



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RAFAEL CARDOSO DE LIMA

**ATIVIDADE ANTAGONISTA E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE
BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE FRUTAS TROPICAIS**

João Pessoa

2016

RAFAEL CARDOSO DE LIMA

**ATIVIDADE ANTAGONISTA E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE
BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS ISOLADAS DE FRUTAS TROPICAIS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Coordenação de Engenharia de Alimentos, do
Centro de Tecnologia, da Universidade Federal
da Paraíba, Campus I, João Pessoa, em
cumprimento aos requisitos obrigatórios para
obtenção do título de Engenheiro de Alimentos.

Orientadora: Dr^a Marciane Magnani

João Pessoa

2016

RAFAEL CARDOSO DE LIMA

**ATIVIDADE ANTAGONISTA E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE
BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS ISOLADAS DE FRUTAS TROPICAIS**

Aprovado em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a Marciane Magnani

Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia,
Universidade Federal da Paraíba, UFPB
Orientador(a)

Prof. Dr^a Ingrid Conceição Dantas Guerra

Departamento de Gastronomia, Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional, UFPB
Examinador Externo

Prof. Estefânia Fernandes Garcia

Departamento de Gastronomia, Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional, UFPB
Examinador Externo

João Pessoa

2016

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, por ter me dado condições de lutar, alcançar meus objetivos, e de manter a esperança em todos os momentos da minha vida. A minha família, namorada e amigos que foram porto seguro perante as dificuldades durante este percurso.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pelo dom da vida, pelo seu amor infinito, sem ele nada sou.

Aos meus pais Antonio Cardoso e Zuleide Alves pelos ensinamentos de vida, amor, companheirismo, compreensão, confiança, incentivo e dedicação aos meus sonhos. Obrigada por se fazerem presente em todos os momentos e por acreditarem em mim. Vocês terão meu amor, admiração e agradecimento eternamente.

Aos meus irmãos Raniel e Amanda pelo apoio e pela ajuda em todos os momentos da minha vida em que precisei e que ainda vou precisar. Ao meu irmão Samuel Cardoso que mesmo não estando mais presente me dá forças para continuar.

A minha namorada, melhor amiga e companheira de todas as horas, Karla Camyla, pelo carinho, compreensão, amor, paciência e pelas horas despendidas a mim para o desenvolvimento desse trabalho, ficando horas ao meu lado, contribuindo e me dando todo apoio, acreditando na minha capacidade.

A todos os familiares por toda a torcida pelo sucesso neste trabalho, fazendo com que a minha vitória também fosse deles.

Aos meus professores, por serem os melhores condutores possíveis para que eu pudesse aprender e vivenciar uma grande experiência.

À minha orientadora Marciane Magnani, por ter acreditado em mim por ter me dado todo incentivo e apoio, pela competência na orientação, pelo tempo de dedicação, paciência e disposição que sempre teve comigo para concretização deste trabalho.

Um agradecimento especial a Whyara Almeida, por ter me dado todo apoio, ter dedicado parte do seu tempo para me orientar, me passar um pouco do seu conhecimento, que por sinal é enorme, ter tido paciência e estar sempre disponível quando eu precisei. Além de tudo possui um grande coração sempre disposta a ajudar, uma pessoa abençoada.

Aos amigos e companheiros de sala de aula que conviveram comigo estes anos de faculdade. Tudo o que passamos com toda certeza foi uma grande experiência que nos será levada para toda nossa vida pessoal e profissional.

Ao meu chefe e verdadeiro amigo Ricardo Candido, por sempre estar presente quando precisei, por ter dedicado um pouco do seu tempo para me ouvir, fazendo da minha luta a sua. Por todo conhecimento a mim passado, por ter acreditado na minha capacidade, mostrando que eu posso mais do que imagino. Pelos conselhos dados, estando sempre a disposição não importando quando e nem onde.

Aos amigos de laboratório: Rayssa, Myrella, Tainá, Jessica, Vanessa, Geany, Laênia, João Otávio, Sonalle, Adma e Janaína pela colaboração na execução do trabalho, pelo carinho e satisfação em fazê-lo.

E a todos mais que colaboraram de forma direta e indireta na elaboração deste sonho.

Muito obrigado!

“Aqueles que esperam no Senhor renovam as suas forças. Voam alto como águias.
Correm e não ficam exaustos, andam e não se cansam”.
(Isaías 40:31).

RESUMO

O uso de agentes antimicrobianos naturais em sistemas de conservação de matrizes alimentares tem sido alvo de inúmeras pesquisas devido à crescente busca, por parte dos consumidores, por alimentos mais naturais, com elevada qualidade organoléptica e sem o comprometimento da vida de prateleira. Bactérias ácido lácticas (BAL) surgem como interessante alternativa devido sua capacidade de produzir substâncias capazes de inibir o crescimento de bactérias patogênicas. Um fator que pode comprometer o uso de BAL como biopreservantes é a resistência a antibióticos. Há a preocupação de que a resistência de BAL possa ser transferida para outros micro-organismos de interesse em alimentos, tornando-os resistentes. O presente trabalho teve como objetivo avaliar atividade antagonista e o perfil de resistência de bactérias ácido lácticas frente à patógenos de interesse em alimentos. A identidade das cepas de BAL teste foi confirmada pela análise de gene 16S RNAr. Cepas de *Salmonella Enteritidis* (SAE), *Salmonella Typhimurium* (SAT) *S. aureus* (STA1 e STA2), *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) e *L. monocytogenes* (LIM) foram utilizadas como reveladoras da atividade antagonista avaliada pela técnica “*Spot on the Lawn*”. Para a avaliação do efeito do meio de cultura sob a produção de substâncias antimicrobianas das cepas teste de BAL, o método foi feito usando diferentes meios de cultivo. Para o teste de resistência a antibióticos tetraciclina, vancomicina, clindamicina, eritromicina, kanamicina, ampicilina, clorofenicol e gentamicina foram selecionadas as cepas de BAL que apresentaram maior atividade inibitória frente *S. Enteritidis*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Os testes foram realizados utilizando micro-diluição em caldo. Quando inoculadas em MRS agar todas as cepas de BAL apresentaram atividade frente às cepas reveladoras. Os maiores halos de inibição foram observados para *Lactobacillus plantarum* (LPMA15) frente SAT ($29,50 \pm 0,40$) e *Lactobacillus paracasei* (LPMA7) frente SAE ($24,00 \pm 1,00$) e os menores para *Lactococcus lactis* (LPMA2) frente STA1 ($5,30 \pm 0,30$) e *Lactobacillus plantarum* (LPMA14) frente PSA ($5,40 \pm 0,10$). O sobrenadante livre de células (SLC) das cepas teste de BAL não apresentou atividade antagonista ao crescimento dos patógenos. Todas as cepas apresentaram resistência a algum antibiótico, sendo que as cepas *Lactobacillus plantarum* (LPMA3) e *Lactobacillus plantarum* (LPMA14) apresentaram maior perfil de resistência frente 5, e 6 antibióticos, respectivamente. Os resultados evidenciaram a capacidade das BAL de inibir o crescimento de patógenos, porém a origem da resistência antimicrobiana das cepas de BAL necessita ser melhor estudada para avaliar o potencial de aplicação das cepas como conservantes de alimentos.

Palavras chave: antimicrobianos naturais, antagonismo, bioconservação, atividade antimicrobiana.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	09
2	OBJETIVOS.....	11
2.1	Objetivo Geral.....	11
2.2	Objetivo Específico.....	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1	Bactérias ácido lácticas (BAL): Características e atividade antagonista.....	12
3.2	Resistência a antibióticos.....	15
3.3	Micro-organismos patogênicos em alimentos.....	18
4	MATERIAL E MÉTODO.....	21
4.1	Local do experimento.....	21
4.2	Identificação molecular dos isolados de BAL.....	21
4.3	Etapas teste para avaliação de atividade antagonista.....	21
4.3.1	TESTE DE ANTAGONISMO "SPOT ON THE LAWN".....	22
4.3.2	TESTE ANTAGONISTA DO SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS (SLC)....	23
4.4	Perfil de resistência a antibióticos.....	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6	CONCLUSÃO.....	32
7	REFERENCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

Os riscos causados por agentes microbiológicos são motivo de grande preocupação para a saúde do consumidor. A indústria de alimentos utiliza diversos agentes químicos sintéticos como conservantes para garantir a inocuidade e ampliar a vida de prateleira dos alimentos (MAGNÚSSON et al., 2012). Entretanto a crescente demanda dos consumidores por alimentos mais naturais e/ou com níveis baixos de aditivos químicos, alta qualidade organoléptica e com a conveniência de uma longa vida de prateleira, vem direcionando as pesquisas para a busca de sistemas de conservação “mais naturais” conhecidos como bioconservação ou biopreservação (CHANG et al., 2015; UDHAYASHREE et al., 2012; LOPES, 2013).

