



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Campus de Sobral

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LOURICÉLIA RODRIGUES DE ABREU

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DO LEITE E QUEIJO CAPRINO**

SOBRAL

2015

LOURICÉLIA RODRIGUES DE ABREU

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DO LEITE E QUEIJO CAPRINO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, campus Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape da Silva Cunha

Co-Orientadores:

Dra. Hévila Oliveira Salles

Dra. Karina Maria Olbrich dos Santos

SOBRAL

2015

LOURICÉLIA RODRIGUES DE ABREU

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO LEITE E QUEIJO CAPRINO

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, campus Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha.

Aprovada em: __/__/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Maranguape (Orientador)
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Dra. Hévila Oliveira Salles
Embrapa Caprinos e Ovinos

Dr. Svetoslav Dimitrov Todorov
Universidade Federal de Viçosa

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca do Curso de Medicina – *Campus* de Sobral

-
- A145i Abreu, Louricélia Rodrigues de.
Identificação e caracterização do potencial probiótico de bactérias isoladas do leite e do queijo caprino. / Louricélia Rodrigues de Abreu. – 2015.
103 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2015.
Área de Concentração: Microbiologia.
Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape da Silva.
Coorientação: Prof. Hévila Oliveira Salles.

1. Virulência. 2. Probióticos. I. Título.

Aos meus pais Ana Célia e Lourenço, pela
segurança, amor e dedicação.

AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me dar forças para continuar, e colocar em meu caminho pessoas que ajudaram a tornar esse sonho possível. Primeiramente à Dra. Karina Olbrich, por me dar a primeira oportunidade de entrar no mundo da pesquisa em microbiologia, ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Maranguape, pela acolhida, apoio e confiança, à Dra. Hévila Salles, por toda ajuda, sugestões, empenho e dedicação, agradeço também ao Dr. Svetoslav Todorov pelo apoio e suporte nos primeiros passos desse trabalho. Nessas pessoas eu agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará - UFC e à Embrapa Caprinos e Ovinos pela oportunidade, suporte técnico e financeiro.

Aos laboratoristas, estagiários e bolsistas da Embrapa Caprinos e Ovinos e UFC; Liana, Tabosa, Batista, Teresinha, Lidiane, Marcio, João Ricardo, Samuel, Viviane, Carolina, Carlos, Pedro e Paulo pela ajuda, paciência e horas de laboratório fora do expediente. A todos que contribuíram com esse trabalho direta ou indiretamente. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro através da bolsa durante todo esse período.

Aos meus pais Ana Célia e Lourenço, pelo amor, carinho e compreensão por minha ausência, minhas irmãs Lourena e Mariana pelos momentos de descontração e meu irmão João Manuel, por ser minha fonte inesgotável de energia.

Agradeço às amigas e irmãs, Carliane, Iara e Elza, com quem divido não só o aluguel mas também minhas experiências, preocupações e alegrias, a elas que me ajudam e compreendem meus momentos de estresse, falta de tempo e até ataque de nervos.

Meus amigos e amigas Ricardo Alcantara, Andres Chaparro, Rulio, Renato, Charles, Janiel, Nando, Charles, Ricardo Bastos, Annyta, Marianne, Wandy, Vitória, Neide e Josiane que me proporcionam apenas momentos de alegria e descontração.

Aos meus colegas do mestrado, com quem dividi momentos de sabedoria e dificuldades.

A todos o meu “Muito obrigada”

“Do mesmo modo que o metal enferruja com a ociosidade e a água parada perde sua pureza, assim a inércia esgota a energia da mente.”

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

A busca por novas bactérias com propriedades funcionais tem sido foco de intensa pesquisa nas últimas décadas. Diversas espécies do gênero *Lactobacillus* já são conhecidas como probióticas e são adicionadas em alimentos. Para uma cultura bacteriana ser selecionada como probiótica é preciso apresentar determinadas características, como a capacidade de sobreviver às condições gastrointestinais e ser livre de patogenicidade. O objetivo desse estudo foi isolar, selecionar e identificar cepas de lactobacilos a partir de leite e queijo de cabra, e avaliar seu potencial probiótico e sua inocuidade através da identificação de genes relacionados às características benéficas e de riscos para o consumo humano, verificando sua expressão *in vitro*. Foram identificados vinte e três cepas diferentes de *Lactobacillus plantarum* e adicionadas ao estudo outras quatro cepas de *L. plantarum* e três *Lactobacillus mucosae* previamente isoladas. As vinte e nove cepas foram avaliadas quanto à presença de genes relacionados a propriedades probióticas como o gene *bsh*, codificante para a enzima hidrolase de sais biliares, *msa*, relacionado à capacidade de adesão ao epitélio intestinal induzido por manose e outros três genes, *map*, *mub* e *ef-tu* associados às propriedades de adesão ao muco. Os genes *bsh* e *msa* tiveram sua expressão avaliada *in vitro*, por meio de testes bioquímicos de desconjugação de sais biliares e agregação de leveduras, respectivamente. Os resultados mostraram que 80% das cepas testadas foram capazes de sobreviver em presença dos sais biliares e 76% foram capazes de desconjugar pelo menos um dos quatro sais testados. Quanto à capacidade de adesão, quatro cepas apresentaram resultado positivo, sendo para três delas confirmada interação via manose. Ainda com relação às propriedades de adesão, apenas duas cepas apresentaram um alto valor de hidrofobicidade da superfície celular, propriedade que tem sido associada indiretamente a essa capacidade, e 90% das cepas estudadas mostraram um perfil genético favorável à ligação à mucosa intestinal, apresentando três dos quatro genes de adesão avaliados. A inocuidade desses microrganismos também foi avaliada quanto à presença e expressão de doze genes relacionados a fatores de virulência, incluindo a resistência a antimicrobianos e produção de aminas biogênicas. A expressão de genes associados à produção de gelatinase (*gelE*), e das aminas tirosina (*tdc*) e histamina (*hdc1* e *hdc2*), bem como à resistência à vancomicina (*vanA* e *vanB*)

foi investigada por meio de testes bioquímicos. Apesar de algumas cepas amplificarem o gene *geE*, este não apresentou expressão *in vitro*. Foi constatada *in vitro* resistência à vancomicina, muito comum entre lactobacilos, sendo observado também em cepas que não amplificaram os genes *vanA* e *vanB*. Com relação à produção de aminas biogênicas, apenas o gene *tdc* para tirosina foi detectado nas cepas, sendo um dos genes com maior frequência de amplificação entre as cepas. No entanto, apenas uma cepa que apresentou o gene teve sua expressão confirmada no teste *in vitro* utilizando meio de descarboxilação, enquanto que algumas cepas que não amplificaram o gene obtiveram resultado positivo *in vitro*. Quatorze isolados não amplificaram genes relacionados à virulência. Destas, apenas a cepa *Lactobacillus plantarum* Q24 não apresentou expressão *in vitro* relacionada a fator de virulência, além de amplificar três dos genes relacionados à adesão ao muco, e de ter sobrevivido e desconjugado dois dos sais biliares avaliados, mostrando ser a mais promissora para se prosseguir com os estudos de investigação do potencial probiótico.

Palavras-chave: Probióticos; Virulência; Genes; Expressão *in vitro*.

ABSTRACT

The search for new bacteria with functional properties has been the focus of intense research in recent decades. Several species of *Lactobacillus* genus are known as probiotic and are added in foods. To be selected as a probiotic bacteria, it needs to present certain characteristics, as capacity to survive the gastrointestinal conditions and be free of pathogenic. The aim of this study was to isolate, identify and select strains of *Lactobacillus* from goat milk and cheese, and evaluate its potential probiotic and its safety through the identification of related genes with beneficial characteristics and risks for human consumption, checking its *in vitro* expression. Were identified twenty-three different strains of *Lactobacillus plantarum* and added to study other four strains of *L. plantarum* and three *Lactobacillus mucosae*. The thirty strains were evaluated for the presence of genes related to probiotic properties as *bsh* gene, coding for the enzyme bile salt hydrolase, the *msa*, related to capacity of adhesion to intestinal epithelium induced by mannose, three other genes *map*, *mub* and *ef-tu* associated the mucus adhesion properties. The *bsh* and *msa* gene had their expression evaluated *in vitro*, by means of biochemical tests deconjugation of bile salts and addition of yeast, respectively. The results show that 80% of the strains were able to survive in the presence of bile salts and 76% were able to deconjugate at least one of the four salts tested. As for the adhesion capacity, four strains show a positive result, and three of them confirmed interaction via mannose. Still evaluating adhesion properties, only two strains have a high hydrophobicity value in the cell surface, property that has been linked indirectly to the ability to adhere to the intestinal mucosa, and 90% from these strains have a genetic profile favorable for binding to the intestinal mucosa, with three of the four genes adherence evaluated. The safety of the microorganisms was also evaluated for the presence and expression of the thirteen genes related to virulence factors, including resistance to antibiotics and production of biogenic amines. The expression of genes associated with the production of gelatinase (*gelE*), and tyrosine amines (TDC) and histamine (*hdc1* and *hdc2*) and resistance to vancomycin (*vanA* and *vanB*) was investigated by means of biochemical tests. Although some strains amplify the *gelE* gene it did not show *in vitro* expression. Was verified *in vitro* resistance to vancomycin, very common among lactobacilli, also observed in strains that did not amplify the genes *vanA*

and vanB. With respect to production of biogenic amines, only the *tdc* gene for tyrosine was detected in strains, one of the genes with the greatest percentage of amplification. However, only one strain that presented the gene had its expression confirmed in vitro test using descarboxilação medium, while some strains that do not amplify the gene had positive results in vitro. Fourteen isolated did not amplified genes related to virulence. Of these, only the *Lactobacillus plantarum* Q24 strain showed no expression in vitro related to virulence factor, in addition to amplify three of the genes related to adherence to mucus, and have survived and disconjugate two of bile salts evaluated, showing be the most promising to pursue studies potential of probiotic research.

Keywords: Probiotics; virulence; genes; *In vitro* expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Esquema de classificação dos ácidos biliares de acordo com sua origem.	27
Figura 2 Aspecto das placas suplementadas com o meio descarboxilativo e os aminoácido testado.....	54
Figura 3 Géis das amostras obtidos utilizando técnica de RAPD-PCR	56
Figura 4 Géis referentes ao rastreio por genes de potencial probiótico.....	59
Figura 5 Expressão da atividade da enzima hidrolase de sais biliares (BSH) em ágar MRS adicionado de sais biliares.	61
Figura 6 Imagem em microscópio de luz 100x de amplificação.....	63
Figura 7 Géis obtidos pelo rastreio dos genes relacionados a fatores de virulência	69
Figura 8 Resultado do teste de gelatinase.....	72
Figura 9 Placas inoculadas com as bactérias e discos de antibióticos	74
Figura 10 Placas das cepas em estudo em meio descarboxilativo após incubação com e sem (controle) o aminoácido testado.	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Efeito fisiológico das principais aminas biogênicas.....	38
Tabela 2 Estrutura química das principais aminas biogênicas	39
Tabela 3 Oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados na investigação de propriedades de adesão à mucosa intestinal e hidrólise de sais biliares no DNA total isolado de cepas de <i>Lactobacillus</i> spp.....	45
Tabela 4 Reações e condições da PCR para os iniciadores relacionados a características de efeito probiótico.....	46
Tabela 5 Oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados na investigação da presença de fatores de virulência no DNA total isolado de cepas de <i>Lactobacillus</i> spp.	51
Tabela 6 Identificação moléculas das bactérias	57
Tabela 7 Presença dos genes associados a características probióticas nas cepas de <i>L. plantarum</i> e <i>L. mucosae</i>	60
Tabela 8 Crescimento das cepas de <i>Lactobacillus</i> spp na presença de sais biliares e capacidade de desconjuga-los	62
Tabela 9 Valor de hidrofobicidade e da velocidade de sedimentação da levedura induzida pelos <i>Lactobacillus</i> spp via manose	65
Tabela 10 Presença dos genes responsáveis pelos fatores de virulência.....	69
Tabela 11 Presença dos genes responsáveis pela resistência ao antibiótico vancomicina e produtores de aminas biogênicas	71
Tabela 12 Resultado da equação de atividade hemolítica.....	73
Tabela 13 Fator de virulência para gelatinase e resistência à vancomicina	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µL	Microlitro
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilancia Sanitária
APT	Adenosine triphosphate
BAL	Bactérias ácido lácticas
BLAST	Basic Local Aligment Search Tool
BSH	Hidrolase de sal biliar
Da	Dalton
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DO	Densidade óptica
EFSA	European Food Safety Authority
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigênica
FDA	Food and Drug Administration
g	grama
GC	Sodium glycocholate
GDC	Sodium glicodeoxycholate
h	Hora
KDa	Quilodalton
Kg	Quilograma
M	Molar
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
min	Minutos
mL	Mililitro
MRS	Man, Rogosa, Sharpe
NaCl	Cloreto de Sódio
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
nm	Nanômetro

MSCRAMM	Microbial Surface Compponents Recognizing Adhesive Matrix Molecules
nt	Nucleotídeo
pb	Pares de base
p/v	Peso/volume
pl	Ponto isoelétrico
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polimerase Chain Reaction
pH	Potencial hidrogeniônico
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
TAE	Tampão Tris-Acetato- EDTA
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TC	Taurocholic acid sodium
TDC	Sodium taurodeoxycholate
TGI	Trato gastrintestinal
TSB	Trypticase Soy Broth
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UH	Unidade Hemolítica
UV	Ultra violeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1. MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS	22
2.2. BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS	24
2.2.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	25
2.2.2. <i>Lactobacillus mucosae</i>	26
2.3. SAIS BILIARES	26
2.4. ADESÃO	29
2.5. FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA À VANCOMICINA	33
2.6. AMINAS BIOGÊNICAS	37
3. OBJETIVO	42
4. METODOLOGIA	43
4.1. ISOLAMENTO E ARMAZENAMENTO	43
4.2. IDENTIFICAÇÃO	44
4.3. POTENCIAL PROBIÓTICO	45
4.3.1. PRESENÇA DE GENES ASSOCIADOS A PROPRIEDADES PROBIÓTICAS	45
4.3.2. HIDRÓLISE DE SAIS BILIARES	47
4.3.3. AGLUTINAÇÃO DE LEVEDURA	47
4.3.4. AGREGAÇÃO DE LEVEDURA	48
4.3.5. HIDROFOBICIDADE	49
4.4. POTENCIAL DE VIRULÊNCIA	50
4.4.1. PRESENÇA DE GENES ASSOCIADOS A FATORES DE VIRULÊNCIA, RESISTÊNCIA À VANCOMICINA E PRODUÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS	50
4.4.2. GELATINASE	52
4.4.3. ATIVIDADE HEMOLÍTICA	52
4.4.4. RESISTÊNCIA À VANCOMICINA	53
4.4.5. AMINAS BIOGÊNICAS	53

5. RESULTADOS	54
5.1. ISOLAMENTO	54
5.2. IDENTIFICAÇÃO	55
5.3. POTENCIAL PROBIÓTICO	58
5.3.1. PRESENÇA DE GENES ASSOCIADOS A PROPRIEDADES PROBIÓTICAS	58
5.3.2. DESCONJUGAÇÃO DE SAIS	61
5.3.3. AGLUTINAÇÃO DE LEVEDURA	63
5.3.4. AGREGAÇÃO DE LEVEDURA	64
5.3.5. HIDROFOBICIDADE	65
5.4. POTENCIAL DE VIRULÊNCIA	67
5.4.1. PRESENÇA DE GENES ASSOCIADOS À FATORES DE VIRULÊNCIA, RESISTÊNCIA À VANCOMICINA E PRODUÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS	67
5.4.2. GELATINASE	71
5.4.3. ATIVIDADE HEMOLÍTICA	72
5.4.4. RESISTÊNCIA À VANCOMICINA	73
5.4.5. AMINAS BIOGÊNICAS	75
6. DISCUSSÃO	77
7. CONCLUSÃO	88
REFERÊNCIAS	89
ANEXO A - PESQUISA REALIZADA UTILIZANDO O BLAST COMPARANDO AS DIFERENÇAS NO COMPRIMENTO DO AMPLICON E NUCLEOTÍDEOS ENTRE O PRIMER MSA UTILIZADO E OUTRAS SEQUENCIAS DISPONÍVEIS.	101
ANEXO B: COMPARAÇÃO DA SEQUENCIA DO PRIMER <i>vanA</i> UTILIZADO COM DEMAIS SEQUENCIAS DISPONÍVEIS NO BANCO DE DADOS DA NCBI UTILIZANDO BLAST, APRESENTANDO DIFERENÇAS ENTRE OS NUCLEOTÍDEOS.	102

1. INTRODUÇÃO

Uma área da microbiologia industrial que vem crescendo há tempos é a produção, potencialização e transformação de alimentos por processos biotecnológicos. Diversas técnicas já eram utilizadas mesmo sem o conhecimento da existência de microrganismos, como a fermentação alcóolica e lática. Através da *Saccharomyces cerevisiae* obtem-se pão, vinho, cerveja e outros produtos industriais. Vários microrganismos, como os lactobacilos, promovem a fermentação lática, onde o principal produto final é o ácido lático. Para isso, o açúcar do leite (lactose) é desdobrado em um processo de hidrólise enzimática fora da célula obtendo glicose e galactose. A glicose entra na célula onde passam por novo processo sendo oxidada em duas moléculas de ácido pirúvico, gerando energia que é utilizada para formar duas moléculas de APT. As moléculas de ácido pirúvico são resuzidas por moléculas de NADH formando duas de ácido lático, baixando o pH e provocando a coagulação das proteínas do leite, resultando na produção de queijo e iogurte por exemplo.

A busca por novas bactérias ácido láticas (BAL) com propriedades benéficas tem sido foco de intensa atividade de pesquisa nas últimas décadas. Essas bactérias desempenham um papel importante na microbiota do organismo, seja atuando na flora vaginal, mantendo o ambiente ácido da vagina que é um importante mecanismo de defesa contra a proliferação de patógeno (LINHARES *et al.*, 2010) ou no meio intestinal, agindo de várias formas benéficas no hospedeiro (CÂMARA, 2012). A microbiologia aplicada à indústria de alimentos não trata apenas da produção e modificação dos alimentos, mas também, atua na proteção contra outros tipos de microrganismos, geralmente patogênicos e deteriorantes.

Probióticos são microrganismos não-patogênicos que, quando ingeridos regularmente em quantidades adequadas, exercem uma influência positiva sobre a saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008) estabeleceu que a quantidade mínima viável de cultura para um produto ser considerado probiótico deve estar entre 10^8 e 10^9 UFC por porção do produto. Os probióticos, geralmente bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, atuam no intestino humano participando da dinâmica da microbiota local e exercendo atividades benéficas (MATHARA *et al.*, 2008), como modulação e estabilização da microbiota

intestinal, resistência a patógenos, alívio na constipação e na intolerância à lactose assim como apresenta um efeito positivo sobre o colesterol.

Existem duas categorias de fatores que definem o bom funcionamento de um probiótico: o fator de adaptação, que permite a sobrevivência ao novo ambiente e o fator de efeito probiótico, que atua no benefício ao hospedeiro. Para um microrganismo ser selecionado como probiótico, precisa possuir características importantes, tais como sobreviver às condições adversas do trato gastrointestinal (TGI), preferencialmente aderindo à mucosa e produzindo efeito benéfico ao hospedeiro, como modular a atividade imunológica e a produção de toxinas, além de não ser patogênico (FULLER, 1989; FAO/WHO, 2002). Sabe-se que diferentes estirpes de probióticos foram associados com diferentes efeitos quanto à sua capacidade benéfica específica.

Sabe-se que a identificação inequívoca de um microrganismo desconhecido, requer a combinação de várias metodologias. Atualmente, após os testes bioquímicos, através dos quais obtém-se a caracterização fisiológica do microrganismo, devem ser aplicadas técnicas de biologia molecular. Essas técnicas de identificação incluem a extração do ADN total, seguida do sequenciamento e identificação da região conservada do ADN, comparando com as sequências de cepas referenciais disponíveis nos bancos de dados. Outra ferramenta utilizada na caracterização molecular dessas bactérias é a reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction*, PCR), que consiste na amplificação de fragmentos de ADN utilizando iniciadores selecionados, que são pequenos fragmentos de ADN fita simples, sintetizados *in vitro*, baseados na sequência do ADN a ser amplificado. Essa técnica é utilizada para avaliar a presença de genes desejados, sejam esses para sequenciamento ou codificantes para características probióticas como os genes relacionados à adesão à mucosa ou genes indesejados, correlacionados a fatores de virulência. A partir desse material amplificado, pode-se identificar o microrganismo pelo sequenciamento da região gênica 16S – 23S. Muitos outros métodos moleculares disponíveis também podem proporcionar evidências e suporte para descobertas epidemiológicas (UPADHYAYA; RAVIKUMAR; UMAPATHY, 2009).

Uma das técnicas de genotipagem mais utilizadas para diferenciação dos microrganismos é a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Esta técnica possibilita diferenciar cepas de um grupo de isolados com características

fenotípicas semelhantes, é baseada em uma reação de PCR, na qual se utiliza iniciadores de sequências aleatórias com cerca de 10 nucleotídeos. A grande vantagem dessa técnica é que ela pode ser utilizada em qualquer tipo de bactéria e não há necessidade de conhecimento prévio do genoma (BARATTO, 2012)

Pesquisas vêm sendo realizadas no intuito de identificar e detectar os genes responsáveis pelas propriedades tecnológicas e potencial probiótico para cada gênero e espécie, isso só é possível graças a sequências genômicas disponíveis em bancos de dados, como por exemplo a do *Lactobacillus plantarum* WCSF1 (KLEEREBEZEM *et al.*, 2003) e *Lactobacillus mucosae* LM1 (LEE *et al.*, 2012). Através desses genomas, muitos genes foram caracterizados, como o *bsh*, para desconjugação de sais biliares (SAVAGE; MOSER, 1999) e o gene *msa* de adesão específica à manose (PRETZER, 2005). O rastreamento de genes relacionados a fatores de virulência também é muito importante, a ausência desses é necessária para confirmar a inocuidade dessas bactérias e a segurança de sua aplicação, descartando a possibilidade de transferência desses genes (RAMIAH, 2008).

Sabe-se que não basta ter o gene, esse deve ser expresso para confirmar sua ação como probiótico. O ponto de partida para que isso ocorra é pela transcrição do ADN em RNA e posteriormente traduzido para uma cadeia de polipeptídios, esse processo é regulado de acordo com as necessidades da célula, sendo muitas vezes ativadas por condições determinadas. A avaliação da presença do gene e confirmação de sua expressão *in vitro* é uma forma mais segura de caracterizar um microrganismo probiótico.

A Embrapa Caprinos e Ovinos vem trabalhando desde 2010 na prospecção de bactérias lácticas com propriedades probióticas e aptidão tecnológica para uso em produtos lácteos probióticos a partir de cepas isoladas de leite e queijos artesanais do Ceará. Testes *in vitro* são empregados para a seleção preliminar dos isolados com base na resistência a condições do TGI, susceptibilidade a antimicrobianos, capacidade de hidrolisar sais biliares, entre outros.

A inocuidade é um aspecto fundamental para as cepas bacterianas a serem utilizadas em alimentos. Nos últimos anos, alguns estudos têm identificado bactérias lácticas probióticas envolvidas em infecções, o que tem aumentado o interesse e o

questionamento da segurança dos microrganismos probióticos, principalmente com relação a novas cepas (VESTERLUND *et al.*, 2007).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

Atualmente a definição mais utilizada para probióticos é a proposta pela Organização Mundial de Saúde em conjunto com a Organização de Agricultura e Alimentos: “microrganismos vivos que, quando administrados regularmente e em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002, 1, p 11). Em situações onde o equilíbrio da microbiota intestinal é prejudicado pelo estresse ou por outros fatores, são condições em que a ingestão de produtos probióticos pode auxiliar na restauração da microbiota intestinal (FULLER, 1989).

Um probiótico deve possuir várias características benéficas ao hospedeiro, estando entre elas o efeito benéfico sobre infecções intestinais, alívio da intolerância à lactose e da constipação, apresentar em alguns casos atividade antitumoral, efeito sobre o colesterol, diminuindo sua circulação, dentre outras propriedades. Quando empregado em produto alimentício, deve conter no rótulo a especificação das células viáveis. Não deve possuir efeito adverso ou patogênico (FULLER, 1989). Muitos estudos sobre os efeitos anticarcinogênicos dos probióticos referem-se principalmente sobre o câncer de cólon, seguido de câncer de mama e de bexiga (RAFTER, 2003). Acredita-se que o potencial máximo dos efeitos de um probiótico pode ser atingido caso esse esteja aderido à mucosa.

Para um microrganismo ser considerado seguro para ser utilizado em alimentos, deve passar por alguns processos de avaliação, tendo início na identificação adequada das espécies, avaliação da segurança *in vitro* e *in vivo*, caracterização funcional e aplicação no produto para posteriormente fazer o levantamento de bactérias viáveis durante o período de estocagem (FAO/WHO, 2002).

