



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS SOBRAL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MARIANE SILVEIRA MAGALHÃES FERNANDES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO SOBRENADANTE DE
CEPAS DE *Lactobacillus* CELL-FREE SOBRE ISOLADOS DE *Escherichia coli*
FARMACORRESISTENTES**

SOBRAL

2019

MARIANE SILVEIRA MAGALHAES FERNANDES

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO SOBRENADANTE DE CEPAS
DE *Lactobacillus CELL-FREE* SOBRE ISOLADOS DE *Escherichia coli*
FARMACORRESISTENTES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Bioprospecção de Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro.

SOBRAL

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F41a Fernandes, Mariane Silveira Magalhães.
 Atividade antimicrobiana e antibiofilme do sobrenadante de cepas de *Lactobacillus cell-free* sobre
 isolados de *Escherichia coli* farmacorresistentes / Mariane Silveira Magalhães Fernandes. – 2019.
 63 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação
 em Biotecnologia, Sobral, 2019.
 Orientação: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro.
1. Enterobactérias. 2. Probióticos. 3. Antimicrobianos. I. Título.

CDD 660.6

MARIANE SILVEIRA MAGALHAES FERNANDES

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO SOBRENADANTE DE CEPAS
DE *Lactobacillus CELL-FREE* SOBRE ISOLADOS DE *Escherichia coli*
FARMACORRESISTENTES.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Microbiologia Aplicada

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Victor Alves Carneiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Igor Iuco Castro da Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Renata Albuquerque Costa
Centro Universitário INTA (UNINTA)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar saúde e força, e por sempre iluminar o meu caminho, colocando pessoas tão especiais ao meu lado.

Aos meus pais, Eduardo e Rosane, e meu irmão, Eudoro, exemplos de integridade, dignidade e caráter nos quais busco todos os dias me espelhar. Meus eternos agradecimentos pela confiança na minha capacidade durante todos os anos de estudo.

Ao meu marido, Marcelino, meu companheiro de todas as horas, por todo seu amor, compreensão, respeito, tolerância e por todas as atitudes que o tornam um grande profissional e ser humano.

À minha filha Lis, minha inspiração diária e motivação maior, que é capaz de me tornar todos os dias uma pessoa melhor e que sempre estará em primeiro lugar na minha vida.

Ao meu orientador e amigo Victor Alves Carneiro, por ter apresentado a mim esse novo mundo da microbiologia e acreditar no meu potencial mais do que eu mesma. Obrigada pelos inúmeros ensinamentos, por me corrigir quando necessário sem desmotivar, por confiar em mim e, sobretudo, por sua paciência em todos os momentos.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, que ultrapassam as dificuldades existentes para exercer um trabalho árduo sem perder a motivação em nos ajudar quando necessário.

Aos meus colegas de turma, por servirem a mim como inspiração de inteligência e dedicação, por compartilharem as angústias, os desafios e principalmente as alegrias durante essa jornada.

Aos membros da banca examinadora, Prof^a Renata Albuquerque Costa e Prof. Igor Iuco, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação.

Aos meus colegas do Laboratório de Biofilme e Antimicrobianos – LaBAM, que me ensinaram todas as práticas necessárias para desenvolvimento desse trabalho de Mestrado, em especial a Rafaela Bastos por toda sua disponibilidade em ajudar e tirar minhas dúvidas.

Às queridas alunas de iniciação científica, Brendda Miranda e Juliana Rios, que foram parte essencial na realização de todos os meus experimentos com muita dedicação e afinco.

À grande amiga Leilah Monte Coelho, por todo seu apoio profissional e pessoal para que eu ultrapassasse esse desafio.

“Pois eu bem sei os planos que estou projetando para vós, diz o Senhor; planos de paz, e não de mal, para vos dar um futuro e uma esperança.” (Jeremias 29:11)

RESUMO

A formação de biofilmes está envolvida com o aumento da incidência de importantes patógenos bacterianos multirresistentes à terapias antimicrobianas convencionais, sendo constatada a presença de enterobactérias resistentes a múltiplos antibióticos em alimentos *in natura*. Dessa forma, surge a necessidade da busca por novas formas de controle microbiano. Como possível estratégia de prevenção, espécies de *Lactobacillus* vêm sendo associadas à dispersão de biofilmes formados por micro-organismos patogênicos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de sobrenadantes de *Lactobacillus cell-free* sobre isolados de *Escherichia coli* multirresistentes. Para isto, foram utilizadas quatro cepas de *E. coli* isoladas de filés de tilápia (P12, P25, P35 e P36) e três cepas probióticas (LA 14, *L. acidophilus* ATCC 4356 e *L. rhamnosus* ATCC 9595). O perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *E. coli* foi verificado por meio de sistema automatizado VITEK[®]2. Para avaliação da atividade antagônica dos probióticos foi utilizada a técnica de *spot overlay*, com medição do diâmetro de inibição. Os sobrenadantes *cell-free* produzidos foram testados quanto ao seu efeito antimicrobiano, por meio de microdiluição em placa entre as concentrações de 6,25 a 50%. A ação antibiofilme foi avaliada após tratamento de biofilme pré-formado por 12 h pelas cepas de *E. coli*, por meio da técnica de coloração por cristal violeta a fim de verificar alterações sobre a biomassa de biofilme. Como resultado, verificou-se que as amostras apresentam um perfil de resistência a ampicilinas, cefalotina e quinolonas. Quanto ao teste de antagonismo, todas as cepas probióticas demonstraram alta capacidade de inibição (escore de inibição > 6 mm) sobre os isolados de *E. coli* multirresistentes. As cepas patogênicas foram susceptíveis a atividade antimicrobiana dos sobrenadantes produzidos, com Concentração Inibitória e Bactericida Mínima variando entre 12,5 a 50%. Entretanto, os mesmos não mantiveram seu efeito após neutralização, o que pode sinalizar que o resultado inibitório esteja relacionado com a produção de ácidos orgânicos. Com relação ao efeito antibiofilme, todos os probióticos analisados foram capazes de reduzir o biofilme pré-formado, com destaque para a cepa comercial que apresentou percentuais de inibição por volta de 50% da biomassa. Portanto, as preparações *cell-free* produzidas pelos *Lactobacillus* do presente estudo podem representar ferramentas para uma possível superação dos mecanismos de resistência apresentados por isolados *E. coli*.

Palavras-chaves: Enterobactérias; Probióticos; Antimicrobianos.

ABSTRACT

The term biofilm describes the life form characterized by the microbial adhesion to a surface with the production of extracellular polymeric substances, constituting a gelatinous network that protects the cells. Biofilms formation is involved in the increasing incidence of important multidrug resistant bacterial pathogens to conventional antimicrobial therapies, being verified the presence of enterobacteria isolated from fresh foods resistant to multiple antibiotics. Given this context, it is necessary to search for new forms of microbial control. Lactic acid bacteria, including *Lactobacillus* species, have been associated with the prevention or dispersion of biofilms formed by pathogenic microorganisms. Therefore, the aim of this work was to evaluate the antimicrobial and antibiofilm activity of the cell-free supernatants produced by *Lactobacillus* strains on multi-drug resistant *E. coli* isolates. For this, the profile of antimicrobial susceptibility of *E. coli* strains was identified by the VITEK®2 automated system. For the evaluation of the antagonistic activity of probiotics, the Spot Overlay technique was used, with measurement of the inhibition halos. The cell-free supernatant produced by *Lactobacillus* was tested for its antimicrobial effect by plaque microdilution of the supernatant with the concentrations ranging 6,25 a 50%. The antibiofilm action was evaluated after treatment of preformed biofilm for 12 h, using a Crystal Violet staining technique to verify changes in biofilm biomass. As a result, the samples were found to be resistant to ampicillins, cephalothin and quinolones. As for the antagonism test, all probiotic strains demonstrated high inhibitory capacity (inhibition scores > 6 mm) against multiresistant *E. coli* isolates. The isolates were susceptible to antimicrobial activity of the supernatants produced, with Minimal Inhibitory and Bactericidal Concentrations ranging from 12.5 to 50%. However, no effect was observed after neutralization, which indicate that the inhibitory action may be related to the production of organic acids. Regarding the antibiofilm effect, all the analyzed probiotics were capable to reduce the preformed biofilm, standing out the commercial strain, that was capable to inhibit around 50% of the biomass. Therefore, the cell-free preparations produced by *Lactobacillus* from the present study may represent tools for a possible overcome of resistance mechanisms presented by *E. coli* isolates.

Keywords: Enterobacteria; Probiotics; Antimicrobials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo de desenvolvimento de um biofilme. Transporte das bactérias a uma superfície, seguido de proliferação e incorporação de uma matriz extracelular, culminando na maturação e dispersão do biofilme. Fonte: Modificado de Joo e Otto (2012).....	24
Figura 2 – Mecanismos de ação de bacteriocinas produzidas por BAL. Fonte: Ogaki; Furlaneto; Maria, 2015.....	33
Figura 3 – Representação esquemática das condições de cultivo e do procedimento de ajuste da concentração do inóculo bacteriano para a realização dos ensaios biológicos. Fonte: Oliveira (2014).....	37
Figura 4 – Representação esquemática da metodologia utilizada para determinar a atividade antagonica das cepas de <i>Lactobacillus</i> contra isolados de <i>Escherichia coli</i> . Fonte: Próprio autor (2019).....	38
Figura 5 – Exemplo da placa de Petri após o teste de antagonismo, com delimitação do halo de inibição de crescimento de <i>Escherichia coli</i> exercido pela cepa de <i>Lactobacillus</i> . Fonte: Próprio autor (2019).....	38
Figura 6 – Representação esquemática da metodologia utilizada para preparo do sobrenadante de <i>Lactobacillus cell-free</i> . Fonte: Próprio autor (2019).....	39
Figura 7 – Representação esquemática da metodologia utilizada para determinar as concentrações inibitórias e bactericidas mínimas de sobrenadante de <i>Lactobacillus cell-free</i> contra isolados de <i>Escherichia coli</i> , segundo teste de microdiluição pela CLSI. Fonte: Oliveira (2014).....	40
Figura 8 – Representação esquemática da metodologia utilizada para determinar a atividade antibiofilme do sonadante de <i>Lactobacillus cell-free</i> contra isolados de <i>Escherichia coli</i> , com pré-formação de biofilme por 12 horas, seguido de tratamento com sobrenadante por 12 horas. Fonte: Próprio autor (2019).....	41
Figura 9 – Representação esquemática da metodologia de quantificação do biofilme em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato. Fonte: Próprio autor (2019).....	42

Figura 10 – Quantificação através de coloração por cristal violeta da biomassa do biofilme 45
de isolados de *Escherichia coli* após 12 h de formação, seguida de 12 h
tratamento com o sobrenadante *cell-free* produzido por (LC) LA 14 comercial
(LA) *L. acidophilus* ATCC 4356 (LR) *L. rhamnosus* ATCC 9595. Fonte:
Próprio autor (2019).....

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Mecanismos de ação das bactérias probióticas. Fonte: Oelshlaeger (2010).....	29
Quadro 2 – Resultado do teste de sensibilidade a antimicrobianos das cepas isoladas de <i>Escherichia coli</i> , por meio do sistema VITEK 2. Fonte: Próprio autor (2019).....	43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Resultados obtidos no teste de antagonismo das cepas de LA 14 comercial, *L. acidophilus* ATCC 4356 e *L. rhamnosus* ATCC 9595 sobre isolados de *Escherichia coli*. Fonte: Próprio autor (2019)..... 42
- Tabela 2 – Percentual (%) de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos sobrenadantes *cell-free* obtidos de LA 14 comercial, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* sobre isolados de *Escherichia coli*. Fonte: Próprio autor (2019)..... 45
- Tabela 3 – Percentual (%) de Inibição do biofilme pré-formado (12 h) por isolados de *Escherichia coli*, após tratamento com os sobrenadantes *cell-free* obtidos de LA 14 comercial, *L. acidophilus* ATCC 4356 e *L. rhamnosus* ATCC 9595. Fonte: Próprio autor (2019)..... 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AI	Autoindutor
BAL	Bactérias Ácido Lácticas
C	Carbono (elemento químico)
CO ₂	Gás carbônico
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CV	Cristal Violeta
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difusamente aderente
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substances</i>
<i>et al.</i>	Colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GRES	<i>Generally Recognized as Safe</i>
h	Hora
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Concentração molar
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
MRS	<i>Mann, de Rogosa, Sharpe</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Nm	Nanômetro
PBS	Tampão Fosfato Salina

pH	Potencial Hidrogeniônico
QS	<i>Quorum Sensing</i>
SEPEC	Septicemia enteropatogênica <i>Escherichia coli</i>
SLCf	Sobrenadante de <i>Lactobacillus cell-free</i>
STEC	<i>Escherichia coli</i> shiga toxigênica
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFC/g	Unidades formadoras de colônia por grama
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
β	Beta
μg	Micrograma
μL	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
<i>G</i>	Gravidade
<	menor que
>	maior que
\leq	menor ou igual
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	Enterobactérias e doenças infecciosas intestinais	19
2.2	Resistência antimicrobiana	20
2.3	Biofilmes microbianos	23
2.4	Micro-organismos comensais	26
2.4.1	<i>Probióticos</i>	26
2.4.1.1	<i>Modo de ação dos probióticos</i>	28
2.4.1.2	<i>Lactobacillus</i>	29
2.5	Interação entre <i>E. coli</i> e <i>Lactobacillus</i>	30
2.5.1	<i>Estratégias antibiofilme</i>	31
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo Geral	35
3.2	Objetivos Específicos	35
4	METODOLOGIA	36
4.1	Micro-organismos	36
4.2	Condições de cultivo	36
4.3	Antibiograma automatizado	37
4.4	Teste de antagonismo - <i>Spot Overlay</i>	37
4.5	Preparo do sobrenadante de <i>Lactobacillus cell-free</i> – SLCf	39
4.6	Estabelecimento da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) do SLCf	40
4.7	Atividade antibiofilme do SLCf	41
4.8	Análise estatística	42
5	RESULTADOS	43
5.1	Teste de sensibilidade antimicrobiana	43
5.2	Teste de antagonismo	43
5.3	Atividade antimicrobiana do SLCf	44
5.4	Atividade antibiofilme do SLCf	45
6	DISCUSSÃO	47
6.1	Teste de sensibilidade antimicrobiana	47
6.2	Teste de antagonismo	49

6.3	Atividade antimicrobiana do SLCf.....	50
6.4	Atividade antibiofilme do SLCf.....	51
7	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54

1 INTRODUÇÃO

As bactérias em seu habitat natural podem ser encontradas aderidas a superfícies diversas, geralmente compondo um ecossistema estruturado altamente dinâmico, que atua de maneira coordenada, com produção de substâncias poliméricas extracelulares, constituindo uma rede gelatinosa que protege as células (SCHIEBEL et al., 2017).

Praticamente todas as bactérias podem crescer como biofilme, sendo metabolicamente diferentes das bactérias suspensas isoladas em uma cultura pura (FURUKAWA, 2015). O desenvolvimento inicia a partir de uma resposta que as células planctônicas dão a sinais de estresse ambientais em busca de aumentar suas chances de sobrevivência, alterando a expressão de centenas de genes. Assim, o resultado é a emergência de um fenótipo mais vantajoso e um aumento adaptativo de sua resistência às condições desfavoráveis (HALL; MAH, 2017).

Os biofilmes estão associados a numerosos casos de infecções crônicas em humanos, já que também são capazes de crescer em superfícies do corpo ou em dispositivos médicos (HOIBY et al., 2011). Além disso, apresentam resistência inerente a antibióticos e à defesa imune do hospedeiro, sendo uma das características mais marcantes dessas comunidades (BJARNSHOLT et al., 2013; DE LA FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013). Esses agregados podem requerer doses mais elevadas de quimioterápicos, considerando que sua tolerância é de 1.000 vezes maior que as de células planctônicas (HANEY et al., 2018).

A formação de biofilmes está envolvida com o aumento da incidência de importantes patógenos bacterianos multirresistentes às terapias antimicrobianas convencionais (FRIERI; KUMAR; BOUTIN, 2017). Tal efeito está relacionado a mecanismos multifatoriais que limitam a ação de componentes antimicrobianos, como a produção de β -lactamases, a má ligação e difusão de antibióticos mediada pela matriz extracelular, alterações fisiológicas devido a lentas taxas de crescimento, entre outras propriedades específicas (HALL; MAH, 2017). Portanto, é possível que a combinação de diferentes estratégias de defesa possa ser um passo promissor no combate aos biofilmes (BJARNSHOLT et al., 2013).