Inúmeros micro-organismos têm sido sugeridos como agentes biopreservantes, alguns com longa história de utilização, tais como bactérias do gênero *Lactobacillus*, outros pouco conhecidos a exemplo de bactérias dos gêneros *Leuconostoc* e *Streptococcus* (ZHEN et al., 2016; BADARÓ et al., 2009). A bioconservação tem como objetivo estender a vida útil, aumentar a segurança, minimizar as perdas nutricionais e as alterações sensoriais de alimentos perecíveis. Estes sistemas surgem como uma alternativa interessante que faz uso da capacidade antimicrobiana natural que alguns micro-organismos e/ou seus metabólitos possuem (GARCÍA et al., 2010) Neste contexto, as bactérias ácido lácticas (BAL) têm sido estudadas devido sua capacidade de produzir substâncias com atividade antimicrobiana, como bacteriocinas, ácidos orgânicos, dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, diacetil, acetaldeídos (MALDONADO-BARRAGAN et al., 2013; AYYASH; SHAH, 2010).

Existem relatos de atividade antagonista de BAL frente bactérias patogênicas de interesse como contaminantes de alimentos, a citar as bactérias *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica* (UDHAYASHREE et al., 2012; MESSAOUDI et al., 2012). Ainda, BAL antagonizam o crescimento de bactérias e fungos deteriorantes e produtores de micotoxinas (DIGAITIENE et al., 2012; GHANBARI et al., 2013; ZHEN et al., 2016) evidenciando o potencial de aplicação destes compostos como conservantes em sistemas alimentares.

BALs são reconhecidas como seguras (GRAS) por fazer parte da microflora normal de frutas e vegetais, em função do seu longo histórico de uso e porque não estão associadas a efeitos patogênicos (GAISER et al., 2011; ZHANG et al., 2012). Ainda, BAL são responsáveis pelo desenvolvimento de características organolépticas de uma ampla variedade de produtos

fermentados e curados, sendo de grande interesse para a utilização como conservadores naturais dos alimentos. Dentre as aplicações industriais de BAL, destaca-se a produção de ácido láctico para uso como aditivo em alimentos.

Um fator que pode comprometer o uso de BALs como biopreservantes é a resistência a antibióticos utilizados na clínica humana e veterinária. Há a preocupação de que a resistência de BAL possa ser transferida para outros micro-organismos de interesse em alimentos, tornando-os resistentes, e conseqüentemente dificultando o tratamento de infecções ou doenças (MAGNÚSSON et al., 2012).

Considerando tais aspectos, torna-se interessante o desenvolvimento de pesquisas que tenham enfoque na caracterização e avaliação da atividade antagonista de cepas de BAL frente patógenos de origem alimentar, bem como que avaliem o perfil de resistência de cepas que apresentem potencial como biopreservantes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar atividade antagonista e o perfil de resistência de bactérias ácido lácticas.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar as espécies de bactérias ácido lácticas (BAL) isoladas de acerola (*Malpighia emarginata*), manga (*Mangífera indica*) e graviola (*Annona muricata*).
- Avaliar a atividade antagonista das cepas de BAL frente patógenos de interesse em alimentos;
- Determinar o perfil de resistência a antibióticos (tetraciclina, clindamicina, eritromicina, kanamicina, ampicilina, clorofenicol e gentamicina) das cepas de BAL que apresentarem atividade antagonista ao crescimento de *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Bactérias Ácido Lácticas (BAL): Características e atividade antagonista

BAL representam um grupo de diversos micro-organismos comumente encontrados em frutas e vegetais (SCHROETER; KLAENHAMMER, 2009). Embora a população microbiana epífita de plantas seja amplamente submetida a flutuações decorrentes das condições físicas e nutricionais nestes substratos, é reconhecido que cada espécie de fruta abriga uma microbiota dominante e constante (YANG et al., 2000). Em geral, a população bacteriana total de frutas e legumes oscila entre 5 e 7 log UFC/g, enquanto a população de BAL varia de 2 a 5 log UFC/g (DI CAGNO et al., 2010). Em relação à segurança, há geralmente um consenso quanto à ausência de patogenicidade de BAL. Com exceção de algumas espécies de *Streptococcus* e *Enterococcus*, BAL raramente são patogênicas para o homem e animais. Entretanto diversos testes são realizados para garantir a aplicação segura destas bactérias em alimentos, no sentido de definir quais cepas dessas bactérias podem realmente ser consideradas isentas de riscos à saúde (FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006).

De acordo com Toro (2005), BAL podem possuir forma de cocos, bacilos ou bastonetes regulares e bacilos ou bastonetes irregulares. Caracterizam-se como bactérias Gram-positivas, catalase negativas, não formadoras de esporos. BAL são considerados aerotolerantes, podendo crescer na ausência ou presença de O₂ (MOZZI et. al, 2010). E incluem os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Microbacterium*, *Bifidobacterium* e *Propionibacterium* (Figura 1).

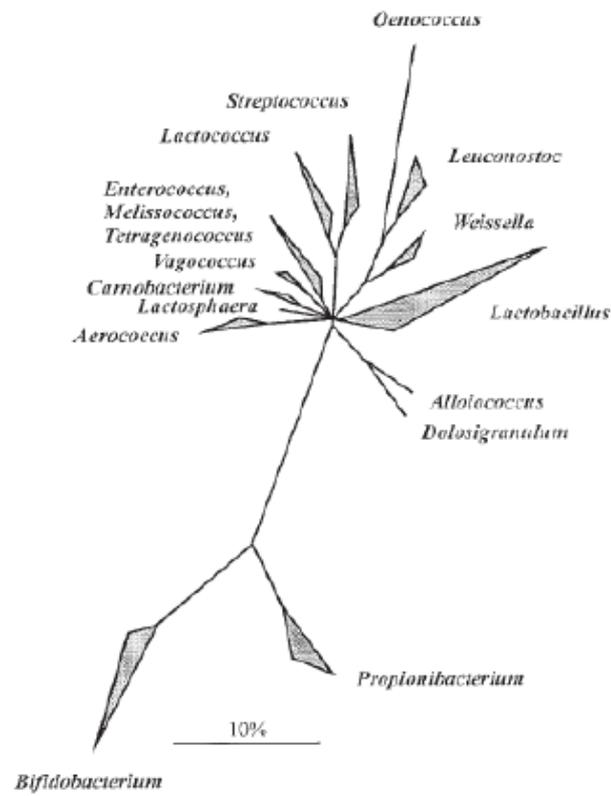


Figura 1. Árvore filogenética dos gêneros de bactérias ácido lácticas baseadas na comparação de análise de sequência 16 rRNA (Adaptado de HOLZAPFEL et al., 2001).

Diferindo de outros grupos microbianos com metabolismo respiratório, as BAL possuem resistências a valores de pHs relativamente baixos, possuindo um sistema capaz de controlar o pH interno da celular através do transporte de ácido láctico para o exterior, sendo capazes de eliminar uma gama de bactérias em ambientes ricos em nutrientes (TORO, 2005; BERNARDEAU et al., 2008). BAL podem ser classificadas de acordo com sua temperatura de crescimento em termofílicas e mesofílicas, ou com base nos produtos finais da fermentação em homo ou heterofermentativa. Bactérias termofílicas possuem temperatura de ideal de crescimento em torno de 42°C e as mesofílicas por volta de 30°C. Bactérias homofermentativas produzem, como principal produto da fermentação da glicólise, ácido láctico, enquanto as heterofermentativa produzem uma série de substâncias, tais como peróxido de hidrogênio, diacetil e outros ácidos orgânicos, incluindo ácido láctico (MARTINS et al., 2006; SYBESMA et al., 2006; GONÇALVES, 2009).

Os ácidos orgânicos podem atravessar a membrana na sua forma não dissociada e uma vez no citoplasma tais ácidos se dissociam, afetando o transporte e causando a morte celular

(HOFVENDAHL; HARGERDAL, 1997). Tal inibição causada pela produção de ácidos orgânicos faz com que o período de conservação de alguns alimentos seja maior quando comparado aqueles em que a matéria-prima não passou por fermentação láctica heterofermentativa. Outros ácidos como acético e propiônico, produzidos por bactérias com metabolismo heterofermentativo, atuam como inibidor de leveduras, fungos e bactérias, agindo com antimicrobianos (PIARD et al., 2005).

O ácido láctico e seus sais são os principais ácidos orgânicos antimicrobianos utilizados para o controle de bactérias deteriorantes e patogênicas. São produtos naturais obtidos pela fermentação do açúcar, sendo reconhecidos como seguros (GRAS) para uso em alimentos, porém afetam as características sensoriais (RODRIGUEZ, 1998). A inclusão de ácidos orgânicos e seus sais na formulação de produtos prontos para o consumo têm sido abordada por diversos grupos de pesquisa (BARMPALIA et al., 2004; DIEZ et al., 2008).