Diversos microrganismos têm sido utilizados ao longo dos anos com interesse tecnológico para uso em alimentos, sendo alguns menos conhecidos que outros, podendo representar algum potencial de perigo para os consumidores. Sendo necessário uma avaliação do seu uso sem prejuízo para a saúde do consumidor e sem

desrespeitar os requisitos legalmente estabelecidos pelo seu país ou estado. Muitos países desenvolveram seu próprio sistema legislativo que garante a segurança do consumidor de produtos probióticos (TAMINE, 2005), como por exemplo, a *European Food Safety Authority* (EFSA) para a União Europeia, a *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos (GONÇALVES, 2009) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil.

Existem alguns mecanismos operacionais que atuam no equilíbrio entre os microrganismos e o hospedeiro, como acidez, presença de substâncias inibidoras como bacteriocinas, ácidos graxos, sais biliares desconjugados e competição pelo local de adesão e nutrição entre as bactérias (NIELSEN, 1994). Sendo necessário para um probiótico, resistir a esses fatores.

Muitas espécies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e algumas de *Enterococcus* já são bem estabelecidas como probióticas e são aplicadas em alimentos. Dentre elas destacam-se *Lactobacillus casei* e *L. rhaminosus* (ITSARANUWAT *et al.*, 2003), *L. plantarum* (KLEEREBEZEM *et al.*, 1997), *Enterococcus faecium* (LUND; ADMASSON; EDLUND, 2002), *Bifidobacterium bifidum* (SCHIFFRIN *et al.*, 1995) e *B. lactis* (CHIANG *et al.*, 2000). Uma concentração mínima de 10^6 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por 1 mL ou 1 g na data de vencimento do produto tem sido preconizada, sendo a dose mínima por dia recomendada de 10^8 - 10^9 UFC/mL, números esses, estipulados para compensar a perda durante os processos (TAMINE, 2005). Dados aprovados e estabelecidos também pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008) onde a quantidade mínima viável de cultura para um produto probiótico deve estar entre 10^8 e 10^9 UFC por porção do produto.

Os probióticos em produtos alimentícios devem manter-se viáveis nas condições de armazenamento do produto, sobreviver à passagem pelo TGI, sendo capaz de exercer atividades benéficas no intestino se integrando temporariamente à microbiota local (FULLER, 1989).

2.2. BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

As BAL são classificadas de acordo com suas características fisiológicas, morfológicas e bioquímicas, levando em consideração a quantidade de ácido láctico produzido por elas, temperatura ótima, produção de gás, compostos aromáticos entre outros (SIMPSON e TAGUCHI, 1995). São um grupo de bactérias que tem o ácido láctico como principal produto metabólico da fermentação de carboidratos (LEITE, 2006). Ácido láctico é o nome comum para o ácido 2-hidroxi-propanóico, isolado a partir do leite ácido (DATTA *et al.*, 1995), e comumente utilizado como acidulante nas indústrias alimentícia e farmacêutica (SCHEPERS *et al.*, 2002).

Segundo Axelsson (2004), os *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella* são os gêneros mais estudados entre as bactérias lácticas, sendo o gênero *Lactobacillus* o maior em espécies reconhecidas.

O consumo de leite fermentado e alimentos suplementados com lactobacilos ou bifidobactérias tem sido relacionado com um baixo índice de câncer de cólon (SAARELA *et al.*, 2000). Através de estudos, foi observado que o consumo regular de bactérias lácticas diminui a atividade de algumas enzimas fecais provavelmente envolvidas na formação de carcinógenos (SPANHAAK *et al.*, 1998).

O gênero *Lactobacillus* possui cento e sessenta espécies e vinte e sete subespécies (ALLEGRETTI, 2009), esses abrangem uma grande variedade de habitats, essa diversidade é justificada pelo tamanho do seu genoma (3 308 274 pb), um dos maiores genomas conhecidos de BAL (KLEEREBEZEM, *et al.*, 2003; RAMIAH, 2008).

Lactobacillus são bactérias fermentativas, aero-tolerantes ou anaeróbicas, com exigências nutricionais de sais, carboidratos, vitaminas, aminoácidos, derivados dos ácidos nucleicos, peptídeos e ésteres de ácidos graxos. Utilizam a glicose como fonte de carbono, podendo ser homofermentativos, com produção de 85% de ácido láctico ou heterofermentativos, produzindo outros compostos além do ácido láctico, como ácido acético, etanol e dióxido de carbono (LEITE, 2006).

2.2.1. *Lactobacillus plantarum*

Lactobacillus plantarum é uma das espécies que compõe o gênero *Lactobacillus*. São BAL, gram-positivas, heterofermentativas facultativas, comumente encontradas em ambientes ricos em proteínas como produtos alimentares, também são encontradas na saliva e TGI, adaptando-se facilmente ao ambiente. Cepas dessa espécie possuem uma série de sistemas de resposta ao estresse, como resposta ao choque de calor, de frio, acidez, entre outros, responsável em parte por sua alta capacidade de sobrevivência (TAMIME, 2005).

Algumas cepas de *L. plantarum* são conhecidas por produzirem uma bacteriocina ativa contra certos patógenos gram-positivos, a plantaricina (MATHARRA, 2008).

L. plantarum está entre as espécies de bactérias mais utilizadas como probióticas em diversos produtos pelas indústrias (GEORGIEVA, 2009; VRIES *et al.*, 2006). No entanto, um caso foi detectado envolvendo essa espécie com a endocardite infecciosa, uma infecção do endotélio extra cardíaco (RAMIAH, 2008).

Todorov *et al.* (2008), sugere que essa espécie possui um alto potencial de associação com superfícies e substratos diferentes, possuindo fácil adaptação às condições ambientais devido a gama de proteínas de superfície já descritas para essa espécie.

O genoma completo do *L. plantarum* WCFS1 foi sequenciado, nos proporcionando melhores condições na investigação molecular das bactérias e do seu potencial probiótico (PRETZER, 2005).

2.2.2. *Lactobacillus mucosae*

Lactobacillus mucosae foi identificada pela primeira vez por Roos (2000), onde recebeu esse nome por sua capacidade de aderir a mucosa intestinal. Segundo Ryan (2015), essa característica deve-se a constante expressão de homólogos do gene codificante para a proteína *mub*, responsável pela adesão ao muco, já identificada em *L. reuteri* e *L. plantarum*. Essa espécie é geralmente encontrada no TGI de mamíferos onde é capaz de aderir firmemente à superfície da mucosa, sendo uma espécie promissora na utilização como probióticos (LEE *et al.*, 2012). Os dados sobre essa espécie ainda é limitado.

Lee (2012) realizou a análise do genoma de *L. mucosae* LM1, isolado das fezes de um leitão saudável, que revelou homólogos da proteína Mub, apresentando 93% de semelhança com o gene *mub* identificado em *Lactobacillus reuteri*. Além disso, também apresentou um transportador ABC que possui afinidade específica para os antígenos dos grupos sanguíneos humanos, esses podem ligar-se ao muco através da presença de antígenos dos grupos sanguíneos encontrados em tecidos secretores (VAN TASSELL; MILER, 2011). O mecanismo de aderência das cepas que possuem afinidade pelos antígenos dos grupos sanguíneos expressos na mucina ainda não é conhecido (WATANABE *et al.*, 2010).

2.3. SAIS BILIARES

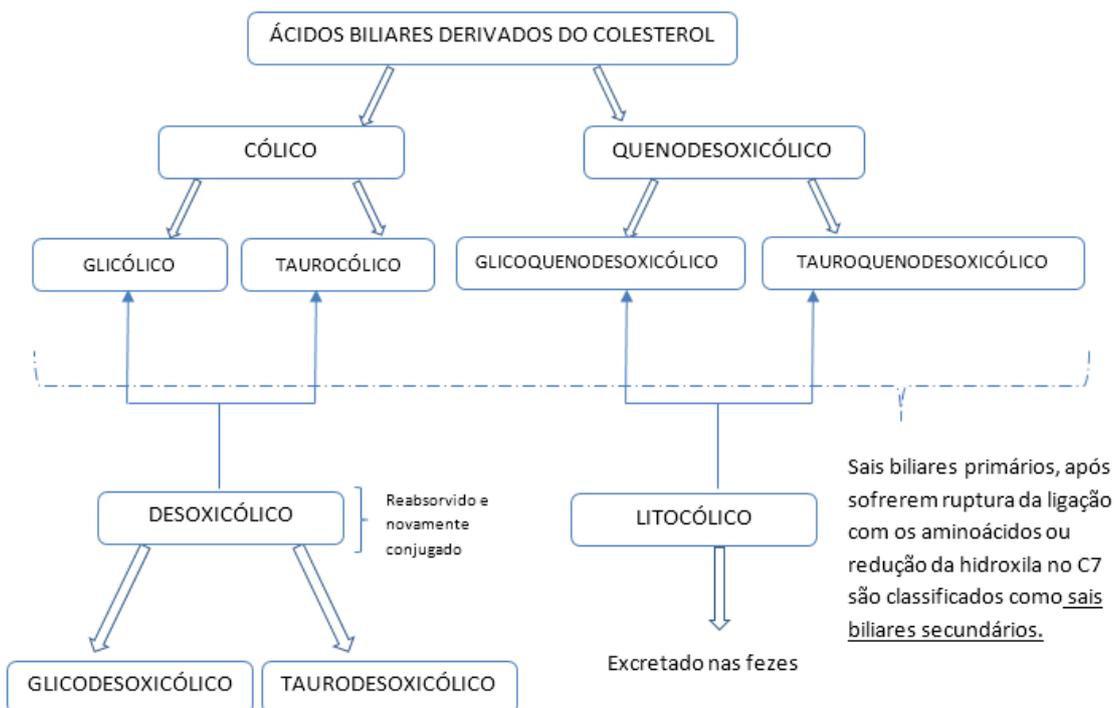
Os sais biliares são esteróis sintetizados no fígado a partir do colesterol e excretados pelos hepatócitos para ser armazenado na vesícula biliar, sendo uma parte destes expelido nas fezes enquanto outra é reabsorvida no íleo sendo novamente excretado no fígado, em processo entero-hepático.

São metabolizados pela conjugação de um dos ácidos biliares originados do colesterol, ácido cólico e ácido quenodesoxicólico conjugados com os aminoácidos glicina ou taurina, através da ligação do grupo carboxílico de um desses ácidos com o grupo amina da glicina ou taurina, formando os sais biliares primários. A síntese dos sais biliares é regulada pelo nível da atividade da enzima 7- α -hidroxilase, que é estimulada

quando a concentração intracelular de sais biliares está baixa no fígado ou a do colesterol aumenta nos hepatócitos.

A classificação dos sais biliares dá-se por sua origem (FIGURA 1). A partir do ácido cólico ocorre a formação dos sais glicólico e taucólico, enquanto que o ácido quenodesoxicólico origina os sais glicoquenodesoxicólicos e tauroquenodesoxicólicos, classificados como sais biliares primários.

Figura 1 Esquema de classificação dos ácidos biliares de acordo com sua origem



Fonte: Autor

As transformações sofridas pelos ácidos primários durante o percurso pelo intestino e ação das bactérias, pode promover desde a ruptura das ligações com a taurina e glicina como a redução da hidroxila no C7, formando os ácidos secundários. O ácido litocólico derivado de um dos sais primários formados a partir do ácido quenodesoxicólico (glicoquenodesoxicólicos e tauroquenodesoxicólicos), é comumente

excretado nas fezes enquanto que o ácido desoxicólico, derivado de um dos sais originados do ácido cólico (glicólico e taurocólico) será, em sua maioria, reabsorvido pelo organismo e conjugado com a glicina ou taurina e reexcretado na bile na forma de sal glicodesoxicólico e taurodesoxicólico (PORTA, 2006).

Os ácidos biliares podem produzir colestase, assim como aumentam os níveis intracelulares de cálcio, o que precede uma lesão celular, confirmando em parte, seu efeito hepatotóxico. Por serem detergentes ativos, os ácidos biliares podem lesar os hepatócitos, tendo como alvo de sua ação tóxica, as mitocôndrias dos hepatócitos, existindo uma associação entre a toxicidade dos ácidos biliares hidrofóbicos e a formação de radicais livres em hepatócitos (KRAHENBUHL *et al.*, 1994).

Os sais biliares possuem a função de detergente biológico solubilizando lipídeos, sendo essencial no processo de digestão de gorduras. Apresentam também ação antimicrobiana, através da dissolução da membrana bacteriana (BEGLEY, 2005).

Alguns microrganismos sintetizam a enzima hidrolase de sais biliares (BSH) que possui a capacidade de hidrolisar os sais biliares, diminuindo o seu efeito como detergente (ERKKILÄ e PETÄJÄ, 2000). Quanto maior a hidroxilação dos ácidos biliares, menor será sua hidrofobicidade e por tanto menor sua toxicidade para essas bactérias (LEVEILLE-WEBSTER, 1997). A classe das enzimas microbianas que catalisam a hidrólise dos sais biliares foi denominada de forma coletiva como hidrolase de sais biliares conjugados (BSH, EC 3.5.1.24) (KIM, 2005).

Bactérias que sintetizam a enzima BSH podem atuar de forma benéfica na redução dos níveis de colesterol circulante, pois com a desconjugação dos sais biliares no intestino, há uma diminuição da presença desses no intestino, induzindo a produção de bile a partir do colesterol (REDONDO, 2008). A purificação e caracterização da enzima BSH foi realizada a partir de várias bactérias como, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e Bacterióides (ELKINS, 2001). A atividade dessa enzima também já foi observada em espécies de *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* e *Xanthomonas maltophilia* (KIM, 2005).

Um dos principais objetivos dos alimentos funcionais é a utilização de um mecanismo que opere no controle dos níveis de colesterol sérico (KUMAR, 2008; NAGPAL, 2007). Bactérias do gênero *Lactobacillus* produtoras da enzima BSH,

apresentam vantagem na colonização do intestino delgado inferior, local de ação do ciclo entero-hepático, sendo assim, a atividade da BSH um fator importante na colonização intestinal (SMET, 1995).

O substrato específico da BSH são os ácidos biliares com os núcleos de esteróis clorato e aminoácidos glicina e taurina. O gene *bsh*, é o gene codificante para a atividade da enzima BSH, sendo importante na hidrólise de sais biliares, que pode resultar na diminuição dos níveis sanguíneos de colesterol (BEGLEY *et al.*, 2006).

Alguns trabalhos mostraram a variabilidade dos fenótipos do gene *bsh* entre isolados de algumas espécies, o que provocou a suspeita que esse gene pode ser adquirido horizontalmente (ELKINS, 2001).

2.4. ADESÃO

A atividade antagônica das bactérias probióticas sobre as patogênicas se deve principalmente pela competição por sítios de ligação, localizados na superfície do epitélio intestinal destinada à absorção de nutrientes, assim como produção dos ácidos láctico e acético (DOBROGOSZ *et al.*, 1989; REDONDO, 2008). O patógeno inicia o processo infeccioso a partir de sua colonização nos tecidos do hospedeiro e provoca, através da produção de toxinas, alterações patológicas (FRANZ *et al.*, 2001). Com a interação entre os probióticos e a membrana intestinal pelos receptores celulares, ocorre a formação de uma barreira contra os invasores patogênicos, demonstrando a importância de manter a colonização por microrganismos benéficos no nosso intestino, levando em consideração que impedir a colonização por patógenos é mais fácil que excluí-los (REDONDO, 2008).

No estudo realizado por Etzold (2014) foi observado que os mecanismos de adesão das bactérias gram-positivas assemelharam-se de forma estrutural entre comensais e bactérias patogênicas.

Sabe-se que a aderência é um processo de três etapas, sendo estas atração, adesão e agregação. Conforme Servin *et al.* (2004) e Redondo (2008) o mecanismo de

adesão das bactérias lácticas ao intestino inclui fatores como hidrofobicidade, interações eletrostáticas e presença de ácidos lipoteicóicos. Outra propriedade que favorece a aderência é a capacidade de agregação entre as bactérias da mesma espécie ou entre espécies diferentes através de moléculas específicas (BASSON, 2008). Apêndices extracelulares, como flagelos, pile e fimbrias também desempenham um papel importante na fixação das bactérias ao hospedeiro.

O mecanismo pelo qual os microrganismos benéficos colonizam o TGI ainda é pouco conhecido. Muitas proteínas multifuncionais podem estar envolvidas na adesão de lactobacilos à mucosa intestinal. Um grande número dessas proteínas de superfície já foi descrito para *Lactobacillus plantarum* (KLEEREBEZEM *et al.*, 2003; TODOROV *et al.*, 2008).

Alguns genes são relacionados a fatores de adesão, como o gene *msa*, um dos primeiros genes identificados e associados a uma característica probiótica, o mesmo está ligado a um processo de adesão específico à manose. Esse gene também possui três domínios de ligação ao muco (PRETZER *et al.*, 2005).

A *E. coli* enterotoxigenica (ETEC) conhecida como o agente para a diarreia dos viajantes, expressa fimbria tipo 1, responsável por uma das formas de interação com os receptores de manose presente na superfície celular do hospedeiro. Em contra partida, alguns *L. plantarum* possuem adesina específica a manose competindo por espaço com as fimbrias da *E. coli* (RAMIAH, 2008).

Sabe-se que há uma camada de muco que recobre o TGI, rico em glicoproteínas, peptídeos antimicrobianos e outras proteínas intestinais, assim como lipídeos e eletrólitos. Essa camada pode ser dividida em duas, uma externa de fácil remoção, onde ocorre contato direto com as bactérias e uma interna que é firmemente ligada ao epitélio, protegendo-o de agressões químicas e mecânicas (JUGE, 2012). O principal constituinte estrutural das camadas mucosas é a mucina, uma glicoproteína de alta massa molecular. A interação entre patógenos entéricos e a mucina, juntamente com os mecanismos que desencadeiam mudanças na produção de mucina tem sido foco de muitos estudos, assim como o papel do muco na colonização de bactérias probióticas na superfície celular do hospedeiro.

Outros genes relacionados à adesão à mucosa intestinal já identificados são o gene *map* e o *mub*. O gene *map*, codificante para a proteína MapA relacionada à adesão às proteínas produtoras de muco, embora seu mecanismo ainda não tenha sido esclarecido (RAMIAH, 2008; SATOH, 2000). Sabe-se que esta proteína possui massa molecular de 26 KDa e um pI teórico de 9,7 (MIYOSHI *et al.*, 2006).

O gene *mub* é relacionado às proteínas de ligação à mucosa (MUB), pertencente a uma classe de moléculas efectoras relacionadas ao mecanismo de adesão dos lactobacilos, assim como de bactérias comensais relevantes do TGI (BOEKHORST, 2006). Segundo Buck (2006), esse gene possui uma abrangente variedade de domínios dessa proteína, sugerindo que o domínio MUB seja constantemente duplicado e apagado no processo de evolução.

Além das proteínas Mub possuírem uma variedade de domínios, também apresentam uma estrutura geral desconhecida (BOEKHORST, 2006; ELZOLD, 2014). Sendo uma das maiores proteínas de superfície bacteriana já identificada. Suas repetições são classificadas como Mub tipo 1 e Mub tipo 2 dependendo da conservação da sequência (ELZOLD, 2014).

A presença de múltiplos *mub* e a disposição ao longo da fita pode ser necessária para assegurar a ligação ao complexo de proteínas glicosiladas reforçando a multivalência mucina glicano (ELZOLD, 2014). Entre esses três genes, *map*, *mub* e *msa* não existe uma sequência de consenso entre os lactobacilos (TURPIN *et al.*, 2012).

No trabalho publicado por Granato (2004), o fator Tu de alongamento foi identificado como uma nova proteína de superfície com características de fator de adesão.

O EF-Tu é uma GTPase, enzima que hidrolisa o GTP, responsável por diferentes fases do alongamento da cadeia polipeptídica no ribossomo durante a síntese protéica. É uma das proteínas de maior frequência em procariotos, liga-se também a componentes de coagulação, trata-se de uma proteína multifuncional (WOLFF, 2013). Pode desenvolver mais de uma função, dependendo da sua localização. No citoplasma tem papel central na síntese de proteínas ou como gene mediador da colonização das células intestinais humanas, sendo codificante para um fator de adesão presente em algumas cepas de lactobacilos (RAMIAH, 2008).

Esse gene possui regiões conservadas comuns, permitindo que seus iniciadores sejam concebidos de várias espécies, entre elas *Lactobacillus plantarum*, *L. johnsonii*, *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *Lactococcus lactis* entre outros (TURPIN *et al.*, 2012).

Para que ocorra a interação entre *ef-tu* e a célula hospedeira este tem que estar localizado na membrana do microrganismo, exposto e acessível para estabelecer interações, já tendo sido identificada como uma importante proteína da parede celular de microrganismos (BALASUBRAMANIAM, 2008).

Seu mecanismo de interação com a mucina ainda não está bem compreendido (BUCK, 2006), assim como o sistema responsável pela aderência intestinal das bactérias comensais e probióticas ao muco (ETZOLD, 2014).

A organização estrutural dos componentes no interior da parede celular é refletida nas propriedades de superfície bacteriana, como as propriedades dos constituintes da superfície e principalmente da conformação das macromoléculas superficiais e as propriedades físico-químicas da parede celular (SCHAR-ZAMMARETTI, 2003).

A hidrofobicidade da superfície celular de algumas cepas bacterianas pode contribuir para a capacidade de aderir a células epiteliais e proteínas da matriz extracelular (BASSON, 2008). Está associada ao deslocamento do organismo e à colonização por adesão (GORSKI, 1992), podendo variar de organismo para organismo, e sendo influenciada pelo meio de cultivo, idade bacteriana e estruturas de superfície (VATSOS, 2001).

Gusils *et al.* (1999) propôs que a hidrofobicidade da superfície da célula microbiana é uma característica que indica seu potencial de adesão às mucosas. A hidrofobicidade da superfície celular promove uma interação não específica fraca e reversível, podendo preceder um processo de adesão por mecanismos mais específicos envolvendo proteínas de superfície celular e ácidos lipotéricos (ROJAS, 2002)

A hidrofobicidade é medida através da habilidade de aderir a hidrocarbonetos, sendo que elevados valores indicam maior habilidade de adesão. No entanto, estudos mais recentes defendem que os valores de hidrofobicidade não estão

correlacionados diretamente às propriedades de adesão (MATHARA *et al.*, 2008; VINDEROLA *et al.*, 2003).

2.5. FATORES DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA À VANCOMICINA

Segundo Schaechter *et al.* (1999), fator de virulência é qualquer componente do microrganismo que aumente sua capacidade em causar ou potencializar doenças, considerando que sua ausência reduz a patogenicidade do microrganismo.

Os fatores de virulência são decisivos para algumas bactérias conseguirem colonizar, invadir e causar algum dano ao hospedeiro. Sabe-se que os fatores de virulência de um organismo são regulados pela presença de seus genes codificantes em regiões específicas do genoma, conhecidas como ilhas de patogenicidade (HACKER, 2000). Esses genes podem estar presentes no cromossomo ou em elementos extra-cromossomais como plasmídeos e transposons. O trabalho de Medeiros *et al.* (2011) demonstrou que amostras de alimentos podem abrigar grandes proporções de genes de virulência.

Vários fatores de virulência já foram descritos, como a produção de gelatinase, enzima codificada pelo gene *gelE*, capaz de hidrolisar gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina, dentre outras proteínas. A principal função da gelatinase na patogênese é o fornecimento nutricional para as bactérias a partir da degradação do tecido hospedeiro (FISHER *et al.*, 2009). Estudos demonstram que cepas de *E. faecalis* produtores de gelatinase contribuem para a ocorrência de endocardite em modelo animal.

Segundo Franz *et al.* (2001) há uma elevada incidência de produção de gelatinase em *Enterococcus* isolados de produtos lácteos como o queijo, por serem ricos em proteínas, sendo a gelatinase um mecanismo de seleção para que esses microrganismos utilizem as proteínas do queijo como fonte de aminoácidos.

A proteína de superfície extracelular (ESP) localizada na superfície da parede celular, é uma proteína comum em espécies do gênero *Enterococcus*, que se associa as

células da parede intestinal sem desencadear alterações histopatológicas significativas, no entanto, contribuindo na colonização e estabilização do patógeno ao hospedeiro (SHANKAR *et al.*, 2001). A colonização amplifica o potencial de patogenicidade do patógeno em conjunto com os demais fatores do desenvolvimento das doenças. O gene *esp*, codificador dessa proteína é caracterizado pelos blocos de repetição de nucleotídeos (nt) na região central, o primeiro, bloco A com três repetições de 252 nt, depois o bloco B com 207 nt seguido do bloco C formado por sete unidades de repetição com 264 nt, logo após se apresenta uma repetição do bloco B (SHANKAR *et al.*, 1999).

Variações na estrutura dessa proteína contribuem para a capacidade de *E. faecalis* não ser detectado pelo sistema imunológico e permanecer no sítio de infecção, como descrito por Shankar *et al.* (1999).

Acredita-se que o domínio *N*-terminal dessa proteína que não tem similaridade significativa com nenhuma outra proteína dos bancos de dados pode ser o que contribui na interação com o tecido hospedeiro, porém sem função conhecida, sendo relatada em diversos enterococos isolados de processos infecciosos (GAMA, 2008). Esta proteína segundo Fisher e Phillips (2009) é responsável pela formação de biofilmes de *Enterococcus* mais resistentes ao estresse ambiental.