A Organização Pan-americana da Saúde (2017) publicou sua primeira lista de “agentes patogênicos prioritários” resistentes aos antibióticos que representam ameaça para a saúde humana. A lista destaca, em particular, as bactérias Gram-negativas resistentes a múltiplos antibióticos, entre elas as Enterobacteriaceae. Essas bactérias possuem capacidade inata de encontrar novas formas de resistir ao tratamento e são capazes de transmitir material genético, o qual permite que outras bactérias também se tornem resistentes aos fármacos,

como ampicilinas e cefalosporinas de primeira, segunda e até mesmo terceira geração (HENRIQUES; VASCONCELOS, 2013).

No contexto da segurança de alimentos, os biofilmes também representam uma preocupação. Pesquisadores alertam que o ambiente aquático atua como responsável pelo desenvolvimento de resistência a antibióticos, sendo constatada a presença de enterobactérias resistentes a múltiplos antibióticos em isolados de peixe (CAPKIN; TERZI; ALTINOK, 2015). No Brasil, o uso indiscriminado de drogas no cultivo em fazendas de camarão resultou no isolamento de enterobactérias com altos índices de resistência antimicrobiana a fármacos (VIEIRA et al., 2010).

Nesse contexto, surge a necessidade de explorar novas formas de controle microbiano. Atualmente, probióticos estão sendo estudados em virtude de seu potencial efeito protetor contra infecções bacterianas, destacando-se como um tratamento terapêutico alternativo (OSAMA et al., 2017). Além disso, especificamente as bactérias produtoras de ácido láctico, vêm sendo associadas à prevenção ou dispersão de biofilmes formados por micro-organismos patogênicos (MIQUEL et al., 2016). Espécies de *Lactobacillus* são as principais bactérias probióticas utilizadas para fins clínicos (MIYAZAKI et al., 2010).

Está claro que o combate aos biofilmes é difícil, especialmente aqueles formados por bactérias multirresistentes à antibióticos (FRIERI; KUMAR; BOUTIN, 2017). Dessa forma, destaca-se a importância da compreensão da correlação entre a multirresistência a antibióticos, apresentadas por diversos micro-organismos, com as habilidades individuais de formarem agregados celulares complexos, a fim de auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias para controle de infecções causadas por biofilmes.

Portanto, existe uma correlação entre a resistência múltipla a antibióticos apresentadas por isolados de enterobactérias com as propriedades individuais de formação e desenvolvimento de biofilmes? A aplicação biotecnológica de cepas de *Lactobacillus* como probióticos pode representar uma ferramenta de combate aos biofilmes microbianos, superando mecanismos de resistência bacteriana? Sendo assim, a proposta desse trabalho é verificar a atividade antibiofilme e antimicrobiana do sobrenadante de *Lactobacillus* sobre isolados de *Escherichia coli* farmacorresistentes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Enterobactérias e Doenças Intestinais Infecciosas

A família Enterobacteriaceae compreende um grupo heterogêneo de bactérias, na forma de bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose, podendo ser móveis ou imóveis. Entre os 27 gêneros e centenas de espécies englobadas por essa família, alguns são patogênicos e outros podem causar doenças oportunistas. Podem ser encontrados no solo, água, plantas, além do trato intestinal humano e de outros homeotermos e dentre os principais acometimentos causados nos seres humanos estão as gastroenterites e infecções extraintestinais como no trato urinário e septicemias (BRASIL, 2013).

No Brasil, entre os anos 2000 a 2017, enteropatógenos clássicos foram identificados como alguns dos principais agentes etiológicos envolvidos em centenas de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), com destaque para a *Escherichia coli* (BRASIL, 2018). Também são comumente relacionadas como causas de infecções urinárias (BRASIL, 2013; WHO, 2014). Apesar de comuns, essas infecções podem ser graves em crianças, idosos ou pessoas que fazem uso de drogas imunossupressoras (OUWEHAND et al., 2014).

Dentre as diversas infecções entéricas, destacam-se com frequência as causadas por cepas patogênicas de *Escherichia coli*, podendo provocar diferentes casos de diarreias infecciosas. Esse micro-organismo pode ser classificado em oito categorias: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* de difusamente aderente (DAEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC) e *E. coli* septicemia enteropatogênica (SEPEC) (MIYAZAKI et al., 2010; SCHIEBEL et al., 2017).

Entre 2006 e 2017, mais de 20 surtos alimentares causados por diferentes estirpes de *E. coli* foram notificados apenas nos Estados Unidos. Com destaque para as linhagens shiga toxigênicas (STEC), responsáveis anualmente por mais de 265.000 infecções, 3.600 hospitalizações e até 30 óbitos (CDC, 2018). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as doenças diarreicas de origem alimentar afetam 550 milhões de pessoas e causam 230.000 mortes anualmente, principalmente em crianças, das quais 96.000 vão a óbito (WHO, 2015).

A diarreia representa um sintoma comum nas doenças intestinais infecciosas e caracteriza-se pela eliminação de três ou mais fezes líquidas por dia ou de consistência reduzida, ou em número de vezes maior do que o usual. Ela pode ser classificada em aguda, quando tem duração inferior a 14 dias, ou em persistente, quando a duração é superior a 14 dias (WHO, 2018).

A formação de biofilmes está envolvida na colonização intestinal por enteropatógenos, sendo responsável por quadros persistentes de diarreia, principalmente em países em desenvolvimento (BLANTON et al., 2018). As infecções intestinais são desencadeadas através de etapas sequenciais, que vão desde a adesão do patógeno às células epiteliais intestinais, até a formação e maturação do biofilme. O resultado será o estabelecimento de uma infecção persistente, já que nesses casos as células patogênicas encontram-se menos susceptíveis à ação de agentes antimicrobianos e à fagocitose por células de defesa do hospedeiro (MIYAZAKI et al., 2010).

Na indústria de alimentos esses micróbios podem ser inativados por um método bastante utilizado que é o tratamento térmico, porém algumas cepas podem apresentar moderada resistência ao calor (LI; GANZLE, 2017). Essa resistência, apesar de ser menor do que a apresentada pelos esporos, representa um problema na indústria de alimentos que pode acarretar na persistência microbiana e ocorrência de DTAs. O problema pode ainda ser agravado quando a resistência ao calor está combinada ao potencial de formação de biofilmes (MARTI et al., 2017).

As infecções causadas pelas bactérias da família Enterobacteriaceae estão intimamente relacionadas ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana, representando um crescente problema mundial (OUWEHAND et al., 2014; SOARES et al., 2016). Isolados de *E. coli* causam infecções com elevada resistência à múltiplos antibióticos em países em desenvolvimento como a Índia. Entre os anos de 2008 a 2013, essas espécies apresentaram um aumento de 70-85% na resistência à fluoroquinolonas e a um amplo espectro de β -lactâmicos (HALDER; MANDAL, 2016).

2.2 Resistência Antimicrobiana

Uma das formas de terapia de maior sucesso na história da medicina é representada pelo uso de antibióticos (FRIEDMAN; TEMKIN; CARMELI, 2015). Estes, que podem ser de origem natural ou sintética, são substâncias naturalmente produzidas por determinados micro-organismos que, em pequenas concentrações, são capazes de inibir o

desenvolvimento de outros micro-organismos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). Porém, é crescente o número de patógenos resistentes aos antibióticos convencionais, comprometendo assim a eficiência dessas drogas. Portanto, compreender os mecanismos envolvidos no processo de resistência é fundamental no contexto do desenvolvimento de estratégias de prevenção (LIN et al., 2015).

Causas simples estão associadas com a seleção de cepas resistentes, tais como, a prescrição e o uso inadequado desses medicamentos, resultando em uma alta morbimortalidade entre os indivíduos afetados (DE OLIVEIRA; DE PAULA; ROCHA, 2015). No Brasil, uma pesquisa aponta que quase metade dos pacientes com infecção (44,7%) ou colonização por micro-organismos resistentes (45,2%) evoluíram para óbito em um hospital do Paraná (SOUZA et al., 2015). Um estudo de revisão destacou uma estimativa que em 2050, mais de 10 milhões de pacientes podem morrer devido à resistência bacteriana, o que significa que as bactérias podem causar mais óbitos do que o câncer e as doenças cardiovasculares (O'NEILL, 2014).

A baixa susceptibilidade a agentes antimicrobianos pode ter dois aspectos, tolerância e resistência. A primeira significa que as bactérias, apesar de não morrerem, ficam incapazes de crescer na presença da droga, enquanto que a segunda permite que a bactéria cresça na presença de antibióticos em concentrações mais altas que doses terapêuticas. Em geral, a tolerância envolve mecanismos físicos, como a formação de biofilmes; fisiológicos, relacionados ao estado metabólico celular; e adaptativos, os quais são regulados a partir da exposição (BJARNSHOLT et al., 2013)

A resistência classificada como intrínseca é uma característica que ocorre naturalmente nos micro-organismos, ou seja, sem uma exposição prévia ao antibiótico (BAPTISTA, 2013). Enquanto que a resistência adquirida ocorre através de mutações espontâneas, que surgem durante o crescimento bacteriano e/ou aquisição de DNA exógeno, por transformação, recombinação ou conjugação (CAG et al., 2016). A principal fonte de transferência de genes entre os micro-organismos ocorre através de conjugação, que permite a translocação de grandes fragmentos de DNA entre duas células bacterianas que estejam próximas entre si. Essa estratégia de difusão genética é responsável pela propagação de um amplo espectro de genes de resistência a antibióticos entre diversas espécies de enterobactérias (POULIN-LAPRADE; CARRARO; BURRUS, 2015).

A resistência pode ser explicada por alguns mecanismos, que podem aparecer isolados ou atuar simultaneamente. Entre estes estão três vias principais: alteração da permeabilidade do fármaco, modificação do alvo de ligação da droga e inativação do

medicamento por ação enzimática (BJARNSHOLT et al., 2013; CAG et al., 2016). Os genes que conferem resistência a antibióticos estão amplamente espalhados na natureza, podendo ser encontrados no solo, água, humanos e animais. Várias classes de antibióticos vêm apresentando um comprometimento da sua eficácia. Os β -lactâmicos são utilizados para tratar um alto número de infecções bacterianas, sendo uma das classes mais acessíveis mundialmente. Entretanto, a produção de β -lactamases, principalmente as β -lactamases de espectro estendido (ESBL), representa um problema mundial de saúde pública. Outra classe que compartilha dessa mesma dificuldade são os aminoglicosídeos, cuja crescente resistência vem sendo atribuída à produção de enzimas aminoglicosídeo-modificadas (LIN et al., 2015).

Outro desafio em desenvolver antibióticos eficazes é identificar componentes que sejam capazes de neutralizar as funções bacterianas de efluxo, pois este é um dos mecanismos que contribuem significativamente com o aumento da resistência à múltiplos antibióticos e que apesar da ampla distribuição em diferentes tipos de micro-organismos, se destaca entre bactérias Gram-negativas (CAG et al., 2016). A expressão desse sistema é geralmente controlada por reguladores transcricionais que podem reprimir ou ativar a transcrição desses genes (LIN et al., 2015).

Além dos mecanismos descritos, outra habilidade desenvolvida pelos micro-organismos é a capacidade de formar biofilmes. A morfologia, a densidade celular nesses conglomerados, assim como o estado fisiológico das mesmas, são alguns dos fatores envolvidos na resistência associada aos biofilmes (BJARNSHOLT, 2013). Além disso, a presença de exopolissacarídeos e DNA extracelular pode representar uma barreira que reduz e dificulta a difusão de antibióticos (MIQUEL et al., 2016).

Pesquisadores também vêm tentando desenvolver agentes antimicrobianos que atuem nos fatores de virulência das bactérias, em vez de atuar sobre próprios patógenos. Tais fatores incluem várias substâncias prejudiciais, como toxinas e enzimas, produzidas pelas bactérias (ENGELKIRK; DUBEN-ENGELKIRK, 2012).

A elaboração de protocolos de terapias alternativas com agentes não antibióticos contra infecções bacterianas é essencial. Visto que a multirresistência bacteriana aos medicamentos convencionais dificulta o tratamento de infecções severas que podem comprometer a vida do paciente (AWEEN et al., 2012; HALDER; MANDAL, 2016).

2.3 Biofilmes Microbianos

Biofilmes são comunidades mono ou multimicrobianas cercadas por uma matriz polimérica e células que frequentemente expressam fenótipos diferentes das células planctônicas, com alta capacidade de colonizar novas superfícies e alta tolerância a estresses ambientais (FRIERI; KUMAR; BOUTIN, 2017). Essas comunidades microbianas podem se desenvolver através de adesão a superfícies sólidas ou de agregação bacteriana em culturas líquidas (BJARNSHOLT, 2013).

Esses aglomerados celulares produzem uma matriz extracelular composta de exopolissacarídeos, DNA extracelular, material proteico, bem como apêndices celulares, sendo comumente reportado como EPS (*Extracellular Polymeric Substances*) a qual tem função protetora, revestindo toda a colônia (ZIMMER et al., 2014; HALL; MAH, 2017). A matriz caracteriza-se como uma camada gelatinosa que envolve toda a estrutura do biofilme funcionando como mecanismo de sobrevivência celular diante de fatores ambientais adversos, tais como, variações de pH, temperatura, escassez de nutrientes, ação de agentes antimicrobianos e fagocitose mediada pelo sistema imune do organismo hospedeiro (SCHIEBEL, 2017).

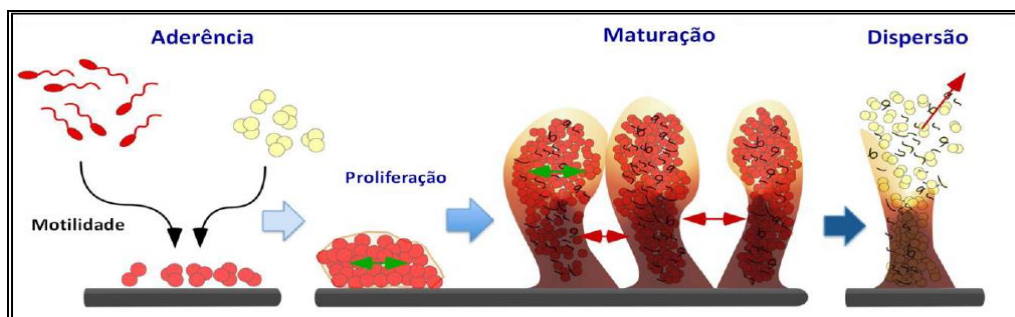
Tais características geram grandes vantagens, entre as quais: proteção contra situações prejudiciais à viabilidade celular; maior adaptabilidade e, por consequência, maior capacidade de colonização em diferentes tipos de ambientes; elevação do potencial metabólico, propiciando maior variabilidade genética, podendo favorecer a disseminação da resistência a antibióticos (HANEY et al., 2018).

O desenvolvimento do biofilme inicia a partir de uma resposta das células planctônicas, ainda não muito bem compreendido, a sinais ambientais em busca de elevar as chances de sobrevivência, alterando a expressão de centenas de genes. Assim, o resultado é a manifestação de um fenótipo mais vantajoso com aumento da capacidade adaptativa de resistência a condições desfavoráveis (DE LA FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013).

Em resumo, o processo de formação de biofilme compreende várias etapas (FIGURA 1). Inicialmente ocorre a ligação da célula a uma superfície, aderida reversivelmente. Nessa etapa as bactérias ainda são susceptíveis a ação de antibióticos. Em seguida ocorre a proliferação celular e formação de microcolônias com produção de matriz polimérica, aderindo de forma irreversível à superfície. Por fim, ocorre a maturação seguida de destacamento ou dispersão de partes do biofilme maduro, podendo determinar o surgimento de aglomerados celulares na forma de biofilmes (HOIBY et al., 2011; JOO;

OTTO, 2012; PETROVA; SAUER, 2016).

Figura 1 – Modelo de desenvolvimento de um biofilme. Transporte das bactérias a uma superfície, seguido de proliferação e incorporação de uma matriz extracelular, culminando na maturação e dispersão do biofilme.



Fonte: modificado de JOO; OTTO, 2012.