Algumas cepas de BAL também são capazes de sintetizar compostos antimicrobianos de origem protéica, denominados bacteriocinas (GÁLVEZ et al., 2008; TOPISIROVIC et al., 2006). De um modo simplificado, as bacteriocinas podem ser definidas como peptídeos catiônicos, termoestáveis, ativos contra outros tipos de bactérias, sendo que a bactéria produtora possui um mecanismo específico que lhe confere imunidade a estas substâncias (COTTER; HILL; ROSS, 2005). As bacteriocinas variam em relação ao espectro de atividade (restrito ou amplo espectro), modo de ação, massa molecular, origem genética e propriedades bioquímicas (GÁLVEZ et al., 2008). Diversas classificações já foram propostas para as bacteriocinas, no entanto, de acordo com a mais recente (HENG et al., 2007), as bacteriocinas produzidas pelas bactérias Gram-positivas dividem-se em quatro classes, de acordo com a estrutura química e função biológica: Classe I: peptídeos lantibióticos, Classe II: peptídeos não-lantibióticos de peso molecular inferior a 10kDa, Classe III: peptídeos não-lantibióticos de peso molecular superior a 10kDa e Classe IV: proteínas cíclicas. No mercado é possível encontrar a nisina (Nisaplin™), produzida por *Lactococcus lactis* e a pediocina PA-1/AcH (ALTATM 2431), produzida por *Pediococcus acidilactici*, são ingredientes comerciais utilizados como bioconservantes nos alimentos (COTTER; HILL; ROSS, 2005; GÁLVEZ et al., 2007; GÁLVEZ et al., 2008). Além de prevenir a multiplicação de micro-organismos patogênicos nos alimentos, as bacteriocinas também podem ser utilizadas para inibir o crescimento de micro-organismos deteriorantes naturalmente presentes nas matrizes alimentares (COTTER; HILL; ROSS, 2005; GÁLVEZ et al., 2008).

Assim, o uso direto de uma cultura de BAL capaz de produzir estes compostos na matriz pode ser interessante, particularmente se a cepa já está habituada as condições da matriz alimentar, como é o caso de BAL endógenas. Estudos sobre o uso de BAL na biopreservação de alimentos têm sido conduzidos (ZHEN et al., 2016; BADARÓ et al., 2009). Entretanto, faz-se necessária avaliação com ferramentas que permitam dimensionar o risco da utilização destes micro-organismos na produção de alimentos. Devido a esta necessidade, a Autoridade Europeia para Segurança Alimentar (EFSA) propôs que tal avaliação poderia ser feita com base no estabelecimento da identidade e patogenicidade das cepas, com o uso final de um grupo taxonômico definido, levando em concessão de uma “Presunção de Segurança Qualificada” (QSP). Hoje um total de 33 espécies de *Lactobacillus* possuem status QSP, dentre elas *L. casei*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, *L. pentosus*, *L. brevis* e *L. plantarum*. Outras espécies de bactérias lácticas, como *Leuconostocs citreum*, *Ln. actis*, *Ln. mesenteroides*, *Pediococos acidilactici*, *P. dextrinicus*, *P. pentosaceus*, *Leuconostoc lactis* e *Streptococcus thermophilus* também receberam status QSP (EC, 2007).

A resistência a drogas antimicrobianas é um dos aspectos mais importantes da segurança de BAL, visto que a resistência pode ser transferidas para outras espécies de bactérias, incluindo patogênicas (PAULA, 2014).

3.2 Resistencia antibióticos

Antibiótico é uma substância que age de diferentes formas sobre os micro-organismos que causam alterações indesejáveis no organismo de modo a combatê-los e elimina-los. Atualmente existe uma gama de antimicrobianos, alguns produzidos por bactérias e fungos já outros podem ser sintetizados em laboratórios possuindo finalidade de impedir ou dificultar a manutenção de certo grupo de células vivas (PAULA, 2014). Diversas formas podem ser usadas para classificar os antibióticos, a mais comum é de acordo com o mecanismo de ação contra a bactéria infectante, mas também podem ser classificados conforme ao espectro de ação como baixo, intermediário ou largo, sendo o primeiro restrito a um grupo de micro-organismos, o segundo apresentando substâncias ativas contra algumas bactérias gram-negativas e o terceiro um composto efetivo contra bactérias gram-positivas e também contra gram-negativas. Outros tipos de classificação são de acordo com a estrutura química e efeito na bactéria que dependerá da espécie bacteriana frente aos quais estes são ativos (GUIMARÃES et al., 2010). A Tabela 1 mostra estas classificações.

Tabela 1. Classificação dos Antibióticos (Adaptado de TRABULSI et al., 1999).

Classificação dos Antibióticos		
Mecanismo de ação	- interfere na biossíntese e estrutura da parede celular	Penicilinas, Cefalosporinas, Vancomicinas
	- interfere na permeabilidade e estrutura da membrana celular	Polimixinas
	- interfere na biossíntese protéica	Tetraciclina, Eritromicina, Cloranfenicol, Amicancina
	- interfere na estrutura dos ácidos nucleicos	Sulfomidas, Trimeoprima, quinolonas
Estrutura química	B – lactâmico	Penicilinas, Cefalosporinas
	Aminoglicosídeos	Estreptomicinas, gentamicina
	Tetraciclina	Tetraciclina
	Rifamicinas	Rifampicina
	Macrolídeos	Eritromicina
	Polipeptídeos	Polimixina, bacitracina
	Cloranfenicol	Cloranfenicol
	Quinolonas	Ácido nalidíxico, ciprofloxacina
	Sulfonamidas	Sulfametazol
	Trimetoprim Metronidazol	Quinolonas, tetraciclina Penicilina
Espectro de ação	Largo	Quinolonas, Tetraciclina
	Baixo	Penicilina, aminoglicosídeos
	Intermediário	Ampicilina, amoxicilina
Efeito na bactéria	Bactericida	Quinolonas, Penicilina
	Bacteriostático	Tatreciclina, Cloranfenicol

A ação dos antibióticos depende da interação dos mesmos com seus alvos bioquímicos, devendo possuir saturação suficiente para obstruir a função celular normal e impedir o crescimento microbiano (PAULA, 2014).

O uso inadequado de antibióticos é um importante fator na ocorrência da resistência bacteriana. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), os antibióticos são empregados na maior parte de formas indevidas e, em variadas situações clínicas, sem base em evidências que confirmem sua real indicação. O uso desnecessário de antibióticos estão evidenciados em até 60% dos casos de infecções respiratórias, e em aproximadamente 40% dos casos de diarreia em países em desenvolvimento, uma vez que preponderam as infecções virais e/ou parasitárias. De acordo com a OMS, ocorre uso desnecessário de antibióticos,

mesmo quando são prescritos, em até 50% de casos (WHO, 2016). Freitas (2012) relata que em alguns países os antibióticos são usados sem receita médica, em até dois terços das ocasiões. O uso indiscriminado de antimicrobianos está diretamente associado com a resistência antimicrobiana, que por vez, colabora para que as bactérias se tornem resistentes aos antibióticos. Estima-se que cerca de 80 milhões de brasileiros são adeptos da automedicação, no ranking mundial o Brasil ocupa a quarta posição em automedicação (FREITAS, 2012). Em virtude disso em 2013 a ANVISA emitiu um nota técnica sobre a RDC nº 20/2011 orientando sobre os procedimentos relativos ao controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição isolada ou em associação.

Tal resistência pode ocorrer de três formas: mutações bacterianas, propagação clonal ou por troca horizontal de genes de resistência situados em vários tipos de elementos genéticos móveis (NORMARK; NORMARK, 2002; KAPIL, 2005). A mudança horizontal de genes pode ocorrer por transdução (bacteriófagos), por conjugação (plasmídeos) e/ou por transformação (inserção direta de DNA de bactérias lisadas no ambiente) (JAWETZ et al., 2001).

As bactérias podem possuir uma resistência natural a antimicrobianos, denominado de resistência intrínseca, sendo inerente em uma espécie bacteriana. Ou podem adquirir uma resistência quando uma estirpe considerada sensível a um antibiótico torna-se resistente ao mesmo (EC, 2008). Na cadeia alimentar dois fatores devem ser levados em consideração quanto ao desenvolvimento de resistência a antibióticos em bactérias. Primeiro, deve ocorrer o contato das bactérias com os antibióticos em questão, segundo, desenvolver a resistência contra o antibiótico (KHACHATOURIANS, 1998; LEVY; MARSHALL, 2004).

A resistência adquirida a antibióticos é descrita na maioria das espécies de bactérias conhecendo-se detalhes do modo de manifestação e aquisição da resistência. Decorrente de modificação na estrutura da célula ou de origem genética a resistência adquirida inibe a ação dos antimicrobianos, sendo este tipo de resistência a mais importante devido ao aumento no número de quadros clínicos infecciosos com esse tipo de micro-organismo (HOEFLER et al., 2006). A partir de variados mecanismos um gene de resistência pode ser transferido de uma cepa para outra, a citar a resistência intrínseca, desenvolvimento de enzimas, modificação na permeabilidade, alteração no sítio de ação do antimicrobiano, desenvolvimento de via metabólica alternativa e retirada da droga do meio intracelular (PAULA, 2014). Entretanto, a

resistência intrínseca tem potencial mínimo de propagação horizontal entre bactérias de espécies distintas (WRIGHT, 2005).

Neste contexto, sabe-se que BAL apresentam resistência intrínseca frente alguns antibióticos e que as chances da transmissão desta resistência é baixa (WRIGHT, 2005). Para a definição de segurança, com base em conhecimentos já estabelecidos sobre a resistência a antibióticos de diferentes grupos, existem parâmetros definidos como pontos de corte (cut off) pela EFSA para a susceptibilidade de BAL (Tabela 2).