A proteína de superfície de *E. faecalis* foi considerada como um possível fator de virulência devido a um estudo no qual observou-se sua presença relacionada ao aumento do número de bactérias aderidas a materiais de drenagem biliar (WAAR *et al.*, 2002)

Em estudo realizado por Willems *et al.* (2001) com *E. faecium* resistentes à vancomicina isolados de hospitais nos Estados Unidos, Reino Unido, Holanda e Austrália, que possuíam o gene *esp* conservado enquanto ausente em não-epidêmicos, levaram a acreditar que esse gene esteja associado à disseminação hospitalar e aumento da virulência (MEDEIROS, 2011).

Substância de agregação Agg é uma glicoproteína de superfície, gene *asa1* codificada por plasmídeos e expressa pela indução de ferormônios, convertendo a superfície da parede bacteriana em aderente através do aumento da hidrofobicidade na superfície celular das doadoras, causando a agregação e facilitando a transferência do plasmídeo e adesão nas células eucarióticas (KOCH *et al.*, 2004). Essa substância

contribui para infecções através de inúmeros mecanismos, principalmente transferência de plasmídeos (UPADHYAYA; RAVIKUMAR; UMAPATHY, 2009)

Schlievert *et al.* (1998) em um de seus estudos com endocardite, observaram que as linhagens de *E. faecalis* que apresentavam o gene *asa*, muito comum a essa espécie, mostraram-se mais virulentas no estabelecimento de infecções cardíacas em comparação com linhagens livres desse gene (MEDEIROS, 2011).

Adesina de colágeno (Ace) é uma proteína de superfície celular em enterococos, pertencente à subfamília de adesina, Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMM), é responsável por interceder na ligação ao colágeno, fibronectina e laminina da matriz extracelular do hospedeiro, atuando na patogênese da endocardite (KOCH *et al.*, 2004). Sua presença em comensais e isolados patogênicos de *E. faecalis* é expressa durante a infecção em seres humano (UPADHYAYA; RAVIKUMAR; UMAPATHY, 2009).

Singh *et al.* (2010) confirmaram por um modelo de endocardite animal que a deleção desse gene resulta no aumento da capacidade de *E. faecalis* em colonizar válvulas aórticas, atuando nos estágios iniciais de colonização por ser mediadora da bactéria ao colágeno exposto no sítio vascular, causando endocardite. Lebreton *et al.* (2009) realizaram um estudo com infecções do trato urinário onde a *ace* também demonstrou estar envolvida.

A enzima citolisina ou hemolisina é uma toxina bacteriana portadora de atividade hemolítica em células eucarióticas e bacteriocida em procarióticas, também causadora de β -hemólise em eritrócitos. A produção de hemolisina ocorre pelo requerimento de íons ferro (HUSAIN, 2008). Codificada por um operon com oito genes que constituem o *cyl*, podendo ser localizado no plasmídeo ferormônio-responsivo ou no cromossomo bacteriano (KOCH *et al.*, 2004; SEMEDO *et al.*, 2003).

Segundo Coburn *et al.* (2003) a patogênese da citolisina se deve a sua atividade hemolítica, ocorrendo devido a inibição dos leucócitos e lise dos eritrócitos, a liberação de ferro e nutrientes. Ocorre uma grande incidência de amostras clínicas bacterianas portadoras desse gene (FISHER; PHILLIPS, 2009), alguns enterococos produtores dessa enzima são utilizados como modelo de infecção em animais, associados a infecções severas (UPADHYAYA; RAVIKUMAR; UMAPATHY, 2009).

Segundo Nelson e Cox (2013) a hialuronidase, é uma enzima secretada por algumas bactérias patogênicas, podendo hidrolisar as ligações glicosídicas do hialuronato que é um componente da matriz extracelular de cartilagens e tendões, e essa hidrólise provocar invasão bacteriana. Essa enzima codificada pelo gene *hyl* está relacionada a doenças invasivas, sendo um potencial fator de virulência em várias bactérias gram-positivas. Dados recentes sugerem que a hialuronidase pode contribuir para a invasão da nasofaringe contribuindo de forma não definida na pneumonia pneumocócica causada pela bactéria *Streptococcus pneumoniae* (RICE *et al.*, 2003).

EfaA é um antígeno de endocardite de *E. faecalis* que possui sequência homóloga em 55-60% com um grupo de proteínas, adesinas de enterococos que atua como um receptor solúvel de proteínas de ligação para o transporte de manganês em *E. faecalis*, é responsável pela sobrevivência e crescimento da maioria dos microrganismos (ABRANTES *et al.*, 2011). A função exata desse antígeno como fator de virulência ainda é desconhecido.

A vancomicina é ativa contra a maioria das bactérias gram-positivas, como *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Listerias* e alguns *Bacilos* (CUI *et al.*, 2006). Essa é indicada em pneumonias, meningoencefalites e endocardites estafilocócicas como alternativa às penicilinas (TAVARES, 2001). A vancomicina inibe a síntese da parede celular susceptíveis a ela através de uma ligação na extremidade terminal D-alanina-D-alanina de unidade precursora da parede celular (CUI *et al.*, 2006).

Muitos genes são responsáveis pela resistência à vancomicina, estando entre eles, VanA classificado como altamente resistente, sendo ativado pela exposição da bactéria à vancomicina, induzindo a produção de proteínas que conferem resistência, o fenótipo VanB possui resistência moderada à vancomicina, estes dois são codificados por agrupamentos de gene adquiridos e transferíveis, VanC é de baixo nível e uma propriedade própria de *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*, não sendo transferível, VanD possui baixa resistência à vancomicina (MURRAY, 1998).

Muitos fatores de virulência estão localizados em plasmídeos conjugativos, que são facilmente distribuídos entre as linhagens, podendo transferir esses determinantes de virulência potencialmente patogênicos para a microbiota endógena (JETT *et al.*, 1994).

Murray (1998) descreveu três sistemas diferentes de conjugação que podem ocorrer entre microrganismos, um deles envolve a secreção de ferormônios, peptídeos que sinalizam para diferentes tipos de plasmídeo, quando há resposta, ocorre a transferência do plasmídeo. Outro sistema de conjugação envolve a transferência de plasmídeo entre espécies diferentes, supõe-se que esse foi o mecanismo pelo qual alguns genes de virulência, principalmente resistência tenha sido espalhado entre gêneros diferentes de microrganismos. O terceiro tipo ocorre através dos transposons conjugativos, onde a conjugação ocorre entre diferentes espécies bacterianas, sendo considerada uma das formas mais eficientes e de grande alcance para disseminar um gene de resistência por exemplo. Devido essa capacidade de provocar conjugação entre diferentes células bacterianas, esta técnica de conjugação deve explicar como o gene *tetM* do transposon conjugativo Tn916 se espalhou para além das espécies gram-positivas. Outros genes de resistência a antibióticos como a eritromicina também foram encontrados em transposons conjugativos (JUSTO, 2013).

Os fatores de virulência mais conhecidos em *Enterococcus* são os de resistência a antibióticos, também possuem a habilidade de adquirir resistência a determinados antimicrobianos (MUNDY *et al.*, 2000). Há ainda outros fatores que podem ser adquiridos por troca genética (FURUMURA *et al.*, 2006).

Dados obtidos por Medeiros (2011) sugerem que genes de virulência podem ser encontrados em amostras de origem alimentar, reforçando a importância da segurança na utilização desses microrganismos em alimentos.

2.6. AMINAS BIOGÊNICAS

Aminas biogênicas são compostos orgânicos nitrogenados de origem biológica que apresentam um grupo amino. Possuem baixo peso molecular podendo ser formado a partir da atividade metabólica normal em animais, plantas e microrganismos, produzida pela descarboxilação de aminoácidos livres ou por aminação ou transaminação de aldeídos e cetonas (STADNIK; DOLATOWSKI, 2010). A reação de

descarboxilação envolve a perda da função carboxílica (COO-) dos aminoácidos, liberando dióxido de carbono e formando aminas biogênicas (GOUVEIA, 2013).

Algumas aminas biogênicas possuem atividade biológica, participando de processos fisiológicos importantes, mostrados na Tabela 1, como a putrescina, espermidina e esperina, que atuam no controle das funções dos ácidos nucléicos, divisão celular, síntese de proteínas e estabilização de membranas, a histamina, tiramina e 2-feniletilamina, atuam nas funções no sistema nervoso e pressão sanguínea, sendo a histamina um mediador primário do sistema de respostas alérgicas (HALASZ *et al.*, 1994). O interesse nos estudos das aminas como tiramina e histamina é associado ao risco para saúde humana pelo seu potencial vasoativo (GOUVEIA *et al.*, 2013).

A tiramina é a principal amina encontrada em produtos fermentados (TORRIANI, 2008), provocando o aumento da concentração da noradrenalina no sangue, dor de cabeça, hipertensão e enxaqueca, já a histamina pode levar a dilatação dos vasos sanguíneos, artérias e capilares assim como um desconforto gastrointestinal e edemas (CHANG, 2012).

A tiramina pode ser formada por microrganismos produtores de tirosina-descarboxilase, como exemplo os coliformes, esporos de clostrídeos sulfito-redutores e espécies dos gêneros *Streptococcus* do grupo D, *Proteus* e *Pseudomonas* (MOSSEL; GARCIA, 1985).

Tabela 1 Efeito fisiológico das principais aminas biogênicas

AMINA BIOGÊNICA	EFEITO FISIOLÓGICO/FARMACOLÓGICO
TRIPTAMINA	Hipertensão
PUTRESCINA	Hipotensão, bradicardia, regulação das funções dos ácidos nucléicos e síntese protéica; estabilização das membranas celulares.
CADAVERINA	Hipotensão; bradicardia
2-FENILETLAMINA	Aumento da pressão arterial; aumento do fluxo sanguíneo e força do coração; liberação de noradrenalina a nível do sistema simpático

ESPERMINA	Regulação das funções dos ácidos nucleicos e síntese protéica; estabilização das membranas celulares; desenvolvimento do tecido intestinal.
ESPERMIDINA	Regulação das funções dos ácidos nucleicos e síntese proteica; estabilização das membranas celulares; desenvolvimento do tecido intestinal
TIRAMINA	Aumento da pressão arterial; aumento do débito e força cardíaca; ação hiperglicemiante; liberação de noradrenalina a nível do sistema simpático.
HISTAMINA	Regulador da secreção gástrica; regulação da temperatura corporal; mediador primário da resposta imunitária; liberação de adrenalina e noradrenalina; estimulação do tecido muscular liso.

Fonte: Adaptado de Alfaia (2002) pelo autor.

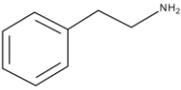
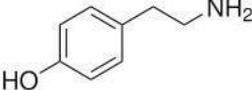
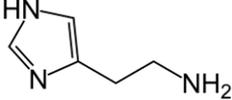
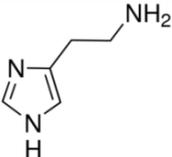
Muitos microrganismos de interesse tecnológico com ação probiótica em alimentos podem produzir aminas biogênicas, (como exemplo a histamina e a tirosina) capazes de provocar reações alérgicas quando presentes em quantidades elevadas em determinados alimentos (GOUVEIA, 2009).

Os processos fermentativos, assim como os de deterioração, podem acarretar proteólise, aumentando a disponibilidade de aminoácidos precursores de aminas biogênicas (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2000).

As aminas biogênicas mais frequentemente encontradas em alimentos são agrupadas em função de sua estrutura química (TABELA 2), sendo estas, monoaminas aromáticas (Tiramina-TYR e 2-feniletilamina-PHE), aminas aromáticas heterocíclicas (histaminas-HIS e triptamina-TRP) diaminas alifáticas putrescina-PUT e cadaverina-CAD e poliaminas alifáticas (espermidina-SPD, espermina-SPM e agmarina (GOUVEIA, 2013).

Tabela 2 Estrutura química das principais aminas biogênicas

Grupos	Composto	Estrutura
--------	----------	-----------

Monoaminas aromáticas	2-Feniletilamina	
	Tiramina	
Aminas heterocíclicas	Histamina	
	Triptamina	
Diaminas alifáticas	Cadaverina	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \cdot 2\text{HCl}$
	Putrescina	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
Poliaminas alifáticas	Espermina	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{H})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
	Espermidina	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{H})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$
	Agmatina	$\text{H}_2\text{N}-\text{C}(\text{NH})=\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4$

Fonte: Adaptado de Gouveia *et al.* (2009) pelo autor.

As aminas biogênicas podem ser de origem exógena ou endógena. As de origem exógena resultam do metabolismo microbiano, em função da descarboxilação dos aminoácidos precursores. As de origem endógena, como as poliaminas naturais, são resultantes de processos metabólicos intracelulares, essenciais para diversos organismos, sendo encontradas em concentrações não tóxicas nos alimentos (CLARO, 2009).

As principais enzimas descarboxilases responsáveis pela síntese das aminas biogênicas em alimentos são de origem bacteriana e são induzidas pelas condições ambientais (MARINÉ *et al.*, 1995).

Masson *et al.* (1996) durante seus estudos, constataram elevada produção de tiramina por *Carnobacterium* e alguns *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus plantarum*. A descarboxilação da histidina está principalmente atribuída à *Escherichia*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Bacillus* e *Lactobacillus* (TIECCO *et al.*, 1986). Latorre-Moratalla *et al.*

(2010), em um estudo recente verificaram que *Enterococcus faecium* e alguns *Staphylococcus* possuem atividade de descarboxilase, que produz elevada quantidade de tiramina e um nível considerável de feniletilamina em produtos fermentados tradicionais europeus.

Segundo Bover-Cid, (2001), os fatores que influenciam na produção de aminas biogênicas por microrganismos estão envolvido na fabricação dos produtos fermentados, fazendo-se necessário um processo de fermentação que limite o acúmulo de aminas biogênicas. É recomendado evitar a utilização de cepas com atividade de descarboxilase como culturas iniciadoras (*starter*), uma vez que essas bactérias podem elevar os teores de aminas biogênicas durante a fermentação (MARTIN *et al.*, 2006). A dose tóxica de aminas biogênicas é difícil de ser estabelecida, pois é dependente de diversos fatores individuais, assim como a presença de outras aminas. Possui um limite incerto, aplicado somente para indivíduos saudáveis (KALAC *et al.*, 2009).

Boa parte dos dados sobre intoxicação por aminas biogênicas refere-se a altas quantidades de histamina ou tirosina nos alimentos, podendo causar aumento da pressão arterial, cefaleia, suores, vômitos e outros. A intoxicação por histamina associada ao consumo de produtos de pesca principalmente, pode causar distúrbios gastrointestinais, cutâneos e neurológicos (ALFAIA, 2002).

A grande frequência desse gene em amostras clínicas bacterianas, em conjunto com a capacidade dos *Enterococcus* em adquirir e compartilhar elementos extra cromossômicos mostra a necessidade do estudo e vigilância desses fatores de virulência.

Métodos moleculares são uma forma mais segura de detectar a produção de aminas biogênicas, podendo ser utilizado técnicas mais avançadas como PCR multiplex com detecção simultânea de bactérias produtoras de aminas biogênicas e PCR em tempo real para uma avaliação quantitativa de bactérias produtoras de aminas biogênicas (TORRIANI, 2008). Outros métodos são as técnicas de PCR convencional e cromatografia, sendo uma solução simples para descrever falso positivo/negativo, comum em meios de rastreio que utilizam indicadores de pH (KUCEROVA, 2009).

3. OBJETIVO

Geral;

Identificar *Lactobacillus* isolados do leite e queijo caprino, selecionando cepas com características probióticas.

Específicos;

- Isolar bactérias a partir do leite e queijo caprino de acordo com as características morfológicas desejadas: lactobacilos, gram-positivos de catalase negativa.
- Diferenciar e identificar as cepas isoladas por técnicas de biologia molecular.
- Observar a presença de genes relacionados a propriedades probióticas e de fatores relacionados à virulência.
- Testar *in vitro* a expressão de alguns dos genes observados, como a capacidade de sobreviver e desconjugar sais biliares e adesão induzida por manose.
- Verificar a inocuidade desses microrganismos de acordo com a capacidade de produzir gelatinase, resistir à vancomicina e produzir aminas biogênicas.

4. METODOLOGIA

4.1. ISOLAMENTO E ARMAZENAMENTO

O isolamento das bactérias lácticas de leite e queijo artesanal caprino fabricados na Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE, foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Laboratório de Ciências e Tecnologia de Alimentos (LCTA).

Amostras de 50 mL de leite de cabra cru e 100 g de queijo artesanal, processado com leite caprino cru, foram coletadas em recipiente estéril de forma asséptica e mantidos conservados em torno de 4 a 7°C até o momento do isolamento.

O leite foi incubado a 37°C por 24 h enquanto a amostra de queijo foi fracionada e homogeneizada. Amostras de 25 g do queijo foram transferidas para um saco de bagmixer e adicionados 225 mL de água peptonada 0,1% (Oxoid). As duas amostras sofreram diluição decimal seriada e foram plaqueadas por superfície em ágar MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) acidificado, pH 5,4, para selecionar BAL. As placas foram incubadas por 24-48 h à 37°C. Colônias isoladas e distintas foram transferidas para um tubo contendo caldo MRS e novamente cultivadas por 24 h à 37°C sendo em seguida plaqueadas e incubadas por mais 24 h à 37°C para purificação dessas colônias, quando foi observada a formação de colônias com morfologias diferentes. Após a purificação foi realizada a coloração de Gram e o teste de catalase, e os isolados conservados em caldo MRS adicionado de glicerol a 10% em uma temperatura de -80°C até o momento do manuseio.

Para ativação, as cepas foram cultivadas em caldo MRS por 24 h à 37°C e reativadas em caldo MRS por 24 h à 37°C para serem utilizadas nas análises.

4.2. IDENTIFICAÇÃO

Dos 200 isolados, foram selecionados 68 de acordo com suas características morfológicas, essas 68 amostras isoladas de leite e queijo caprino foram cultivadas em caldo MRS por 24 h à 37 °C e tiveram seu ADN extraído utilizando o kit ZR Fugal/Bacterial DNA (Zymo Research, Irvine, CA, USA) e a concentração do ADN determinada por NanoDrop (Thermo). Esse ADN foi diferenciado pela amplificação aleatória de ADN polimórfico PCR (RAPD) utilizando os *primers* OPL14 (5'-GTGACAGGCT-3') e OPL20 (5'-TGGTGGACCA-3') separadamente em reações de 25 µL contendo 2 µL do ADN (concentração em torno de 20 ng/µL), 13,3 µL de água ultrapura estéril 2,5 µL de dNTP's 0,7 µL primer em 10 mM, 2 µL de MgCl₂ em 25 mM e 0,5 µL de Taq polimerase, amplificado em 45 ciclos de 94°C por 1 min, 28 °C por 1 min, 72°C por 2 min e 75°C por 5 min, segundo Todorov *et al.* (2010). O produto foi separado por eletroforese em gel de agarose 1,5 % em tampão 0.5x TAE em 100 V durante 2 h. Os géis foram corados em tampão 0.5x TAE contendo 0,5µL/mL de brometo de etídeo (Sigma-Aldrich Diagnostics, St. Louis, MO, USA).

A partir dos dados obtidos com o RAPD, as bactérias que geraram perfis idênticos foram divididas em grupos e um representante de cada grupo teve a sequência conservada, 16S sequenciada no centro de estudos do genoma humano no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Brasil e identificadas de acordo com a comparação entre as sequências obtidas e as sequências conhecidas no GenBank utilizando BLAST (Basic Local Aligment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

4.3. POTENCIAL PROBIÓTICO

4.3.1. PRESENÇA DE GENES ASSOCIADOS A PROPRIEDADES PROBIÓTICAS

Para avaliar a presença dos genes codificantes das proteínas de adesão *map*, *mub* e para o fator de alongamento *ef-tu*, assim como o de adesão específica a manose *msa* e o gene codificante da enzima hidrolase de sais biliares *bsh*, foram utilizadas as sequências dos *primers* apresentados na Tabela 3, em reações de 20 µL descritas na Tabela 4. O produto da amplificação foi avaliado em gel de agarose nas concentrações de 1-2% e 0,5x de tampão TBE contendo brometo de etídeo, em 100V durante 1 h, e visualizado em luz UV.

Os iniciadores *msa*, *map* e *bsh* foram projetados a partir da sequência de *L. plantarum* WCFS1 (número de acesso NC 004567). *Ef-tu* e *mub* a partir da sequência de *L. acidophilus* NCFM (número de acesso NC 006814), segundo Ramiah *et al.* (2007).

Tabela 3 Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na investigação de propriedades de adesão à mucosa intestinal e hidrólise de sais biliares no ADN total isolado de cepas de *Lactobacillus* spp.

Genes probióticos	Primer (5'-3')	bp	Referência
<i>msa</i>	GCTATTATGGGGATTACGTTG CTGTCTTGACAATAGCCATATA	1740	Zago <i>et al.</i> , 2011
<i>map</i> 423	TGGATTCTGCTTGAGGTAAG GACTAGTAATAACGCGACCG	156	Ramiah <i>et al.</i> 2007
<i>mub</i> 423	GTAGTTACTCAGTGACGATCAATG TAATTGTAAAGGTATAATCGGAGG	150	Ramiah <i>et al.</i> , 2007

Continua...

Genes probióticos	Primer (5'-3')	bp	Referência
<i>Ef-tu4 423</i>	TTCTGGTCGTATCGATCGTG CCACGTAATAACGCACCAAC	161	Ramiah <i>et al.</i> 2007
<i>bsh</i>	CGTATCCAAGTGCTCATGGTTTAA ATGTGTACTIONGCCATAACTTATCAATCTT	919	Zago <i>et al.</i> , 2011

msa (adesina manose específica), *map* (adesão as proteínas produtoras de muco) *mub* (proteínas de ligação a mucosa) *ef-tu* (fator de alongamento Tu) *bsh* (hidrolase de sal biliar). **Fonte:** Autor

Tabela 4 Reações e condições da PCR para os iniciadores relacionados a características de efeito probiótico

Reações	<i>msa</i>	<i>map</i>	<i>mub</i>	<i>Ef-tu</i>	<i>bsh</i>
ADN 20ng/μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL	5 μL
Buffer 10x	2 μL	2 μL	2 μL	2 μL	2 μL
Água ultrapura	5,3 μL	6 μL	6 μL	6 μL	1,3 μL
dNTP's 2,5mM	1,6 μL	1,6 μL	1,6 μL	1,6 μL	1,6 μL
Primer 1 10pmol	2 μL	2 μL	2 μL	2 μL	2 μL
Primer 2 10pmol	2 μL	2 μL	2 μL	2 μL	2 μL
MgCl ₂ 5mM	2 μL	1,2 μL	1,2 μL	1,2 μL	6 μL
taq	0,1 μL	0,2 μL	0,2 μL	0,2 μL	0,1 μL
Condições					
Desnaturação inicial	94°C-4min	94°C-5min	94°C-5min	94°C-5min	94°C-4min
35 ciclos (desnaturação, hibridização e extensão)	94°C-30s. 47°C-30s. 72°C- 1min.	94°C-30s. 48°C-30s. 72°C-30s.	94°C-30s. 46°C-30s. 72°C-30s.	94°C-30s. 50°C-30s. 72°C-30s.	94°C-30s. 55°C-30s. 72°C- 1min.
Extensão final	72°C-7min	72°C-7min	72°C-7min	72°C-7min	72°C-7min
Armazenam	4 °C ∞	4 °C ∞	4 °C ∞	4 °C ∞	4 °C ∞

Fonte: Autor

4.3.2. HIDRÓLISE DE SAIS BILIARES

A metodologia utilizada para esse teste foi descrita por Bude-Ugarte *et al.* (2006), com modificações. As cepas de *Lactobacillus* foram cultivadas em caldo MRS por 48 h à 37°C. Após esse período, discos de papel filtro estéreis foram embebidos no caldo do cultivo e dispostos em placas de *Petri* previamente preparados com ágar MRS adicionado de 0,5% (p/v) de cada um dos sais sódicos de ácidos biliares testados. Foram utilizados: ácido taurocólico (TC, Taurocholic acid sodium salt hydrate 95%), taurodesoxicólico (TDC, Sodium taurodeoxycholate hydrate minimum 97%), glicocólico (GC, Sodium glycocholate hydrate 97%) e glicodesoxicólico (GDC, Sodium glicodeoxycholate 97%), todos da Sigma-Aldrich (St. Louis). Em seguida, as placas foram incubadas anaerobicamente por 72 h a 37°C. A presença de precipitado opaco na área de crescimento bacteriano foi considerada como resultado positivo, indicando a desconjugação do respectivo ácido biliar. O teste foi realizado em três repetições independentes.