As estruturas bacterianas externas representam importante papel na formação de biofilme, podendo citar as fímbrias, flagelos e cápsulas (HOIBY et al. 2011). A cápsula influencia diretamente na arquitetura do biofilme, além de proteger micro-organismos contra fatores ambientais estressantes, como um ataque do sistema imune do hospedeiro ou a presença de agentes antimicrobianos (WILLIS, WHITFIELD, 2013). Os flagelos são responsáveis pelo direcionamento de micro-organismos sésseis a uma determinada superfície a ser colonizada, de maneira ativa (JOO; OTTO, 2012). Já as fímbrias facilitam a agregação bacteriana e a aderência sobre diversos substratos, bióticos e abióticos, sendo uma estrutura comum em organismos Gram-negativos (WILLIS, WHITFIELD, 2013).

De acordo com a sua localização (ambiental, biomédica, industrial) e a espécie de micro-organismos que os compõem, os biofilmes podem ser benéficos ou maléficos aos seres humanos. Alguns destes, como a microbiota intestinal, desempenham uma função protetora e funcional ao sistema gastrointestinal de diversos animais (MIQUEL et al., 2016). Entretanto, os biofilmes formados por bactérias patogênicas são mais extensamente documentados na literatura (HOIBY et al., 2011).

A formação de biofilme sofre impactos significativos quando as bactérias são portadoras de genes de resistência a diferentes antibióticos em seus plasmídeos. Vem sendo sugerido que a presença desses genes pode aumentar ou reduzir a formação desses aglomerados, dependendo da cepa estudada e do seu perfil genético (TEH, WANG, DYKES, 2013). Destaca-se ainda outra preocupação particular, já que, devido à proximidade entre as células dessa comunidade, a transferência horizontal de genes responsáveis por codificar enzimas que conferem resistência a drogas antimicrobianas pode ocorrer entre diferentes

espécies de bactérias (BJARNSHOLT et al., 2013).

Vários fatores são responsáveis pelo aumento da resistência, um deles é heterogeneidade da população bacteriana, já que células em diferentes estágios metabólicos apresentam respostas distintas quando são expostos às terapias antimicrobianas. Os diferentes gradientes de oxigênio e nutrientes que existem dentro da estrutura do biofilme favorecem essa diferenciação celular (DE LA FUENTE-NÚÑEZ et al., 2013).

A matriz extracelular, composta por polissacarídeos, DNA extracelular e proteínas, também vem sendo reportada como protetora das células contra diferentes agentes antimicrobianos, possivelmente por facilitar o acúmulo de enzimas que degradam os antibióticos como as β -lactamases (HALL; MAH, 2017).

A mudança evolucionária também pode ser uma explicação para tal característica. É possível que a mesma possa surgir em um biofilme bacteriano através de processo genético e seja capaz de se perpetuar pelas populações descendentes, já que essas comunidades possuem tamanhos consideráveis e que as novas mutações que surgem podem se espalhar em intervalos de tempo relativamente pequenos. Essas células variantes resistentes podem ser capazes não apenas de sobreviver, mas também proliferar durante a antibioticoterapia (TYERMAN et al., 2013).

As bactérias são capazes de coordenar suas atividades através de uma comunicação química entre as células denominada *quorum sensing* (QS). Essa sinalização é essencial para variações genóticas e fenóticas de diferentes cepas, afetando, por exemplo, a mobilidade bacteriana, a resposta a situações de estresse e o transporte e síntese de matriz extracelular (RIBEIRO et al., 2015). Como consequência, a bactéria torna-se capaz de desencadear uma resposta metabólica específica, ativando determinados genes para expressão de fatores de virulência, como enzimas e toxinas (HOIBY et al., 2011).

Alguns dos aspectos citados como as estruturas celulares, a comunicação celular e os efeitos do ambiente, devem ser melhor compreendidos para que possam ser utilizadas como possíveis abordagens para inibição dos mesmos (HALL; MAH, 2017). Além disso, fatores ambientais, como composição do substrato, disponibilidade de nutrientes e condições hidrodinâmicas também podem afetar a biomassa do biofilme e a produção de componentes extracelulares. Portanto, entender como as bactérias respondem a esses fatores pode trazer informações que visam à prevenção de biofilmes patogênicos (RIBEIRO et al., 2015).

2.4 Micro-organismos Comensais

A associação de dois organismos diferentes que vivem juntos é definida como simbiose. Essas relações podem ser benéficas para apenas um dos simbioses, sem acarretar prejuízos para a espécie que os abriga, o que se caracteriza como comensalismo (ENGELKIRK; DUBEN-ENGELKIRK, 2012). Apesar de muitos micro-organismos da microbiota intestinal serem denominados comensais, sabe-se que existe uma relação de equilíbrio benéfica entre hospedeiro e os organismos que formam a microbiota humana, sendo vantajoso para ambos, o que caracteriza uma relação de mutualismo (PAIXÃO; CASTRO, 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

No intestino humano, define-se microbiota normal como àquela que evita o surgimento de patologias e desempenha as funções do trato gastrointestinal relacionadas à nutrição, ao sistema imune e antimicrobiana (PAIXÃO; CASTRO, 2016). Destaca-se, portanto, a existência do antagonismo microbiano, no qual os micro-organismos invasores (patógenos ou não) são impedidos de colonizar um local específico e não conseguem se estabelecer devido à intensa competição por espaço e nutrientes (ENGELKIRK; DUBEN-ENGELKIRK, 2012).

Tal antagonismo também pode ser desempenhado a partir da produção de proteínas chamadas bacteriocinas, que são capazes de inibir o crescimento de outras bactérias da mesma espécie ou de espécies intimamente relacionados, sem afetar a própria bactéria que a produziu (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015).

Em geral, os organismos comensais intestinais só podem ser denominados como cepas probióticas quando isolados, caracterizados e com efeitos benéficos à saúde devidamente validados (HILL et al., 2014). Assim, justifica-se o atual interesse nesses agentes probióticos com habilidades de interferir na colonização do hospedeiro por micro-organismos patogênicos.

2.4.1 Probióticos

O termo probiótico é definido como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro, podendo ser encontrados adicionados em alimentos ou como suplementos dietéticos e medicações (WHO, 2002; HILL et al., 2014).

Segundo a FAO/WHO (2001), existem vários critérios que precisam ser preenchidos para que um micro-organismo seja classificado como probiótico para o consumo humano. Os principais são: origem humana, resistência aos processos tecnológicos, propriedades não patogênicas, adesão aos tecidos epiteliais, estabilidade na presença de ácido e bile, capacidade de sobreviver no ambiente gastrointestinal, capacidade de influenciar atividades metabólicas e outras atividades funcionais.

Dentre os probióticos utilizados, destacam-se os pertencentes ao gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que são comensais do organismo humano. Devido seus efeitos antagonistas contra numerosos patógenos, alguns desses micro-organismos são considerados uma opção profilática e terapêutica no tratamento de doenças infecciosas (VUOTTO; LONGO; DONELLI, 2014; CHEW et al., 2015).

O interesse na atuação metabólica desses organismos cresceu nos últimos anos (DUBOURG; ELSAWI; RAOULT et al., 2015). No contexto das infecções intestinais, a utilização de probióticos apresenta-se como uma importante alternativa terapêutica, atuando não só na consistência das fezes, como também no equilíbrio da microbiota intestinal (MIYAZAKI et al., 2010). Além da utilização de espécies isoladas, coquetéis contendo diferentes cepas combinadas também demonstraram ser cada vez mais úteis no tratamento de algumas dessas doenças (VUOTTO; LONGO; DONELLI, 2014).

Entretanto, a principal alegação atual para utilização de probióticos é sua contribuição para o bom funcionamento intestinal, favorecendo o equilíbrio da microbiota intestinal, promoção da digestão da lactose por indivíduos intolerantes, alívio da constipação e aumento da absorção de vitaminas e minerais (VUOTTO; LONGO; DONELLI, 2014). Dados clínicos demonstram benefícios em três principais situações: infecções intestinais, doença inflamatória intestinal e síndrome do intestino irritável (GAGLIARDI et al., 2018).

A promoção da melhoria do sistema imunológico é outra alegação para o uso desses organismos, contribuindo na prevenção de doenças alérgicas, regulação de inflamações e atividade contra infecções no hospedeiro (HILL et al., 2014). Benefícios quanto à proteção contra doenças cardiovasculares, autoimune e câncer também são associados às Bactérias Ácido Lácticas (BALs) (OSAMA et al., 2017).

Os efeitos benéficos contra infecções bacterianas em humanos estão relacionados com o consumo regular de alimentos que sejam fonte dos mesmos, como iogurtes e coalhadas, além da suplementação (HALDER; MANDAL, 2016; PRABHURAJESHWAR E CHANDRAKANTH, 2017). Em geral, a dose de administração diária desses micro-

organismos é relativamente inferior (10^9 ou 10^{10} UFC/g) à quantidade de bactérias encontradas no cólon intestinal (10^{14} UFC/g) (OELSCHLAEGER, 2010).

2.4.1.1 Mecanismo de ação dos probióticos

Além da regulação da microbiota intestinal, os probióticos podem afetar diretamente os patógenos através de distintos mecanismos (MIYAZAKI et al., 2010). Essas bactérias ajudam a fortalecer a função da barreira intestinal, elevando a produção de mucina e modulando a atividade do sistema imune, e conseqüentemente, as superfícies bióticas envolvidas na formação de biofilmes por patógenos são modificadas, protegendo o hospedeiro (MIQUEL et al., 2016). Outros fatores como a produção de metabólitos, competição por nutrientes e supressão da produção de toxinas também estão envolvidos nessa ação antimicrobiana (LEBEER; VANDERLEYDEN; DE KEERSMAECKER, 2008, OELSCHLAEGER, 2010).

O efeito imunomodulador pode ser desencadeado por metabólitos, componentes da parede celular e fragmentos de DNA. A interação por adesão de células probióticas em células epiteliais do hospedeiro, principalmente intestinais, pode desencadear uma sinalização em cascata levando a uma modulação da resposta imune (OELSCHLAEGER, 2010).

Assim, essa modulação favorece a atividade fagocítica inespecífica por meio da ativação dos macrófagos ou alterando o equilíbrio de citocinas (GAGLIARDI et al., 2018). Os níveis de anticorpos também são aumentados, assim como a atividade das células “*natural killer*”, dos macrófagos e dos linfócitos B, sem o desenvolvimento de uma resposta inflamatória prejudicial ao hospedeiro (RIBEIRO, 2015).

A utilização de BALs para inibição do crescimento de enteropatógenos como a *E. coli* possui resultados positivos (VUOTTO, LONGO, DONELLI, 2014; DELLEY et al., 2015; RUIZ et al., 2017; ABDELHAMID; ESAAM; HAZAA, 2018). Um dos mecanismos de ação ocorre devido a capacidade de produção de ácidos orgânicos que alteram o pH do meio. O ajuste da acidez influencia diretamente na atividade antimicrobiana dos sobrenadantes obtidos de *Lactobacillus*, sendo mantida em pH próximo a 3 e perdida em pH 5 (MIYAZAKI et al., 2010).

Alguns probióticos também demonstram capacidade de inibir a expressão de um importante fator de virulência bacteriano: a produção de toxinas. Assim, a eficácia da utilização de certas cepas para tratamento de quadros diarreicos é provavelmente associada à

sua habilidade de proteger o hospedeiro contra a ação dessas toxinas, inclusive as produzidas por cianobactérias e fungos (OELSCHLAEGER, 2010).

O quadro abaixo resume os principais mecanismos de ação envolvidos nos efeitos benéficos de bactérias probióticas (QUADRO 1).

Quadro 1: Mecanismos de ação das bactérias probióticas.

MECANISMO DE AÇÃO E APLICAÇÕES
Modulação da resposta imune do hospedeiro, inata e adquirida. <ul style="list-style-type: none"> • Prevenção e tratamento de doenças infecciosas, • Tratamento de inflamações crônicas no trato digestivo.
Efeito antimicrobiano direto sobre outros micro-organismos, comensais ou patogênicos. <ul style="list-style-type: none"> • Prevenção e tratamento de infecções • Restauração do equilíbrio da microbiota intestinal.
Efeito sobre produtos microbianos, como toxinas, e do hospedeiro, como sais biliares. <ul style="list-style-type: none"> • Inativação de toxinas no hospedeiro.

Fonte: Oelschlaeger, 2010.

Apesar desses mecanismos estarem envolvidos em diversas utilizações, ressalta-se que aparentemente nenhum probiótico é apontado por apresentar os três princípios simultaneamente. Assim, é necessária a correta identificação e caracterização das propriedades de cada cepa, distinguindo os que possuem reais efeitos benéficos ao hospedeiro (OELSCHLAEGER, 2010).

2.4.1.2 *Lactobacillus*

Entre as BALs mais utilizadas como probióticos, os *Lactobacillus* são bactérias Gram-positivas usualmente encontradas em ambientes anaeróbicos, mas que também são capazes de sobreviver em condições aeróbicas (RUIZ et al., 2017). Esse gênero é industrialmente importante e representa bactérias produtoras de ácido lático a partir de carboidratos simples, o qual inibe o crescimento de micro-organismos competidores e permitem que sejam competitivas. Em seres humanos são encontradas na cavidade oral, trato intestinal e urinário (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE GASTROENTEROLOGIA, 2017).

Diversas espécies deste grupo ganharam o status GRAS (*Generally Recognized as Safe*), que identifica um micro-organismo ou derivado microbiano seguro para uso na alimentação (CUI, 2017; GAGLIARDI, 2018). Dessa forma, são um dos mais importantes micro-organismos no que diz respeito à microbiologia de alimentos e à nutrição humana

devido ao fato de algumas cepas possuírem papel fundamental na produção e preservação de alimentos (RUIZ et al., 2017).

L. rhamnosus é uma das bactérias produtoras de ácido láctico mais bem estudada e comercializada no mundo todo em produtos probióticos (RASINKANGAS et al., 2014). A espécie *L. acidophilus* já é utilizada em alguns alimentos, como queijo e iogurte, e apresenta cepas com efeitos importantes para a saúde humana (XING et al., 2014). Também são apontados por possuir propriedades bactericidas fortes através da produção de bacteriocinas (DUBOURG; ELSAWI; RAOULT, 2015).

Além das espécies de *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*, cepas de *L. reuteri*, e *L. casei* também vêm sendo amplamente isoladas e caracterizadas, já que são comumente utilizadas na preparação de probióticos (DUBOURG; ELSAWI; RAOULT, 2015). Sua ação também parece promissora no tratamento de infecções orais, intestinais e vaginais tanto em ensaios clínicos quanto em estudos *in vitro* (VUOTTO; LONGO; DONELLI, 2014).

Aween et al. (2012) determinaram o efeito bacteriostático e bactericida de células e do sobrenadante de *L. acidophilus*, isolados de amostras de mel, contra bactérias multirresistentes a antibióticos, especialmente *Staphylococcus aureus*. Além disso, esses isolados são capazes de produzir metabólitos resistentes ao calor, ação de enzimas proteolíticas e ajustes no pH.

2.5 Interação entre *Escherichia coli* e *Lactobacillus*

Patógenos como a *Escherichia coli* são capazes de colonizar o mesmo compartimento intestinal (epitélio do cólon) que os *Lactobacillus*. Assim, há ocorrência de interações entre esses micro-organismos no sentido de inativar a ação patogênica, a partir da inibição da sua adesão e invasão, neutralização de toxinas e competição por recursos limitados (OELSCHLAEGGER, 2010). O efeito inibitório também é atribuído à produção de substâncias características do metabolismo destes micro-organismos, como os ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (FIJAN, 2014; DAVOODABADI et al., 2015; CUI et al., 2017; ABDELHAMID; ESAAM; HAZAA 2018).

Apesar de o ácido láctico ser considerado um ácido fraco, destaca-se seu potencial bactericida contra inúmeros patógenos, especialmente em condições em que haja limitação de nutrientes (CADIEUX et al., 2009). Nessas condições, ácidos na forma não dissociada penetram no citoplasma, onde então se dissociam e diminuem o pH intracelular, interferindo negativamente nos processos metabólicos celulares (DE KEERSMAECKER et al., 2006).

Além disso, o ácido láctico é capaz de aumentar a permeabilidade da membrana externa de organismos Gram-negativos e comprometer sua integridade, potencializando a ação sinérgica de outras substâncias antimicrobianas como as bacteriocinas (CADIEUX et al., 2009).