Tabela 2. Ponto de corte (cut off) para susceptibilidade de BAL, adaptado de EFSA (2012).

	Ampicilina	Vancomicina	Gentamicina	Kanamicina	Streptomicina	Eritronina	Clindamicina	Quinupristina + dalfopristina	Tetraciclina	Clorofenicol
<i>Lactobacillus</i> homofermentativa	1	2	16	16	16	1	1	4	4	4
<i>Lactobacillus helveticus</i>	1	2	16	16	16	1	1	4	4	4
<i>Lactobacillus acidophilus</i> group	1	2	16	16	16	1	1	4	4	4
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	1	2	16	16	16	1	1	4	4	4
<i>Lactobacillus</i> heterofermentativa	2	n.r.	16	16	64	1	1	4	8	4
<i>Lactobacillus reuteri</i>	2	n.r.	8	16	64	1	1	4	16	4
<i>Lactobacillus fermentum</i>	1	n.r.	16	32	64	1	1	4	8	4
<i>Lactobacillus</i> heterofermentativa facultativa *	4	n.r.	16	64	64	1	1	4	8	4
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2	n.r.	16	64	n.r.	1	1	4	32	8
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4	n.r.	16	64	32	1	1	4	8	4
<i>Lactobacillus paracasei</i>	2	n.r.	32	64	n.r.	1	1	4	4	4

3.3 Micro-organismos patogênicos em alimentos

Diversos micro-organismos patogênicos ocorrem naturalmente no ambiente onde os alimentos são produzidos. Estes micro-organismos são regularmente associados a manipuladores e produtos crus contaminados num estabelecimento. Entre os vários tipos de micro-organismos, as bactérias patogênicas estão associadas à maioria dos surtos e casos de doenças transmitidas por alimentos (BOARATTI, 2004).

Existem cerca de 250 tipos de doenças alimentares e, dentre elas, muitas são causadas por micro-organismos patogênicos, os quais são responsáveis por sérios problemas de saúde pública e convincentes perdas econômicas. As síndromes, resultantes da ingestão de alimentos

contaminados por esses micro-organismos são conhecidas como Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA) ou simplesmente toxinfecções (SILVA, 2008).

Surtos alimentares ocorrem quando uma ou mais pessoas apresentam sintomas semelhantes, após o consumo de alimentos contaminados com micro-organismos patogênicos. As intoxicações são causadas pela ingestão de toxinas contidas nos alimentos, liberadas por micro-organismos durante o processo de multiplicação, quando absorvidas no organismo humano atingem o intestino e o sistema nervoso (GERMANO, 2011).

Os alimentos que causam doenças alimentares possuem odor e sabor sem alteração, podendo desse modo ser consumido facilmente e só depois apresentarem problemas gastrointestinais deixando as vítimas doentes. O período de incubação e duração de doenças transmitidas por alimentos pode variar de acordo com o agente patógeno causador, como exemplo, a *Salmonella spp.* que tem período de incubação de 16 a 72 horas e com duração da enfermidade de 2 a 7 dias. *Salmonella spp.* têm sido implicada em surtos relacionados com vários tipos de alimentos, e continua sendo uma preocupação para a indústria alimentícia. Atualmente esse gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*, sendo a *S. enterica* é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Em cada subespécie são reconhecidos diferentes sorovares, com base na caracterização de seus antígenos somáticos (O) e flagelares (H), totalizando na atualidade 2.610 sorovares (MARINHO, 2014). Os alimentos mais sujeitos à contaminação por Salmonelas são queijos, chocolates, carnes frescas e o leite (FORSYTHE, 2005).

Listeria monocytogenes pode apresentar um período de incubação variando de 3 a 70 dias e o tempo de duração da enfermidade é variável (FORSYTHE, 2002). É o agente infeccioso responsável pela doença de origem alimentar denominada listeriose. A respeito da baixa incidência, a listeriose exerce importante risco à saúde pública, pelo grau de severidade das sequelas e alto índice de mortalidade que ocasiona em populações de risco, como pacientes imuno comprometidos, idosos e gestantes (FRANCO, 2008). As infecções por *L. monocytogenes* estão frequentemente associadas a carnes frescas, em particular carne de porco e frango e ao leite cru ou insuficientemente pasteurizado.

Pseudomonas aeruginosa tem período de incubação geralmente de 48 horas (indo de 8 horas a 5 dias) depois da exposição à água contaminada. Compreende um grande número de espécies de bacilos Gram negativos, especificados por meio de provas bioquímicas, formação de pigmentos, teste de sensibilidade a antibióticos, números e localização dos flagelos. Pode

causar diversas infecções e a maioria dessas infecções é adquirida nos hospitais, principalmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Isso ocorre porque *P. aeruginosa* cresce facilmente mesmo em condições desfavoráveis aos outros micro-organismos (LINCOPAN, 2005).

Staphylococcus aureus é um dos principais agentes causadores de intoxicações alimentares, geralmente está relacionado com os manipuladores. É uma bactéria Gram-positiva com grande diversidade de fatores de patogenicidade e virulência. *S. aureus* é caracterizado em biótipos de acordo com a fagotipagem, sorotipagem, análise de plasmídeo e ribotipagem (FRANCO; LANDGRAF, 2008). As intoxicações alimentares são causadas pelas enterotoxinas estafilocócicas, que são proteínas de baixo peso molecular, classificadas em sete tipos antigênicos pela sorologia: SEA, SEB, SEC, SEC, SEC, SED e SEE. Os sintomas da doença são náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreias com período de incubação de 1 a 6 horas. Os sintomas têm curta duração, de poucas horas a um dia (FORSYTHE, 2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do experimento

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Processos Microbianos (LPMA) em Alimentos do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) – João Pessoa/PB. Para o estudo, foram selecionados 16 cepas de BAL, pertencentes ao banco de cepas do LPMA, isoladas de frutos e subprodutos de acerola (*Malpighia glabra L.*), manga (*Mangifera indica*) e graviola (*Annona muricata*).

O isolamento dos gêneros de BAL foi realizado no Laboratório de Microbiologia dos Alimentos do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) – João Pessoa/PB. O teste foi realizado por Garcia e Colaboradores (2014) conforme procedimento descrito pela Associação Americana de Saúde Pública (APHA, 2004).

4.2 Identificação molecular dos isolados de BAL

A identificação em nível de espécie dos isolados de BAL selecionados para o presente estudo foi realizada no centro de análise genômica e patogênica da universidade católica de Brasília e o método conforme descrito por Turner et al. (1999). Após a extração do DNA, para amplificação do fragmento correspondente ao gene 16S-RNA_r foram utilizados os primers 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). As reações de PCR foram conduzidas em volume de 25 µL nas seguintes condições: desnaturação inicial de 3 min a 95°C, seguida por 25 ciclos de 30s a 94 °C (desnaturação), 30s a 52 °C (anelamento) e 1 min 40 s a 72°C (extensão), com extensão final de 7 min a 72 °C. Os produtos da PCR (1465 pb) foram purificados com o kit *Ciclo Pure EZNA* (Life Technologies, EUA) e sequenciados utilizando o kit *Big Dye Terminator* (Life Technologies, EUA). As sequências obtidas foram analisadas com auxílio do programa *Bio Edit Aliment Editor* em comparação as sequências já depositadas no Genbank (www.ncbi.nlm.gov/Genbank). Para identificação foi considerado a similaridade de 97%.

4.3 Etapas teste para avaliação de atividade antagonista

Para avaliação da atividade antagonista das cepas de BAL foram utilizadas seis (6) cepas reveladoras, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Identificação e codificação das cepas de bactérias patogênicas utilizados nos ensaios de antagonismo.

Micro-organismo	Fonte	Codificação
<i>Salmonella</i> Typhimurium 46/99*	Paciente de surto	SAT
<i>Salmonella</i> Enteritidis 107/01*	Carne de frango	SAE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Alimento	PSA
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25922	Fossas nasais	STA1
<i>Staphylococcus aureus</i> *	Superfície de processamento de alimentos	STA2
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	Alimento	LIM

*: cepas pertencentes ao banco de cepas do LPMA

4.3.1 TESTE DE ANTAGONISMO “SPOT ON THE LAWN”

Os ensaios de antagonismo “Spot on the Lawn” foram realizados conforme descrito por Harris e colaboradores (1989) com algumas modificações. As culturas reveladoras de BAL foram cultivadas em caldo MRS a 37 °C sob anaerobiose por 48h. Posteriormente, 2 µL foram semeados sob forma de pontos (spot) em placas de Petri contendo ágar MRS e incubados a 37 °C durante 24h em condições de anaerobiose, de forma que em cada placa houvessem 4 spots. As culturas reveladoras (10⁶ UFC/ mL), previamente cultivadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) por 24h foram transferidas para caldo BHI semi-sólido (87 %) e vertidas nas placas com os spots de BAL. Após a solidificação, as placas foram incubadas a 37 °C por 24h sob anaerobiose. A presença de uma zona distinta de inibição em torno dos spots de BAL (denominada halo) com largura ≥ 5mm foi considerada um efeito positivo de antagonismo (SCHILLINGER e LUCKER, 1989), sendo diâmetro mensurado em milímetros (mm) com o auxílio de paquímetro e posteriormente comparado à halos formados por antibióticos frente as mesmas culturas reveladoras. Para a avaliação do efeito do meio de cultura sob a produção de substâncias antimicrobianas das cepas teste de BAL, o mesmo procedimento foi realizado em ágar TSA (Tryptone Soya Ágar).