4.3.3. AGLUTINAÇÃO DE LEVEDURA

O ensaio seguiu a metodologia descrita por Pretzer *et al.* (2005), com modificações. As bactérias foram cultivadas por 24 h à 37°C em caldo MRS para as cepas de *Lactobacillus* spp. avaliadas em Trypticase Soy Broth (TSB) para a *Escherichia coli* INCQS 00033 (Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil), utilizada como controle positivo. Ao final do cultivo, as bactérias foram centrifugadas a 7000 x g por 5 min temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$), lavadas e suspensas em 0,1 mL de solução salina tamponada com fosfato (Phosphate buffered saline - PBS, 0,1 M pH 7,4). Em seguida, 50 μL dessa suspensão bacteriana foram transferidos para placa de microtitulação de 96 poços e adicionado a cada poço 50 μL do tampão PBS ou tampão PBS contendo D-Manose (25 mM e 100 mM). Após 30 min à 37°C foram adicionados, a cada poço, 100 μL de *Saccharomyces cerevisiae* a 1,0% (p/v) em PBS. As placas foram agitadas à 150 RPM por 1 h à temperatura ambiente e, em seguida, 20 μL foram transferidos do poço

para a lâmina, que foi visualizada em microscópio óptico com 100 vezes de ampliação (Physis). Foi comparada a capacidade das bactérias de induzirem aglutinação das células de levedura em tampão na ausência e presença da manose. O teste foi realizado com três experimentos independentes.

4.3.4. AGREGAÇÃO DE LEVEDURA

Coagregação é um processo pelo qual as bactérias geneticamente distintas tornam-se ligadas umas às outras através de moléculas específicas, como a interação entre adesinas, que são glicoproteínas ou lipoproteínas que se ligam ao seu receptor específico, que podem ser carboidratos ou resíduos peptídicos, esses devem ser expressos na superfície da parede bacteriana (BASSON, 2008).

As cepas de lactobacilos após serem cultivadas em caldo MRS e a bactéria utilizada como controle positivo (*Escherichia coli* INCQS 00033) em TSB, foram centrifugadas a 7000 x g por 5 min à 25°C, lavadas e suspensas em PBS, 0,1 M pH 7,4.

A densidade ótica (DO)_{580nm}, das cepas foi ajustada em espectrofotômetro (Analítica – LibraS12) para turbidez correspondente a $1,8 \times 10^9$ células/mL, equivalente ao tubo 6 na escala de Mac Farland, sendo esta etapa de padronização da concentração de células de grande importância para o teste. Após o ajuste, 1 mL de suspensão celular foi transferido para tubo eppendorf, centrifugado 7000 x g por 5 min à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$) e ressuspensão em 1 mL de PBS contendo 0,3 M de manose, mantendo as células bacterianas em contato com a manose por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, 1 mL de suspensão em PBS de fermento biológico, *S. cerevisiae* 1,0% (p/v) foi adicionado aos tubos contendo as bactérias com e sem manose, os quais foram agitados durante 1 h à temperatura ambiente.

Após esse período, os 2 mL de suspensão celular foram transferidos para uma cubeta de plástico e a DO₅₈₀ foi verificada a cada 10 min durante uma hora, para determinação da velocidade de sedimentação (abs/min) da levedura com a bactéria em função da interação entre elas e a influência da manose sobre essa ligação. O controle

negativo foi a suspensão de levedura em PBS com e sem manose. O teste foi realizado em três repetições independentes.

4.3.5. HIDROFOBICIDADE

Outra forma de testar a capacidade de adesão das bactérias é com base na hidrofobicidade da superfície celular. A metodologia utilizada para o teste de hidrofobicidade foi descrita por Vinderola e Reinheimer (2003). Consiste na determinação da hidrofobicidade da superfície das células bacterianas pela habilidade de aderirem a hidrocarbonetos. A queda na absorvância da fase aquosa é considerada como medida de hidrofobicidade da superfície celular (VINDEROLA; REINHEIMER, 2003).

As cepas testadas foram cultivadas em caldo MRS por 24 h à 37 °C. Dois mililitros de cada cultura foram centrifugados por 5 min. a 7000 x g à 4 °C, células lavadas duas vezes com 1 mL de tampão fosfato pH 6,8 (0,1M) e ressuspendido em seu volume inicial (2 mL) com o mesmo tampão. As leituras da absorvância foram realizadas em um comprimento de onda de 560 nm e ajustadas com tampão fosfato para leitura mais próxima de um, sendo essa a leitura inicial (A_0). A variação de A_0 entre as cinco repetições da mesma cepa foi, desta forma, minimizada. Após o ajuste da absorvância, 3 mL de cada suspensão foram transferidos para tubo de ensaio estéril, adicionado de 0,6 mL de hexadecano (Sigma-Aldrich), homogeneizado por 2 min e incubado em banho-maria por 1 h à 37 °C. Após esse período, uma quantidade suficiente para a leitura da absorvância foi retirada cuidadosamente do fundo do tubo com pipeta de Pasteur, para não coletar o hexadecano, e feita a leitura final (A). Os valores são expressos em porcentagem de bactérias que aderem a hidrocarbonetos pela seguinte equação:

$$(\%) = [(A_0 - A) / A_0] * 100$$

Onde cada valor representa a média do experimento realizado com cinco repetições. As cepas foram consideradas fortemente hidrofóbicas quando obtinham valor superior a 50%, moderadamente hidrofóbicas quando se encontravam entre 20 -50% e hidrofílicas quando o valor foi inferior a 20%.

4.4. POTENCIAL DE VIRULÊNCIA

4.4.1. PRESENÇA DE GENES ASSOCIADOS A FATORES DE VIRULÊNCIA, RESISTÊNCIA À VANCOMICINA E PRODUÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS

O ADN das vinte e nove cepas foram testados quanto à presença dos seguintes genes relacionados à virulência: *gelE* (gelatinase), *hyl* (hyaluronidase), *asa1* (substância de agregação), *esp* (proteína de superfície de enterococos), *cylA* (citolisina), *efaA* (antígeno endocardite), *ace* (adesão de colágeno), *vanA* e *vanB* (resistência à vancomicina) e os genes associados à produção de aminos biogênicos: *hdc1* e *hdc2* (histidina descarboxilase), *tdc* (tirosina descarboxilase) e *odc* (ornitina descarboxilase). O ADN foi amplificado utilizando técnica de PCR e os *primers* descritos na Tabela 5, com base no protocolo descrito por Favaro *et al.* (2014), De las Rivas *et al.* (2005), Martin Platero *et al.* (2009) e Vankerckhoven *et al.* (2004). As reações de 20 µL, foram compostas por MgCl 5 mM, *primers* 10 pmol/µL, dNTP's 2,5 mM, tampão 10x, Taq polimerase 5 U/µL (Invitrogen, Brasil), água ultrapura e ADN submetidas a um ciclo inicial de desnaturação 94 °C/4 min, anelamento a temperatura apropriada por *primer* e extensão a 72 °C/7 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão indicado para cada *primer*.

O produto amplificado foi separado por eletroforese em gel de 1-2% de agarose MS-6 (METAGEL, Laboratorios CONDA) com brometo de etídeo (Sigma) em tampão TBE 0,5x (2 µL/50 mL) 100 V por 45 min e visualizado em transluminador sob luz UV.

Tabela 5 Oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados na investigação da presença de fatores de virulência no ADN total isolado de cepas de *Lactobacillus spp.*

Genes (bp)	Primer (5'-3')	Condições	Referência
gelE (213)	TATGACAATGCTTTTTGGGAT AGATGCACCCGAAATAATATA	94°C-1min 47°C-1min 72°C-1min	Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004
hyl (276)	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	94°C-1min 53°C-1min 72°C-1min	Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004
asa1 (375)	GCACGCTATTACGAACTATGA TAAGAAAGAACATCACCCACGA	94°C-1min 52°C-1min 72°C-1min	Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004
esp (510)	AGATTTTCATCTTTGATTCTTG AATTGATTCTTTAGCATCTGG	94°C-1min 47°C-1min 72°C-1min	Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004
cylA (688)	ACTCGGGGATTGATAGGC GCTGCTAAAGCTGCGCTT	94°C-1min 50°C-1min 72°C-1min	Vankerckhoven <i>et al.</i> , 2004
efaA (688)	GCCAATTGGGACAGACCCTC CGCCTTCTGTTCCCTTCTTTGGC	94°C-1min 57°C-1min 72°C-1min	Martin-Platero <i>et al.</i> , 2009
ace (1008)	GAATTGAGCAAAAAGTTCAATCG GTCTGTCTTTTCACTTGTTTC	94°C-1min 48°C-1min 72°C-1min	Martin-Platero <i>et al.</i> , 2009
Resistência a antibióticos			
vanA (377)	TCTGCAATAGAGATAGCCGC GGAGTAGCTATCCCAGCATT	94°C-1min 52°C-1min 72°C-1min	Martin-Platero <i>et al.</i> , 2009
vanB (529)	GCTCCGCAGCCTGCATGGACA ACGATGCCGCCATCCTCCTGC	94°C-1min 60°C-1min 72°C-1min	Martin-Platero <i>et al.</i> , 2009
Aminas biogênicas			
hdc1 (367)	AGATGGTATTGTTTCTTATG AGACCATACACCATAACCTT	94°C-30s 46°C-30s 72°C-2min	De Las Rivas <i>et al.</i> , 2005
hdc2 (534)	AAYTCNTTYGAYTTYGARAARGARG ATNGGNGANCCDATCATYTTTRTGNCC	94°C-30s 50°C-30s 72°C-2min	De Las Rivas <i>et al.</i> , 2005
Tdc (924)	GAYATNATNGGNATNGGNYTNGAYCARG CCRTARTCNGGNATAGCRAARTCNTRTG	94°C-30s 55°C-30s 72°C-2min	De Las Rivas <i>et al.</i> , 2005
Odc (1446)	GTNTTYAAYGCNGAYAARCANTAYTTYGT ATNGARTTNAGTTCRCAYTTYTCNGG	94°C-30s 54°C-30s 72°C-2min	De Las Rivas <i>et al.</i> , 2005

gelE (gelatinase), *hyl* (hialuronidase), *asa1* (agregação de substância), *esp* (proteína de superfície de *Enterococcus*), *cylA* (citolisina), *efaA* (antígeno de endocardite), *ace* (adesão ao colágeno), *vanA* e *vanB* (resistência a vancomicina), *hdc1* e *hdc2* (histidina decarboxilase), *tdc* (tirosina decarboxilase), e *odc* (ornitina decarboxilase). **Fonte:** Favaro *et al.* (2014)

4.4.2. GELATINASE

Foi avaliada a capacidade da cepa de hidrolisar gelatina, provocando a liquefação do meio, composto por peptona bacteriológica 0,1%, extrato de carne e suplementado com 12% de gelatina bovina. As bactérias foram cultivadas em caldo MRS por 24 h à 37°C e posteriormente inoculadas no meio contendo gelatina com a ajuda de uma agulha estéril, que é mergulhada no meio de cultura e disposto no centro até o fundo do tubo. Esses são incubados à 37°C por 24 h. Após esse período os tubos de bactérias crescidas em meio com gelatina foram refrigerados por 30 min à 4°C. As amostras que apresentaram liquefação do meio foram consideradas positivas enquanto que as amostras com o meio ainda sólido foram mantidas por mais 48 h à 37°C e novamente resfriadas, sendo consideradas negativas as que ainda se mantiveram sólidas.

4.4.3. ATIVIDADE HEMOLÍTICA

As cepas foram cultivadas em caldo MRS por 24 h à 37°C, centrifugadas (10.000 x g/15 min), sendo seu sobrenadante armazenado em tubo falcon estéril. O sangue de coelho foi centrifugado (3000 x g/5 min) lavado de três a cinco vezes com NaCl 0,15 M e ajustado para uma concentração de hemolisina a 1% em NaCl. Após esse processo, 500 µL da amostra e 500 µL do sangue a 1% foram transferidos para um eppendorf estéril e incubados por 30 min à 37°C. Após esse período, foram centrifugadas (14.000 x g / 30 s) e feita a leitura da absorbância das amostras (A_a) em um comprimento de onda de 540 nm. O teste foi realizado em triplicata.

Para determinar a lise espontânea das hemácias (A_B) 500 µL do caldo MRS foram adicionados de 500 µL de hemácias de coelho a 1%, em paralelo às amostras avaliadas. Para determinar a lise completa das hemácias (A_{100}) foram utilizados 500 µL de triton X-100 em concentração de 0,1% e adicionados de 500 µL de hemácias a 1%. A porcentagem de lise desencadeada pelas amostras foi obtida pelo seguinte cálculo:

$$\% = \frac{(A_a - A_B)}{(A_{100} - A_B)} * 100$$

Uma unidade hemolítica (UH) foi determinada como a quantidade de amostra capaz de gerar por mL 50% de lise da suspensão de hemácias de coelho a 1%.

4.4.4. RESISTÊNCIA À VANCOMICINA

O método utilizado para avaliação de resistência a antibióticos foi descrito por Charteris *et al.* (1998), trata-se de um método de difusão em disco. As cepas foram cultivadas em caldo MRS por 48 h à 37 °C. Após este período as bactérias foram diluídas de forma seriada em água peptonada tamponada (APT) até uma diluição de 10^{-7} , para posteriormente serem plaqueadas por semeadura em profundidade em ágar MRS. Após a solidificação do meio, discos contendo a concentração de 30 g de vancomicina (Oxoid), foram dispostos em placas inoculadas com a cepa, sendo incubado por 24 h à 37 °C em aerobiose. Após esse período, verificou-se a formação de zonas de inibição ao redor dos discos, o diâmetro dessa foi medido e comparado com a tabela de Charteris *et al.* (1998) indicando por seu valor a resistência ou susceptibilidade da cepas para o antibiótico.

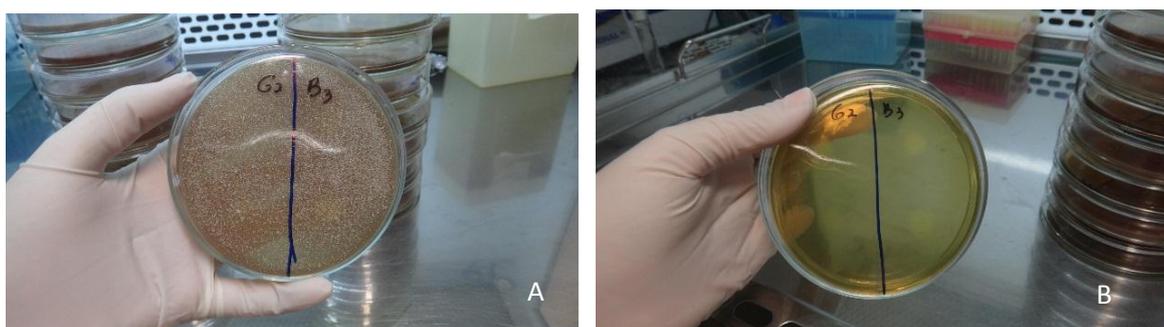
4.4.5. AMINAS BIOGÊNICAS

O meio de descarboxilação utilizado para o teste foi descrito por Bover-Cid e Holzapfel (1999), baseado no meio utilizado por Joosten e Northold (1989), com algumas modificações. É composto por 0,5% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de extrato de carne, 0,25% de cloreto de sódio (NaCl), 0,05% de glicose ($C_6H_{12}O_6$), 0,02% de sulfato de magnésio ($MgSO_4$), 0,005% de sulfato de manganês ($MnSO_4$), 0,004% de sulfato de ferro ($FeSO_4$), 0,01% de carbonato de cálcio ($CaCO_3$) e 0,2% de fosfato dipotássico (K_2HPO_4) - o que favorece o efeito tampão e neutraliza os ácidos produzidos durante a multiplicação bacteriana - mais 1% do aminoácido testado: L-histidine (99%, Sigma- Aldrich) para verificar a produção de histaminas, ou L-tyrosine disodium salt hydrate (99%, Sigma- Aldrich) para a produção de tiramina. Foi utilizado 0,005% de piridoxal-5-fostato hidratado (98%, Sigma- Aldrich) como cofator na reação de descarboxilação, 0,2% de citrato de amônio e 0,1% de Tween 80 para favorecer o

desenvolvimento das bactérias, 0,001% de tiamina para auxiliar a multiplicação bacteriana, 0,006% do bromocresol purple como indicador de pH e 2% de ágar bacteriológico. O pH foi ajustado para 5,3 favorecendo a síntese e atividade das enzimas descarboxilases, sem interferir no crescimento bacteriano, pois BALs são tolerantes e crescem em pH 5,0. O meio foi autoclavado por 15 min à 121°C.

As vinte e nove cepas de *Lactobacillus* spp foram cultivadas em caldo MRS suplementado com 0,1% do aminoácido testado e 0,005% de piridoxal-5-fosfato, tendo o pH do meio ajustado para 6,2 e incubadas por 48 h à 37°C. Para avaliar a produção de tiramina fora utilizados como controles positivo duas cepas de *Enterococcus faecium* (L2-3 e L3-4, coleção da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE), e para histamina duas cepas de *Staphylococcus aureus* (6538 e 6539 – ATCC, Embrapa CNPAT), as quais foram cultivadas sob as mesmas condições das cepas a serem avaliadas. Após o período de incubação, 10 µL da cultura foi inoculado em placas previamente preparadas com o meio de descarboxilação na presença e ausência do aminoácido (FIGURA 2) e incubadas por 96 h à 37°C em condições aeróbicas e anaeróbicas, paralelamente. O teste foi realizado em duplicata.

Figura 2 Aspecto das placas suplementadas com o meio descarboxilativo e os aminoácido testado.



Placas suplementadas com o aminoácido A) Tirosina. B) Histidina. Fonte: Autor.

5. RESULTADOS

5.1. ISOLAMENTO

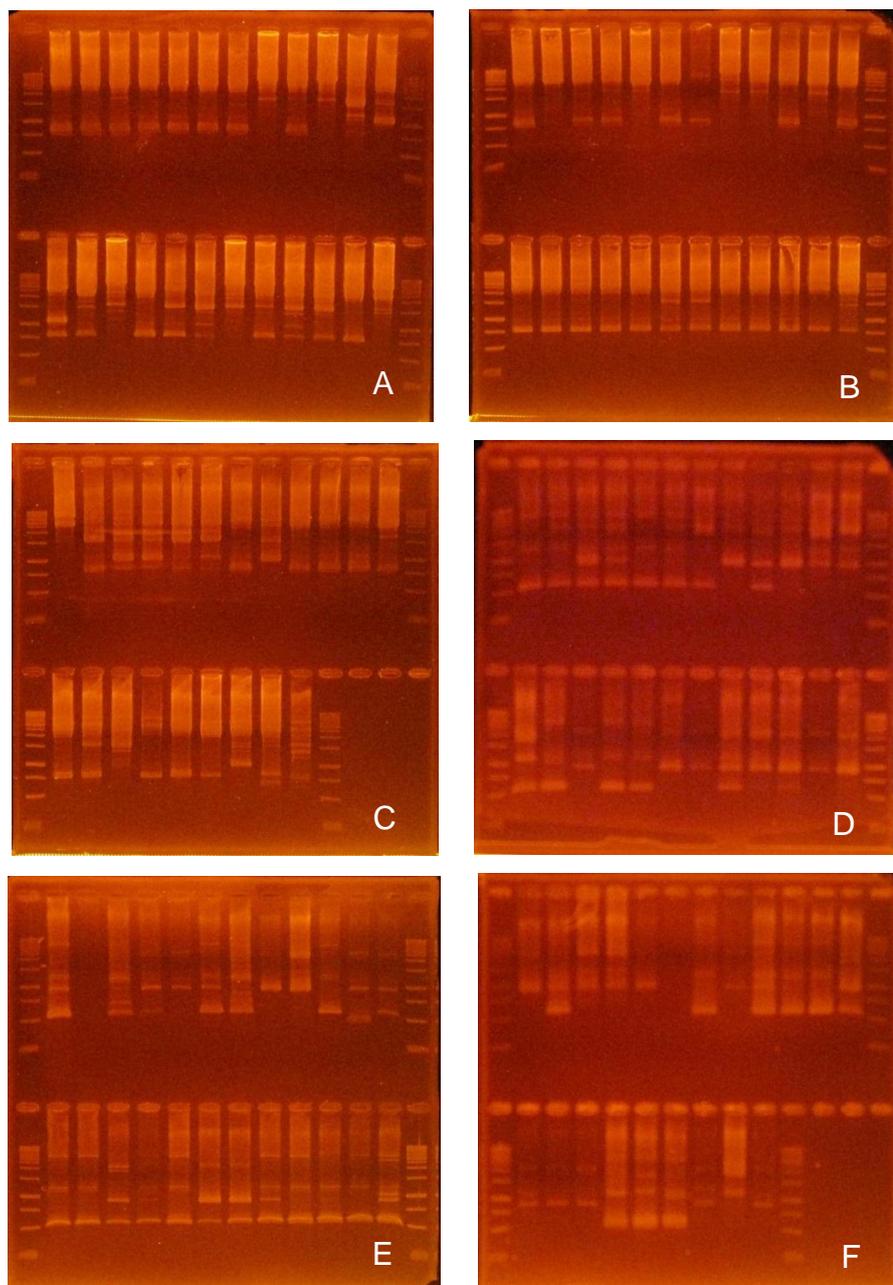
Foram isoladas aproximadamente 200 amostras bacterianas do leite e queijo caprino produzidos na Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE, Brasil. Os isolados foram avaliados quanto a sua morfologia pelo método de coloração de Gram e produção de catalase. Dos 200 isolados, apenas 68 possuíam as características desejadas para o estudo, bacilos Gram-positivos e catalase negativa.

5.2. IDENTIFICAÇÃO

Os 68 isolados selecionados no processo de isolamento tiveram seu ADN extraído e submetido à técnica de RAPD-PCR. Com base na comparação entre os perfis gerados (FIGURA 3), as amostras foram divididas em 23 grupos de acordo com sua semelhança genética. Após esta seleção, um representante de cada grupo foi selecionado para ser identificado pela análise do sequenciamento da região 16S do rRNA e da região gênica espaçadora 16-23S. Os isolados foram identificados como sendo 22 *Lactobacillus plantarum*, e 1 *Enterococcus faecium*, como apresentado na Tabela 6.

Das amostras identificadas, as vinte e duas das cepas de *L. plantarum* foram selecionadas para avaliação do seu potencial probiótico e de fatores de virulência, sendo acrescentado ao grupo teste 3 *Lactobacillus mucosae* e 4 *L. plantarum* identificados anteriormente, pertencentes à coleção da Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral/CE, Brasil.

Figura 3 Géis das amostras obtidos utilizando técnica de RAPD-PCR



Géis de RAPD dos 68 isolados, obtidos pela amplificação do *primer* OPL14 (A, B e C) e *primer* OPL20 (D, E e F). **Fonte:** Autor.