O peróxido de hidrogênio produzido por muitas cepas de *Lactobacillus* também é capaz de induzir estresses na membrana externa de algumas Gram-negativas, como a *Escherichia coli* uropatogênica, que afeta a estrutura das fímbrias e dificulta sua capacidade de adesão celular (CADIEUX et al., 2009).

Além da utilização de espécies isoladas, coquetéis contendo diferentes cepas combinadas também demonstraram ser cada vez mais úteis no tratamento de algumas dessas doenças (VUOTTO; LONGO; DONELLI, 2014). Halder e Mandal (2016) comprovaram que *Lactobacillus* de diferentes espécies, isoladamente, demonstraram excelente inibição no crescimento de enterobactérias como *E. coli* e *K. pneumoniae*. Além disso, quando testados de forma associada a diferentes cepas desse mesmo gênero, apresentaram efeito sinérgico contra *E. coli* quando combinados.

Vale ressaltar que a capacidade bactericida exercida por produtos dessas bactérias sobre células planctônicas, não necessariamente predizem uma ação antibiofilme. Entretanto, considerando também a crescente habilidade dos patógenos em gerar infecções persistentes relacionadas à formação dos biofilmes, a administração de probióticos também apresenta-se capaz de modular e/ou prevenir o acúmulo de micro-organismos invasores, devendo assim, ser melhor investigada (VUOTTO; LONGO; DONELLI, 2014).

2.5.1 Estratégias antibiofilme

A tendência em promoção de saúde através de meios naturais conduz a um interesse em agentes antibiofilmes não químicos, incluindo derivados de bactérias, capazes de reduzir a biomassa bacteriana através de modificações na sua formação, integridade e/ou qualidade (VUOTTO; LONGO; DONELLI, 2014; MIQUEL et al., 2016;). São verificados dois mecanismos capazes de modular a formação dessas comunidades: inibição da aderência bacteriana à superfície ou desestabilização de biofilmes maduros aderidos irreversivelmente (MIQUEL et al., 2016). Nesse contexto, os probióticos são capazes de modificar a composição da matriz exopolimérica, afetar a adesão primária e/ou a maturação de biofilmes através de exclusão/competição, ou ainda desencadear a dispersão (GUTIERREZ et al., 2016; MIQUEL et al., 2016).

Osama et al. (2017) comprovaram ação antimicrobiana e antibiofilme de cepas de *L. rhamnosus* e *L. gasseri* contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, três patógenos comumente envolvidos em infecções causadas por biofilmes. Entretanto, pesquisas envolvendo a utilização de probióticos como estratégia contra biofilmes formados por patógenos intestinais vêm apresentando diferentes resultados a depender da espécie bacteriana envolvida (VUOTTO; LONGO; DONELLI, 2014). Alguns autores apontam a capacidade de inibição da formação, enquanto outros estudos reportam aumento da biomassa dos mesmos (MIYAZAKI et al., 2010; VILELA et al., 2015).

O efeito anti-adesão é resultado de uma competição entre patógenos e probióticos por um mesmo receptor, estabelecimento de biofilmes, produção de receptores análogos e indução de mucina (OELSCHLAEGER, 2010). Algumas BALs também são capazes de produzir biossurfactantes que atuam na prevenção da primeira etapa de formação dos biofilmes por micro-organismos invasores, ao modificar as propriedades da superfície celular ou serem adsorvidos por superfícies sólidas, impedindo a adesão bacteriana (GOMEZ et al., 2016; SHARMAN; SAHARAN, 2016).

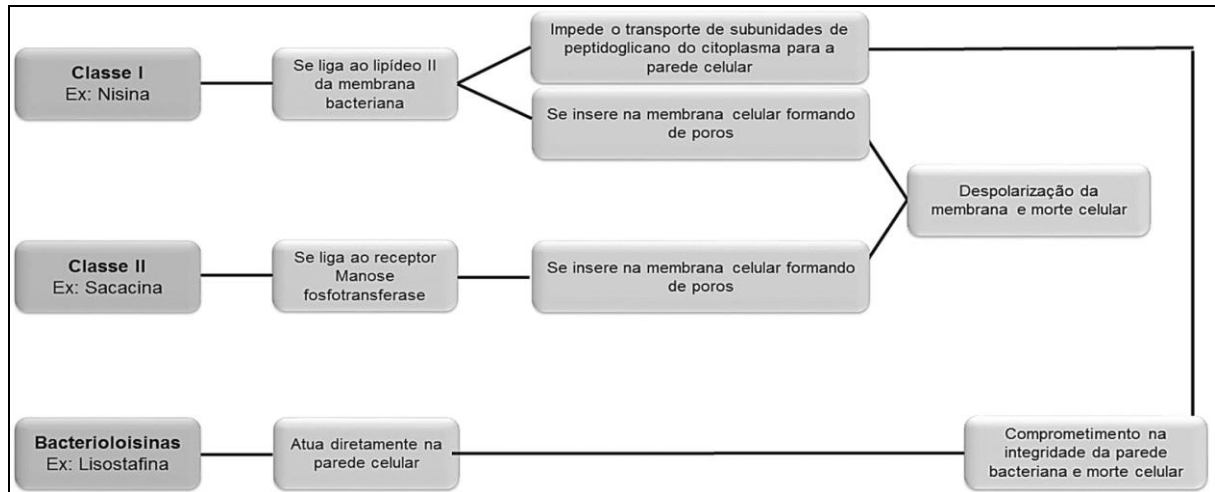
Entre as substâncias produzidas com ação antibiofilme, cita-se também as bacteriocinas. São proteínas ribossomicamente sintetizadas de interesse clínico e farmacêutico e com aplicabilidade como bioconservantes de alimentos, pois apresentam espectro de ação contra micro-organismos que deterioram alimentos ou causam infecções via alimento, entre eles a *E. coli* (ZACHAROF; LOVVIT, 2012; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015).

A maior parte das bacteriocinas secretadas por *Lactobacillus* são pertencentes a classe II, estáveis ao calor, cujo efeito está relacionado com a desestabilização da membrana lipídica a partir da formação de poros e extravasamento do conteúdo plasmático e consequente morte celular (PAIXÃO, 2015). Dessa forma, *Lactobacillus* produtores desse tipo de peptídeos previnem que cepas patogênicas venham a invadir o cólon intestinal, mantendo o equilíbrio da microbiota (GÓMEZ et al., 2016).

A nisina, um peptídeo antimicrobiano natural, é o lantibiótico mais conhecido e amplamente estudado, sendo a primeira bacteriocina autorizada a ser utilizada pela indústria de alimentos para fins de preservação (GÁLVEZ et al., 2007). A reuterina, produzida por algumas estirpes de *L. reuteri*, apresentou efeito bactericida sobre biofilmes de *E. coli* após 30 segundos de exposição (EL-ZINEY; JAKOBSEN, 2009). Jeon et al. (2011) também relataram o efeito inibitório de bacteriocinas produzidas por *L. rhamnosus* na biossíntese de EPS por bactérias patogênicas.

Ogaki, Furlaneto e Maia (2015) ao realizar revisão de literatura sobre os aspectos gerais das bacteriocinas, resumem o mecanismo de ação na Figura 2 a seguir.

Figura 2 - Mecanismos de ação de bacteriocinas produzidas por bactérias produtoras de ácido láctico.



Fonte: Ogaki; Furlaneto; Maria, 2015.

Entretanto, trata-se de um diverso grupo de proteínas/peptídeos antimicrobianos e, portanto, é esperado que esses resultados se apresentem de maneiras diferentes à medida que os patógenos alvo sejam alterados, assim como as condições ambientais consideradas (GÁLVEZ et al., 2007).

Já é reconhecido que a ação antimicrobiana desses compostos é potencializada em condições ácidas, o que destaca a importância dos ácidos orgânicos que também são secretados pelas BALs (GÁLVEZ et al., 2010). Gomez et al. (2016) ao analisarem abordagens alternativas no combate ao biofilme em indústrias alimentícias, concluíram que os possíveis efeitos de cepas de BALs estão relacionados com uma combinação de fatores como a produção de bacteriocinas, biossurfactantes e a mecanismos que utilizam o princípio de exclusão, no qual a proliferação de patógenos sobre uma superfície é impedida pelo fato de já estar colonizada por probióticos.

A produção de bacteriocinas é controlada de acordo com a densidade populacional e QS. Assim, com a percepção de seu próprio crescimento, que provavelmente é comparável ao de espécies relacionadas, a produção será estimulada em momentos em que a competição por nutriente possivelmente se tornará mais grave (LEBEER; VANDERLEYDEN; DE KEERSMAECKER, 2008).

As bactérias utilizam o QS para coordenar sua expressão gênica e permitir a produção de fatores de virulência que desencadeiam as infecções (LIXA et al., 2015). Assim,

o controle desse processo se tornou um dos objetivos no desenvolvimento de novas estratégias para tratamento de infecções por biofilmes bacterianos (WU et al., 2015)

Através do QS as bactérias tendem a produzir sinais químicos chamados autoindutores (AIs) que, ao se difundir no meio e atingir concentrações críticas, são internalizados e induzem a expressão de genes que alteram o metabolismo celular (LIXA et al., 2015). Várias enterobactérias são reconhecidas por produzir e/ou responder a esses AIs de forma que possam expressar seus fatores de virulência e possam vir a ter sucesso na colonização e consequente estabelecimento de infecções intestinais. Portanto, a inibição desses indutores pode atenuar a virulência dessas bactérias (MENDELLIN-PEÑA; GRIFFITHS, 2009).

A utilização de probióticos surge como estratégia para combate desses patógenos, já que produzem pequenas moléculas biologicamente ativas capazes de interferir nessa comunicação celular e, assim, ocupar seu nicho. Mendellin-Peña e Griffiths (2009) demonstraram que a cepa de *L. acidophilus* La-5 foi capaz de modificar a virulência de *E. coli* enterohemorrágica *in vitro* e *in vivo*, devido a secreção de moléculas de baixo peso molecular que se ligam a autoindutores (AI-2 ou AI-3) que alteraram o sistema QS.

Entretanto, a utilização de probióticos com fins antimicrobianos deve ainda ser melhor elucidada. Em estudo realizado por Miyazaki et al. (2010), foram testadas diferentes espécies bacterianas contra *E. coli* enteroagregativa e verificado que a adesão desse patógeno ao epitélio intestinal não foi inibida por nenhuma das cepas. Além disso, cepas de *L. casei* aumentaram a capacidade de formação de biofilme pela *E. coli*, contribuindo com a proliferação bacteriana. Os diferentes resultados obtidos pelas pesquisas que avaliam a ação antibiofilme de *Lactobacillus* probióticos sugerem que os efeitos desejáveis são específicos para cada cepa e não devem ser extrapolados nem mesmo entre cepas de uma mesma espécie (VUOTTO; LONGO; DONELLI, 2014; OSAMA et al., 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme do sobrenadante de cepas de *Lactobacillus cell-free* sobre isolados de *Escherichia coli* multirresistentes.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana das cepas *E. coli* isoladas, por meio de sistema automatizado;
- Determinar a atividade antagônica das cepas de *Lactobacillus* sobre o crescimento de *E. coli*, *in vitro*;
- Analisar a atividade antimicrobiana por microdiluição do sobrenadante de *Lactobacillus* durante o crescimento planctônico de cepas de *E. coli* isoladas (estabelecimento de CIM e CBM);
- Verificar o efeito do sobrenadante de *Lactobacillus* sobre as propriedades de formação de biomassa de biofilme pelas cepas de *E. coli* isoladas.

4 METODOLOGIA

4.1 Micro-organismos

Foram utilizadas nesse estudo quatro cepas de *Escherichia coli* previamente isoladas de 5 amostras de pescado (*Oreochromis niloticus*) obtidas a partir de uma única coleta no comércio varejista da cidade de Sobral – CE, cedidas pelo o Núcleo de Bioprospecção e Experimentação Molecular Aplicada - NUBEM do Centro Universitário INTA (ALMEIDA et al., 2017). Os isolados foram identificados como P12, P25, P35 e P36.

As espécies *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 e *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595, ambas isoladas de fezes humanas, foram gentilmente cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro – Brasil. Para fins de comparação também foi utilizada uma cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus* LA 14 comercializada em cápsulas (PROLIVE®, ACHÉ).

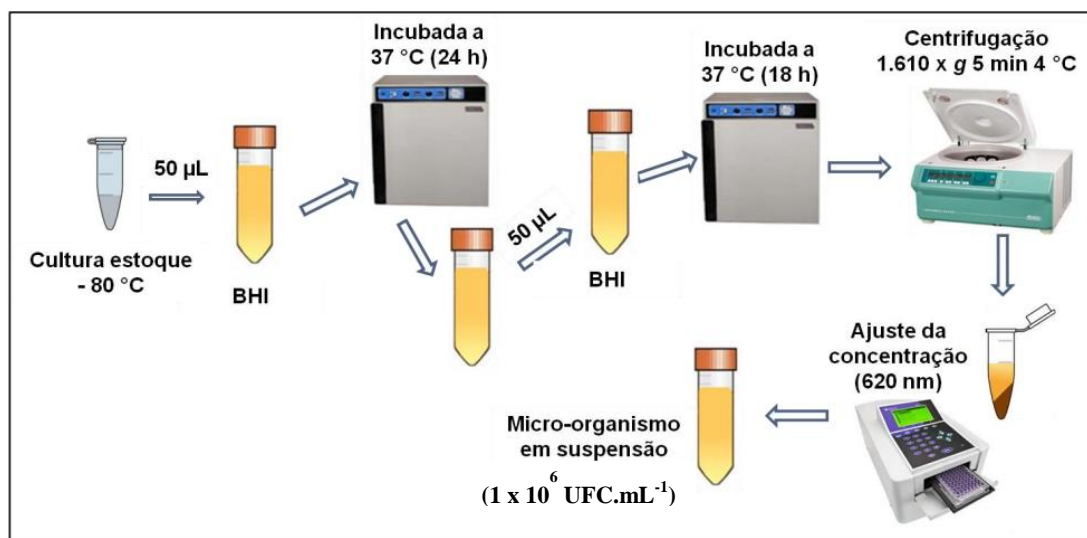
4.2 Condições de cultivo

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biofilmes e Antimicrobianos, localizado na Universidade Federal do Ceará, no campus de Sobral. As cepas de *E. coli* foram armazenadas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI; M210-500 g, Himedia, Mumbai, Índia) em alíquotas de 200 µL com 20% de glicerol a -80 °C. Para a ativação das cepas, uma alíquota inicial de 50 µL foi inoculada em 5 mL de meio BHI caldo estéril e incubada por 24 h a 37° C. Após esta ativação inicial, a cultura foi renovada inoculando-se uma alíquota de 50 µL em 5 mL de meio BHI caldo estéril, mantendo as mesmas condições de cultivo por 18 horas.

As células bacterianas na fase tardia de crescimento exponencial foram colhidas por centrifugação (VS-15000CFNII, Vision, Coreia) a 5000 rpm, durante 5 minutos, a 4 °C, e ressuspensas em meio de cultura BHI caldo estéril. A densidade óptica (DO) foi verificada com o auxílio de um leitor de placas de microtitulação (BioTrak II, Amersham Biosciences, Reino Unido) a 620 nm, e a partir desta, realizado o ajuste da concentração para 1×10^6 UFC.mL⁻¹, de acordo com a escala 0,5 de Mcfarland (FIGURA 3).

As espécies de *Lactobacillus* passaram pelo mesmo processo, porém foram cultivadas em caldo *de Man, Rogosa and Sharpe* (MRS; 500 g, Acumedia, Michigan, Estados Unidos) e incubadas anaerobicamente (5% CO₂).

Figura 3 – Representação esquemática das condições de cultivo e do procedimento de ajuste da concentração do inóculo bacteriano para a realização dos ensaios biológicos.



BHI: Meio *Brain Heart Infusion*. UFC. mL⁻¹: Unidades Formadoras de Colônia por mL. Fonte: Oliveira (2014).