4.3.2 TESTE ANTAGONISTA DO SOBRENADANTE LIVRE DE CÉLULAS (SLC)

As cepas de BAL, que apresentaram a formação de halo no teste “*Spot on the Lawn*” foram reativadas em caldo MRS em cultivo a 37 °C por 24-48h, sob anaerobiose cepas reveladoras foram reativadas em caldo Infusão Cérebro-Coração (BHI) em cultivo a 35-37 °C por 18-24h. Para confirmação da atividade, após a reativação, uma alíquota de 1mL das cepas de BAL (10^8 UFC/ mL) foi coletada e centrifugada a 1400 rpm por 10 min. a 4 °C para a obtenção do sobrenadante livre de células (SLC) das culturas. O SLC foi aquecido a 80 °C por 10 min em banho de água, o pH foi ajustado para 6,0 com NaOH 1 M estéril e 10 µL foram adicionados na superfície de BHI semi-sólido (caldo BHI acrescido de 0,8% de ágar) contendo 10^5 - 10^6 UFC/ mL da cepa reveladora. As placas foram incubadas por 18-24h, a 37 °C para observação da formação de halo de inibição, sendo os resultados expressos em unidades arbitrárias (UA) por mL de SLC (ROSA et al., 2002).

4.4 Perfil de resistência à antibióticos

Para o teste de resistência a antibióticos foram selecionadas as cepas de BAL que apresentaram maior atividade inibitória frente *S. Enteritidis*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

O inóculo de cada cepa foi padronizado para uma leitura de densidade ótica (DO) de 0,5 em comprimento de onda 625 nm, equivalente a uma concentração de 10^5 log UFC/ mL. Para os testes de resistência aos antibióticos, as cepas bacterianas foram inoculadas (1%, v / v) em caldo MRS suplementado com os seguintes antibióticos: cloranfenicol, gentamicina, kanamicina, eritromicina, tetraciclina, ampicilina e clindamicina em concentrações finais na faixa de 2-1024 µg/mL, Os testes foram realizados utilizando micro-diluição em caldo, conforme preconizado pela CLSI (2012). O material foi incubado durante 24h a 37 °C. A concentração inibitória mínima (CIM) foi confirmada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano. Para verificação do padrão de resistência/suceptibilidade foram utilizados os critérios estabelecidos pela EFSA (2012).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise das sequências do gene 16S RNAr geradas revelaram espécies pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* (n=13), *Lactococcus* (n=1), *Leuconostoc* (n=1) e *Pediococcus* (n=1), conforme representado na Tabela 4. As análises filogenéticas realizadas através do método de similaridade máxima baseado no modelo Tamura-Nei (1993), utilizando o programa MEGA6 de análises evolucionárias (TAMURA et al., 2013) revelaram que as cepas isoladas e identificadas não se tratavam de clones.

Tabela 4. Identificação, fonte de isolamento, codificação das cepas de bactérias ácido lácticas isoladas de frutas tropicais utilizados nos ensaios de antagonismo

Micro-organismo	Fonte	Codificação
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Acerola (<i>Malpighia glabra</i>)	LPMA1
<i>Lactococcus lactis</i>	Manga (<i>Mangifera indica</i>)	LPMA 2
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Graviola (<i>Annona muricata</i>)	LPMA 3
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Manga (<i>Mangifera indica</i>)	LPMA 4
<i>Lactobacillus brevis</i>	Manga (<i>Mangifera indica</i>)	LPMA 5
<i>Lactobacillus spp.</i>	Manga (<i>Mangifera indica</i>)	LPMA 6
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Graviola (<i>Annona muricata</i>)	LPMA 7
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Graviola (<i>Annona muricata</i>)	LPMA 8
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Manga (<i>Mangifera indica</i>)	LPMA9
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Manga (<i>Mangifera indica</i>)	LPMA10
<i>Pediococcus pentosacus</i>	Manga (<i>Mangifera indica</i>)	LPMA11
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Manga (<i>Mangifera indica</i>)	LPMA12
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Manga (<i>Mangifera indica</i>)	LPMA 13
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Manga (<i>Mangifera indica</i>)	LPMA 14
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Manga (<i>Mangifera indica</i>)	LPMA 15
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Manga (<i>Mangifera indica</i>)	LPMA 16

A prevalência do gênero *Lactobacillus* nos isolados avaliados é um achado interessante e pode ser correlacionado aos achados inúmeros estudos que discorrem sobre a adaptabilidade de bactérias deste gênero em aplicações alimentares, incluindo seu uso como culturas iniciadoras para processos fermentativos (ANTARA et al., 2004; DICAGNO et al., 2008; KOSTINEK et al., 2005). Vale salientar que algumas características das frutas tais como o ambiente ácido e elevada concentração de nutrientes não digeríveis podem favorecer a manutenção da microflora láctica (ROSA et al., 2005).

As cepas de BAL foram submetidas à avaliação de sua atividade antagonista frente cepas reveladoras previamente selecionadas a partir dos testes *Spot on the Lawn*, considerando que na maior parte dos casos, a microbiota autóctone de frutas e legumes deve colonizar e aderir às superfícies dos vegetais, além de exercer atividade antagônica frente a micro-organismos deterioradores e patogênicos (VITALI et al., 2012). Foram testadas 6 cepas de micro-organismos de importância em alimentos (Figura 2). Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Figura 2: Halo de inibição de BAL frente micro-organismo patógenos



Fonte: arquivo pessoal, 2016.

Quando inoculadas em MRS agar todas as cepas de BAL apresentaram atividade frente às cepas reveladoras. Os maiores halos de inibição foram encontrados para as cepas LPMA15 frente SAT ($29,50 \pm 0,40$) e STA1 ($19,90 \pm 0,30$); LPMA7 frente SAE ($24,00 \pm 1,00$), STA2 ($23,40 \pm 0,80$) e LIM ($19,5 \pm 0,05$), e cepa LPMA1 frente PSA ($14,0 \pm 0,00$). Em contrapartida, os menores halos de inibição foram observados para as cepas LPMA10 frente SAE ($6,90 \pm 0,80$); LPMA2 frente STA1 ($5,30 \pm 0,30$); LPMA14 frente PSA ($5,40 \pm 0,10$); LPMA2 frente LIM ($6,50 \pm 0,20$); LPMA14 frente STA2 ($6,80 \pm 0,40$), e cepa LPMA5 frente SAT ($6,90 \pm 0,80$).

Tabela 5. Resultado dos testes de antagonismo conforme teste *Spot On The Lawn*. Dados da zona de inibição (Z. I.) apresentados em diâmetro (D) do halo originado expressos em média (n=4) ± desvio-padrão (em mm).

BAL	CEPAS REVELADORAS					
	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
DIÂMETROS						
LPMA1	13,2 ± 0,5	23,5 ± 0,5	14,0 ± 0,0	6,3 ± 0,1	20,4 ± 0,4	18,3 ± 0,4
LPMA 2	17,5 ± 1,5	19,9 ± 0,9	6,3 ± 0,2	5,3 ± 0,3	18,9 ± 0,7	6,5 ± 0,2
LPMA 3	14,2 ± 0,2	21,5 ± 0,5	10,0 ± 0,0	6,6 ± 0,1	16,4 ± 0,4	16,5 ± 0,5
LPMA 4	7,5 ± 0,5	9,3 ± 0,4	1,8 ± 0,8	6,4 ± 0,1	8,3 ± 0,1	11,8 ± 0,8
LPMA 5	6,9 ± 0,8	6,9 ± 0,7	8,0 ± 0,7	8,0 ± 0,9	9,0 ± 0,2	9,0 ± 0,5
LPMA 6	11,4 ± 0,2	6,1 ± 0,2	9,0 ± 0,1	5,9 ± 0,1	11,8 ± 0,4	7,6 ± 0,1
LPMA 7	10,7 ± 0,1	24,0 ± 1,0	13,3 ± 0,4	5,6 ± 0,1	23,4 ± 0,8	19,5 ± 0,5
LPMA 8	11,0 ± 0,6	10,0 ± 0,0	8,5 ± 0,5	6,7 ± 0,1	14,0 ± 0,6	6,8 ± 0,4
LPMA9	17,6 ± 0,7	13,5 ± 1,1	11,5 ± 0,5	6,6 ± 0,1	19,0 ± 0,3	9,0 ± 0,7
LPMA10	17,3 ± 1,5	5,1 ± 0,3	8,4 ± 0,1	5,8 ± 0,1	14,6 ± 0,1	11,5 ± 0,4
LPMA11	20,8 ± 1,5	15,7 ± 0,4	6,1 ± 0,2	6,0 ± 0,1	16,5 ± 1,8	11,5 ± 0,1
LPMA12	8,3 ± 0,2	16,5 ± 0,9	7,8 ± 0,1	6,0 ± 0,1	11,3 ± 0,8	9,3 ± 0,4
LPMA 13	8,0 ± 0,0	15,0 ± 0,8	8,3 ± 0,2	5,7 ± 0,2	9,9 ± 0,1	10,3 ± 0,4
LPMA 14	17,0 ± 0,7	21,5 ± 1,1	5,4 ± 0,1	7,0 ± 0,1	6,8 ± 0,4	13,0 ± 1,0
LPMA 15	29,5 ± 0,4	19,0 ± 0,7	12,6 ± 0,2	19,9 ± 0,3	11,1 ± 0,2	17,2 ± 0,3
LPMA 16	10,3 ± 0,3	16,3 ± 0,4	9,7 ± 0,4	6,5 ± 0,2	13,9 ± 0,4	10,6 ± 0,3