Tabela 6 Identificação moléculas das bactérias

Cepas	Identificação	Valor-E	%	Score
G2	<i>L. plantarum</i>	0,0	98	1563
G6	<i>L. plantarum</i>	0,0	97	1632
G8	<i>L. plantarum</i>	0,0	98	1627
Q6	<i>L. plantarum</i>	0,0	98	1571
Q24	<i>L. plantarum</i>	0,0	98	1580
Q84	<i>L. plantarum</i>	0,0	94	1074
Q90	<i>L. plantarum</i>	0,0	98	1514
T1-4	<i>L. plantarum</i>	0,0	98	1576
1	<i>L. plantarum</i>	0,0	98	1620
15	<i>L. plantarum</i>	0,0	98	1470
16	<i>L. plantarum</i>	0,0	98	1608
23	<i>L. plantarum</i>	0,0	99	1625
32	<i>L. plantarum</i>	0,0	98	1589
50	<i>L. plantarum</i>	0,0	96	1435
70	<i>L. plantarum</i>	0,0	98	1598
113	<i>L. plantarum</i>	0,0	99	1648
115	<i>L. plantarum</i>	0,0	98	1500
122	<i>L. plantarum</i>	0,0	97	1571
123	<i>L. plantarum</i>	0,0	98	1535
124	<i>L. plantarum</i>	0,0	98	1617
126	<i>L. plantarum</i>	0,0	99	1602
129	<i>L. plantarum</i>	0,0	98	1557
Q80	<i>E. faecium</i>	5e-08	94	59.4

Identificação da espécie das amostras, valor E, porcentagem de identificação e valor de Score obtido no processo de identificação das amostras. **Fonte:** Autor

5.3. POTENCIAL PROBIÓTICO

5.3.1. PRESENÇA DE GENES ASSOCIADOS A PROPRIEDADES PROBIÓTICAS

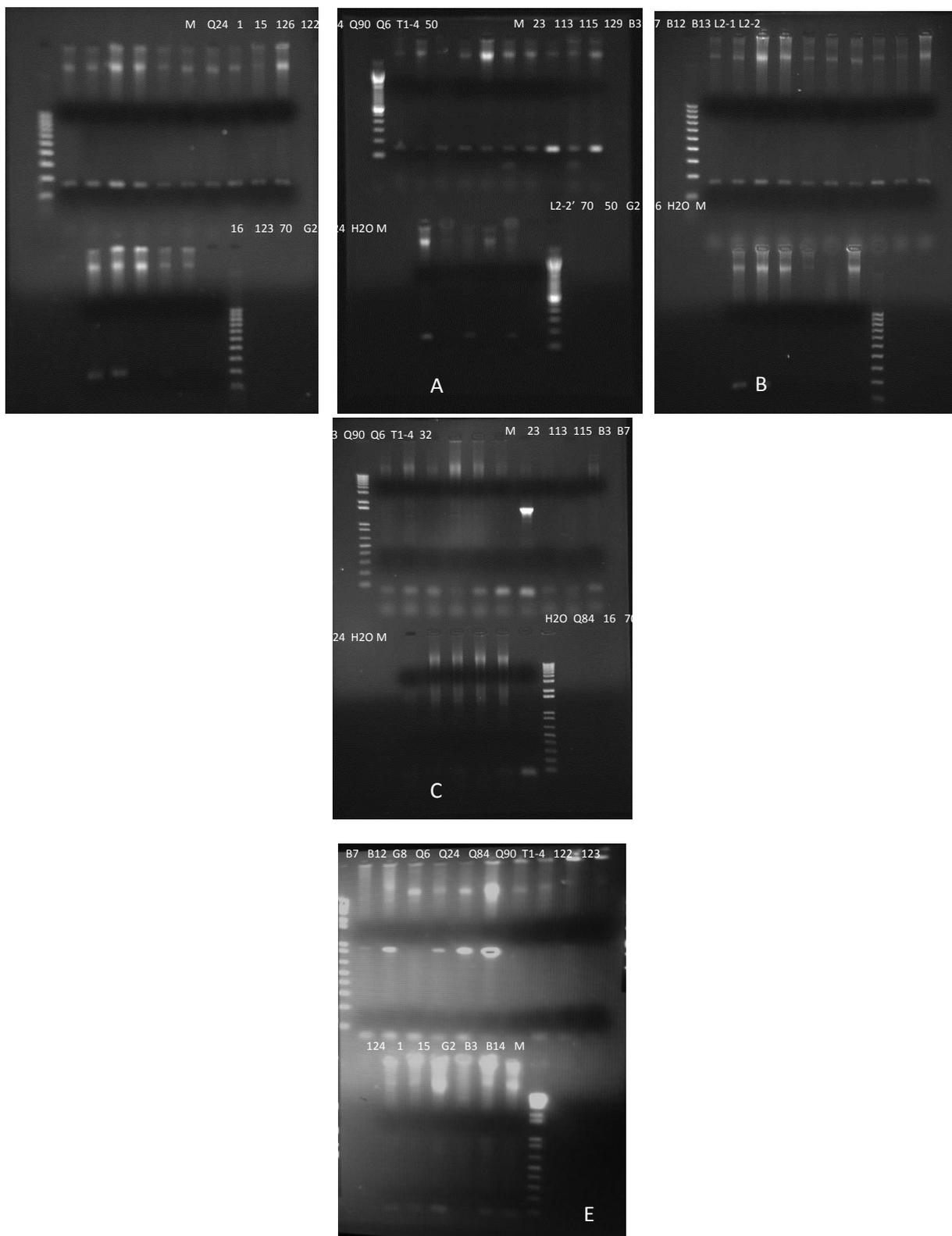
As vinte e nove cepas foram avaliadas por PCR quanto à presença dos genes relacionados a características probióticas como o gene *bsh*, codificante para a enzima hidrolase de sais biliares (BSH) e os seguintes genes de adesão, *msa* que é associado especificamente à adesão por manose e os genes de adesão às proteínas produtoras de muco, *map* e as proteínas de ligação à mucina, *mub*. As amostras de ADN também foram testadas quanto à presença do gene *ef-tu*, codificante para uma proteína multifuncional que é um fator de alongamento que também medeia a adesão à mucosa, facilitando a colonização das células intestinais. A presença de *amplicon* no gel (FIGURA 4) representando as amplificações dos respectivos fragmentos de ADN, de acordo com os oligonucleotídeos iniciadores listados na Tabela 3 foi considerada como resultado positivo.

Os resultados da detecção dos genes estão apresentados na Tabela 7. Dez das cepas avaliadas possuem o gene correspondente à enzima BSH, presente tanto entre as cepas de *L. mucosae* como em *L. plantarum*.

Os genes *ef-tu*, *map* e *mub* foram detectados em quase todas as cepas avaliadas, compartilhando do mesmo resultado, ausentando-se apenas nas cepas G2, 70 e 124. O gene *msa* foi o gene de adesão menos encontrado nas cepas estudadas, presente apenas em duas cepas de *L. mucosae*.

Devido à baixa frequência na amplificação do *primer msa*, foi realizada uma comparação por BLAST do *primer* com as sequências da base de dados GenBank NCBI. Este apresentou diferenças nos nucleotídeos dos iniciadores, assim como diferenças no comprimento do *amplicon* em relação a sequência do gene *msa* em *L. plantarum*.

Figura 4 Géis referentes ao rastreio por genes de potencial probiótico



A) *map* B) *mub* C) *ef-tu* D) *msa* E) *bsh*. O marcador utilizado foi o de 100bp para os *primers map*, *mub* e *ef-tu* enquanto que para os *primers msa* e *bsh* utilizou-se o marcados de 1Kb de acordo com os pares de base do produto. **Fonte:** Autor

Tabela 7 Presença dos genes associados a características probióticas nas cepas de *L. plantarum* e *L. mucosae*.

Cepas	<i>bsh</i>	<i>msa</i>	<i>map</i>	<i>mub</i>	<i>Ef-tu4</i>
B3	+	-	+	+	+
B7	+	-	+	+	+
B12	+	-	+	+	+
B13	+	-	+	+	+
B14	-	-	+	+	+
G2	-	-	-	-	-
G6	+	-	+	+	+
G8	-	-	+	+	+
L2-1	+	-	+	+	+
L2-2	+	+	+	+	+
L2-2'	+	+	+	+	+
Q6	+	-	+	+	+
Q24	+	-	+	+	+
Q84	+	-	+	+	+
Q90	-	-	+	+	+
T1-4	-	-	+	+	+
1	-	-	+	+	+
15	-	-	+	+	+
16	-	-	+	+	+
23	-	-	+	+	+
32	-	-	+	+	+
50	-	-	+	+	+
70	-	-	-	-	-
113	-	-	+	+	+
115	-	-	+	+	+
122	-	-	+	+	+
123	-	-	+	+	+
124	-	-	-	-	-
126	-	-	+	+	+
129	-	-	+	+	+

Fonte: Autor

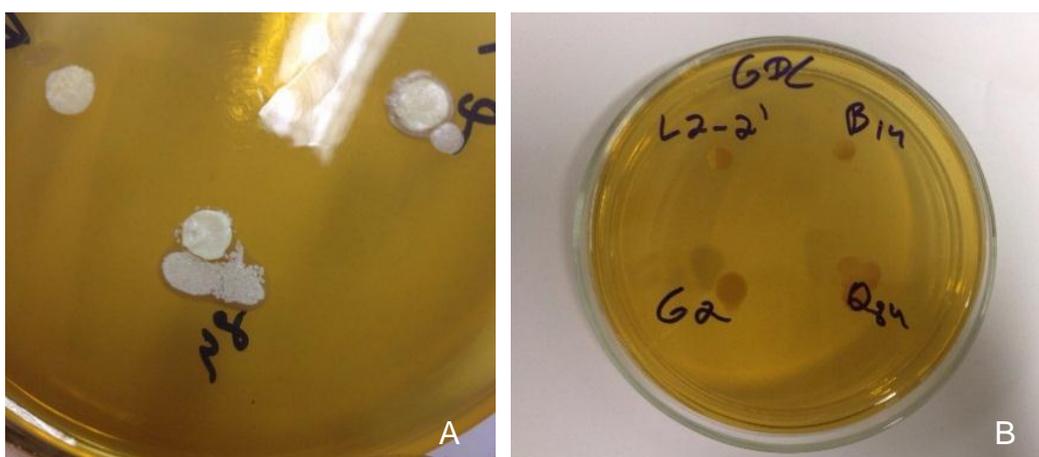
5.3.2. DESCONJUGAÇÃO DE SAIS

O resultado referente à capacidade de sobreviver e hidrolisar os quatro tipos de sais biliares testados nas 27 cepas de *L. plantarum* e três *L. mucosae* são apresentados na Tabela 8. Observa-se que das vinte e nove cepas avaliadas, apenas seis não foram capazes de crescer na presença de sais sódicos do ácido glicodesoxicólico (GDC), enquanto vinte e três delas desconjugaram pelo menos um tipo de sal biliar, sendo os sais dos ácidos desoxicólicos, GDC e TDC, os mais frequentemente hidrolisados.

Apenas duas cepas de *L. plantarum*, B7 e B12 foram capazes de desconjugar o ácido glicolítico (GC), e apenas a cepa *L. plantarum* 32 desconjugou o sal sódico do ácido taurocólico (TC).

O resultado positivo para hidrólise dos sais biliares foi representado pela formação de um precipitado opaco ao redor dos discos embebidos da cultura bacteriana, como demonstrado na Figura 5.

Figura 5 Expressão da atividade da enzima hidrolase de sais biliares (BSH) em ágar MRS adicionado de sais biliares.



Expressão da desconjugação do ácido biliar. A) representada pelo *Lactobacillus plantarum* Q84 frente a placa B) suplementada com o sal biliar glicodesoxicólico (GDC) não apresentando desconjugação. **Fonte:** Autor

Tabela 8 Crescimento das cepas de *Lactobacillus* spp na presença de sais biliares e capacidade de desconjugá-los

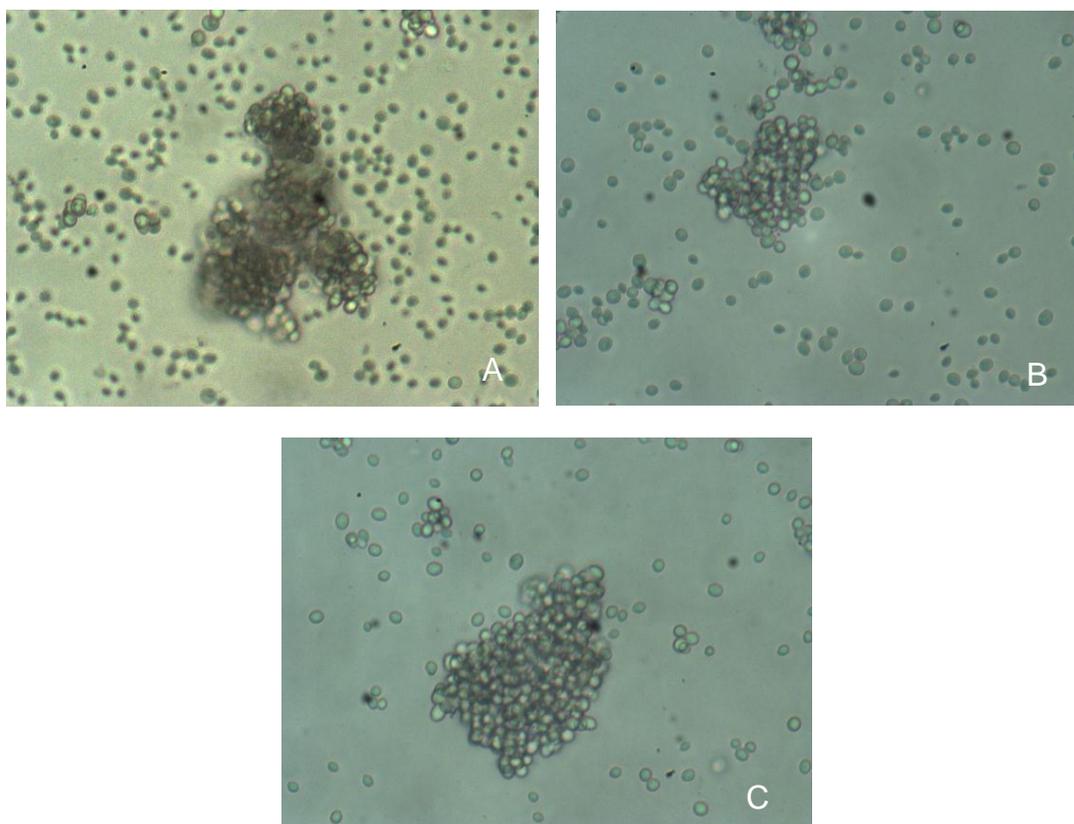
Cepas	Sais biliares			
	GDC	GC	TDC	TC
B3	ng	g-/g-	g++/g++	g-/g-
B7	ng	g+/g+	g-/g-	g-/g-
B12	g++/g++	g+/g+	g-/g-	g-/g-
B13	g++/g++	g-/g-	g-/g-	g-/g-
B14	g-/g-	g-/g-	g-/g-	g-/g-
G2	ng	g-/g-	g-/g-	g-/g-
G6	g+/g+	g-/g-	g+/g+	g-/g-
G8	g++/g++	g-/g-	g+/g+	g-/g-
L2-1	ng	g-/g-	g-/g-	g-/g-
L2-2	g++/g++	g-/g-	g++/g++	g-/g-
L2-2'	g++/g++	g-/g-	g-/g-	g-/g-
Q6	g+/g+	g-/g-	g+/g+	g-/g-
Q24	g+/g+	g-/g-	g+/g+	g-/g-
Q84	g+/g+	g-/g-	g+/g+	g-/g-
Q90	g-/g-	g-/g-	g++/g++	g-/g-
T1-4	g++/g++	g-/g-	g++/g++	g-/g-
1	g-/g-	g-/g-	g+/g+	g-/g-
15	g-/g-	g+/g+	g+/g+	g+/g+
16	g+/g+	g-/g-	g+/g+	g-/g-
23	g++/g++	g-/g-	g++/g++	g-/g-
32	ng	g-/g-	g-/g-	g-/g-
50	g++/g++	g-/g-	g+/g+	g-/g-
70	g++/g++	g-/g-	g+/g+	g-/g-
113	g++/g++	g-/g-	g-/g-	g-/g-
115	g+/g+	g-/g-	g+/g+	g-/g-
122	g-/g-	g-/g-	g-/g-	g-/g-
123	g-/g-	g-/g-	g-/g-	g-/g-
124	g+/g+	g-/g-	g-/g-	g-/g-
23	g++/g++	g-/g-	g++/g++	g-/g-
32	ng	g-/g-	g-/g-	g-/g-

Sódicos de ácido taurocólico (TC), ácido taurodesoxicólico (TDC), ácido glicolítico (GC) e ácido glicodesoxicólico (GDC). (ng) a bactéria não cresceu (g-) não houve desconjugação, (g+) a bactéria desconjugou o sal biliar, (g++) forte desconjugação do sal biliar. **Fonte:** Autor

5.3.3. AGLUTINAÇÃO DE LEVEDURA

Não foram obtidos resultados válidos para as cepas de lactobacilos utilizando esse teste. Embora a cepa de *E. coli* INCQS 00033, utilizada como controle positivo tenha respondido ao ensaio, apresentando uma capacidade de aglutinação visivelmente maior que o controle negativo, levedura em PBS, esse apresentou aglutinação nos meios com e sem manose (FIGURA 6), fato que levantou dúvidas quanto à eficiência da metodologia.

Figura 6 Imagem em microscópio de luz 100x de amplificação.



A) levedura em PBS B) levedura em PBS com manose C) Levedura em PBS com a bactéria B7. **Fonte:** Autor

5.3.4. AGREGAÇÃO DE LEVEDURA

O resultado obtido para esse teste se deu através da comparação das médias da velocidade de sedimentação (absorbância/min) de cada cepa em relação aos controles positivo e negativo, onde os dados foram submetidos primeiramente aos testes estatísticos de Shapiro-Wilk e Bartlett para verificar sua normalidade e homogeneidade respectivamente. Duas análises foram realizadas, a primeira comparando os valores de sedimentação da bactéria na ausência e presença da manose e a segunda, utilizando o teste de Dunnett para os valores da velocidade de sedimentação inicial e final. Para ambos, foi aplicado o teste F, via análise de Variância (ANOVA), considerando o nível 5% de significância.

Uma diferença significativa ($P < 0,05$) foi observada apenas entre os controles negativo e positivo, levedura em PBS e *E. coli* INCQS 00033, respectivamente. Levando em consideração a comparação entre a velocidade de sedimentação da *E. coli* INCQS 00033 e dos lactobacilos, apenas as bactérias *L. plantarum* 123, 124, 126 e 129 mostraram um resultado de possível agregação segundo o teste estatístico (TABELA 9).

Com relação à presença da manose no meio, foi observado que esse carboidrato interfere fortemente na interação entre *E. coli* INCQS 00033 e levedura (fermento de padeiro, Dona Benta, Fermix), diminuindo a velocidade de sedimentação da amostra em aproximadamente 60,0%. Das amostras que apresentaram resultados de agregação à levedura semelhante à *E. coli* INCQS 00033, três sofreram interferência da manose na agregação, os *L. plantarum* 124, 126 e 129.

O software estatístico utilizado para as análises foi o SAS 9.2 (2009). STATISTICAL ANALYSIS SYSTEMS – SAS Institute Inc. 2009. SAS OnlineDoc. 9.2. Cary, NC: SAS Institute Inc.

5.3.5. HIDROFOBICIDADE

Os valores de hidrofobicidade da superfície celular das cepas avaliadas apresentados na Tabela 9, variaram de -24,96 a 60%, sendo que sete cepas apresentaram valores negativos e apenas duas obtiveram valores acima de 50%. Como demonstrado na tabela 8, vinte cepas obtiveram valores entre -24,96 a 20% de hidrofobicidade, sendo considerados hidrofílicas, enquanto que oito cepas apresentaram resultado entre 20 e 49%, consideradas como hidrofobicidade moderada e apenas duas, as cepas de *L. plantarum* 115 e 129, obtiveram resultado superior a 50%, indicando elevada hidrofobicidade da superfície celular.

Os resultados obtidos entre as cepas de *L. mucosae* foram divergentes, não demonstrando correlação entre cepas da mesma espécie, variando desde um resultado hidrofílico até hidrofóbica moderada.

Tabela 9 Valor de hidrofobicidade e da velocidade de sedimentação da levedura induzida pelos *Lactobacillus* spp via manose

Cepas	Hidrofobicidade (%) a	Agregação de levedura ^b	
		Sem manose	Com manose
B3	16,68 ± 0,09	4,98 ± 0,47	5,55 ± 1,46
B7	15,76 ± 0,08	8,27 ± 1,26	4,68 ± 2,56
B12	18,75 ± 0,10	8,69 ± 4,33	8,06 ± 4,89
B13	16,75 ± 0,09	6,18 ± 2,49	5,42 ± 2,94
B14	38,49 ± 0,10	6,45 ± 1,01	4,74 ± 0,92
G2	-17,39 ± 0,10	5,89 ± 1,54	6,27 ± 1,67
G6	13,53 ± 0,07	8,78 ± 0,26	5,75 ± 0,89
G8	29,91 ± 0,26	7,39 ± 1,33	5,60 ± 1,29
L2-1	-3,22 ± 0,03	7,58 ± 1,11	5,51 ± 0,81
L2-2	20,93 ± 0,11	7,49 ± 1,34	4,21 ± 0,31
L2-2'	16,38 ± 0,10	8,47 ± 2,02	5,97 ± 1,88
Q6	0,10 ± 0,07	9,90 ± 0,59	6,75 ± 2,68
Q24	10,59 ± 0,05	7,64 ± 2,26	5,32 ± 1,87
Q84	-1,86 ± 0,12	7,30 ± 1,92	5,72 ± 1,47
Q90	4,25 ± 0,04	8,03 ± 0,64	6,7 ± 3,06
T1-4	9,72 ± 0,06	6,97 ± 2,03	3,88 ± 0,87

Continuar....

Cepas	Hidrofobicidade (%) ^a	Agregação de levedura ^b	
		Sem manose	Sem manose
1	33,65 ± 0,18	7,29 ± 0,98	5,07 ± 0,99
15	9,19 ± 0,09	7,82 ± 0,95	5,68 ± 1,68
16	-20,98 ± 0,19	10,59 ± 0,96	6,87 ± 0,97
23	42,93 ± 0,24	8,25 ± 1,21	7,93 ± 4,16
32	-4,41 ± 0,09	9,19 ± 1,13	6,61 ± 2,95
50	6,28 ± 0,03	9,07 ± 1,49	6,73 ± 2,67
70	5,38 ± 0,06	7,24 ± 2,97	5,86 ± 1,63
113	30,34 ± 0,16	8,51 ± 1,82	9,45 ± 4,31
115	52,24 ± 0,27	10,24 ± 1,20	8,17 ± 1,80
122	-24,96 ± 0,14	9,31 ± 2,73	6,98 ± 1,95
123	-0,36 ± 0,06	12,55 ± 2,12	9,58 ± 2,72
124	13,73 ± 0,08	11,30 ± 2,57	7,61 ± 1,30
126	7,53 ± 0,05	11,95 ± 2,23	7,73 ± 1,21
129	60,54 ± 0,32	13,23 ± 2,70	8,19 ± 0,76
Cont. +	-	18,59 ± 4,21	7,60 ± 2,12
Cont. -	-	8,74 ± 1,96	5,97 ± 2,44

^a Valores médio ± desvio padrão de cinco repetições independentes. ^b Valor médio de agregação de levedura ± desvio padrão de três repetições. **Fonte:** Autor

5.4. POTENCIAL DE VIRULÊNCIA

5.4.1. PRESENÇA DE GENES ASSOCIADOS À FATORES DE VIRULÊNCIA, RESISTÊNCIA À VANCOMICINA E PRODUÇÃO DE AMINAS BIOGÊNICAS

As 30 cepas foram avaliadas quanto à presença dos seguintes genes relacionados a fatores de virulência; *geIE*, *hyl*, *asa1*, *esp*, *cylA*, *efaA*, *ace*, resistência à vancomicina; *vanA*, *vanB* e produção de aminas biogênicas; *hdc1*, *hdc2*, *tdc* e *odc* (FIGURA 7). Foi considerado como resultado positivo a presença, no gel, de bandas referentes à amplificação de fragmento de ADN associado a cada oligonucleotídeo indicados, apresentados na Tabela 10 e 11.

A cepa *Lactobacillus mucosae* L2-1 destacou-se pela maior presença de genes de virulência, apresentando seis dos treze genes avaliados, entre eles o gene para hialuronidase (*hyl*), e três dos quatro genes relacionados a invasão e colonização dos tecidos, gelatinase (*geIE*), citolisina (*cylA*) e o antígeno de endocardite (*efaA*). Também apresentaram o gene de resistência à vancomicina (*vanB*), e o gene para descarboxilação da tirosina (*tdc*).

Os resultados obtidos para os genes relacionados à invasão e colonização se apresentaram da seguinte forma, o gene para gelatinase, *geIE*, foi apresentado por apenas duas cepas (6,45%), ambas de *L. mucosae*, enquanto o gene para substância de agregação *asa1* também foi identificado em duas amostras (6,45%), porém essas de *L. plantarum*. Para o gene de antígeno de endocardite (*efaA*) foram identificadas três (9,67%) amostras positivas, sendo duas de *L. plantarum* e uma *L. mucosae*. A presença do gene *cylA* para citolisina, enzima portadora de atividade hemolítica, foi muito expressiva, estando presente em seis amostras (19,3%), uma *L. mucosae* e cinco *L. plantarum*.

O gene para hialuronidase *hyl*, foi detectado em quatro das cepas avaliadas (12,9%), sendo três destas em cepas de *L. mucosae*. A presença do gene relacionado às proteínas de superfície extracelular de *Enterococcus*, foi detectada em três cepas (9,67%), sendo duas de *L. plantarum* e uma *L. mucosae*. O gene relacionado a adesão

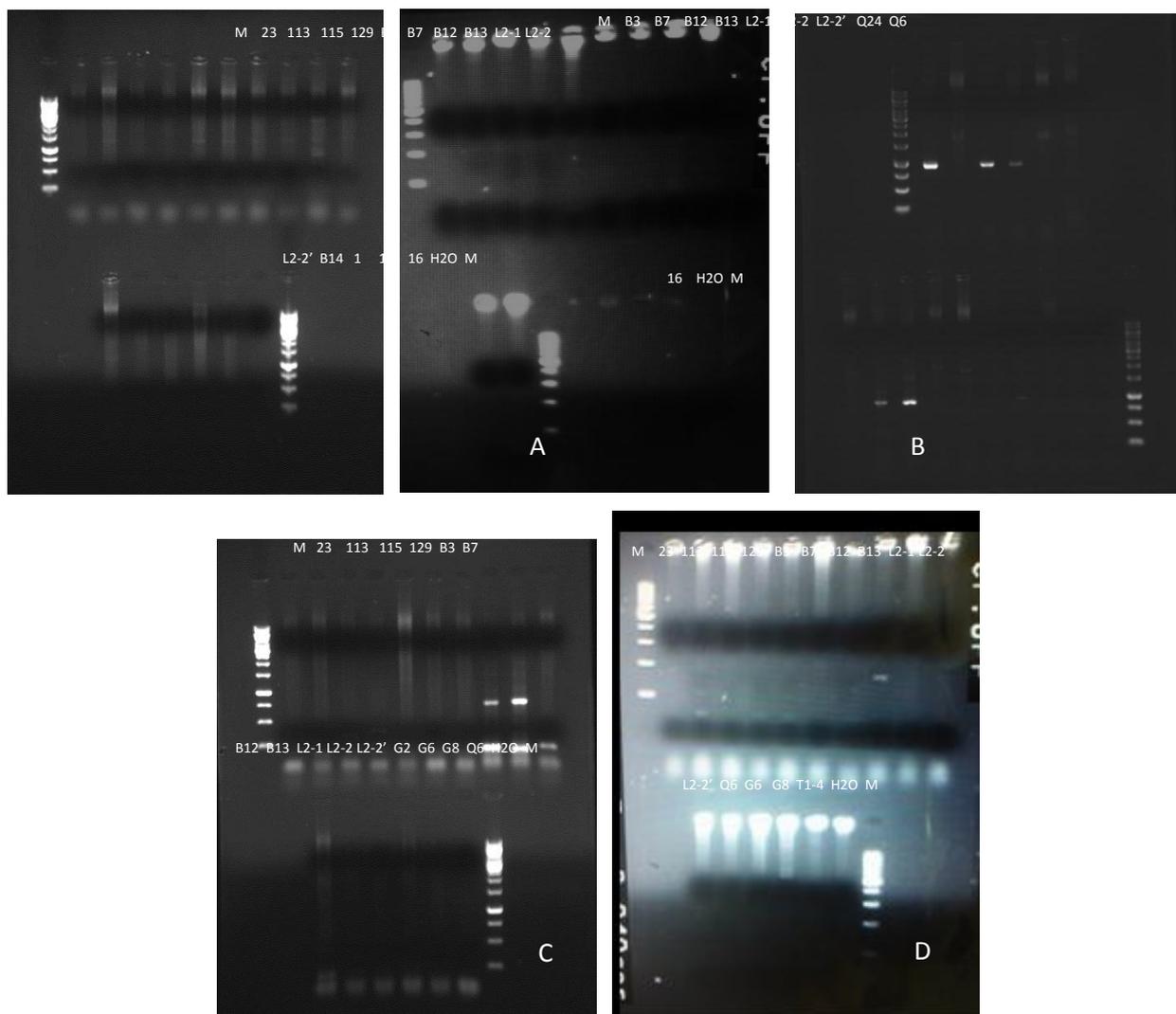
ao colágeno *ace*, mostrou-se mais expressivo, sendo encontrado em quatro das cepas estudadas (12,9%), todas de *L. plantarum*.