4.3 Teste de Sensibilidade Antimicrobiana

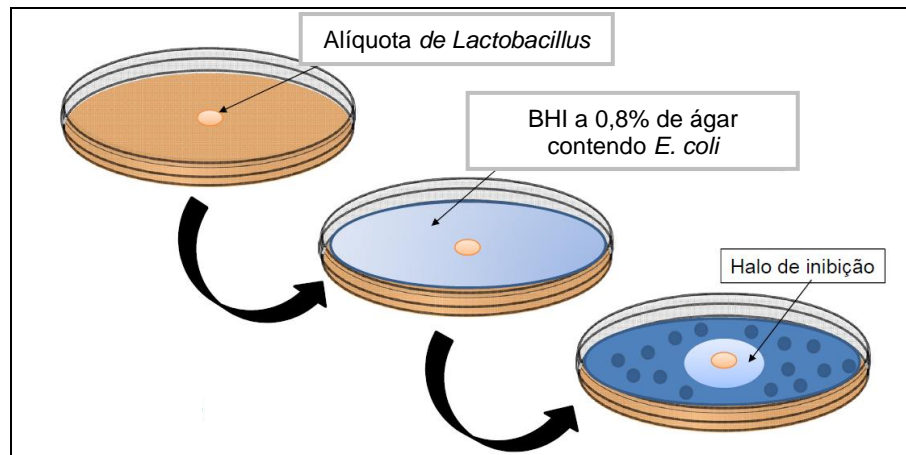
Os isolados bacterianos das cepas de *E. coli* foram submetidos ao teste de sensibilidade antibiótica pelo sistema automatizado VITEK®2 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, França), realizado na Santa Casa de Misericórdia de Sobral. O teste é baseado na técnica da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Cada cartão apresenta 64 micropoços, sendo um poço controle, que contém apenas meio de cultura, e os demais com quantidades conhecidas de um antimicrobiano específico combinado com um meio de cultura. No fim do ciclo de incubação, os valores de CIM são determinados para cada antimicrobiano contido no cartão e as amostras foram classificadas como: sensível (S), intermediariamente resistente (I) ou resistente (R).

4.4 Teste de Antagonismo - *Spot Overlay*

Para uma avaliação inicial da atividade antagônica das cepas de *Lactobacillus* contra os isolados de *E. coli* foi conduzida a técnica de *Spot Overlay* descrita por Chew et al. (2015) com pequenas modificações. A densidade óptica (DO) das culturas de *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. rhamnosus* ATCC 9595 e LA 14 foram verificadas a 620 nm, e a partir desta, realizado o ajuste da concentração para 1x10⁶ UFC.mL⁻¹. Posteriormente, 5 µL da suspensão bacteriana foram inoculados na parte central da placa MRS ágar, seguido de incubação

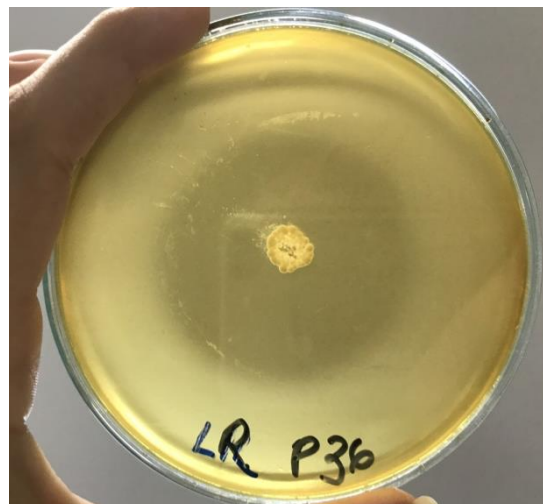
anaeróbica (5% CO₂) por 48 horas a 37°C. Em seguida, as placas contendo as colônias de *Lactobacillus* foram sobrepostas com as cepas de *Escherichia coli* suspensas em 15 mL de BHI ágar (0,8% ágar) numa concentração de 1×10^7 UFC.mL⁻¹ e reincubadas por mais 24 horas à 37°C (FIGURA 4 e 5).

Figura 4 - Representação esquemática da metodologia utilizada para determinar a atividade antagonista das cepas de *Lactobacillus* contra isolados de *Escherichia coli*.



BHI: Meio *Brain Heart Infusion*. Fonte: Próprio autor (2019).

Figura 5 – Exemplo da placa de Petri após o teste de antagonismo, com delimitação do halo de inibição de crescimento de *Escherichia coli* exercido pela cepa de *Lactobacillus*.



Fonte: Próprio autor (2019).

Para interpretação dos resultados, foi medido o diâmetro das zonas de inibição de crescimento de *E. coli* circundando as colônias de *Lactobacillus* após as 24 horas de incubação. A inibição de crescimento foi expressa como a medida dos halos de inibição em mm (R), utilizando a fórmula sugerida por Halder e Mandal (2016):

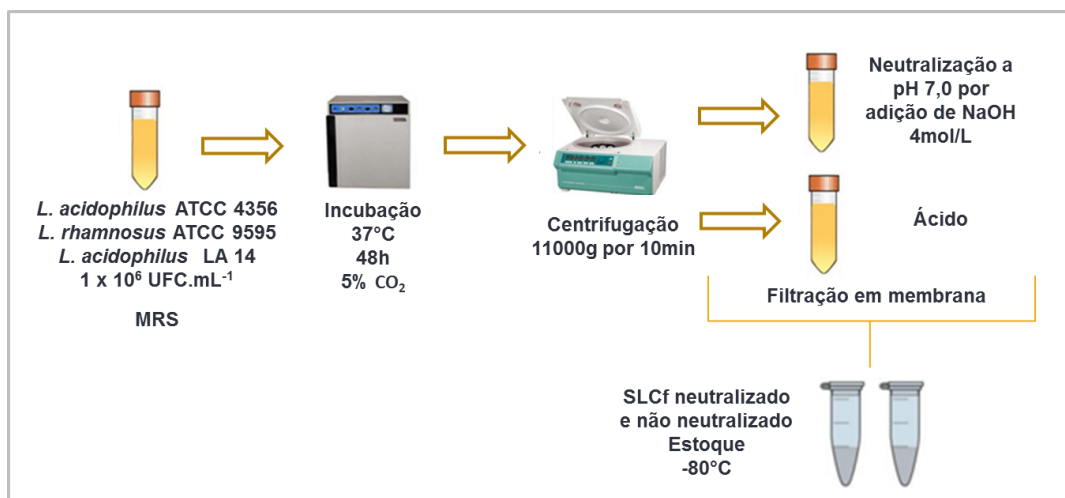
$$R = \frac{(dinib - dspot)}{2}$$

Onde ‘*dinib*’ representa o diâmetro da zona sem crescimento que circunda o “*spot*” e ‘*dspot*’ denota o diâmetro da zona de crescimento do *Lactobacillus*. Os escores de inibição foram considerados como: sem capacidade de inibição com $R < 2$ mm; baixa capacidade de inibição com $R = 2-5$ mm; e alta capacidade de inibição com $R > 6$ mm (HALDER; MANDAL, 2016).

4.5 Preparo do sobrenadante de *Lactobacillus cell-free* - SLCf

A fim de avaliar os efeitos dos *Lactobacillus* sobre as propriedades de formação de biofilme, foi utilizado apenas o SLCf. Para o preparo do sobrenadante foi seguida metodologia proposta por Chew (2015). Culturas primárias de *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. rhamnosus* ATCC 9595 e LA 14 foram ajustadas a uma concentração de 1×10^6 UFC.mL⁻¹, em caldo MRS. Em seguida, 1 ml de cultura foi adicionada a 10 mL de MRS caldo e incubado anaerobicamente (5% CO₂) por 48 h a 37 °C. O sobrenadante foi coletado após centrifugação a 11000 g por 10 minutos e esterilizado por meio de filtração em membrana millipore (0,22 µm). O SLCf obtido foi armazenado em alíquotas de 1 mL a -80 °C. Para determinar o efeito do pH na atividade inibitória contra *E. coli*, o mesmo foi neutralizado a pH 7,0 por adição de NaOH a 4 N antes da etapa de filtração (FIGURA 6).

Figura 6 - Representação esquemática da metodologia utilizada para preparo do sobrenadante de *Lactobacillus cell-free*.



MRS: Meio de Man Rogosa, Sharpe. SLCf: Sobrenadante de *Lactobacillus cell-free*. Fonte: Próprio autor (2019).

4.6 Estabelecimento da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do SLCf

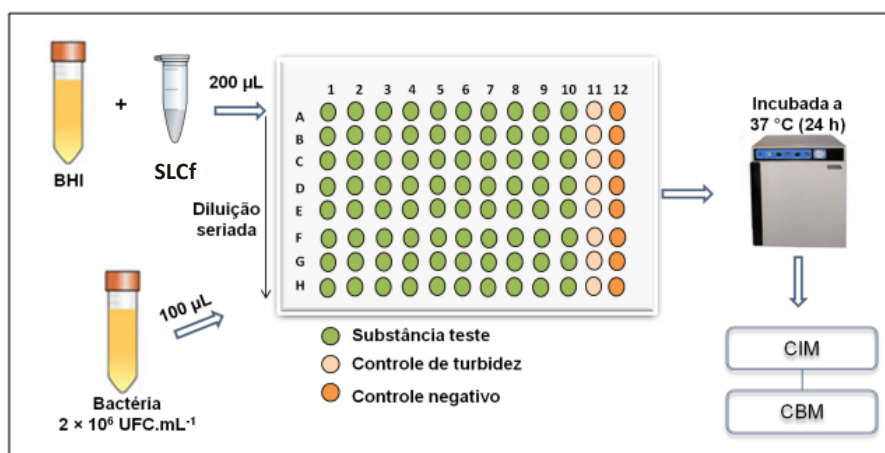
A atividade antimicrobiana do SLCf foi verificada através de testes de microdiluição padronizada pelo CLSI (2015), utilizando placa de microtitulação de 96 poços. Foram adicionados os SLCf diluídos em 100 μL de caldo BHI, a fim de obter uma concentração de 50%. Posteriormente, foi procedida diluição seriada na base dois para obtenção das concentrações de 25, 12,5 e 6,25% de cada SLCf.

Em seguida, foram adicionados à placa 100 μL de suspensão bacteriana previamente ajustada como descrito no item 4.2 a uma concentração de 2×10^6 UFC.mL⁻¹, obtendo-se um volume final de 200 μL e concentração bacteriana de 1×10^6 UFC.mL⁻¹. Para o controle de crescimento bacteriano foram utilizados 100 μL do inoculo e 100 μL de meio BHI caldo estéril e para o controle de turbidez 100 μL do PBS e 100 μL de meio BHI caldo estéril.

As placas foram incubadas por 24h a 37° C em condições aeróbicas para a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) e das concentrações bactericidas mínimas (CBM) de cada sobrenadante testado. Foi considerada CIM, a menor concentração da substância capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano após 24h de incubação.

Para a determinação da CBM uma alíquota de 10 μL foi retirada dos poços em que não se verificou o crescimento bacteriano visível e inoculado em placas de Petri contendo meio BHI ágar e incubado por 24h a 37° C em condições aeróbicas. Após o tempo de incubação as placas foram analisadas e considerada como CBM a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano sobre a superfície de ágar (FIGURA 7).

Figura 7 - Representação esquemática da metodologia utilizada para determinar as concentrações inibitórias e bactericidas mínimas de sobrenadante de *Lactobacillus cell-free* contra isolados de *Escherichia coli*, segundo teste de microdiluição padronizado pelo CLSI.

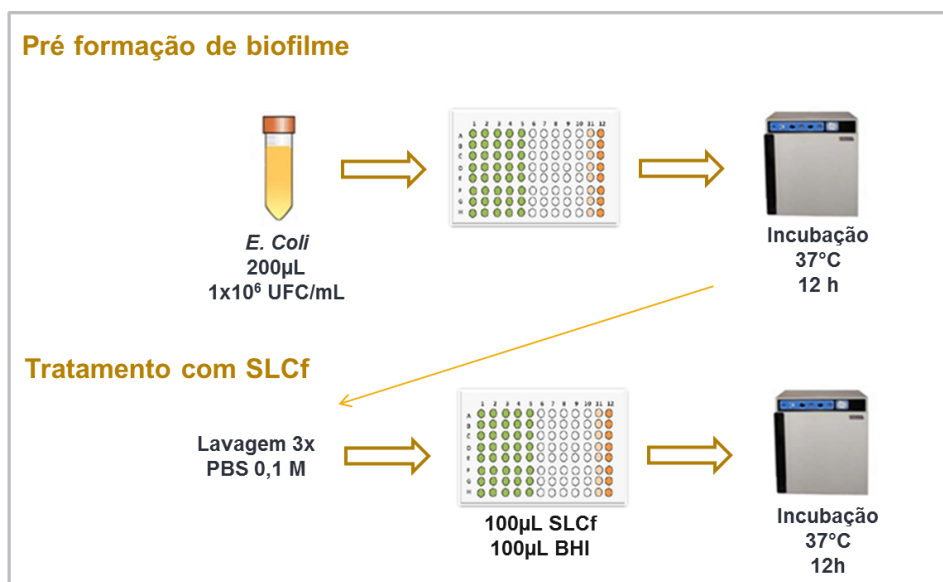


BHI: Meio *Brain Heart Infusion*. SLCf: Sobrenadante de *Lactobacillus cell-free*. UFC. mL⁻¹: Unidades Formadoras de Colônia por mL. CIM: Concentração Inibitória Mínima. CBM: Concentração Bactericida Mínima. Fonte: Oliveira (2014).

4.7 Atividade antibiofilme do SLCf

Para avaliar o efeito do SLCf sobre o biofilme pré-formado dos isolados de *E. coli*, foram utilizadas placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato. Foram adicionados 200 µL do inóculo bacteriano ajustado a uma concentração de 1×10^6 UFC.mL⁻¹ em cada poço e incubados por 12 horas a 37 °C. Para o controle de crescimento bacteriano nos grupos sem tratamento foi utilizado PBS ao invés de SLCf. Após esse período para formação do biofilme, os poços foram lavados com Tampão Fosfato-Salino (PBS) 0,05 M estéril com pH 7,4 para retiradas das células planctônicas. Posteriormente, foram adicionados 200 µL de SLCf a 50%, preparado com meio BHI e as placas foram incubadas por mais 12h a 37° C (FIGURA 8).

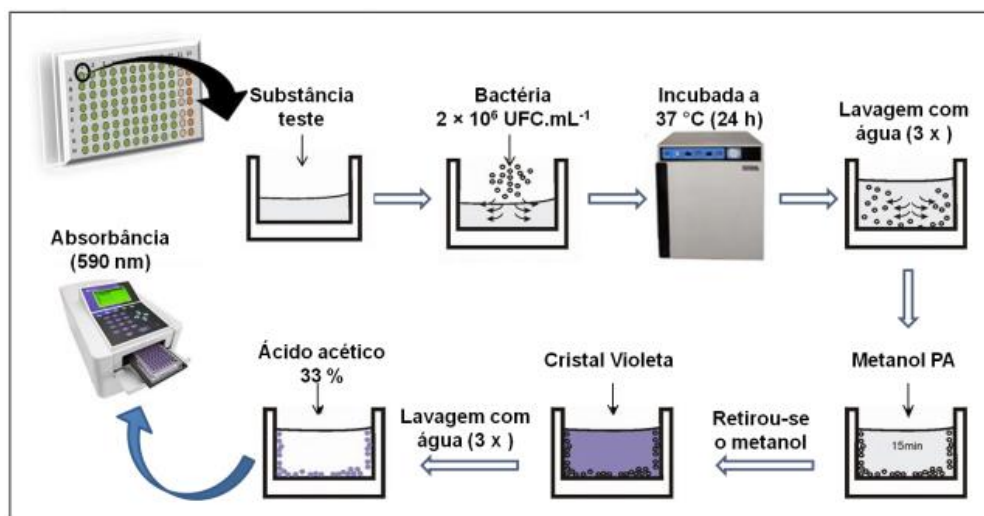
Figura 8 - Representação esquemática da metodologia utilizada para determinar a atividade antibiofilme do sonadante de *Lactobacillus cell-free* contra isolados de *Escherichia coli*, com pré-formação de biofilme por 12 horas, seguido de tratamento com sobrenadante por 12 horas.



UFC. mL⁻¹: Unidades Formadoras de Colônia por mL. PBS: Tampão Fosfato Salina. BHI: Meio *Brain Heart Infusion*. SLCf: Sobrenadante de *Lactobacillus cell-free*. Fonte: Próprio autor (2019).

Para quantificação da biomassa residual após os tratamentos, as placas foram submetidas à análise de quantificação de biomassa por meio da técnica de coloração por Cristal Violeta (O'TOOLE, 2011), conforme descrito na Figura 9.

Figura 9 - Representação esquemática da metodologia de quantificação do biofilme em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato.