SAT: *Salmonella Typhimurium*; SAE: *Salmonella Enteritidis*; PSA: *Pseudomonas aeruginosa*; STA1: *Staphylococcus aureus* ATCC 25922; STA2: *Staphylococcus aureus*; LIM: *Listeria monocytogenes*; LPMA1: *Lactobacillus plantarum*; LPMA2: *Lactococcus lactis*; LPMA3: *Lactobacillus plantarum*; LPMA4: *Lactobacillus plantarum*; LPMA5: *Lactobacillus brevis*; LPMA6: *Lactobacillus spp.*; LPMA7: *Lactobacillus paracasei*; LPMA8: *Lactobacillus fermentum*; LPMA9: *Lactobacillus fermentum*; LPMA10: *Leuconostoc mesenteroides*; LPMA11: *Pediococcus pentosacus*; LPMA12: *Lactobacillus fermentum*; LPMA13: *Lactobacillus fermentum*; LPMA14: *Lactobacillus plantarum*; LPMA15: *Lactobacillus plantarum*; LPMA16: *Lactobacillus fermentum*.

Lactobacillus plantarum (LPMA1, LPMA3, LPMA4, LPMA14, LPMA15) e *Lactococcus lactis* (LPMA2) mostraram um amplo espectro de ação frente às bactérias reveladoras (Tabela 5). Estas duas espécies de BAL são frequentemente estudadas devido sua capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos tais como *L.*

monocytogenes e *S. aureus* (ORTOLANI, 2009; ENGELHARDT et al., 2015; RAMOS et al., 2013).

Cepas de *L. fermentum* (LPMA8, LPMA9, LPMA12, LPMA13 e LPMA15) mostraram um amplo espectro de ação com diferentes tamanhos de halos, sendo os maiores frente SAT e STA1. Resultados semelhantes foram apresentados por Tulumoglu et al. (2014) ao isolar diferentes cepas de *L. fermentum* de queijo tulum e testar sua atividade contra *P. aeruginosa* variando de 14 ± 3 a 18 ± 1 mm e para *S. aureus* entre 11 ± 2 e 16 ± 3 mm. Para cepas de *L. brevis*, *L. paracasei*, *Lc. mesenteroides* e *P. pentosacus* poucos estudos relatam suas atividades antagonistas frente micro-organismo de importância em alimentos. A cepa *L. paracasei* comparada às demais BAL apresentou os maiores halos frente SAE, STA2 e LIM, demonstrando grande potencial inibitório (Tabela 5).

De acordo com o Manual para Antibiograma Kirby e Bauer (LABORCLIN, 2011) cada antimicrobiano possui uma ação específica sobre cada espécie bacteriana, que pode ser caracterizada como resistente (R), ter resistência intermediária (I) ou sensível (S) de acordo com a zona de inibição formada. Para avaliar a atividade de BALs os halos gerados frente a bactérias reveladoras foram comparados àqueles formados pelo uso da amoxicilina, ceftriaxona e cefazolina frente às mesmas espécies bacterianas. Visto que estes antimicrobianos possuem amplo espectro frente bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Ainda a atividade de BAL frente SAT, SAE e PSA foi comparada halos formados pelo ácido nalidíxico, conhecido pela ação frente *Salmonella* e *P. aeruginosa* (Tabela 6).

Tabela 6: Valores de halos inibitórios de alguns antibióticos para *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* teste de difusão em poços.

<i>Enterobacteriaceae</i>			
AGENTE	Halos de inibição (mm)		
	R	I	S
Ácido-nalidíxico	≤13	14-18	≥19
Amoxicilina	≤13	14-16	≥17
Cefazolina	≤19	20-22	≥23
Ceftriaxona	≤19	20-22	≥23
<i>P. aeruginosa</i>			
Ácido Nalidíxico	≤13	14-18	≥19
Ceftriaxona	≤13	14-20	≥21
<i>S. aureus</i>			
Cefazolina	≤13	14-20	≥21
Ceftriaxona	≤14	15-17	≥18

Fonte: Manual para Antibiograma: difusão em disco (Kirby e Bauer) (LABORCLIN, 2011).

De acordo com o manual para antibiograma, para leitura contra *Enterobacteriaceae* para resistência intermediária os halos variam de 14–16mm e 14–18mm para amoxicilina e ácido-nalidíxico respectivamente, enquanto para ceftriaxona e cefazolina os valores de resistência intermediária variam de 20–22mm, sendo os patógenos considerados resistentes em caso de halos menores e sensíveis em caso de halos maiores (LABORCLIN, 2011). Assim, em comparação a amoxicilina e ácido-nalidíxico as BAL LPMA2, LPMA9, LPMA10, LPMA11, LPMA14 e LPMA15 frente SAT e SAE demonstraram forte atividade, pois os halos produzidos foram superiores a 16mm. Porém em comparação com a ceftriaxona e cefazolina apenas as LPMA15 foi efetiva frente SAT e as cepas LPMA1 e LPMA7 frente SAE (Tabela 5).

Quando a atividade de BAL foi comparada à ceftriaxona e o ácido-nalidíxico em sua ação frente a *P. aeruginosa* (resistente ≤ 13mm; resistência intermediária 14-20 mm e 14 18mm; sensível ≥ 21mm e ≥19mm, respectivamente) (LABORCLIN, 2011), apenas a LPMA1 exerceu ação semelhante sobre frente PSA (Tabela 5).

Frente STA1 destaca-se a ação da LPM15, enquanto LMP1, LPM2, LPM7 e LPM9 mostraram destacada atividade frente STA2 considerando formação de halo semelhante ao ceftriaxona e cefazolina frente *S. aureus* (Tabela 5).

Todas as BAL apresentaram alguma atividade antagonista frente as culturas reveladoras, destacando a ação da LPMA7 que apresentou maior formação de halos frente 3 das 6 cepas reveladoras usadas e a atividades antagonista da LPMA15 por apresentar halos satisfatórios sobre todas a cepas patogênas principalmente as SAT e STA1. Porém quando verificado ação do SLC frente micro-organismos de importância em alimentos nenhuma BAL apresentou ação antagônica, tal acontecido pode estar associado ao fato das BAL produzirem ácidos orgânicos como principais substâncias inibitórias, sendo este neutralizado no teste com o SLC (MORAES et al., 2010).

Diante do resultado obtido para atividade antagonista de BALs fez-se necessário a determinação do perfil de resistência a antibióticos das cepas de BALs consideradas promissoras para uso como biopreservantes (cepas que apresentaram forte ação antagônica frente as cepas reveladoras). A resistência a antibióticos de uso clínico deve ser cuidadosamente considerada para avaliar o potencial de cepas biopreservantes devido ao risco à saúde pública (CASTANHEIRA, 2013) quando de sua transferência para outros micro-organismos.

O resultado do teste de sensibilidade a antibióticos das cepas de BALs através da concentração inibitória mínima de (CIM) é apresentado na Tabela 7. As cepas são consideradas resistentes quando apresentarem um CIM maior que o *breakpoint* (ponto de corte) estabelecido pela EFSA (2012).

Tabela 7. Perfil de resistência a antibióticos das cepas de BAL.

Cepas	CIMs (µg/ml)						
	Kan.	Chl.	Gen.	Amp.	Clin.	Eri.	Tet.
LPMA1	8 ^S	n.r	2 ^S	1024 ^R	16 ^R	8 ^R	n.r
LPMA2	n.r	n.r	n.r	n.r	n.r	n.r	n.r
LPMA3	64 ^R	2 ^S	16 ^R	n.r	32 ^R	16 ^R	4 ^S
LPMA7	16 ^S	n.r	32 ^R	1024 ^R	n.r	n.r	n.r
LPMA9	8 ^S	n.r	4 ^S	1024 ^R	2 ^R	2 ^R	4 ^S
LPMA11	n.r	n.r	16 ^R	8 ^R	n.r	n.r	n.r
LPMA14	256 ^R	4 ^S	1024 ^R	2 ^R	4 ^R	16 ^R	n.r
LPMA15	n.r	n.r	n.r	16 ^R	4 ^R	32 ^R	n.r
EFSA	64	8	16	2	2	1	32

^R Resistência, ^S Sensível e n.r: não resistente de acordo com breakpoint da EFSA (2012). Kan.= kanamicina, Chl.=cloranfenicol, Gen.=gentamicina, Amp.=ampicilina, Clin.=clindamicina, Van=vancomicina, Eri.=eritromicina e Tet.=tetraciclina. LPM1: *Lactobacillus plantarum*; LPM2: *Lactococcus lactis*; LPM3: *Lactobacillus plantarum*; LPM7: *Lactobacillus paracasei*; LPM9: *Lactobacillus fermentum*; LPM11: *Pediococcus pentosacus*; LPM14: *Lactobacillus plantarum*; LPM15: *Lactobacillus plantarum*.