Dos dois genes de resistência a antibiótico para vancomicina, foi verificado a presença do gene *vanA* em uma única amostra (3,2%) sendo esta, um *L. plantarum* e o gene *vanB* foi observado apenas nas 3 amostras (9,67%) de *L. mucosae*. Esses genes também foram analisados no BLAST, onde foi observado que o gene *vanA* possui variações em alguns nucleotídeos e em sua localização (ANEXO). O gene *vanB* foi caracterizado apenas para a espécie de *L. mucosae* dentro do gênero *Lactobacillus*.

Dos genes codificantes para aminas biogênicas, nenhuma das amostras apresenta resultado positivo no gel para o gene de descarboxilação da ornitina, *odc*, ou para os dois genes determinantes da produção de histamina (*hdc1* e *hdc2*), porém obteve um resultado bastante expressivo para o gene de tirosina *tdc*, sendo apresentado em seis das vinte e nove amostras (19,3%), entre elas uma *L. mucosae* (L2-1).

Quatorze das cepas de *L. plantarum* avaliadas não apresentaram genes relacionados a fatores de virulência.

Figura 7 Géis obtidos pelo rastreo dos genes relacionados a fatores de virulência



Primers; A) *odc*. B) *hdc1* C) *tdc* D) *efaA* E) *esp14*. O marcador utilizado para os *primers odc, tdc e efaA* foi o de 1kb enquanto o marcador de 100bp foi utilizado para os *primers hdc1 e esp14* de acordo com os pares de base do produto. **Fonte:** Autor

Tabela 10 Presença dos genes responsáveis pelos fatores de virulência.

Cepas	<i>geIE</i>	<i>hyl</i>	<i>asa1</i>	<i>esp</i>	<i>cylA</i>	<i>efaA</i>	<i>ace</i>
B3	-	-	-	-	+	-	+
B7	-	-	-	-	-	-	-
B12	-	+	-	-	+	-	+
B13	-	-	-	-	+	+	+
B14	-	-	-	-	-	-	-
G2	-	-	-	-	-	-	-
G6	-	-	-	-	+	+	-
G8	-	-	-	-	+	-	+
L2-1	+	+	-	-	+	+	-
L2-2	-	+	-	-	-	-	-

L2-2'	+	+	-	+	-	-	-
Q6	-	-	-	-	-	-	-
Q24	-	-	-	-	-	-	-
Q84	-	-	-	-	-	-	-
Q90	-	-	-	-	-	-	-
T1-4	-	-	+	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	+	-	-	-	-
23	-	-	-	-	-	-	-
32	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-	-
113	-	-	-	-	-	-	-
115	-	-	-	-	-	-	-
122	-	-	-	-	-	-	-
123	-	-	-	-	-	-	-
124	-	-	-	+	-	-	-
126	-	-	-	-	-	-	-
129	-	-	-	+	-	-	-

Fonte: Autor

Tabela 11 Presença dos genes responsáveis pela resistência ao antibiótico vancomicina e produtores de aminas biogênicas

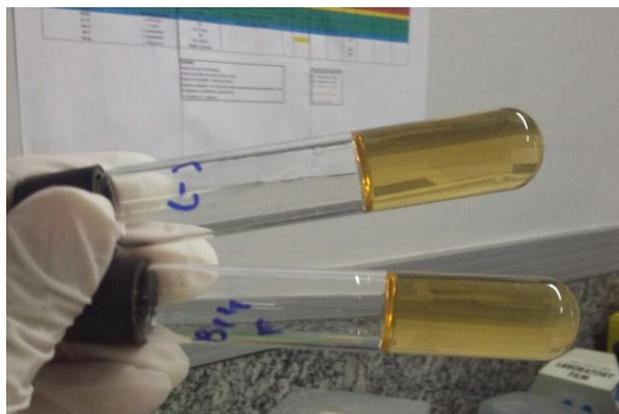
Cepas	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>	<i>hdc1</i>	<i>hdc2</i>	<i>tdc</i>	<i>odc</i>
B3	-	-	-	-	-	-
B7	-	-	-	-	-	-
B12	-	-	-	-	-	-
B13	-	-	-	-	+	-
B14	-	-	-	-	+	-
G2	-	-	-	-	-	-
G6	-	-	-	-	-	-
G8	+	-	-	-	-	-
L2-1	-	+	-	-	+	-
L2-2	-	+	-	-	-	-
L2-2'	-	+	-	-	-	-
Q6	-	-	-	-	-	-
Q24	-	-	-	-	-	-
Q84	-	-	-	-	-	-
Q90	-	-	-	-	-	-
T1-4	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-
23	-	-	-	-	+	-
32	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-
70	-	-	-	-	-	-
113	-	-	-	-	-	-
115	-	-	-	-	+	-
122	-	-	-	-	-	-
123	-	-	-	-	-	-
124	-	-	-	-	-	-
126	-	-	-	-	-	-
129	-	-	-	-	+	-

Fonte: Autor

5.4.2. GELATINASE

Nenhuma das cepas testadas foi capaz de provocar a liquefação do meio contendo gelatina (FIGURA 8), mesmo depois de 48 h de incubação, como mostra a Tabela 13.

Figura 8 Resultado do teste de gelatinase



Representação do resultado negativo para o teste de gelatinase comparado com o controle negativo.
Fonte: Autor.

5.4.3. ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Os resultados para esse teste foram expressos em Unidade Hemolítica (UH), onde 1 UH é referene à quantidade de amostra capaz de gerar por mL 50% de lise da suspensão de hemácias de coelho a 1%. Valor obtido através da equação apresentada na metodologia desse teste.

Como observado na Tabela 12, nove das bactérias avaliadas apresentaram atividade hemolítica de 1 UH, sendo estas as cepas G6, G8, T1-4, 23, 50, 113, 115 e 122 de *L. plantarum* e a cepa L2-1 de *L. mucosae*. Nenhuma das amostras testadas apresentou atividade máxima de unidade hemolítica (2 UH) referente ao controle positivo triton X 100.

Tabela 12 Resultado da equação de atividade hemolítica

Cepa	Unidade Hemolítica (UH)
B3	0,299
B7	0,284
B12	0,335
B13	0,275
B14	0,267
G2	0,536
G6	1,031
G8	1,138
L2-1	1,010
L2-2	0,440
L2-2'	0,020
Q6	0,948
Q24	0,834
Q84	0,327
Q90	0,959
T1-4	1,478
1	0,722
15	0,417
16	0,330
23	1,053
32	0,343
50	1,355
70	0,298
113	1,746
115	1,218
122	1,083
123	0,321
124	0,915
126	0,272
129	0,877

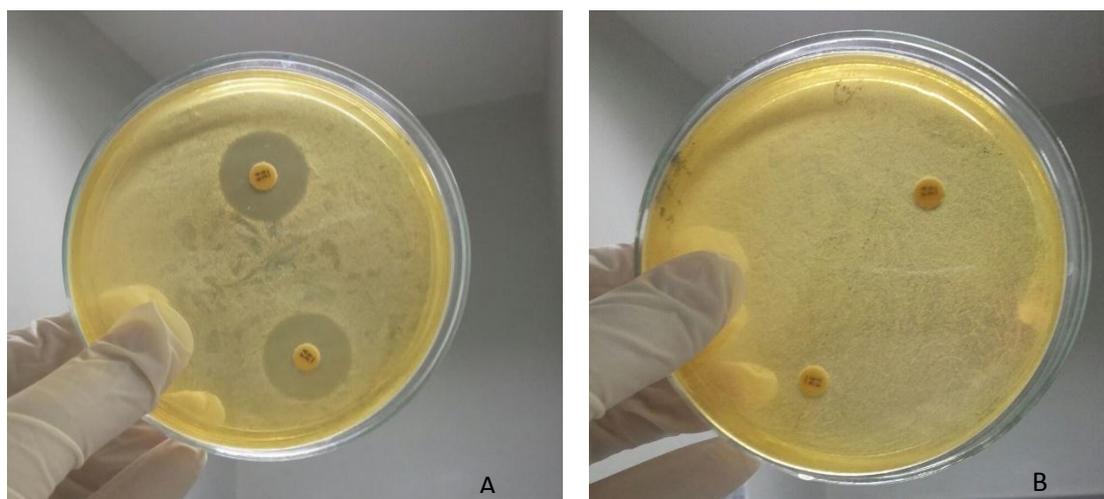
Fonte: Autor

5.4.4. RESISTÊNCIA À VANCOMICINA

A maioria dos lactobacilos se mostrou resistente à ação da vancomicina, mantendo seu crescimento bem próximo ao disco contendo o antibiótico (FIGURA 9). Apenas 10 das cepas avaliadas foram susceptíveis à ação do antibiótico (TABELA 12), uma zona de inibição ao redor do disco indicando a ausência do crescimento bacteriano na presença de vancomicina.

O raio do halo de inibição foi medido, partindo da extremidade do disco de antibiótico até o final do halo, este valor multiplicado por dois gera o diâmetro real do halo, valor que foi comparado com o trabalho de Charteris *et al.* (1998), onde o halo com diâmetro igual ou menor que 14mm representa resistência ao antibiótico vancomicina.

Figura 9 Placas inoculadas com as bactérias e discos de antibióticos



Placas do teste para resistência ao antibiótico vancomicina. A) Resultado positivo. B) Resultado negativo; Fonte: Autor

Tabela 13 Fator de virulência para gelatinase e resistência à vancomicina

Cepas	Resistência à vancomicina ^a		Gelatinase ^b	
	Média	R/S	1	2
B3	0	R	-	-
B7	0	R	-	-
B12	0	R	-	-
B13	0	R	-	-
B14	0	R	-	-
G2	0	R	-	-
G6	18	S	-	-
G8	0	R	-	-
L2-1	0	R	-	-
L2-2	0	R	-	-

Continua...

Cepas	Resistência à vancomicina ^a		Gelatinase ^b
	Média	R/S	Média

G8	0	R	-	-
L2-1	0	R	-	-
L2-2	0	R	-	-
L2-2'	0	R	-	-
Q6	16	S	-	-
Q24	15,2	S	-	-
Q84	0	R	-	-
Q90	11,38	R	-	-
T1-4	19,13	S	-	-
1	14,8	S	-	-
15	10	R	-	-
16	0	R	-	-
23	18	S	-	-
32	0	R	-	-
50	14,15	S	-	-
70	0	R	-	-
113	0	R	-	-
115	18	S	-	-
122	18,54	S	-	-
123	0	R	-	-
124	14,6	S	-	-
126	0	R	-	-
129	0	R	-	-

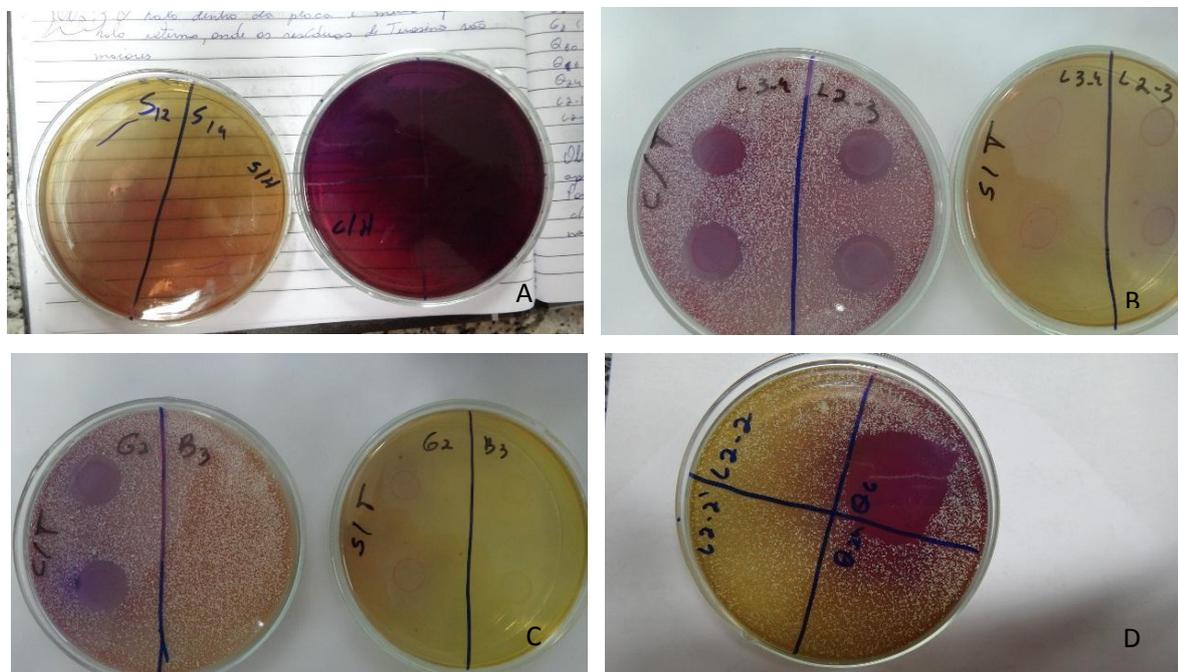
^a Média \pm desvio padrão dos valores obtidos no teste de antibióticos (R) Resistente, (S) Suscetível ao antibiótico vancomicina. ^b teste de gelatinase. **Fonte:** Autor

5.4.5. AMINAS BIOGÊNICAS

Para o teste de expressão das aminas biogênicas *in vitro* foi avaliada a descarboxilação dos aminoácidos histidina e tirosina. A formação de um halo roxo ao redor da colônia foi considerado como resultado positivo para produção da histamina. Para tirosina, a produção de uma auréola ao redor das colônias, com ausência do aminoácido presente no ágar, foi considerado como resultado positivo.

Todas as bactérias foram capazes de crescer no meio contendo os aminoácidos, porém não foi observado resultado positivo para produção de histamina. Por outro lado dez das bactérias avaliada apresentaram resultado *in vitro* positivo para descarboxilação da tirosina, sendo estas as cepas G2, G6, G8, Q6, Q90, T1-4, 1, 50, 115 e 124, representados na figura 10.

Figura 10 Placas das cepas em estudo em meio descarboxilativo após incubação com e sem (controle) o aminoácido testado.



A) Controle positivo na presença e ausência da histamina. B) Controle positivo na presença e ausência da tirosina. C) Bactéria G2 positiva e B3 negativa para descarboxilação da tirosina. D) Bactérias negativas L2-2, L2-2' e Q 24, e bactéria Q6 positiva para descarboxilação da tirosina. **Fonte:** Autor

6. DISCUSSÃO

Para realizar esse estudo, foram isoladas, cultivadas e avaliadas por métodos bioquímicos de identificação 200 cepas bacterianas. Sessenta e oito dessas foram selecionadas de acordo com as características morfológicas desejadas para o estudo: *Lactobacillus* Gram-positivos e catalase negativa. Essas seguiram para diferenciação e identificação por meio de técnicas de biologia molecular. Vinte e duas cepas identificadas como *L. plantarum* prosseguiram no estudo de caracterização, sendo adicionadas ao grupo mais quatro *L. plantarum* e três *L. mucosae* previamente identificadas, pertencentes ao acervo da Embrapa Caprinos e Ovinos, Fazenda Três Lagoas, Sobral/CE, Brasil.

Para um microrganismo ser considerado como probiótico, deve ser submetido a diversas análises *in vitro* e *in vivo* que comprovem seu potencial probiótico, não apresentando risco ao consumidor e sendo capaz de sobreviver e adaptar-se às condições impostas pela aplicação em produto ou pelo TGI.

Uma das propriedades de um microrganismo probiótico a ser avaliada é sua capacidade de sobreviver na presença de sais biliares e desconjugá-los. É necessário que uma bactéria considerada como probiótica seja capaz de sobreviver a uma concentração de 0,5% de bile desidratada (DUNNE *et al.*, 2001). Dos 30 *Lactobacillus* spp avaliados na presença dos sais biliares, seis deles não foram capazes de crescer nas placas contendo o sal glicodesoxicólico (GDC). Supõe-se que esse resultado deve-se ao efeito detergente desse sal sobre os microrganismos, uma vez que a membrana celular é formada por lipídeos e ácidos graxos (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000). As cepas devem se manter viáveis até o intestino delgado para exercerem sua função como probiótico. Das cepas avaliadas 80% mostraram ser resistentes à ação dos sais biliares *in vitro*.

Três das cepas que amplificaram o gene *bsh* no teste por PCR, não demonstraram resistência a todos os sais biliares, não crescendo na presença do sal GDC. O mesmo ocorreu no experimento de Zago *et al.* (2011). Essa resistência à presença do sal é uma interação complexa de fatores que não depende apenas da presença do gene *bsh*, como demonstrado por Turchi *et al.* (2013) onde 64% de suas

amostras resistentes a concentração de 1,0% de sais biliares, não apresentavam o gene *bsh*.

Todas as outras cepas que amplificaram o gene *bsh* tiveram sua expressão *in vitro* confirmada, desconjugando pelo menos um dos quatro sais avaliados. Quando ocorreu a hidrólise dos sais biliares pela ação das cepas de bactérias lácticas estudadas, o resultado positivo foi representado pela formação de um precipitado ao redor dos discos embebidos do caldo de cultivo das cepas, difundindo-se pelo ágar e mudando a cor do meio. Essa observação, foi descrita anteriormente por Dashkevics e Feighner (1989), que demonstraram que a atividade da enzima hidrolase de sais biliares em bactérias lácticas ocorre de duas formas, como uma mudança na coloração da colônia para um branco opaco ou um precipitado ao redor das colônias.

Outras cepas também foram capazes de desconjugar *in vitro* algum dos sais biliares testados, mesmo não tendo sido detectada nesse estudo a presença do gene *bsh*. Resultados obtidos por Elkins (2001) sugerem que tanto o fenótipo quanto o genótipo da enzima BSH seja variável em determinadas espécies. Várias cepas de bactérias como *Lactobacillus plantarum* WCFS1 possuem mais de um *bsh* homólogo não idêntico, em regiões genéticas distintas em todas as espécies, nos casos onde mais de um se apresenta não estão localizados na mesma região cromossômica (KUMAR, 2012). Estudos realizados para caracterizar o *loci* da BSH mostraram diferentes arquiteturas entre os diferentes gêneros (ELKINS, 2001).

Através do genoma sequenciado de muitos microrganismos foi obtido várias sequências de genes *bsh*, como o de *L. plantarum* 80 (CHRISTIAENS *et al.*, 1992), *L. acidophilus* KS-13 (SAVAGE; MOSER, 1999), *L. plantarum* WCFS1 (KLEEREBEZEM *et al.*, 2003), entre outros. A cepa *L. acidophilus* NCFM teve seu genoma completo sequenciado, revelando a presença de dois genes associados à de *bsh*, *bshA* e *bshB* (KUMAR *et al.*, 2012). A presença de outra sequência de gene correspondente à hidrolase de sais biliares é uma possível explicação para a ação da enzima BSH, observada no teste *in vitro*, mesmo sem o gene *bsh* avaliado ter sido amplificado.

Estudos anteriores expuseram casos de isolados portadores dos genes e que não apresentaram atividade, sendo denominados “genes silenciosos”. No entanto, outros

casos também foram relatados onde os genes eram ativados por alguns fatores externos, como as condições do TGI (FISHER; PHILLIPS, 2009).

Outra característica desejada em um probiótico é sua capacidade de aderir ao TGI, sendo de grande relevância na ação benéfica ao hospedeiro, permitindo a colonização do TGI por bactérias benéficas. Nesse estudo, quatro genes relacionados às propriedades de adesão foram testados quanto à presença e expressão, com base em testes *in vitro*. O *msa*, gene relacionado à adesão específica à manose, foi o menos encontrado entre as cepas de lactobacilos estudadas, resultado que pode ser explicado pela alta variabilidade de sequências de nucleotídeos decorrente de grandes deleções, ocorrendo comumente para esse gene em *L. plantarum* (PRETZER, 2005; TURPIN, 2012).

Para testar a expressão *in vitro* do gene *msa*, foi necessário realizar dois testes utilizando fermento de padeiro, *S. cerevisiae*. Pois o primeiro teste, aglutinação de levedura, não obteve resultados válidos, sendo que mesmo no poço contendo apenas o controle negativo em tampão (PBS e PBS/manose) foi visualizado a formação de aglutinados, sendo impossível distinguir e validar um resultado positivo. No entanto, foi possível observar na cepa *E. coli* INCQS 00033 uma alta capacidade de aglutinação de levedura, confirmando sua utilização como controle positivo para testes de adesão à manose. A *S. cerevisia* apresenta polissacarídeos contendo manose em sua parede celular, onde bactérias portadoras de adesinas específicas para receptores de manose se ligam à parede aglutinando as células de levedura. Esse teste já foi utilizado para avaliar as propriedades de ligação mediadas por fimbrias tipo 1 (PRETZER *et al.*, 2005). Essas fimbrias são estruturas curtas e finas apresentadas por bactérias gram-negativas relacionadas com a capacidade de adesão.

Um novo método foi desenvolvido para detectar a aderência à manose através da velocidade de sedimentação mediada por receptores de manose, que intermedeiam a agregação entre as bactérias e as células de *S. cerevisiae*. Dessa forma, quanto maior sua velocidade de sedimentação maior a capacidade de agregação entre as leveduras e as bactérias.

Na comparação entre as velocidades de sedimentação dos controles positivo/negativo foi apresentado alta capacidade de agregação da *E. coli* em PBS

enquanto que no meio com adição de manose essa interação foi inibida, indicando que a interação entre esses microrganismos ocorreu por adesão a manose, podendo ser mediada pelas fimbrias tipo 1.

FimH por exemplo, é uma adesina específica de manose, localizada na ponta da fimbria tipo 1 de enterobactérias como *E. coli* e *Salmonella* (JUGE, 2012). As fimbrias permitem que as bactérias possam aderir a um grande número de alvos, entre eles células e proteínas. Adesina fimbrial está relacionada, por exemplo, à habilidade da salmonela entérica *Typhimurium* de ligar-se às células epiteliais do cólon (CHESSA, *et al.*, 2008), assim como outros tipos de adesinas fimbriais atuando na adesão ao muco.

A capacidade de induzir a agregação das células de *S. cerevisiae* por bactérias foi validada pelo controle positivo (*E. coli*). No entanto, foi pouco variável entre os *Lactobacillus* spp, não sendo observada diferença significativa ($P > 0,05$) na velocidade de sedimentação entre esses e o controle negativo (levedura em PBS). Comparando as cepas com o controle positivo, foram observados valores de agregação semelhante nas cepas 123, 124, 126 e 129 de *L. plantarum*. Essas três últimas apresentaram uma queda na velocidade de sedimentação quando em meio com manose, indicando que a adesão foi mediada pela afinidade por esse açúcar.

Nenhuma das cepas que apresentaram resultado positivo *in vitro* amplificou o gene *msa*, resultado semelhante ao apresentado no trabalho de Turchi *et al.* (2013), que obtiveram resultado positivo *in vitro* para cepas que não apresentaram o gene, assim como não foi detectada expressão em bactérias portadoras do gene, sugerindo variações dessa sequência em *L. plantarum*.