Fonte: Oliveira (2014).

A partir da leitura da D.O., os isolados sem interferência do SLCf foram classificados quanto a sua capacidade de produzir biofilmes como: fracos ($0.208 < D.O. \leq 0.416$); moderados ($0.416 < D.O. \leq 0.832$) e fortes ($D.O. > 0.832$) (SCHIEBEL et al., 2017).

Para avaliação do potencial antibiofilme também foi realizado cálculo do percentual de inibição proposto por Abdelhamid, Esaam e Hazaa (2018), descrita abaixo:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - ((D.O. \text{ do poço de controle positivo} / D.O. \text{ do poço com SLCf}) \times 100)$$

4.8 Análise estatística

Trata-se de um estudo quantitativo experimental. Todos os experimentos foram realizados em triplicata com os respectivos valores médios dos resultados organizados em Microsoft Excel (Versão 2012 para Windows) e posteriormente analisadas no *software* GraphPad Prism (Versão 5.0 para Windows, San Diego, California USA). A comparação dos dados quantitativos entre os grupos foi verificada através da aplicação do teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. Quando comparadas duas variáveis, foi aplicado Two-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,01$ em ambos os testes.

5 RESULTADOS

5.1 Teste de sensibilidade antimicrobiana

Os resultados apresentam os perfis de susceptibilidade dos isolados de *E. coli* para alguns antibióticos, com base nos testes realizados pelo sistema automatizado Vitek®2. Observou-se que a maioria dos antibióticos testados possui ação sobre o crescimento planctônico das amostras (QUADRO 2).

Quadro 2: Resultado do teste de sensibilidade a antimicrobianos das cepas isoladas de *Escherichia coli*, por meio do sistema VITEK 2.

Classe	Antibacteriano	P12	P25	P35	P36
Penicilinas	Amoxicilina/Ác. Clavulânico	I	I	S	I
	Ampicilina	R	R	R	R
	Piperaciclina/Tazobactam	S	S	S	S
Cefalosporinas	Cefalotina	R	I	I	I
	Cefepima	S	S	S	S
	Ceftriaxona	S	S	S	S
	Cefuroxima	S	S	S	S
	Cefuroxima axetil	S	S	S	S
Carbapenêmicos	Ertapenem	S	S	S	S
	Meropenem	S	S	S	S
Quinolonas	Ciprofloxacina	R	S	S	S
	Norfloxacina	R	S	S	S
	Ácido Nalidíxico	R	S	S	S
Aminoglicosídeo	Amicacina	S	S	S	S
	Gentamicina	S	S	S	S
Sulfonamidas	Trimetoprim/Sulfametoxazol	S	S	S	S
Nitroimidazólicos	Nitrofurantoína	S	S	S	S

Fonte: Próprio autor (2019). (S) Sensível, (I) Intermediariamente resistente, (R) Resistente.

Entretanto, os isolados estudados revelaram-se como resistentes ou intermediariamente resistentes a mais de um agente antibacteriano testado *in vitro*. Todas as cepas apresentaram-se resistentes a ampicilina. Também foram obtidos resultados de resistência ou resistência intermediária contra amoxicilina/ácido clavulânico e cefalotina.

5.2 Teste de Antagonismo

A técnica de *overlay* é sugerida como método rápido para testes de *screening* da

atividade antimicrobiana de espécies de *Lactobacillus* contra diversos micro-organismos indicadores. A partir da interpretação dos escores de inibição apresentados na Tabela 1, o teste não revelou variações com diferenças significativas na atividade antimicrobiana dos três probióticos testados. Entretanto, todas foram consideradas com alta capacidade de inibição, com $R > 6$ mm (HALDER; MANDAL, 2016).

Tabela 1: Resultados obtidos no teste de antagonismo das cepas de LA 14 comercial, *L. acidophilus* ATCC 4356 e *L. rhamnosus* ATCC 9595 sobre isolados de *Escherichia coli*.

Amostra	Escore de inibição (R)		
	LA 14	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595
P12	18,25 ($\pm 2,96$)	16,42 ($\pm 2,78$)	16,13 ($\pm 2,21$)
P25	16,90 ($\pm 3,97$)	15,60 ($\pm 2,97$)	16,38 ($\pm 3,20$)
P35	19,40 ($\pm 2,38$)	17,20 ($\pm 4,31$)	18,75 ($\pm 3,13$)
P36	19,40 ($\pm 2,38$)	19,25 ($\pm 0,88$)	18,67 ($\pm 2,46$)

Fonte: Próprio autor (2019).

R= Valores representativos da média aritmética \pm desvio padrão das zonas de inibição em mm.

5.3 Atividade antimicrobiana do SLCf

A atividade antimicrobiana do SLCf foi avaliada através do método de microdiluição em caldo, utilizando placas de poliestireno de 96 poços preconizada pelo CLSI (2015), que considera CIM a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de impedir o crescimento visível de um micro-organismo em testes de sensibilidade por diluição em caldo ou ágar.

Os resultados obtidos mostraram que o crescimento planctônico das cepas de *E.coli* foi influenciado pela presença de diferentes concentrações dos sobrenadantes, apresentando CIM de 12,5 a 25%, o que demonstra que as cepas utilizadas no presente estudo são susceptíveis a atividade antimicrobiana dos SLCf produzidos (TABELA 2). Ao ser realizado o teste com os sobrenadantes neutralizados não foi observado efeito inibitório em nenhuma das concentrações analisadas.

A atividade bactericida foi analisada através do método de determinação da CBM, a qual é considerada como a menor concentração capaz de erradicar completamente o crescimento microbiano após o tempo de incubação. A menor CBM obtida para os SLCf foi de 25% (TABELA 2).

Tabela 2 – Percentual (%) de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos sobrenadantes *cell-free* obtidos de LA 14 comercial, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* sobre isolados de *Escherichia coli*.

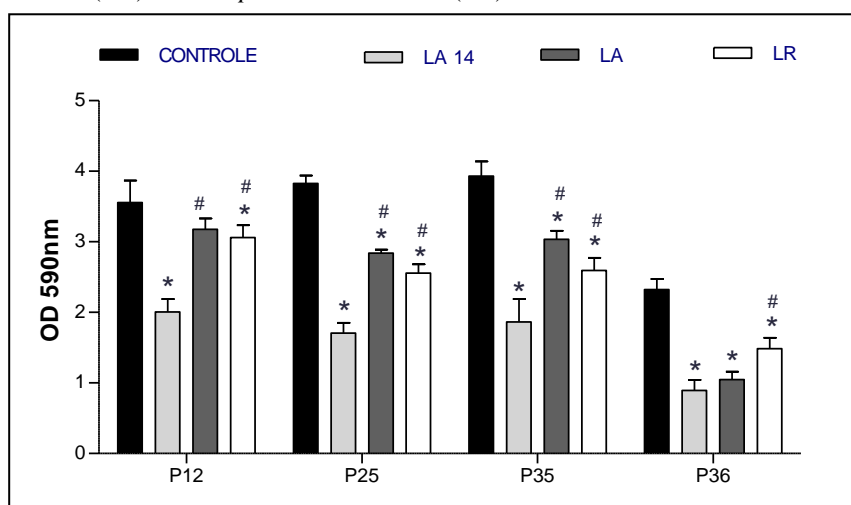
Amostra	CIM/CBM (%SLCf)		
	LA 14	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595
P12	25,00 / 50,00	12,50 / 50,00	12,50 / 50,00
P25	12,50 / 50,00	12,50 / 50,00	12,50 / 50,00
P35	12,50 / 50,00	12,50 / 25,00	12,50 / 25,00
P36	12,50 / 50,00	12,50 / 25,00	25,00 / 25,00

Fonte: Próprio autor (2019).

5.4 Atividade antibiofilme do SLCf

Nos ensaios de atividade antibiofilme foi verificado que a biomassa produzida pelas cepas que não entraram em contato com o SLCf apresentou médias de absorbância entre 1,17 ($\pm 0,198$) e 4,09 ($\pm 0,125$), sendo classificadas como fortes produtores de biofilme (SCHIEBEL et al., 2017). Neste caso, as concentrações capazes de inibir o crescimento planctônico das *E. coli* provavelmente não apresentariam efeitos relevantes na redução da biomassa pré-formada. Portanto, optou-se em utilizar para os tratamentos a concentração de SLCf a 50%, que representa a CBM para a maioria dos isolados (FIGURA 6).

Figura 10 – Quantificação através de coloração por cristal violeta da biomassa do biofilme de isolados de *Escherichia coli* após 12 h de formação, seguida de 12 h tratamento com o sobrenadante *cell-free* produzido por (LC) LA 14 comercial (LA) *L. acidophilus* ATCC 4356 (LR) *L. rhamnosus* ATCC 9595.



Fonte: Próprio autor (2019).

* Efeito estatisticamente relevante do grupo tratado com sobrenadante *cell-free* em relação ao controle não tratado ($p < 0,01$).

Efeito estatisticamente relevante entre os grupos tratados com sobrenadante *cell-free* ($p < 0,01$).

Neste ensaio foi possível verificar que o biofilme formado durante 12h por todas as cepas de *E. coli* foi susceptível à ação pelo menos dois SLCf. Destaca-se que os isolados P25, P35 e P36 apresentaram uma redução significativa no biofilme após o tratamento com os três tipos de SLCf.

Também foi calculado o percentual (%) de inibição da biomassa pré-formada por 12 h, após 12 h de tratamento com os SLCf, conforme fórmula proposta por Abdelhamid, Esaam e Hazaa (2018), cujos resultados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Percentual (%) de Inibição do biofilme pré-formado (12 h) por isolados de *Escherichia coli*, após tratamento com os sobrenadantes *cell-free* obtidos de LA 14 comercial, *L. acidophilus* ATCC 4356 e *L. rhamnosus* ATCC 9595.

Amostra	% Inibição ± D.P.		
	LA 14	<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 9595
P12	49,55 ± 2,64 *	9,77 ± 4,23	25,61 ± 1,86
P25	55,39 ± 3,38 * #	25,78 ± 2,43	33,03 ± 4,19
P35	52,53 ± 5,44 * #	22,57 ± 5,71	33,86 ± 7,18
P36	62,62 ± 4,50 #	53,23 ± 5,73 #	35,75 ± 9,42

Fonte: Próprio autor (2019). D.P.: Desvio padrão das médias de inibição.

* Efeito de inibição estatisticamente relevante em relação à cepa padrão *L. acidophilus* ATCC 4356 (p<0,01).

Efeito de inibição estatisticamente relevante em relação à cepa padrão *L. rhamnosus* ATCC 9595 (p<0,01).

Dessa forma, foi possível verificar que o sobrenadante produzido pela cepa comercial apresentou maiores percentuais de inibição de biofilme de P12, P25 e P35, além de igualar com *L. acidophilus* ATCC 4356 no tratamento de P36, complementando o resultado apresentado na Figura 6.

6 DISCUSSÃO

6.1 Teste de sensibilidade antimicrobiana

Os isolados estudados apresentaram perfil de resistência e a cepa P12 de multirresistência já que não foi susceptível a mais de uma classe de agente antibacteriano (WANG et al., 2017). A resistência à ampicilina evidenciada por todas as cepas é incompatível com o preconizado pelo CLSI (2015), o qual indica a utilização das aminopenicilinas para fins clínicos contra este micro-organismo. O termo “resistente” significa a capacidade de crescimento de uma bactéria *in vitro* na presença da concentração sérica de antibiótico sem produzir toxicidade ao organismo.

Os isolados de *E. coli* também apresentaram resistência ou resistência intermediária contra amoxicilina/ácido clavulânico e cefalotina. Tais antimicrobianos compõem o grupo dos beta-lactâmicos, um dos mais utilizados para combater bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, representando cerca de 60% dos antibióticos utilizados no mundo para o tratamento de doenças infecciosas (ÖZTÜRK; OZKIRIMLI; ÖZGUR, 2015).

Observou-se que mesmo com a combinação da amoxicilina com um inibidor de beta-lactamases (ácido clavulânico), as cepas ainda apresentaram resistência intermediária. Esse inibidor, utilizado associado a penicilinas hidrolisáveis, foram produzidos a fim de combater as enzimas de resistência adquiridas pelos micro-organismos e não possuem ação antimicrobiana, porém tem ação inibidora sobre as beta-lactamases (MOSQUITO et al., 2011).

Os antibióticos beta-lactâmicos interferem na síntese do peptidoglicano, um componente estrutural da parede celular bacteriana (CAG et al., 2016). Entretanto, sabe-se que mais de 60% das cepas de *E. coli* isoladas mundialmente são capazes de produzir beta-lactamases, enzimas capazes de anular a ação desses antibióticos (ÖZTÜRK; OZKIRIMLI; ÖZGUR, 2015). A presença de linhagens resistentes dessa bactéria é preocupante por dificultar o tratamento de doenças em animais e humanos, agravando os quadros clínicos possivelmente curáveis (CERGOLE-NOVELLA; PIGNATARI; GUTH; 2015).

Em relação à classe das quinolonas, observou-se que a amostra P12 foi resistente à ciprofloxacina, norfloxacina e ácido nalidíxico. A partir dos anos 1990, deu-se início a um uso generalizado desses antimicrobianos sintéticos no tratamento de infecções do trato urinário causadas por *E. coli*, havendo assim um aumento progressivo de estirpes resistentes a essa substância (WHO, 2014).

As quinolonas são destacadas pela Organização Mundial de Saúde na lista dos antimicrobianos criticamente importantes para a medicina humana, na qual recomenda-se prudência na utilização desses fármacos (WHO, 2017). A resistência aos antibióticos dessa família pode acarretar em maiores custos ao paciente e ao sistema de saúde, já que os mesmos representam uma das últimas opções de tratamento oral disponíveis (WHO, 2014).

Ryu et al. (2012) analisando isolados de *E. coli* provenientes de peixes frescos comercializados, também detectaram amostras não susceptíveis à ação de 8 antimicrobianos, entre os quais: ampicilina, cefalotina e ácido nalidíxico. Os autores sugerem que esses alimentos podem servir de reservatório para bactérias multirresistentes e facilitam a disseminação de genes de resistência.

Dentre os fármacos discutidos, Kong et al. (2015) destacam que ampicilina e quinolonas são utilizados na primeira linha de tratamento contra infecções causadas por *E. coli* enteroagregativas devido a fácil disponibilidade e baixo custo. O patótipo EAEC é caracterizado por sua habilidade em aderir-se às células humanas, com consequente formação de biofilme e estabelecimento de infecções persistentes (GONÇALVES, 2017).

Ressalta-se ainda que as bactérias do presente estudo foram isoladas de amostras de tilápias adquiridas no comércio varejista, o que causa preocupação pelo seu fácil acesso ao consumidor já que é o peixe mais cultivado no Brasil, cuja produção aumentou em mais de 220% entre os anos de 2005 e 2015 (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2017). Estima-se que a produção da pesca e aquicultura no Brasil deve crescer mais de 100% até o ano de 2025, sinalizando a necessidade de maior atenção à propagação de resistência antibiótica (FAO, 2018). Entretanto, a legislação brasileira relacionada ao uso de antimicrobianos recomendados na aquicultura ainda é incipiente e existem poucas informações sobre o uso e as concentrações dos antibióticos, bem como as formas de administração (ALMEIDA et al., 2017).

Os antibióticos são usados para combater doenças e melhorar a produtividade em sistemas de produção de animais aquáticos (COLELLO et al., 2015). Porém, sabe-se que o uso indiscriminado desses agentes no cultivo de peixe também pode estar relacionado com a incidência de enterobactérias resistentes na população (CHUAH et al., 2016; MONTEIRO et al., 2016). Cepas de *E. coli* resistentes a diferentes famílias de antibióticos vêm sendo isoladas de amostras de peixes. Inclusive, devido à importante comercialização de tilápias no Nordeste do Brasil, estudos conduzidos no Estado do Ceará também chegaram a resultados semelhantes (TEOPHILO et al., 2002; ROCHA et al., 2014).

Entre outros fatores que devem ser mencionados para justificar o elevado número

de cepas resistentes a beta-lactâmicos provenientes de pescado, ressalta-se a constante contaminação de reservatórios d'água por resíduos hospitalares, trazendo riscos adicionais à saúde humana e ao meio ambiente (ALMEIDA et al., 2017). Rocha et al. (2014) relacionam também a manipulação inadequada como um ponto crítico para que peixes comercializados sirvam de reservatórios para disseminação de genes bacterianos que conferem múltipla resistência.