Praticamente todas as cepas testadas, com exceção da LPMA2, apresentaram resistência a alguns antibióticos. De acordo com Andrade et al., (2014) essa resistência é uma característica comum de bactérias ácido lácticas, principalmente entre cepas de *Lactobacillus*. Cepas de *L. rhamnosus* e *L. paracasei* já foram relatadas como resistentes a esse antibiótico, com CIM > 250 µg/mL (FELTEN, 1999). Resultados semelhantes são relatados em estudos anteriores realizados com BAL (LUI et al., 2009; TEMMERMAN et al., 2003; ACÚRCIO, 2011; RODRÍGUEZ-ALONSO et al. 2009; D'AIMMO et al., 2007).

As cepas LPMA3 e LPMA14 apresentaram resistência a 5 e 6 antibióticos respectivamente. Sendo estas cepas as únicas que apresentaram resistência à kanamicina. Outras publicações relataram a resistências de *Lactobacillus* à kanamicina. Em seu estudo, Argyri et al., (2013) relataram resistência a este antibiótico em BAL isoladas de de azeitonas fermentadas. No mesmo estudo, os autores reportam resistência de isolados de *Lactobacillus* frente gentamicina, tetraciclina, ampicilina e cloranfenicol.

A sensibilidade de BAL frente a tetraciclina e cloranfenicol observada no presente estudo concorda com o relatado por Costa et al., (2013). Entretanto, existem inúmeros relatos de *Lactobacillus* resistentes ao cloranfenicol (ARGYRI, et al., 2013; AZEVEDO et al. 2000; BELLETTI et al., 2009; LIU et al., 2009; TEMMERMAN et al., 2003).

No presente estudo 5 cepas de BAL foram resistentes a eritromicina, diferindo do reportado em estudos anteriores (ANDRADE et al., 2014; CHAVES, 2013; COSTA et al., 2013). Embora as cepas avaliadas tenham apresentado resistência variável frente aos antibióticos testados, uma verificação mais detalhada da origem desta resistência pode elucidar o potencial de sua transferência para outros microrganismos (SAARELA et al., 2000).

6 CONCLUSÃO

Os resultados evidenciaram a capacidade das BAL de inibir o crescimento de bactérias patogênicas teste, sendo que algumas cepas apresentaram poder de inibição semelhante a alguns antibióticos. Entretanto, algumas das cepas de BAL testadas mostraram resistência frente a antibióticos de uso clínico. A pesquisa realizada apresentou resultados coerentes com os encontrados na literatura, e os dados gerados podem direcionar novos estudos com objetivo de determinar o real potencial de aplicação das cepas avaliadas como bioconservantes na indústria de alimentos.

REFERÊNCIAS

- ACÚRCIO, L.B. **Isolamento, enumeração, identificação molecular e avaliação de propriedades probióticas de *Enterococcus* isolados de leite de ovelha**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- ANDRADE, C.R.G.; SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M.; ACURCIO, L.B.; SANT’ANNA, F.M.; CASTRO, R.D.; OLIVEIRA, D.L.S. Propriedades probióticas *in vitro* de *Lactobacillus* spp. isolados de queijo minas artesanal da Serra da Canastra – MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. V.66, P. 1592-1600, 2014.
- ANTARA, N.S., SUJAYRA, N., YOKOTA, A., ASANO, K., TOMITA, F. Effects of indigenous starter cultures on the microbial and physiochemical characteristics. **Journal Biology Scienc and Bioengineering**. 2004.
- ARGYRI, A.A.; ZOUMPOPOULOU, G.; KARATZAS, K.G.; TSAKALIDOU, E.; NYCHAS, G.E.; PANAGOU, E.Z.; TASSOU, C.C. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. **Journal of Food Microbiology**. V.33, P. 282-291, 2013.
- AYYASH, M.M.; SHAH, N.P. Effect of partial substitution of NaCl with KCl on Halloumi cheese during storage: chemical composition, lactic bacterial count and organic acids production. **Journal Food Chemycal**, V. 75, P. 525-529, 2010.
- AZEVEDO, P.A.; PERIN, C.; BECKER, F.L. *et al.* Isolamento e caracterização de *Lactococcus garvieae*. **Rev. AMRIGS**. v.44, p.81-84, 2000.
- BADARÓ, A.C.L. *et al.* Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana – parte 2. **Revista Digital de Nutrição**, v.3, p.396-416, 2009.
- BARMPALIA, I. M. *et al.* Control of *Listeria monocytogenes* on frankfurters with antimicrobials in the formulation and by dipping in organic acid solutions. **Journal Food Protect**. p. 2456-2464, 2004.
- BERNARDEAU, M. *et al.* Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**. v.126, p.278-295, 2008.
- BELLETTI, N.; GATTI, M.; BOTTARI, B. *et al.* Antibiotic Resistance of Lactobacilli isolated from two Italian hard cheeses. **Journal Food Protect**. v.72, p.2162–2169, 2009
- BOARATTI, M. F. G. **Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle para Alimentos**. Dissertação (mestrado em tecnologia nuclear). Instituto de Pesquisa as Energéticas e Nucleares. São Paulo, 2004.
- BRASIL. Nota Técnica Sobre a RDC nº 20/2011. Órgão emissor: **ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília, 2013. Disponível em: <<https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=4&cad=rja&uact>

=8&ved=0ahUKEwib2dz8y57NAhXJHZAKHfmFD00QFgguMAM&url=http%3A%2F%2Fwww.anvisa.gov.br%2Fsngpc%2Fdocumentos%25202013%2FNota_Tecnica_RDC_n_20_2011_24_09_2013.pdf&usg=AFQjCNGT3dCuEKW3SCIZWMDOWtJsGLQ7-A&bvm=bv.124272578,d.Y2I>. Acesso em: 10 de Junho de 2016

CASTANHEIRA, B.A.M.G. **Mecanismos de resistência à antibióticos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Lusófona de Humanidade e Tecnologias, Lisboa, 2013.

CHAVES, A.A.M. **Avaliação da suscetibilidade à antibióticos de *Lactobacillus plantarum* isolados de salsicharia tradicional portuguesa**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Zootécnica/Produção animal). Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2013.

CHANG, C.K.; WANG, S. C.; CHIU, C. K.; CHEN, S.Y.; CHEN, Z.T.; DUH, P.D. Effect of lactic acid bacteria isolated from fermented mustard on immunopotentiating activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. p. 281-286, 2015.

COSTA, H.H.S.; SOUZA, M.R.; ACÚRCIO, L.B.; CUNHA, A.F.; RESENDE, M.F.S. NUNES, A. C. Potencial probiótico in vitro de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.65, p.1858-1866, 2013.

COTTER, D.P.; HILL, C.; ROSS, R.P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nat. Rev. Microbiology**. v 3, p. 777-788, 2005.

D'AIMMO, M. R.; MODESTO, M.; BIAVATI, B. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and Bifidobacterium spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. **Journal of Food Microbiology**. v. 115, p. 35-42, 2007

DI CAGNO, R.; et al. Taxonomic structure of the yeasts and lactic acid bacteria microbiota of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.) and use of autochthonous starters for minimally processing. **Journal Food Microbiology**. v. 27, p. 381-389, 2010.

DIEZ, A.M.; et al. Application of organic acid salts and high-pressure treatments to improve the preservation of blood sausage. **Journal Food Microbiology**. v. 25, p. 154-161, 2008.

DIGAITIENE, A.; et al. Lactic acid bacteria isolated from rye sourdoughs produce bacteriocin like inhibitory substances active against *Bacillus subtilis* and fungi. **Journal Applied Microbiology**. v. 112, p. 732-742, 2012.

ENGELHARDT, T.; et al. Antilisterial activity of bacteriocinogenic *Pediococcus acid lactic* HA6111-2 and *Lactobacillus plantarum* ESB 202 grown under pH and osmotic stress conditions. **Journal food Microbiology**. p. 109-115, 2015.

EUROPEAN COMMISSION. Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. **EFSA Journal**. v. 587, p.1-16, 2007.

EUROPEAN COMMISSION. Technical guidance prepared by the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. **EFSA Journal**. v. 587, p.1-16, 2008.

European Food Safety Authority – EFSA. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. **EFSA Journal**. v. 10 (6), p. 2740, 2012.

FELTEN, A.; BARREAU, C.; BIZET, C.; LAGRANGE, P.H.; PHILIPPON, A. *Lactobacillus* species identification, H₂O₂ production, and antibiotic resistance and correlation with human clinical status. **Journal Clinical Microbiology**, 1999.