As cepas que apresentaram o gene *msa*, não expressaram agregação significativa para o teste com levedura, esse resultado pode estar relacionado às condições de cultivo, pois existem algumas variações na expressão desse gene que se deve à presença ou ausência de fatores adicionais ao processo de adesão (GROSS *et al.*, 2010). Outra justificativa a ser levada em consideração é que mesmo uma pequena mutação do gene pode provocar a perda total da sua função (PRETZER *et al.*, 2005). Diferenças sutis na sequência do gene podem alterar as sequências de aminoácidos e conseqüentemente provocar divergências na adesão à manose (GROSS *et al.*, 2010). A sequência desse *primer* foi comparada por BLAST com sequências da base de dados

da NCBI GenBank, foi observado diferenças de nucleotídeos e no comprimento do *amplicon*.

Uma das bactérias que apresentaram o gene *msa*, a cepa de *L. mucosae* L2-2' mostrou que a manose interferiu em sua velocidade de sedimentação, provocando uma queda de 43,66% nessa velocidade.

Em adição, foi observada também uma interferência da manose na interação levedura/levedura, sugerindo que a levedura possui capacidade de auto-agregação através da interação por manose.

Os demais genes avaliados quanto à capacidade de adesão foram frequentemente detectados nas cepas por meio de PCR. Resultados semelhante aos obtidos por Turpin *et al.* (2012), onde esses três genes também apresentaram alta representabilidade nas amostras de BAL. O gene *ef-Tu* por exemplo, possui regiões conservadas comuns, podendo ser facilmente encontrado em várias espécies (TURPIN *et al.*, 2012), O domínio MUB é abundantemente encontrado em Lactobacilos do TGI (GROSS *et al.*, 2010), explicando a presença constante desses genes em nossos resultados.

Das bactérias avaliadas, 90% possui um perfil genético favorável à ligação à mucosa do TGI, por apresentarem três dos quatro genes associados à propriedades de adesão.

Outra forma de estimar a capacidade de adesão das bactérias baseia-se em sua hidrofobicidade, onde a queda na absorbância da fase aquosa é determinada como medida de hidrofobicidade da superfície celular (VINDEROLA e REINHEMER, 2003). A organização estrutural dos componentes no interior da parede celular é refletida nas propriedades de superfície bacteriana, como as propriedades dos constituintes da superfície e principalmente da conformação das macromoléculas superficiais e as propriedades físico-químicas da parede celular (SCHAR-ZAMMARETTI, 2003).

A divergência do resultado de hidrofobicidade entre as *L. mucosae* confirma que a interação entre o hexadecano e a superfície bacteriana é dependente das cepas bacteriana e não da espécie, podendo obter variações em decorrência das condições de

crescimento, composição do meio de cultura e suspensão, ou expressão variável das proteínas de superfície (BASSON *et al.*, 2008).

A cepa *L. plantarum* 129 foi a única que apresentou resposta de agregação induzida pela manose e também um alto valor de hidrofobicidade. Porém, apesar de amplificar os três genes de adesão ao muco, *map*, *mub* e *ef-tu*, não foi detectado o gene de adesão à manose por PCR.

As duas cepas de *L. mucosae* (L2-2 e L2-2') portadoras dos quatro genes de adesão avaliados por PCR não apresentaram resultado significativo de agregação, tendo a cepa L2-2 apresentado interferência por manose e baixa hidrofobicidade (hidrofílica), enquanto que a L2-2', apresentou hidrofobicidade média mas não respondeu ao teste de agregação mediado por manose. Todorov *et al.* (2008) observou em seus estudos, que mesmo as cepas com elevada porcentagem de hidrofobicidade não foram capazes de aderir à maioria das células HT-29 que simula o TGI, enquanto uma cepa de baixa hidrofobicidade obteve aderência, concluindo que a hidrofobicidade não é um pré-requisito para uma adesão forte, embora possa auxiliar no processo de adesão. Um teste *in vitro* adequado e de maior confiabilidade para confirmar o mecanismo de adesão ao muco dessas bactérias seria utilizando cultura de células HT-29.

Um microrganismo probiótico além de exercer atividade benéfica para o hospedeiro deve ter sua inocuidade testada e comprovada. Segundo Vesterlund *et al.* (2007), infecções por lactobacilos probióticos são raros, porém já relatados em alguns casos em pacientes imunocomprometidos.

Com respeito aos fatores de virulência, a FAO/WHO (2002) recomenda, como um critério de segurança importante para os probióticos, a ausência desses fatores. Alguns estudos recentes vêm demonstrando uma maior frequência da presença de genes de virulência em isolados de origem alimentícia (ABRIOUEL *et al.*, 2008). Reforçando a importância da investigação dos fatores de virulência em cepas com potencial probiótico antes de serem empregadas em produtos alimentícios. Os determinantes de virulência podem ser facilmente transferidos, pois ficam comumente localizados nos plasmídeos (JETT *et al.*, 1994; RAMIAH, 2008).

No presente estudo, os genes que apresentaram maior incidência entre as cepas de lactobacilos foram os genes *tdc* para a produção da tirosina, amina biogênica

que entre outras coisas provoca hipertensão, e o gene *cyIA* codificante para citolisina, enzima de atividade hemolítica e bacteriocina contra células procarióticas e eucarióticas (MEDEIROS, 2011). Este último pode estar integrado no cromossomo ou transportados no plasmídeo (VANKERCKHOVEN, 2004).

Três das cepas estudadas apresentaram um maior número de genes relacionados a fatores de virulência, estas foram as cepas de *L. mucosae*, L2-1 e L2-2' e a cepa B13 de *L. plantarum*, que apresentaram entre quatro e seis genes relacionados à virulência. Essas cepas foram consideradas como não seguras para serem utilizadas em um produto probiótico. Quatorze dos isolados não apresentaram gene relacionados à virulência amplificados pela PCR.

Algumas bactérias são capazes de produzir e secretar enzimas como a gelatinase, uma exoenzima hidrolítica capaz de hidrolisar moléculas que dificultam o transporte das fontes de nutrientes para a célula, como a gelatina, derivada do colágeno, caseína, hemoglobina e peptídeos bioativos. Essas enzimas liquefazem a gelatina e as transformam em aminoácidos, subunidades menores que podem ser transportados para o interior da célula onde são utilizados no fornecimento de energia ao microrganismo (VERMELHO, 2006). Isso contribui no aumento de sua patogenicidade, pois esses nutrientes são obtidos através da degradação do tecido hospedeiro.

Nesse estudo, apenas duas cepas apresentaram o gene *ge/E* para gelatinase, porém nenhuma delas tiveram sua expressão demonstrada *in vitro*. Um fator que interfere na expressão desse gene em *Enterococcus* está relacionado às condições de armazenamento da bactéria antes dos testes, como apresentado no trabalho de Macovei *et al.* (2009), onde observou que após o armazenamento em baixa temperatura (4-8 °C), alguns de seus isolados perderam a capacidade de hidrolisar gelatina. No entanto, para o gênero de *Lactobacillus*, não foi encontrado relatos da atividade dessa enzima.

Nas análises de fatores de virulência de Eaton e Gasson (2001), foi observado que algumas bactérias contendo o gene *ge/E* não expressavam atividade da gelatinase. Existem diversos fatores que podem influenciar a expressão de um gene, como um baixo nível de expressão, condições de laboratório e presença de genes silenciosos (CARIOLATO *et al.*, 2008).

A presença e expressão do gene relacionado a atividade hemolítica em cultura bacteriana é considerada uma característica negativa para utilização em produtos (GIRAFFA, 2003), pois o *operon* deste gene pode estar localizado tanto no genoma da bactéria como em seu plasmídeo ferormônio-responsivo. (GOMES, 2013). Na avaliação *in vitro* para o gene relacionado à atividade hemolítica, foi observado que apenas três das seis cepas que amplificaram o gene *cyIA* tiveram sua expressão confirmada, as cepas G6 e G8 de *L. plantarum* e a L2-1 de *L. mucosae*.

A hemolisina ocorre pelo requerimento de íons de ferro, BAL não precisam de ferro para crescer (ELLI *et al.*, 2008), no entanto, nove bactérias apresentaram atividade hemolítica, assim como nos estudos de Chaves *et al.* (2009) e Maragkoudakis *et al.* (2006), confirmando a importância da avaliação desse fator mesmo em bactérias consideradas seguras. Seis cepas apresentaram atividade hemolítica de 1 UH mesmo não tendo amplificado o gene *cyIA*, sugerindo a presença de outro gene relacionado a essa característica, como os outros dois genes para citolisina, *cyB* e *cyM* que também estão relacionados à atividade hemolítica (REVIRIEGO *et al.*, 2005).

Outro fator de virulência relevante, é a presença de elementos genéticos que determinam resistência antimicrobiana, podendo estar presente no organismo de forma intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é cromossomal não pode ser transferida, a adquirida, seja por mutações genéticas ou por aquisição de outra bactéria por transferência horizontal pode ser novamente transferida. A resistência à vancomicina apresentada em algumas espécies foi adquirida por transferência de plasmídeos (CHAVES, 2009), tornando assim, a ausência de gene de resistência a antibióticos um fator de extrema importância na escolha de um probiótico, evitando o risco de transferência desse gene para outras bactérias, principalmente as patogênicas (JUSTO *et al.*, 2013) O teste utilizado para avaliar a resistência à antibióticos é semi-quantitativo, pois proporciona um valor estimado para considerar sua resistência e suscetibilidade.

As quatro cepas que apresentaram um dos genes avaliados quanto à resistência à vancomicina (G8, L2-1, L2-2 e L2-2') também expressaram essa atividade no teste *in vitro*, porém cepas que não amplificaram nenhum dos genes de resistência à vancomicina também se mostraram capazes de resistir à ação desse antibiótico. Estudo realizado por Justo *et al.* (2013) demonstrou que a resistência à vancomicina, entre outros antibióticos, é comum em bactérias lácticas isoladas de alimentos, incluindo

Lactobacillus sp onde todas as suas amostras mostraram-se resistentes a esse antibiótico.

As sequências dos primers utilizados quanto à resistência à vancomicina foram comparada utilizando BLAST com sequências disponíveis na base de dados da NCBI GenBank, onde foi observado diferenças de nucleotídeos no local do anelamento no gene *vanA*, o que poderia prejudicar o anelamento e conseqüentemente a amplificação em algumas cepas. Sugerindo uma explicação para a ação de resistência ao antibiótico ser expresso em bactérias onde o gene em questão não foi amplificado.

O gene *vanB*, como já era esperado amplificou apenas as cepas de *L. mucosae*, pois foi caracterizado apenas para essa espécie entre o gênero de *Lactobacillus*, segundo os dados apresentados na pesquisa BLAST.

Com relação à produção de aminas biogênicas, não foi observado resultado positivo para produção de histamina, o que já era esperado, pois nenhuma das bactérias avaliadas amplificaram os genes relacionado à descarboxilação do aminoácido histidina. Todas as cepas avaliadas cresceram no meio contendo ambos os aminoácidos avaliados.

Quanto à descarboxilação da tirosina, dez das cepas avaliadas apresentaram nas placas um halo ao redor das colônias, indicado pela ausência do aminoácido. A maioria dessas bactérias também apresentou uma coloração roxo nas placas, independente da presença ou ausência do aminoácido no meio de cultura. Trabalhos anteriores consideraram essa mudança na coloração do meio como sendo um resultado positivo para a descarboxilação da tirosina, porém foi observado que as cepas 122 e 129 de *L. plantarum*, apresentaram a formação da cor roxa em ambos os meios, porém não houve formação do halo no meio contendo o aminoácido, sugerindo a mudança da cor do meio como um resultado falso positivo para o teste de descarboxilação, devido à possível formação de outros compostos alcalinos que provocariam a queda no pH e conseqüentemente mudança na coloração. O resultado interpretado como positivo para a descarboxilação da tirosina nesse estudo foi aquele interpretado e descrito nos experimentos de Joosten e Northolt (1989), onde a ausência do aminoácido é indicada pela formação de um halo, associada a sua descarboxilação.

A detecção de bactérias produtoras de aminas biogênicas utilizando técnicas convencionais de cultivo tem suas desvantagens, pois é comum de ocorrer falsos positivos/negativos, além de ser um teste de baixa sensibilidade (LANDETA *et al.*, 2007). A mudança da coloração do meio para roxo é devido ao aumento do pH, que poderia ser causado tanto pela descarboxiação do aminoácido quanto pela produção de outros compostos alcalinos como o amoníaco. Assim como o resultado falso positivo pode ocorrer devido à presença de enzimas degradantes de aminas biogênicas, conforme observação de Chen *et al* (1982).

Segundo Bover Cid (1999), os pesquisadores Baranowski (1985) e Roing-Sague's (1997) relataram problemas em seus estudos sobre a produção de aminas biogênicas em microrganismos produtores de ácido láctico (LAB) associados tanto ao fato de algumas bactérias não serem capazes de crescer no meio teste, quanto à ocorrência de falsos positivos associados à formação de outros compostos alcalinos e falsos negativos devido ao processo de fermentação por algumas bactérias que produziam o ácido em paralelo à produção da amina biogênica. A ocorrência de divergência de resultados entre os trabalhos de Silla-Santos (1998) e Bover Cid (2001) com lactobacilos isolados de carne, foi explicado pela ocorrência de resultado falso positivo/negativo em BAL e que a formação de aminas biogênicas não é uma característica da espécie e sim dependente da cepa (BOVER CID *et al.*, 2001), sendo necessária uma avaliação individual para cada cepa e associadas à confirmação por métodos moleculares. O problema com os resultados falso positivo/negativo utilizando os meios para detecção da descarboxilase é muito comum na literatura, porém, foi mantido apesar das melhorias realizadas por outros autores.

Apesar do resultado falso positivo/negativo que pode apresentar o teste, o meio de crescimento diferencial com adição do aminoácido é um teste rápido, fácil e barato que proporciona uma seleção preliminar das bactérias com ação de descarboxilação dos aminoácidos (KUCEROVA, 2009).

A utilização de técnicas de cultivo para detectar bactérias produtoras de aminas biogênicas é um processo lento e variável como foi observado nesse e em trabalhos anteriores, comprovando que os métodos de biologia molecular são uma alternativa interessante, pois oferecem uma informação mais segura sobre o risco potencial.

Para reforçar a hipótese de resultados falso positivos no teste bioquímico, foi observado que entre as dez cepas que obtiveram resultado positivo *in vitro*, apenas a cepa 115 amplificou o gene *tdc*, relacionado à produção de tiramina, o restante das bactérias positivo *in vitro* não amplificaram o gene. O *primer tdc* utilizado é degenerado, ou seja, possui um grande número de opções de nucleotídeos em várias posições, apresentando uma grande variedade de sequências, o que pode prejudicar na amplificação do gene, pois este poderia estar muito diluído para ter uma amplificação considerável.

Lacunas foram encontradas entre o rastreamento dos genes e os resultados obtidos *in vitro*. O rastreamento genético também possui suas limitações, apresentando possíveis falso positivos, como a amplificação de pseudogenes ou falsos negativos pela variabilidade das sequências e existência de mutações (TURPIN *et al.*, 2012). Faz-se necessário uma melhor compreensão da regulação desses genes.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo conclui que dos isolados avaliados, a cepa Q24 de *Lactobacillus plantarum* possui características probióticas desejadas, confirmando seu potencial biotecnológico devido a presença de três genes relacionados à adesão a mucosa, assim como sobreviver a presença dos quatro sais biliares avaliados *in vitro* e ser capaz de desconjugar dois desses. Esta também não amplificou ou expressou nenhum fator de virulência testado nesse trabalho, sendo considerada a mais indicada para prosseguir com os estudos de caracterização do potencial probiótico.

REFERÊNCIAS

ABRANTES, M. C.; LOPES, M. F.; KOK, J. Impact of Manganese, Copper and Zinc Ions on the Transcriptome of the Nosocomial Pathogen *Enterococcus faecalis*. **PLoS ONE**, v. 583, n. 28, 2011.

ABRIOUEL, H.; OMAR, N.B.; MOLINOS, A. C.; LÓPEZ, R. L.; GRANDE, M. J.; VIEDMA, P. M.; ORTEGA, E.; CANAMERO, M. M.; GALVEZ, A. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal populations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p. 38-49, 2008.

ALFAIA, C. M. R. P. M. **Perfil de aminoácidos livre, aminas biogénicas e outras frações azotadas em presunto de cura rápida: Sua influência na qualidade e no risco toxicológico do alimento**. 2002. Dissertação (Mestrado em Controlo da Qualidade e Toxicologia dos Alimentos) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2002.

ALLEGRETTI, L. **Isolamento e identificação de *Lactobacillus* spp. *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp. *Pediococcus* spp. E *Lactococcus* spp. Da microbiota intestinal de Papagaio verdadeiro (*Amazonia aestiva*)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Patologia experimental Comparada) – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2009

AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 15 de Agosto de 2014.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, von wright A, Ouwehand A, **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. v. 3, p.1-66, 2004.

BALASUBRAMANIAM, S.; KANNAN, T. R.; BASEMAN, J. B. The surface-exposed carboxyl region of *Mycoplasma pneumoniae* elongation factor-Tu interacts with fibronectin. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 7, p. 3116-3123, 2008.

BARANOWSKI, J. Assay for histidine decarboxylase activity. In: Pan, B. S., James, d. (Eds.), Histamine in marine products: Production by bacteria, **Measurement and prediction of Formation**, v. 252 p.10-13, 1985.

BARATTO, C. M.; MEGIOLARO, F. Comparação de diferentes protocolos de extração de DNA de bactérias para utilização em RAPD-PCR. **Unoesc & Ciência - ACET**, Joaçaba, v. 3, n. 1, p. 121-130, 2012.

BASSON, A.; FLEMMING, L. A.; CHENIA, H. Y. Evaluation of Adherence, Hydrophobicity, Aggregation, and Biofilm Development of *Flavobacterium johnsoniae*-Like isolates. **Microbial Ecology**, v. 55, p. 1-14, 2008.

BEGLEY, M.; GAHAN, C. G. M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 625-651, 2005.

BOEKHORST, J.; HELMER, Q.; KLEEREBEZEM, M.; SIEZEN, R. J. Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. **Microbiology** 152, 273-280, 2006.

BOVER-CID, S.; HOLZAPFEL, W. H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, p. 33-41, 1999.

BOVER-CID, S.; HUGAS, M.; PULIDO, M. I.; VIDAL-CAROU, M. C. Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 66, p. 185-189, 2001.

BUCK, B. L. Functional analysis of adhesion factors and signaling mechanisms in *Lactobacillus acidophilus* ncf. A dissertation submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University. **Microbiology**, 2006.

BUDE-UGARTE M, GUGLIELMOTTI D, GIRAFFA G, REINHEIMER JA, HYNES E. Nonstarter lactobacilli from Argentinean cheeses. **J Food Prot** v.69, 2983- 2991, 2006

CÂMARA, S. P. A. **Estudo do potencial bioativo e ecológico de bactérias do ácido láctico isoladas de queijo do pico artesanal**. 2012 Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo, 2012.

CARIOLATO, D.; ANDRIGHETTO, C.; LOMBARDI, A. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. **Food Control**, v.19, p. 886-892, 2008.

CHANG, M.; CHANG, H. C. Development of a screening method for biogenic amine producing *Bacillus* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 269-274, 2012.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 333-337, 1998.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 1, p. 2007-2014, 2001

CHAVES, K. S. **Avaliação de características probióticas e de segurança de *Lactobacillus* spp. Isoladas a partir de recém-nascidos**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

CHEN, K. C. S., CULBERTSON, N. J., KNAPP, J. S., KENNY, G. E., HOLMES, K. K. Rapid method for Simultaneous detection of the arginine dihydrolase system and amino acid decarboxylase in microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 16, n. 5, p. 909-919, 1982.

CHESSA, D.; WINTER, M. G.; NUCCIO, S. P.; BAUMLER, A. J. RosE represses *Std* fimbrial expression. In *Salmonella* entérica *Typhimurium*. **Mol. Microbiol**, v. 68, p. 573-587, 2008.

CHIANG B. L.; SHEIH, Y. H.; WANG, L. H.; LIAO, C. K.; GILL, H. S. Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. **Eur J Clin Nutr.** v. 54, p. 849–855, 2000

CHRISTIAENS, H. R. J.; LEER, P. H.; VERSTRAETE, W. Cloning and expression of a conjugated bile acid hydrolase gene from *Lactobacillus plantarum* by using a direct plate assay. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 3792-3798, 1992.

CLARO, F. S. G. **Desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a determinação de amins biogénicas em enchidos.** 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Superior de Tecnologia e de Gestão, Bragança, 2009

COBURN, P. S.; GILMORE, M. S. The Enterococcus faecalis cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 661-669, 2003.

CUI, L.; IWAMOTO, A.; LIAN, J. Q.; NEOH, H. M.; MARUYAMA, T.; HORIKAWA, Y.; HIRAMATSU, K. Novel Mechanism of Antibiotic Resistance Originating In Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 428-438, 2006.

DASHKEVICZ, M. P.; FEIGHNER, S. D. Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active *Lactobacillus* spp. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 55, p.11-16, 1989..

DATTA, R.; TSAI, S. P.; BONSIGNORE, P.; MOON, S. H.; FRANK, J. R. Technological and economic potencial of poly (lactic acid) and lactic acid derivaties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, p. 221-231, 1995.

DE LAS RIVAS, B., MARCOBAL, A., MUÑOZ, R. Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. **FEMS Microbiology Letters** v. 244, 367–372, 2005

DOBROGOSZ, W. J.; CASAS, I. A.; PAGANO, G. A.; TALARICO, T. L.; SJORBERG, B.; KARLSON, M. *Lactobacillus reuteri* and the enteric microbiota. In: Grubb R, Midtvedt T, Norin E, eds. **The Regulatory and Protective Role of the Normal Microflora.** London: Macmillan Ltd, p. 69–96, 1989.

DUNNE , C.; O'MAHONY, L.; MURPHY, L.; THORNTON, G.; MORRISSEY, D.; O'HALLORAN, S.; O'SULLIVAN, G. C.; SHANAHAN, F.; COLLINS, K. In-vitro selection criteria for probiotic bacteria of humun origin: Correlation with in vivo findings. **Am. J.Clin. Nutri**, v. 73, p. 386-392, 2001.

EATON, T. J.; GASSON, M. Molecularscreening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1628-1635, 2001.

ELKINS, C. A.; MOSER, S. A.; SAVAGE, D. C. Genes encoding bile salt hydrolases and conjugated bile salt transporters in *Lactobacillus johnsonii* 100-100 and other *Lactobacillus* species. **Microbiology**, v. 147, n. 12, p. 3403-3412, 2001.

ELLI, M.; ZINK, R.; RYTZ, A.; RENIERO, R.; MORELLI, L. Iron requirement of *Lactobacillus* spp. In completely chemically defined growth media. **Journal of applied Microbiology**, v. 88, p. 695-703, 2008

ERKKILÄ, S.; PETÄJÄ, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Science**, v. 55, p. 297-300, 2000.

ETZOLD, S.; KOBER, O. I. Structural basis for adaptation of lactobacilli to gastrointestinal mucus. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 888-903, 2014.

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS / WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotic in Food, Ontario, Canada, 2002. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. Acessado em 20 de Outubro de 2014.

FAVARO, L.; BASAGLIA, M.; CASELLA, S.; HUE, I.; DOUSSET, X.; FRANCO, B. D. G. M.; TODOROV, S. D. Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from homemade White brine cheese. **Food Microbiology**, v. 38, p. 228-239, 2014.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v.155, p.1749-1757, 2009.

FRANZ, C. M. A. P.; MUSCHOLL-SILBERHORN, A. B.; YOUSIF, N. M. K.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J.; HOLZAPFEL, W. H. Incidence of virulence factor and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 9, p.4385-4389, 2001.

FULLER, A. A Review: Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989

FURUMURA, M. T.; CARBONELL, G. V.; LEMES-MARQUES, E. G.; DARINI, A. L. C.; YANO, T. Virulence-associated characteristics of *Enterococcus Faecalis* strains isolated from clinical sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 230-236. 2006.

GAMA, B. A. **Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência de *Enterococcus* spp.** 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio de Janeiro, 2008.

GÁRCÍA-GARCÍA, P.; BALBUENA-BRENES, M.; HORNERO-MENDÉZ, D.; GARCÍA-BORREGO, A. E.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A. Content of biogenic amines in table olives. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 111-116, 2000.

GEORGIEVA, R.; ILIEV, I.; HAERTLÉ, T.; CHOBERT, J.; IVANOVA, I.; DANOVA, S. Technological properties of candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 696-702, 2009.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88 p. 215 – 222, 2003.

GOMES, M. B. Caracterização de *Enterococcus* spp. Isolados de alimentos quanto à presença de genes de virulência, da descarboxilase e de atividade antimicrobiana. 2013. Dissertação (Mestrado em vigilância sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013

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

GORSKI, L.; GODCHAUX III, W.; LEADBETTER, E. R.; WAGNER, R. R. Diversity in surface features of *Cytophaga johnsoniae* motility mutants. **J Gen Microbiol**, v. 138, p. 1767-1772, 1992.

GOUVEIA, I. M. **Avaliação Da Produção de Aminas Biogénicas por *Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Enterococcus* Isolados de Produtos Cárneos Fermentados/Fumados Portugueses.** 2013. Dissertação (Mestrado em segurança alimentar) - Universidade Técnica de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 2013

GOUVEIA, N. N. F. **Desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de aminas biogénicas em tunídeos.** 2009. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada) - Universidade da Madeira, Funchal, 2009.