6.2 Teste de Antagonismo

Os testes de antagonismo são bem documentados na literatura a fim de investigar a propriedade antibacteriana de microrganismos benéficos. No *screening* inicial do presente estudo, foi possível detectar que os três probióticos possuíam forte capacidade de inibição do crescimento dos isolados de *E. coli* farmacorresistentes.

A capacidade antagônica do gênero *Lactobacillus* já é bem documentada, corroborando os resultados dessa pesquisa. Uma diferente cepa de *L. rhamnosus* (CSUR P567) já havia demonstrado efeito antagônico sobre isolados clínicos de *E. coli* em estudo realizado por Dubourg, Elsayi, Raoult (2015). Tal resultado foi atribuído à produção de substâncias características do metabolismo destes micro-organismos, como os ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas.

Halder e Mandal (2016), também utilizando o método *overlay* para avaliar a ação de cepas comerciais, entre elas o *L. acidophilus* PBL2B, evidenciaram uma ação de inibição sobre o crescimento de *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Desta forma, concluem sugerindo que a utilização dessa cepa, de forma isolada ou combinada com outros probióticos e até mesmo com antibióticos, seria uma alternativa útil na terapia contra infecções bacterianas em humanos.

Abdelhamid, Esaam e Hazaa (2018) também evidenciaram forte atividade antagônica de *L. acidophilus* EMCC 1324 sobre isolados clínicos de *E. coli* multirresistentes (zonas de inibição ~ 13-17 mm). Ayeni, Ruppitsch e Ayeni (2018) ao realizarem o teste de ágar *overlay*, identificaram ação antagônica de *Lactobacillus* e outras BAL's isolados de iogurtes comerciais sobre *E. coli* entérica EC6 multirresistente, *Shigella* sp. e *Salmonella* sp..

Entretanto, sugere-se que esse potencial seja sempre avaliado, já que também se encontra na literatura pesquisas que não detectaram resultados satisfatórios. Uma cepa selvagem de *L. acidophilus* isolada de amostra comercial de coalhada apresentou um fraco

efeito antagônico contra *E. coli* proveniente de urinocultura ($R= 3,17 \pm 0,29 - 5,13 \pm 0,48$ mm) (HALDER; MANDAL, 2017).

6.3 Atividade antimicrobiana do SLCf

A atividade antimicrobiana é um dos precedentes cruciais para que um probiótico seja considerado eficaz. Em uma recente revisão realizada por Markowiak e Slizewska (2017), foram elencados diversos gêneros de micro-organismos intestinais patogênicos, como *Clostridium*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Yersinia* e *Escherichia*, sensíveis a essas bactérias benéficas. O efeito sobre as enterobactérias é atribuído à produção de substância que tornem o ambiente hostil, como ácidos orgânicos (lático, acético, propiônico, succínico, etc), peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e substâncias antimicrobianas de baixo peso molecular (FIJAN, 2014; DAVOODABADI et al., 2015; CUI et al., 2017; ABDELHAMID; ESAAM; HAZAA 2018).

Em consonância com o presente estudo, Prabhurajeshwar e Chandrakanth (2017) evidenciaram o potencial antimicrobiano do sobrenadante de *Lactobacillus* isolados a partir de produtos lácteos sobre o crescimento planctônico de diferentes cepas enteropatogênicas, dentre elas, *E. coli*.

A cepa de referência *L. acidophilus* ATCC 4356 já havia anteriormente apresentado capacidade competitiva contra enteropatógenos como *C. jejuni* (CAMPANA et al., 2012). Estes mesmos autores indicaram que tal ação estava relacionada à presença de moléculas proteicas, já que o sobrenadante obtido manteve o efeito mesmo após neutralização e aquecimento. Porém, após a adição de tripsina e proteinase K, a atividade inibitória foi reduzida. Sabe-se também que esta bactéria de origem humana possui proteção contra ambientes hostis, desempenhada pela funcionalidade da camada de superfície (*S-layer*), fundamental para o seu estabelecimento no trato gastrointestinal e para o controle no crescimento de bactérias Gram-negativas (CAMPANA et al., 2012).

O *L. rhamnosus* também é uma cepa bastante estudada por suas propriedades probióticas. Delley et al. (2015) referem que entre os plausíveis mecanismos de ação antimicrobiana de *L. rhamnosus* GR-1 contra espécies de *E. coli* uropatogênicas, destacam-se sua capacidade acidogênica e a indução de estresse na membrana externa de bactérias Gram-negativas.

Ao ser realizado o teste com os sobrenadantes neutralizados não foi observado efeito inibitório em nenhuma das concentrações analisadas. Esse resultado pode ser um

indicativo de que a ação antagonica do sobrenadante obtido das cepas de *Lactobacillus* seja devido à produção de ácidos orgânicos, os quais tiveram seu efeito anulado após a adição de NaOH a 4 N. Estudos anteriores já reportaram um mecanismo pH-dependente está diretamente envolvido na ação antimicrobiana de *Lactobacillus* (AWEEN et al., 2012; DAVOODABADI et al., 2015; DELLEY et al., 2015; OSAMA et al., 2017).

6.4 Atividade antibiofilme do SLCf

Dependendo das condições ambientais encontradas, os micro-organismos organizados em biofilmes podem exibir características fenotípicas diferentes, de maneira a resultar em variações de fatores de virulência, moléculas de superfície e até mesmo resistência antimicrobiana (DEAN; BISHOP; VAN HOEK, 2011). Ressalta-se ainda que 80% das infecções bacterianas em humanos estão associadas à presença de biofilmes resistentes a agentes antimicrobianos (ABDELHAMID; ESAAM; HAZAA, 2018).

Dentre as enterobactérias causadoras de doenças infecciosas intestinais, a *E. coli* desempenha sua habilidade de adesão a diferentes superfícies como um de seus reconhecidos fatores de virulência, o que demonstra consonância com os resultados obtidos em que as cepas foram classificadas como fortes produtoras de biofilmes (FIGURA 10). Adicionalmente, os isolados formadores de biofilmes que apresentam resistência antimicrobiana possuem maior facilidade em persistirem no hospedeiro, sendo capaz de desencadear casos de infecções crônicas (CERGOLE-NOVELLA; PIGNATARI; GUTH; 2015).

Ao ser analisada a capacidade de tratamento de biofilmes pré-formados (12 h) com SLCf a 50%, os resultados também foram satisfatórios, já que formação de biofilme pelas cepas de *E. coli* foi interferida pelos três probióticos testados, com exceção de P12 que sofreu interferência de apenas dois (FIGURA 6), com expressivos percentuais de redução (TABELA 3). Para esse ensaio foi utilizada a concentração que representava a CBM para maior parte das cepas testadas, já que a exposição do biofilme a concentrações subinibitórias, além de falhar na sua erradicação, pode aumentar sua formação (BJARNSHOLT et al., 2013).

Destaca-se aqui que os resultados obtidos com o sobrenadante produzido pela cepa LA 14 em conseguir interferir na biomassa produzida por todos os isolados investigados condiz com sua alegação comercial de propriedades probióticas, que pode estar relacionada com a inibição de micro-organismos potencialmente prejudiciais, como a *E. coli*, demonstrado neste estudo. Entretanto, as duas outras cepas testadas também apresentaram potencial antibiofilme e podem representar estratégias terapêuticas alternativas.

O desenvolvimento da biomassa bacteriana é a etapa conclusiva na formação dos biofilmes que pode desencadear resistência à ação de antibióticos, portanto, uma interrupção nessa cascata de formação é um processo complexo e desejável (THAKUR et al., 2016). Nesse mesmo contexto, substâncias capazes de atacar esses aglomerados celulares na etapa de dispersão também se destacam como possibilidades de tratamento de biofilmes resistentes (PETROVA; SAUER, 2016). Dessa forma, a utilização de preparações *cell-free* obtidas a partir de probióticos pode ser efetiva no tratamento de infecções causadas por cepas multirresistentes de *E. coli*, além de também possuir aplicações no âmbito da conservação de alimentos, conforme destacam estudos recentes (ZANFARDINO et al., 2017; ABDELHAMID; ESAAM; HAZAA, 2018).

A indústria alimentícia já sinaliza interesse em investigar a ação protetora de probióticos, a fim de ser utilizada como uma abordagem alternativa de reduzir a formação de biofilmes por bactérias patogênicas. Dessa forma, destaca-se a importância da produção de biosurfactantes capazes de inibir a adesão de competidores em uma mesma superfície, como a *E. coli* O157:H7 (GOMEZ et al., 2016). De forma geral, as atividades antibiofilme desempenhadas por *Lactobacillus* também se deve a outras substâncias inibidoras, como os ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (CUI et al., 2017). No entanto, mecanismos moleculares detalhados do efeito inibitório sobre o biofilme de bactérias patogênicas não foi completamente compreendido e merece mais estudos.

7 CONCLUSÃO

Os isolados de *E. coli* foram identificados como resistentes a pelo menos dois antimicrobianos testados, além de caracterizarem-se por apresentar alto potencial de formação de biofilme. Inicialmente, as cepas probióticas testadas exerceram forte atividade antagônica sobre o crescimento das *E. coli*. Além disso, os sobrenadantes livres de células também exerceram ação bacteriostática e bactericida durante o crescimento planctônico de cepas de *E. coli* isoladas.

Com relação ao efeito antibiofilme, todos os sobrenadantes de *Lactobacillus* desempenharam atividade sobre as propriedades de formação de biomassa pelas cepas de *E. coli* isoladas, com destaque para a cepa comercial LA 14, seguida de *L. rhamnosus* ATCC 9595 e *L. acidophilus* ATCC 4356. Entretanto, todas as preparações *cell-free* obtidas podem representar ferramentas para uma possível superação dos mecanismos de resistência apresentados por isolados *E. coli*.

Em conclusão, ressalta-se que estes resultados poderão servir como futura aplicação biotecnológica para o desenvolvimento de estratégias de controle microbiano mais eficazes, tanto na clínica médica e na bio-preservação de alimentos.

REFERÊNCIAS

- ABDELHAMID, A.G.; ESAAM, A; HAZAA, M.M. Cell free preparations of probiotics exerted antibacterial and antibiofilm activities against multidrug resistant *E. coli*. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, p. 603-607. 2018.
- ALMEIDA, M.V.A; CANGUSSÚ, I.M.; CARVALHO, A.L.S.; BRITO, I.L.P.; COSTA, R.A. Drug resistance, AmpC- β -lactamase and extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae isolated from fish and shrimp. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, p. 1-7. 2017.
- AWEEN, M.M.; HASSAN, Z.; MUHIALDIN, B.J.; ELJAMEL, Y.A.; AL-MABROK, A.S.W.; LANI, M.N. Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from honey marketed in Malaysia against selected multiple antibiotic resistant (MAR) gram-positive bacteria. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 7, p. 364-371. 2012.
- AYENI, A.O.; RUPPITSCH, W.; AYENI, F.A. Characterization of Bacteria in Nigerian Yogurt as Promising Alternative to Antibiotics in Gastrointestinal Infections. **Journal of Dietary Supplements**, p. 1–11. 2018.
- BAPTISTA, M.G.F.M. **Mecanismos de resistência aos antibióticos**. 2013. 51 páginas. Dissertação (Mestrado Integrado em ciências Farmacêuticas). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa. 2013.
- BJARNSHOLT, T; CIOFU, O.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M; HOIBY, N. Applying insights from biofilm biology to drug development — can a new approach be developed? **Nature**, v. 12, p. 791-808. 2013.
- BLANTON, L.V.; WANG, L.T.; HOFFMANN, J.; DUBOW, J.; LAFRANCE, A.; KWAK S.; BOWERS, L.; LEVINE, M.A.; HALE, C.O.; MENEELY, P.M.; OKEKE, I.N. Aggregative adherence and intestinal colonization by enteroaggregative *Escherichia coli* are produced by interactions among multiple surface factors. **mSphere**, v. 3, p. 1-14. 2018.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência a Saúde**. Modulo 6 : Detecção e identificação de bactérias de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2013.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Secretaria de Vigilância em Saúde – Brasília: Anvisa, 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>> Acesso em 02 de Fevereiro de 2018.
- CADIEUX, P.A.; BURTON, J.P.; DEVILLARD, E.; REID, G. *Lactobacillus* by-products inhibit the growth and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 60, p. 13-18. 2009.
- CAG, Y.; CASKURLU, H.; FAN, Y.; CAO, B.; VAHABOGLU, H. Resistance mechanisms. **Annals of Translational Medicine**, v. 4, n. 17, p. 326–326. 2016.

CAMPANA, R.; FEDERICI, S.; CIANDRINI, E.; BAFFONE, W. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 on the growth and adhesion/invasion characteristics of human *Campylobacter jejuni*. **Curr. Microbiol**, v. 64, p. 371-378. 2012.

CAPKIN, E.; TERZIE, E.; ALTINOK, I. Occurrence of antibiotic resistance genes in culturable bacteria isolated from Turkish trout farms and their local aquatic environment. **Diseases of Aquatic Organism**, v.114, n.2, p.127-37. 2015.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Reports of Selected *E. coli* Outbreak Investigations**. 2018. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html>>. Acesso em 27 de Março de 2018.

CERGOLE-NOVELLA, M.C.; PIGNATARI, A.C.C.; GUTH, B.C. Adhesion, biofilm and genotypic characteristics of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 167-171. 2015.

CHEW, S.Y.; CHEAH, Y.K.; SEOW, H.F.; SANDAI, D.; THAN, L.T.L. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 exhibit strong antifungal effects against vulvovaginal candidiasis-causing *Candida glabrata* isolates. **Journal of applied Microbiology**, v. 118, p.1180-1190. 2015.

CHUAH, L.O.; EFFARIZAH, M.E.; GONI, A.M.; RUSUL, G. Antibiotic Application and Emergence of Multiple Antibiotic Resistance (MAR) in Global Catfish Aquaculture. **Current Environmental Health Reports**, v.3, n.2, p.118-27. 2016.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**, Twenty-Fifth Informational Supplement. Document M100-S25. Wayne, PA: CLSI, v. 35, n.3. 2015.

COLELLO, R.; ETCHEVERRÍA, DI CONZA, J.A.; GUTKIND, G.O.; PADOLA, N.L. Antibiotic resistance and integrons in Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p.1-5. 2015.

CUI, X.; SHI, Y.; GU, D.; YAN, X.; CHEN, H.; GE, J. Antibacterial and antibiofilm activity of lactic acid bacteria isolated from traditional artisanal milk cheese from northeast China against enteropathogenic bacteria. **Probiotics & Antimicro Prot**, v. 10, n. 4, p. 601-610. 2017.

DAVOODABADI, A.; DALLAL, M.M.S.; LASHANI, E.; EBRAHIMI, M.T. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from fecal flora of healthy breast-fed infants against diarrheagenic *Escherichia coli*. **Jundishapur J Microbiol**, v. 8, n. 12, p. 1-6. 2015.

DE KEERSMAECKER, S.C.J.; VERHOEVEN, T.L.A.; DSAIR, J.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, J.; NAGY, I. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. **FEMS Microbiol Lett**, v. 259, p. 89-96. 2006.

DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; REFFUVEILLE, F.; FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E.W. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. **Current Opinion in Microbiology**, v.16, p.580-589. 2013.

DE OLIVEIRA, A. C.; DE PAULA, A. O.; ROCHA, R. F. Costs of antimicrobial treatment in patients with infection. **Av Enferm**, v. 33, n. 3, p.351-361. 2015.

DEAN, S. N.; BISHOP, B. M.; VAN HOEK, M. L. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm to Alpha-Helical Peptides: D-enantiomer of LL-37. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1–11. 2011.

DELLEY, M.; BRUTTIN, A.; RICHARD, M.; AFFOLTER, M.; REZZONICO, E.; BRUCK, W.M. *In vitro* activity of commercial probiotic *Lactobacillus* strains against uropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 13, p.1-25. 2015.

DUBOURG, G.; ELSAWI, Z.; RAOULT, D. Assessment of the *in vitro* antimicrobial activity of *Lactobacillus* species for identifying new potential antibiotics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.46, n. 5, p. 590-593. 2015.

EL-ZINEY, M.; JAKOBSEN, M. Effectiveness of reuterin alone and in combination with nisin or other food contact surfaces sanitizers and cleaners for disinfection of stainless steel surfaces contaminated with *Escherichia coli* and *Listeria innocua*. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 7, n. 3-4, p. 145-149, 2009.