FRANCO, B. D. G. D. M.; LANGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

FREITAS, A. Brasil tem de três a quatro farmácias a mais por pessoa. **Infonet**, Sergipe, 26 out. 2012. Disponível em: <<http://www.infonet.com.br/saude/ler.asp?id=135784>>. Acesso em: 05 de Abril de 2016.

FORSYTHE. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 424p. 2005.

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

FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; SARANTINOPOULUS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**. v. 106, p. 1-24, 2006.

GAISER, R.A.; et al. Production of eukaryotic antimicrobial peptides by bacteria: A review. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. ed. Méndez-Villas. v.2. p.992-1002, 2011.

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

GÁLVEZ, A.; et al. Application of bacteriocins in the control of foodborn pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews Biotechnology**. v. 28, p. 51-70, 2008.

GARCIA, E.F.; XAVIER, D. E.; COSTA, W. K. A.; CARVALHO, R. J.; CAMPANA, E. H.; PICÃO, R. C.; MAGNANI, M.; SAARELA, M.; SOUZA, E. L. Identification of lactic acid bacteria isolated from fruits and industrial byproducts of fruits through the MALDI-TOF technique. **Anais: MICRIAL**. 2014.

GARCÍA, P. et al. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. **Journal of Food, Science and Technology**. v. 21, p. 373-285, 2010.

GERMANO, P.M.L.G.M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 4º. ed. Barueri-SP: Manole, 2011.

GHANBARI, M.; et al. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria: A review. **Journal of Food Science and Technology**. v. 54, p. 315-324, 2013.

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

GUIMARÃES, D.O.; et al. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**. v.33, n.3, p.667-679, 2010.

HARRIS, L. J. et al. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **J Food Protection**, v. 52, p. 384-387, 1989.

HENG, N.C.K.; et al. The diversity of bacteriocins in Gram positive bacteria. In: RILEY, M. A.; CHAVAN, M. A. **Bacteriocins: ecology and evolution**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 45-83. 2007.

HOEFLER, R.; et al.. Ações que estimulam o uso racional de antimicrobianos. **Boletim Farmacoterapêutico**. n.4, 2006.

HOLZAPFEEL, W.H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJORKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**. ed. 73, p. 365 – 373, 2001.

HOFVENDAHL, K.; HAGERDAL-HAHN, BHOLZAPFEL, H.W.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJORKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 1997.

JAWETZ, E. et al. **Microbiologia Médica**. ed. Guanabara Koogan. 524p, 2001.

KAPIL, A. The challenge of antibiotic resistance: Need to contemplate. **Indian Journal of Medical Research**. v.121, p.83-91, 2005.

KHACHATOURIANS, G.G. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. **Canadian Medical Association Journal**, 1998.

KOSTINEK, M.; PULKALL, R.; ROONEY, A.P.; SCHILLINGER, U.; HERTEL, C.; HOLZAPFEEL, W.H.; FRANZ, C.M. *Lactobacillus arizonensis* is a later heterotypic synonym of *Lactobacillus plantarum*. **Journal System Evolution Microbiology**. 2005.

LARBOCLIN. Manual para Antiobiograma difusão em disco (Kirby & Bauer). p.1-29, 2011.

LEVY, S.B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine**, 2004.

- LINCOPAN, N.; TRABULSI, L.R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Trabulsi LR, Alterthum F, editores. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu. p. 359-68, 2005.
- LIU, C.; ZHANG, Z.Y.; DONG, K.; YUAN, J.P.; GUO, X.K. Antibiotic resistance of probiotic strains of lactic acid bacteria isolated from marketed foods and drugs. **Journal of Biomedicine Environment Scienc**. p. 401-412, 2009.
- LOPES, A. R., **Prospecção de bactérias lácticas em matriz ambiental**. Tese mestrado (Ciências biológicas), Instituto de Biociências, Ri claro, 2013.
- MAGNÚSSON, S.H.; et al. State of the art in benefit-risk analysis: Food microbiology. **Journal of Food and Chemical Toxicology**. v.50, p.33-39, 2012.
- MALDONADO-BARRAGAN, A. et al. Induction of bacteriocin production by coculture is widespread among plantaricin-producing *Lactobacillus plantarum* strains with different regulatory operons. **Journal of Food Microbiology**. v. 33, p. 40-47, 2013.
- MARTINS, A.D.O.; et al. Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagonista frente a microrganismos indicadores. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. v.5, n.1, p.53-59, 2006.
- MARINHO, D.F. **Capacidade de desenvolvimento de tolerância em cepas de Salmonella enterica expostas ao óleo essencial de Origanum vulgare L**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba. 2014.
- MESSAOUDI, S.; et al. Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51. **Journal Food Microbiology**. v.32, p. 129-134, 2012.
- MORAES, P.M.; et al. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. **Food Scienc and Technology**, v. 43, p. 1320-1324, 2010.
- MOZZI, F. et al. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications**. 1. ed. Wiley-Blackwell, 2010.
- CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; VApproved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- NORMARK, H.; NORMARK S. Evolution and spread of antibiotic resistance. **Journal of Internal Medicine**. v.252, n.2, p.91-106, 2002.
- ORTOLANI, M.B.T. **Bactérias ácido lácticas autóctones de leite cru e de queijo minas frescal: isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular**. Dissertação (medicina veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, MG. 2009.

PAULA, M.C. de, **Avaliação do risco da ocorrência de resistência a antibióticos e/ou bacteremia causadas por bactérias ácido lácticas: uma revisão sistemática.** Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2014.

PIARD, J.C.; LOIR Y.L.; POQUET, I.; LANGELLA, P. **Utilização das bactérias lácticas no centro dos novos desafios.** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento – Encarte Especial. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br>. Acesso em: 21 abr. 2005.

RAMOS, C.L.; et al. Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. **Journal of Food Microbiology.** v. 36, p. 22-29, 2013.

RODRÍGUEZ-ALONSO, P.; FERNÁNDEZ-OTERO, C.; CENTENO, J.A.; GARABAL, J.I. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria and Micrococcaceae/Staphylococcaceae isolates from artisanal raw milk cheeses, and potential implications on cheese making. **Journal of Food Science.** v. 74, p. 284-293, 2009.

RODRIGUEZ, E.; et al. Inhibitory activity of a nisin-producing starter culture on *Listeria innocua* in raw ewes milk Manchego cheese. **Journal Food Microbiology.** v.39, p.129–132, 1998.

ROSA, C.M.; et al. Purification and mechanistic action of a bacteriocin produced by a Brazilian sausage isolated, *Lactobacillus sake* 2a. **Journal Food Safety.** v. 22, p. 39-54, 2002.

SAARELA, M.; VIRKAJARI, I.; ALAKOMI, H.L.; SIGVARD-MATTILA, P.; MATTO, J. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. **International Dairy Journal.** v. 16, p. 1477-1482, 2006.

SCHILLING, U.; LUCKER, F. Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* from Meat. **Applied and Environmental Microbiology.** 1989.

SCHROETER, J.; KLAENHAMMER, T. Genomics of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Lett.** v. 292, p. 1-6, 2009.

Silva Jr EA. **Manual de Controle Higiênico- Sanitário em Serviços de Alimentação.** 6 ed. São Paulo: Ed Varela. 2008.

SYBESMA, W.; et al. Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food. Bridging the gap between consumers, green groups, and industry. **Electronic Journal of Biotechnology,** 2006.

TAMURA K.; et al. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution,** 2013.

TEMMERMAN, R.; POT, B.; HUYS, G.; SWINGS, J. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. **Journal of Food Microbiology.** v. 81 (1), p. 1-10, 2003.

- TOPISIROVIC, L.; et al. Potencial of acid lactic bacteria isolated from natural niches in food production and preservation. **Journal Food Microbiology**. v. 112, p. 230-235, 2006.
- TORO, C.R. **Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *Litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune**. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- TRABULSI, L.R.; et al. **Microbiologia**. 3. ed. Atheneu. 616p, 1999.
- TULUMOGLU, S.; KAYA, H.I.; SIMSEK, O. Probiotic characteristics of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from tulum cheese. **Journal Anaerobe**. v. 30, p. 120-125, 2014.
- TURNER, S.; et al. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal Eukaryot Microbiology**, 1999.
- UDHAYASHREE, N.; et al. Production of bacteriocin and their application in food products. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. v. 2, p. 406-410, 2012.
- WHO. Fruit and vegetables for health: Report of a Joint FAO/WHO Workshop. **Kobe, Japan**, 2016.
- WRIGHT, G.D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.57, p.1451-1470, 2005.
- YANG, C.H.; et al. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized. **Microbial Ecology**, 2000.
- ZHANG, Z.Y.; et al. Safety assessment of *Lactobacillus plantarum* JDM1 based on the complete genome. **International Journal of Food Microbiology**. v.153, p.166-170, 2012.
- ZHEN, P.X.; FANG, H.Y.; YANG, H.B.; TIEN, N.Y.; WANG, M.C.;WU, J.J. *Lactobacillus pentosus* strain LPS16 produces lactic acid, inhibiting multidrug-resistant *Helicobacter pylori*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. p. 168 – 174, 2016.