GRANATO, D.; BERGONZELLI, G. E.; PRIDMORE, R. D.; MARVIN, L. ROUVET, M.; CORTHE'SY-THEULAZ, I. E. Cell Surface-Associated Elongation Factor Tu Mediates the Attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to Human Intestinal Cells and Mucins. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p. 2160-2169, 2004.

GROSS, G.; SNEL, J.; BOEKHORST, J.; SMITS, M. A.; KLEEREBEZEM, M. Biodiversity of mannose-specific adhesion in *Lactobacillus plantarum* revisited: strain-specific domain composition of the mannose-adhesin. **Beneficial Microbes**, v. 1, n. 1, p. 61-66, 2010.

GUSILS, C.; GONZALEZ, S. M.; OLIVER, G. *Lactobacilli* isolated from chicken intestines: potential use as probiotics. **J. Food Prot**, v. 62, p. 252-256, 1999.

HACKER, J.; KAPER, J. B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. **Annu Rev Microbiol**, v. 54, p. 641-679, 2000.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L. HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends Food Science & Technology**, v. 5, n. 2, p. 42-49, 1994.

HUSAIN, S. Effect of ferric iron siderophore production and pyrene degradation by *Pseudomonas fluorescens* 29L. **Current Microbiology**, v. 57, p. 331-334, 2008.

ITSARANUWAT P, AL-HADDAD KSH, ROBINSON RK. The potential therapeutic benefits of consuming health-promoting fermented dairy products: a brief update. **Int J Dairy Technol**. v. 56 n. 4 p. 203-210, 2003.

JETT, B. D.; HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Virulence of enterococci. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 4, p. 462-478, 1994.

JOOSTEN, H. M. L. J.; NORTHOLT, M. D. Detection, growth, and amine-producing capacity of Lactobacilli in cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 9, p. 2356-2359, 1989.

JUGE, N. Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. **Trends in Microbiology**, v. 20, 2012.

JUSTO, T. H., TUSSOLINI, L., MACEDO, R. E. F., WOLUPECK, H. L., SANTA, H. S. D., SANTA, O. R. D. Resistência de Lactobacillus sp. Isolados de salames artesanais produzidos na região sul do Brasil a antibióticos. **Vet. E Zootec.** V. 20 n. 2: p. 285-295, 2013.

KALAC, P.; DADÁKOVÁ, E.; PELIKÁNOVÁ, T. Content of biogenic amines and polyamines in some species of European wild-growing edible mushrooms. **Eur. Food Res. Technol**, v. 230, p. 163-170, 2009.

KIM, G. B.; LEE, B. H. Biochemical and Molecular Insights into Bile Salt Hydrolase in the Gastrointestinal Microflora - A Review - Asian-Aust. **J. Anim. Sci**, v. 18, n. 10, 2005.

KLEEREBEZEM, M.; BEERTHUYZEN, M. M.; VAUGHAN, E. E.; DE VOS, W. M.; KUIPERS, O. P. Controlled gene expression systems for lactic acid bacteria: transferable nisin-inducible expression cassettes for *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Lactotobacillus* spp. **Appl Environ Microbiol.** v. 63, p. 4581-4593, 1997.

KLEEREBEZEM, M.; BOEKHORST, J. R.; VAN KRANENBURG, D.; MOLENAAR, O. P.; KUIPERS, R.; LEER, R.; TARCHINI, S. A.; PETERS, H. M.; SANDBRINK, M. W. E. J.; FIERS, W. STIEKEMA, R. M. K.; LANKHORST, P. A.; BRON, S. M.; HOFFER, M. N. N.; GROOT, R.; KERKHOVEN, M.; DE VRIES, B.; URSING, W. M.; DE OF VOS, R. J. SIEZEN. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States America.** V. 100 n. 4 p. 1990-1995, 2003.

KOCH, S.; HUFNAGEL, M.; THEILACKER, C.; HUEBNER, J. Enterococcal infections: hst response, therapeutic, and prophylactic possibilities. **Vaccine**, v. 22, p. 822-830, 2004.

KRAHENBUHL, L. S.; TALOS, C.; FISCHER, S.; REICHEN, J. Toxicity of Bile Acids on the Electron Transport Chain of Isolated Rat Liver Mitochondria. **Hepatology**, v. 19, n. 2, p. 471-479, 1994.

KUČEROVÁ, K.; SVOBODOVÁ, H.; TŮMA, S.; ONDRÁČKOVÁ, I.; PLOCKOVÁ, M. Production of Biogenic Amines by Enterococci Czech. **J. Food Sci**, v. 27, 2009.

KUMAR, M., NAGPAL, R., KUMAR, R., HEMALATHA, R., VERMA, V., KUMAR, A., CHAKRABORTY, C., SINGH, C., MAROTTA, F., JAIN, S., YADAV, H. *Review Article* Cholesterol-Lowering Probiotics as Potential Biotherapeutics for Metabolic Diseases. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, 2012

KUMAR, M.; BEHARE, P. V.; MOHANIA, D.; ARORA, S.; KAUR, A.; NAGPAL, R. *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* DGCC 420 modulate unspecific cellular immune response in healthy adults. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 5, p. 584-593, 2008.

LANDETA, G., DE LAS RIVAS, B., CARRASCOSA, A. V., MUNOZ, R. Screening of biogenic amine production by coagulase-negative staphylococci isolated during industrial Spanish dry-cured ham processed. *Meat Science*, v. 77, p 556-561, 2007.

LATORRE-MORATALLA, M. L.; BOVER-CID, S.; TALON, R.; GARRIGA, M.; ZANARDI, E.; IANIERI, A.; FRAQUEZA, M. J.; ELIAS, M.; DROSINOS, E. H.; VIDAL-CAROU, M. C. Strategies to reduce biogenic amine accumulation in traditional sausage manufacturing. *LWT Food Science and Technology*, v. 43, p. 20-25, 2010.

LEBRETON, F.; RIBOULET BISSON, E.; SERROR, P.; SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; TORELLI, R.; HARTKE, A.; AUFRAY, Y.; GIARD, J. C. Ace, which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by Ers and is involved in virulence. *Infection and Immunity*, v. 77, n. 7, p. 2832-2839, 2009.

LEE, J. H.; VALERIANO, V. D.; SHIN, Y.; CHAE, J. P.; KIM, G. B.; HAM, J.; CHUN, J.; KANG, D. Genome Sequence of *Lactobacillus mucosae* LM1, Isolated from Piglet Feces. *J. Bacteriol*, v. 194, n. 17, 2012. 4766p.

LEITE, M. T. **Otimização da produção do ácido láctico através da fermentação do soro de queijo por *Lactobacillus helveticus***. 2006. 179f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2006.

LEVEILLE-WEBSTER, C. Bile Acids - What's New? **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery**. v. 12, n. 1, p. 2-9, 1997.

LINHARES, I. M.; GIRALDO, P. C.; BARACAT, E. C. Novos conhecimentos sobre a flora bacteriana vaginal. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 3, 2010.

LUND, B.; ADMASSON, I.; EDLUND, C. Gastrointestinal transit survival of an *Enterococcus faecium* probiotic strain administered with or without vancomycin. *International J. Food Microbiol.* v. 77, p. 109-115, 2002.

MACOVEI, L.; GHOSH, A.; THOMAS, V. C.; HANCOCK, L. E.; MAHMOOD, S.; ZUREK, L. *Enterococcus faecalis* with the gelatinase phenotype regulated by the *fsr* operon and with biofilm-forming capacity are common in the agricultural environment. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 1540-1547, 2009.

MARAGKOUidakis, P. A.; ZOU, POPOULOU, G.; MIARIS, C.; POT, B.; TSAKALIDOU, E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**. V. 16, p. 189-199, 2006.

MARINÉ, A.; VIDAL, M. C.; IZQUIERDO, M.; VECIANA, T. Aminas biogénicas em alimentos: unos microcomponentes de interés múltiple. **Rev. Esp. Nutr. Comunitaria**, p. 138-141, 1995.

MARTIN, B.; GARRIGA, M.; HUGAS, M.; BOVER-CID, S.; VECIANA-NOGUÉS, M. T.; AYMERICH, T. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase positive cocci from slightly fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, p. 148-158, 2006.

MARTÍN-PLATERO, A. M.; VALDIVIA, E.; MAQUEDA, M.; BUENO, M. M. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 132, p. 24-32, 2009.

MASSON, F.; ECLACHE, L.; COMPTE, T.; TALON, R.; MONTEL, M. C. Qui produit des amines biogènes dans produits carnés? **Viandes des Produits Carnés**. v. 7, p. 287-289, 1996

MATHARA, J. M.; SCHILLINGER, U.; KUTIMA, P. M.; MBUGUA, S. K.; GUIGAS, C.; FRANZ, C.; HOLZAPFEL, W. H. Functional Properties of Lactobacillus plantarum Strains Isolated from Maasai Traditional Fermented Milk Products in Kenya. **Curr Microbiol**, v. 56, p. 315-321, 2008.

MEDEIROS, A. W. **Avaliação dos fatores de virulência e a capacidade de formação de biofilme *in vitro* em isolados alimentares e clínicos de *Enterococcus* sp. e utilização de PCR-RFLP para a identificação de *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus gallinarum***. 2011. Dissertação (Mestrado EM Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio de Janeiro, 2011

MIYOSHI, Y.; OKADA, S.; UCHIMURA, T.; SATOH, E. A mucus adhesion promoting protein, MapA, mediates the adhesion of Lactobacillus reuteri to Caco-2 human intestinal Epithelial cells. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v. 70, n. 7, p. 1622-1628, 2006.

MOSSEL, D. A. A.; GARCIA, B. M. Intoxicaciones alimentarias agudas: enfermedades producidas por la presencia en los alimentos de toxinas preformadas de origen bacteriano. Síndromes causados por bacterias productoras de aminas vasopresoras. **Microbiología de los Alimentos**.p. 29-30, 1985.

MUNDY, L. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. Relationship between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, p. 213-522, 2000.

MURRAY, B. E. Diversity among multidrug-resistant enterococci. **Emerging Infectious Disease**, v. 4, p. 37-47, 1998.

NAGPAL, R.; YADAV, H.; PUNIYA, A. K.; SINGH, K.; JAIN, S.; MAROTTA, F. Potential of probiotics and prebiotics for symbiotic functional dairy foods. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 2, p. 75-84, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger, Principles of Biochemistry**. Fourth Edition, artmed, capítulo 7 pag 254, 2013.

NIELSEN, E. M.; SCHLUNDT, J.; GUNVIG, A.; JACOBSEN, B. L. Epithelial, Mucus and Lumen Subpopulations of *Escherichia coli* in the Large Intestine of Conventional and Gnotobiotic Rats. **Microbial ecology in health and disease**, v. 7, p. 263-273, 1994.

PORTA, G. Transporte dos Ácidos Biliares. **Gaz. Méd**, v.76, p.S13-S15, 2006.

PRETZER, G.; SNEL, J.; MOLENAAR, D.; WIERSMA, A.; BRON, P. A.; LAMBERT, J.; DE VOS, W.; VAN DER MEER, R.; SMITS, M. A.; KLEEREBEZEM, M. Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of Lactobacillus plantarum. **J. Bacteriol**, v. 187, p. 6128-6136, 2005.

RAFTER, J. Probiotics and colon cancer. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol**, v. 17, n. 5, p. 849-859, 2003.

RAMIAH, K., 2008. **Characterization of the adhesion genes of probiotic lactic acid bacteria**. Tese (Doctor of Philosophy) - University of Stellenbosch, March, 2008

RAMIAH, K; REENEN, C. A.; DICKS, L.M. T., Expression of the mucus adhesion genes Mub and MapA, adhesion-like factor EF-Tu and bacteriocin gene plaA of *Lactobacillus plantarum* 423, monitored with real-time PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 405-409, 2007.

REDONDO, N. C. **Avaliação *in vitro* de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416**. 2008. Dissertação (Mestrado em Alimentos e nutrição) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2008.

REVIRIEGO, C.; EATON, T.; MARTÍN, R.; JIMÉNEZ, E.; FERNÁNDEZ, L.; GASSON, M. J.; RODRÍGUEZ, J. M. Screening of Virulence Determinants in *Enterococcus faecium* Strains Isolated From Breast Milk. **Jornal of Human Lactation** v. 21 n.2, p 131-137, 2005.

RICE, L. B.; CARIAS, L.; RUDIN, S.; VAEL, C.; GOOSSENS, H.; KONSTABEL, C.; KLARE, I.; NALLAPAREDDY, S. R.; HUANG, W.; MURRAY, B. E. A potential virulence gene hylEfm, predominantes in *Enterococcus faecium* of clinical origin. **Journal Infectious Diseases**, v.187, p. 508-512, 2003.

ROING-SAGUES, A. X., HERMANDEZ-HERRERO, M. M., LOPEZ-SABATER, E. I., RODRIGUEZ-JEREZ, J. J., MORA-VENTURA, M. T. Evaluation of three decarboxylating agar media to detect histamine and tyramine-production bacteria in ripened sausages. **Lett. Appl. Microbiol.** V. 25, p. 309-312, 1997

ROJAS, M.; ASCENCIO, F.; CONWAY, P. L. Purification and characterization of a surface protein from *Lactobacillus fermentum* 104R that binds to porcine small intestinal mucus and gastric mucin. **Appl Environ Microbiol**, v. 68, p. 2330-2336, 2002.

ROOS, S., KARNER, F.; AXELSSON, L.; JONSSON, H. *Lactobacillus mucosae* sp. nov., a new species with *in vitro* mucus-binding activity isolated from pig intestine. **Int J Syst Evol Microbiol** v. 50, p. 251–358, 2000

RYAN, P. M.; GUINANE, C. M.; LONDON, L. E. E.; KELLEHER, P. R.; FITZGERALD, G. F.; CAPLICE, N. M.; ROSS, R. P.; STANTON, C. Genome sequence of the Heteropolysaccharide-producing strain *Lactobacillus mucosae* DPC 6426. **Genome Announc** v. 3 n.1, 2015.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **J. Biotechnol**, v. 84, p. 197-215, 2000.

SATOH, E. R. J.; LEER, M.; ROJAS, P. L.; CONWAY, P. H.; POUWELS. The gene encoding the adhesion promoting protein MapA from *Lactobacillus reuteri* 104R is part of an operon whose expression is controlled by a mechanism of transcription attenuation, involving cysteine. **Gene bank** Accession Number AJ 293860. 2000.

SAVAGE, D. C.; MOSER, S. A. *Lactobacillus acidophilus* putative bile salt hydrolase operon, complete sequence. **Gen bank** Accession no. AF091248, 1999

SCHAR-ZAMMARETTI, P.; UBBINK, J. The Cell Wall of Lactic Acid Bacteria: Surface Constituents and Macromolecular Conformations. **Biophysical Journal**, v. 85, p. 4076-4092, 2003.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. Mechanisms of microbial disease. Ed. **Lippincott, Williams & Wilkins**, 3th edition 1999.

SCHEPERS, A. W.; THIBAUT, J.; LACROIX, C. Lactobacillus helveticus growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I. Multiple factor kinetic analysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p 176-186, 2002.

SCHIFFRIN, E.; ROCHAT, F.; LINK-AMSTER, H.; AESCHLIMANN, J.; DONNET-HUGHES, A. *Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria*. **J Dairy Sci** v. 78, p. 491-497, 1995.

SCHLIEVERT, P.; GAHR, P. ASSIMACOPOULOS, A.; DINGES, M.; STOEHR, J.; HARMALA, J. W.; DUNNY, G. M.; Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of *Enterococcus faecalis* endocarditis. **Infect Immun** v. 66 p. 218–223, 1998.

SEMEDO, T.; SANTOS, M. A.; MARTINS, P.; LOPES, M. F. S.; MARQUES, J. J. F.; TENREIRO, R.; CRESPO, M. T. B. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in Enterococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 6, p. 2569-2576, 2003.

SERVIN, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiol. Rev**, v. 405-440, 2004.

SHANKAR, N.; BAGHDAYAN, A. S.; HUYCKE, M.; LINDAHL, G.; GILMORE, M. S. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. **Infection Immunity**, v. 67, n. 1, p. 193-200, 1999.

SHANKAR, N.; LOCKATELL, C. V.; BAGHDAYAN, A. S.; DRACHENBERG, C.; GILMORE, M. S. JOHNSON, D. E. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein *Esp* in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n.7, p.4366-4372, 2001.

SILLA-SANTOS, M. H., Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat productions. **J. Food Microbiol.** V. 39, p. 227-230, 1998.

SIMPSON, W. J.; TAGUCHI, H. The genus *Pediococcus* with notes on the genera *Tetratogenococcus* and *Aerococcus*. **The genera of Lactic Acid Bacteria**. V. 2, p. 125-172, 1995.

SINGH, K. V., NALLAPAREDDY, S. R., SILANPAA J., MURRAY, B. E. Importance of the collagen adhesion *Ace* in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis. **Plos Pathogens**. V. 6 n. 2, 1000716, 2010

SMET, I. D.; HOORDE, L. V.; WOESTYNE, M. V.; CHRISTIAENS, H.; VERSTRAETE, W. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli, **Journal of Applied Bacteriology**, v. 79, n. 3, p. 292-301, 1995.

SPANHAAK, S.; HAVENAAR, R.; SCHAAFSMA, G. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 52, p. 899-907, 1998.

STADNIK, J.; DOLATOWSKI, Z. J. Biogenic amines in meat and fermented meat products. *Acta Scientiarum Polunorum. Technologia Alimentaria*, v. 9, n. 3, p. 251-263, 2010.

TAMINE, A. Probiotic Dairy Products. **Dairy Science and Technology Consultant** Ayr, UK by Blackwell Publishing Ltd 2005

TARJÁN, V.; JÁNOSSY, G. The role of biogenic amines in foods. **Die Nahrung**, v. 22, n. 3, p. 285-289, 1978

TAVARES, W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos Editora Atheneu, ed. 20, São Paulo, Cap 18, p438-441, 2001

TIECCO, G.; TANTILLO, G.; FRANCIOSO, E.; PAPARELLA, A.; DE NATALE, G. Ricerca qualitativa di alcune amine biogene in insaccati nel corso della stagionatura. **Industrie Alimentari**, v. 25, p. 209-213, 1986.

TODOROV, S. D.; BOTES, M.; GUIGAS, C.; SCHILLINGER, U.; WIID, I.; WACHSMAN, M. B.; HOLZAPFEL, W. H.; DICKS, L. M. T. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 465-477, 2008.

TODOROV, S. D.; WACHSMAN, M.; TOMÉ, E.; DOUSSET, X.; DESTRO, M. T.; DICKS, L. M. T.; FRANCO, B. D. G. M.; VELHO, M. V.; DRIDER, D. Characterisation of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. **Food Microbiology**, v. 27, p. 869-879, 2010.

TORRIANI, S.; FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* Gene Sequence Analysis and Multiplex PCR Assay with *recA* Gene-Derived Primers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 3450-3454, 2001.

TURCHI, B.; MANCINI, S.; FRATINI, F.; PEDONESE, F.; NUVOLONI, R.; BERTELLONI, F.; EBANI, V. V.; CERRI, D. Preliminary evaluation of probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Italian food products. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 29, p. 1913-1922, 2013.

TURPIN, W.; HUMBLLOT, C.; NOORDINE, M. L.; THOMAS, M.; GUYOT, J. P. Lactobacillaceae and cell adhesion: genomic and functional screening. **PLoS ONE**, v. 7, 2012.

UPADHYAYA, P. M. G.; RAVIKUMAR, K. L.; UMAPATHY, B. L. REVIEW of virulence factors of enterococcus: an emerging nosocomial pathogen. **Indian journal of medical Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 301-305, 2009.

VAN TASSELL, M. L.; MILLER, M. J. *Lactobacillus* adhesion to mucus. **Nutrients** v. 3, 613-636, 2011.

VANKERCKHOVEN, V.; AUTGAERDEN, T. V.; VAEL, C.; LAMMENS, C.; CHAPPELLE, S.; ROSSI, R.; JABES, D.; GOOSSENS, H. Development of a Multiplex PCR for the

Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* Genes in Enterococci and Survey for Virulence Determinants among European Hospital Isolates of *Enterococcus faecium* **Journal Clinical Microbiology**, v. 42 n.10 p. 4473 – 4479, 2004

VATSOS, I. N.; THOMPSON, K. D.; ADAMS, A. Adhesion of the pathogen *Flavobacterium psychrophilum* to unfertilized eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and α -hexadecane. **Lett Appl Microbiol**, v. 33, p. 178-182, 2001

VERMELHO, A. B., PEREIRA, A. F., COELHO, R. R. R.; PADRON, T. S. Prática de microbiologia, Testes Bioquímicos para identificação de bactérias. Ed. Guanabara, v. 1, p. 190-191, 2006.

VESTERLUND, S. V.; VANKERCKHOVEN, M.; SAXELIN, H.; GOOSSENS, S.; SALMINEN, OUWEHAND, A. C. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: Presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. **Int. J. Food Microbiol**, v. 116, p. 325-331, 2007.

VINDEROLA, G. C.; REINHEIMER, J. A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristic and biological barrier resistance. **Food Res**, v. 6, p. 885-904, 2003.

VRIES, M. C.; VAUGHAN, E. E.; KLEEREBEZEMA, M.; DE VOS, W. M. *Lactobacillus plantarum* – survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1018-1028, 2006.

WAAR, K.; VAN DER MEI, H. C.; HARMSSEN, J. M. H.; DEGENER, J. E.; BUSSCHER, H. J. *Enterococcus faecalis* surface proteins determine its adhesion mechanism to bile drain materials. **Microbiology**, v. 148, p. 1863-1870, 2002.

WATANABE, M.; KINOSHITA, H.; NITTA, M.; YUKISHITA, R.; KAWAI, V.; KIMURA, K.; TAKITOMO, N.; YAMAZAKI, Y.; TATENO, Y.; MIURA, K.; HARI, A.; KITAZAWA, H.; SAITO, T. Identification of a new adhesin-like protein from *Lactobacillus mucosae* ME-340 with specific affinity to the human blood group A and B antigens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 927-935, 2010

WOLFF, D. G. **Caracterização do fator de alongamento Tu (EF-Tu) de *Leptospira*: aspectos relacionados à colonização e evasão ao sistema complemento do hospedeiro**. 2013. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ZAGO, M.; FORNASARI, M. E.; CARMINATI, D.; BURNS, P.; SUÀREZ, V.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J.; GIRAFFA, G. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1033-1040, 2011.

ANEXO A - PESQUISA REALIZADA UTILIZANDO O BLAST COMPARANDO AS DIFERENÇAS NO COMPRIMENTO DO *AMPLICON* E NUCLEOTÍDEOS ENTRE O PRIMER *MSA* UTILIZADO E OUTRAS SEQUENCIAS DISPONÍVEIS.

>[EU011786.1](#) Lactobacillus plantarum strain CIP 104452 mannose-specific adhesin-like (msa) gene, partial sequence

product length = 1741

Forward primer 1 GCTATTATGGGGATTACGTTG 21
 Template 22

Reverse primer 1 CTGTCTTGACAATAGCCATATA 22
 Template 1762GA..... 1741

>[EU011785.1](#) Lactobacillus plantarum strain NC8 mannose-specific adhesin-like (msa) gene, partial sequence

product length = 1741

Forward primer 1 GCTATTATGGGGATTACGTTG 21
 Template 10

Reverse primer 1 CTGTCTTGACAATAGCCATATA 22
 Template 1750G.....T..... 1729

Fonte Blast-Ncbi

**ANEXO B: COMPARAÇÃO DA SEQUENCIA DO PRIMER *vanA* UTILIZADO COM
DEMAIS SEQUENCIAS DISPONÍVEIS NO BANCO DE DADOS DA NCBI
UTILIZANDO BLAST, APRESENTANDO DIFERENÇAS ENTRE OS
NUCLEOTÍDEOS.**

>[CP006249.1](#) Lactobacillus plantarum ZJ316 plasmid pLP-ZJ103, complete sequence

product length = 1930

Forward primer 1 TCTGCAATAGAGATAGCCGC 20
Template 26642 ...T.CCC..C..... 26661

Reverse primer 1 GGAGTAGCTATCCCAGCATT 20
Template 28571 .TT.....A.A..C.... 28552

>[CP006039.1](#) Lactobacillus plantarum 16 plasmid Lp16F, complete sequence

product length = 1930

Forward primer 1 TCTGCAATAGAGATAGCCGC 20
Template 44269 ...T.CCC..C..... 44288

Reverse primer 1 GGAGTAGCTATCCCAGCATT 20
Template 46198 .TT.....A.A..C.... 46179

>[CP002223.2](#) Lactobacillus plantarum subsp. plantarum ST-III plasmid pST-III, complete sequence

product length = 1930

Forward primer 1 TCTGCAATAGAGATAGCCGC 20
Template 5620 ...T.CCC..C..... 5639

Reverse primer 1 GGAGTAGCTATCCCAGCATT 20
Template 7549 .TT.....A.A..C.... 7530

Fonte: Blast-Ncbi