ENGELKIRK, P.G.; DUBEN-ENGELKIRK, J.D. **Burton, Microbiologia para ciências da saúde**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 142-159. 2012

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Produção de tilápia no Brasil cresce 223% em dez anos**. 2017. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/21621836/producao-de-tilapia-no-brasil-cresce-223-em-dez-anos>>. Acesso em 27 de Março de 2018.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United States of America. **Guidelines for the evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**, v. 85, p. 1-4. 2001.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United States of America. **Novo relatório da FAO aponta que produção da pesca e aquicultura no Brasil deve crescer mais de 100% até 2025**. 2018. Disponível em: <<http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/423722/>>. Acesso em 27 de Março de 2018.

FIJAN, S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. **Int J Environ Res Public Health**, v. 11, p. 4745-4767. 2014

FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, p. 369—378. 2017.

FRIEDMAN, N. D.; TEMKIN, E.; CARMELI, Y. The negative impact of antibiotic resistance. **Clin Microbiol Infect**. Epub. 2015.

FURUKAWA, S. Studies on formation, control and application of biofilms formed by food related microorganisms. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 79, n. 7, p. 1050-1056. 2015.

- GABLIARDI, A.; TOTINO, V.; CACCIOTTI, F.; IEBBA, V.; NERONI, B.; BONFIGLIO, G.; TRANCASSINI, M.; PASSARIELLO, C.; PANTANELLA, F.; SCHIPPA, S. Rebuilding gut microbiota ecosystem. **Environ Res and Public Health**, v. 15, n. 1679, p. 1-24. 2018.
- GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; OMAR, N.B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 51-70. 2007.
- GÁLVEZ, A.; ABRIOUL, H.; BENOMAR, N.; LUCAS, R. Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 142-148. 2010.
- GÓMEZ, N.C.; RAMIRO, J.M.; QUECAN, B.X.V.; FRANCO, B.D.G.M. Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-15. 2016.
- GUTIÉRREZ, S.; MARTÍNEZ-BLANCO, H.; RODRÍGUEZ-APARICIO, L.B.; FERRERO, M.A. Effect of fermented broth from lactic acid bacteria on pathogenic bacteria proliferation. **J Dairy Sci**, v. 99, p. 1-12. 2016.
- HALDER, D.; MANDAL, S. Antibacterial potentiality of commercially available probiotic Lactobacilli and curd Lactobacilli strains, alone and in combination, against human pathogenic bacteria. **Translational Biomedicine**, v. 7, n. 2, p. 1-7. 2016.
- HALL, C. W.; MAH, T-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 276–301. 2017.
- HANEY, E.F.; TRIMBLE, M.J.; CHENG, J.T.; VALLÉ, Q.; HANCOCK. Critical assessment of methods to quantify biofilm growth and evaluate antibiofilm activity of host defence peptides. **Biomolecules**, v. 8, n. 19, p. 1-22. 2018.
- HENRIQUES, A.; VASCONCELOS, C.; CERCA, N.; A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais – o estado da arte. **Arquivos de Medicina**, v. 7, n. 1, p.27-36. 2013.
- HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G.R.; MERENSTEIN, D.J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R.B.; FLINT, H.J.; SALMINEM, S.; CALDER, P.C.; SANDERS, A.E. The international scientific association for probiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v. 11, p. 506-514. 2014.
- HOIBY, N.; CIOFU, O.; JOHANSEN, H.K.; SONG, Z.; MOSER, C.; JENSEN, P.O.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; TOLKER-NIELSEN, T.; BJARNSHOLT, T. The clinical impact of bacterial biofilm. **Int. J. Oral Sci**, v. 3, p. 55-65. 2011.
- KONG, H.; HONG, X.; LI, X. Current perspectives in pathogenesis and microbial resistance of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, v. 85, n.1, p. 44-49. 2015.
- JEON, J.G.; ROSALEN, P.L.; FALSETTA, M.L.; KOO, H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. **Caries res.**, v. 45, p. 243-263. 2011.

JOO, H. S.; OTTO, M. Molecular basis of *in vivo* biofilm formation by bacterial pathogens. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 12, p. 1503-1513. 2012.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S.C.J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 72, n. 2, p. 728-764. 2008.

LI, H.; GANZLE, M. Some like it hot: heat resistance of *Escherichia coli* in food. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-12. 2017.

LI, X.; YAN, Z.; XU, J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 149, n. 2, p.353-362. 2003.

LIN, J.; NISHINO, K.; ROBERTS, M.C.; TOLMASKY, R.; AMINOV, R.; ZHANG, L. Mechanisms of antibiotic resistance. **Frontier in Microbiol**, v. 6, p. 1-3. 2015.

LIXA, C.; MUJO, A.; ANOBOM, C.D.; PINHEIRO, A.S. A structural perspective on the mechanisms of quorum sensing activation in bacteria **An Acad Bras Cienc**, v. 87, n. 4, p. 2189-2203. 2015.

MARKOWIAK, P.; SLIZEWSKA, K. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. **Nutrients**, v. 9, n. 1021, p. 1-30. 2017.

MARTI, R.; SCHMID, M.; KULLI, S.; SCHNEEBERGER, K.; NASKOVA, J.; KNOCHEL, S.; AHRENS, C.H.; HUMMERJOHANN, J. Biofilm formation potential of heart resistant *Escherichia coli* dairy isolates and complete genome of MDR heat resistant strain FAM21845. **Applied and environmental microbiology**. 2017.

MENDELLIN-PEÑA, M.J.; GRIFFITHS, M.W. Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 colonization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 4, p. 1165-1172. 2009

MIQUEL, S.; LAGRAFEUILLE, R.; SOUWEINE, B.; FORESTIER, C. Anti-biofilm Activity as a Health. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 592, p.1-14. 2016.

MIYAZAKI, Y.; KAMIYA, S.; HANAWA, T.; FUKUDA, M.; KAWAKAMI, H.; TAKAHASHI, H.; YOKOTA, H. Effect of probiotic bacterial strains of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Enterococcus* on enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal Infect Chemother**, v. 16, p. 10-18. 2010.

MONTEIRO, S.H; GARCIA, F.; GOZI, K.S.; ROMERA, D.M.; FRANCISCO, J.G.; MOURA-ANDRADE, G.C.; TORNISIELO, V.L. Relationship between antibiotic residues and occurrence of resistant bacteria in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in cagefarm. **Journal of Environmental Science and Health**. v.5, p.1-7. 2016.

MOSQUITO, S.; RUIZ, J.; BAUER, J.L.; OCHOA, T.J. Mecanismos moleculares de resistência antibiótica em *Escherichia coli* associadas a diarreia. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, v. 28, n.4, p.648-56, 2011.

OELSCHLAEGER, T.A. Mechanisms of probiotic action – A review. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 300, n. 1, p. 57-62. 2010.

OGAKI, M.B.; FURLANETO, M.C.; MAIA, L.F. Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas. **Braz. J. Food Technol.**, v. 18, n. 4, p. 267-276. 2015.

OLIVEIRA, S T. **Uso do peptídeo sintético Lys-a1 no favorecimento da atividade antimicrobiana de ciprofloxacina contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.** 2014. 89 páginas. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Ceará, Sobral, CE. 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE GASTROENTEROLOGIA. **Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia – Probióticos e Prebióticos.** 2017. Disponível em: <<http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-portuguese-2017.pdf>>. Acesso em 05 de Março de 2018.

OPAS. ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente.** 2017. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente&Itemid=812>. Acesso em 02 de Outubro de 2017.

OSAMA, D.M.; ELKHATIB, W.F.; TAWFEIK, A.M.; MOHAMMAD, M. Antimicrobial, Antibiofilm and Immunomodulatory Activities of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus gasseri* against some Bacterial Pathogens. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 6, p.12-21. 2017.

O'NEILL, J. **Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations.** London: Review on Antimicrobial Resistance. 2014. Disponível em: <https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf> Acessado em: 05 de Março 2018.

O'TOOLE, G.A.; Microtiter dish biofilm formation assay. **JoVE**, v. 47. 2011.

OUWEHAND, A.C.; TEN BRUGGENCATE, S.J.M.; SCHONEWILLE, A.J.; ALHONIEMI, E.; FORSSTEN, S.D.; BOVEE-UDENHOVEN, M.J. *Lactobaccillus acidophilus* supplementation in human subjects and their resistance to enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. **British Journal of Nutrition**, v. 111, p. 465-473. 2014.

ÖZTÜRK H.; OZKIRIMLI, E.; ÖZGUR, A. Classification of Beta-Lactamases and Penicillin Binding Proteins Using Ligand-Centric Network Models. **Plos One** v.10, n.2,p.1-23. 2015.

PAIXÃO, L.A.; CASTRO, F.F.S. A colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 14, n. 1, p. 85-96. 2016.

PETROVA, O. E.; SAUER, K. Escaping the biofilm in more than one way: Desorption, detachment or dispersion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 30, p. 67-78. 2016.

POULIN-LAPRADE, D.; CARRARO, N.; BURRUS, V. The extended regulatory networks of SXT/R391 integrative and conjugative elements and IncA/C conjugative plasmids. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p. 1-15. 2015.

PRABHURAJESHWAR, C.; CHANDRAKANTH, R.K. Probiotic potential of Lactobacilli with antagonistic activity against pathogenic strains: an in vitro validation for the production of inhibitory substances. **Biomedical Journal**, v. 40, p. 270-283. 2017.

RASINKANGAS, P.; REUNANEN, J.; DOUILLARD, F.P.; RITARI J.; UOTINEN V.; PALVA A; DE VOS, W. Genomic characterization of non-mucus adherent derivatives of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals genes affecting pilus biogenesis genomic. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 80, n. 22, p. 7001-7009. 2014.

RIBEIRO, F.C. **Influência de Lactobacillus rhamnosus na patogenicidade e na expressão de genes de virulência de Candida albicans: estudo in vitro e in vivo**. 2015. 73f.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2015.

ROCHA, R.S.; LEITE, L.O.; SOUSA, O.V.; VIEIRA, R.H.S.F.V. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from fresh-marketed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Pathogens**, v. 2014, p. 1-5. 2014.

RUIZ, M.J.; COLELLO, R.; PADOLA, N.L.; ETCHEVERRÍA, A.I. Efecto inhibitorio de *Lactobacillus* spp. Sobre bacterias implicadas em enfermidades transmitidas por alimentos. **Rev. Argent. Microbiol.**, v. 49, n.2, p. 174-177. 2017.

RYU, S.; PARK, S.; CHOI, S.; HWANG, Y.; HAM, H.; KIM, S.; LEE, Y.; KIM, M.; PARK, G.; KIM, K.; CHAE, Y. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, p. 14–18. 2012.

SCHIELBEL, J.; BOHM, A.; NITSCHKE, J.; BURDUKIEWICZ, M.; WEINREICH, J.; ALI, A.; ROGGENBUCK, D.; RODIGER, S.; SCHIERACK, P. Genotypic and phenotypic characteristics associated with biofilm formation by human clinical *Escherichia coli* isolates of different pathotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, p. 1-15. 2017.

SHARMAN, D., SAHARAN, B.S. Functional characterization of biomedical potential of biosurfactant produced by *Lactobacillus helveticus*. **Biotechnol. Rep.**, v. 11, p. 27-35. 2016.

SOARES, G.G.; COSTA, F.C.; MELO, F.B.S.; MOLA, R.; BALBINO, T.C.L. Biofilm production and resistance profile of *Enterobacter* sp. Strains isolated from pressure ulcers in Petrolina, Pernambuco, Brazil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 52, n. 5, p.293-298. 2016.

SOUZA, E. S.; BELEI, R. A.; CARRILHO, C. M. D. M.; MATSUO, T.; YAMADA-OGATTA, S. F.; ANDRADE, G.; PERUGINI, M. R. E.; PIERI, F. M.; DESSUNTI, E. M.; KERBAUY, G. Mortalidade e riscos associados a infecção relacionada à assistência a saúde. **Texto Contexto Enferm.**, v. 24, n. 1, p.220-228. 2015.

THAKUR, P.; CHAWLA, R.; TANWAR, A.; CHAKOTIYA, A.S.; NARULA, A.; GOEL, R.; ARORA, R.; SHARMA, R.K. Attenuation of adhesion, quorum sensing and biofilm

mediated virulence of carbapenem resistant *Escherichia coli* by selected natural plant products. **Microbial Pathogenesis**, v. 92, p. 76-85. 2016.

TEH, A.H.T.; WANG, Y.; DYKES, G.A. The influence of antibiotic resistance gene carriage on biofilm formation by two *Escherichia coli* strains associated with urinary tract infections. **Can. J. Microbiol.**, v. 60, p. 105-111. 2014.

TEOPHILO, G.N.D.; VIEIRA, R.H.S.F.; RODRIGUES, D.P.; MENEZES, F.G. *Escherichia coli* isolated for seafood: toxicity and plasmid profiles. **Int. Microbiol.**, v. 5, p. 11-14. 2002.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**, 12.ed. Porto alegre: Artmed, 2017.

TYERMAN, J.G.; PONCIANO, J.M.; JOYCE, P.; FORNEY, L.J.; HARMON, L.J. The evolution of antibiotic susceptibility and resistance during the formation of *Escherichia coli* biofilms in the absence of antibiotics. **BMC Evolutionary biology**, v. 13, n. 22. 2013.

VIEIRA, R.H. et al. Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and pond environment in northeastern Brazil. **Journal of Environmental Science and Health**, v.45, n.3, p.198-203. 2010.

VILELA, S.F.G.; BARBOSA, J.O.; ROSSONI, R.D.; SANTOS, J.D.; PRATA, M.C.A.; ANBINDER, A.L.; JORGE, A.O.C.; JUNQUEIRA, J.C. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. **Virulence**, v. 6, n. 1, p. 29-39. 2015

VUOTTO, C.; LONGO, F.; DONELLI, G. Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. **International Journal of Oral Science**, v. 6, p. 189-194. 2014.

WANG, L.; NAKAMURA, H.; KAGE-NAKADAI, E.; HARA-KUDO, Y.; NISHIKAWA, Y. Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from different retail foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 249, p. 44–52. 2017.

WILLIS, L.M.; WHITFIELD, C. Structure, biosynthesis, and function of bacterial capsular polysaccharides synthesized by ABC transporter-dependent pathways. **Carbohydrate Research**. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. Londres, 2002. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antibiotic Resistance - Global report on surveillance**. 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1>. Acesso em 05 de Março de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Estimates of the global burden of foodborne diseases: Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007-2015**. 2015.

Disponível em:

<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf;jsessionid=50D99B64425B4C71C19A9749B91EF829?sequence=1>. Acesso em 10 de Julho de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Critically important antimicrobials list**. 2017.

Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety/publications/cia2017.pdf?ua=1>>. Acesso em 05 de Março de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diarrhoea**. 2018. Disponível em:

<<http://www.who.int/topics/diarrhoea/en/>>. Acesso em 02 de Janeiro de 2018.

WU, H.; MOSER, C; WANG, Q.; HOIBY, N.; SONG, Z. Strategies for combating bacterial biofilm infections. **International Journal of Oral Science**, v. 7, p. 1-7. 2015.

XING, Y.; XU, Q.; MA, Y.; CHE, Z.; CAI, Y.; JIANG, L. Effect of porous starch concentrations on the microbiological characteristics of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*. **Food Funct**, v. 5, n. 5, p. 972-983. 2014.

ZACHAROF, M.; LOVVIT, R.W. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: a review article. **APCBEE Procedia**, v. 2, n.1, p. 50-56. 2012.

ZANFARDINO, A.; CRISCUOLO, G.; Di LUCCIA, B.; PIZZO, E.; CIAVATTA, M.L.; NOTOMISTA, E.; CARPENTIERI, A.; PEZELLA, A.; VARCAMONTI, M. Identification of new small bioactive peptide from *Lactobacillus gasseri* supernatant. **Beneficial Microbes**, v. 8, n. 1, p. 133-141. 2017.

ZIMMER, K.R.; BLUM-SILVA, C.H.; WULFFSCHUCH, M.; REGINATTO, F.H.; PEREIRA, C.M.; MACEDO, A.J.; LENCINA, C.L. The Antibiofilm Effect of Blueberry Fruit Cultivars Against *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medicinal Food**, v.17 n.3, p.324–331. 2014.