



Universidade de Brasília

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL DE SEGURANÇA, PROBIÓTICO E
TECNOLÓGICO DE *PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS* ISOLADO DE LEITE
DE OVELHAS**

MAYARA LEAL FERNANDES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA-DF



Universidade de Brasília

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL DE SEGURANÇA, PROBIÓTICO E
TECNOLÓGICO DE *PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS* ISOLADO DE LEITE
DE OVELHAS**

MAYARA LEAL FERNANDES

ORIENTADORA: MÁRCIA DE AGUIAR FERREIRA

PUBLICAÇÃO: 137/2017

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA-DF

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL DE SEGURANÇA, PROBIÓTICO E TECNOLÓGICO DE *PEDIOCOCCUS PENTOSACEUS* ISOLADO DE LEITE DE OVELHAS

MAYARA LEAL FERNANDES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.

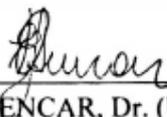
APROVADA POR:



MÁRCIA DE AGUIAR FERREIRA, Dra. (Universidade de Brasília) (Orientadora)



JANICE LISBOA DE MARCO, Dra. (Universidade de Brasília) (Membro externo)



ERNANDES RODRIGUES ALENCAR, Dr. (Universidade de Brasília) (Membro externo)

Brasília, 22 de fevereiro de 2017.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

FERNANDES, M. L. **Avaliação *in vitro* do potencial de segurança, probiótico e tecnológico de *Pediococcus pentosaceus* isolado de leite de ovelhas.** Brasília, Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, 2017. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de Mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos; foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

Fernandes, Mayara Leal

Avaliação *in vitro* do potencial de segurança, probiótico e tecnológico de *Pediococcus pentosaceus* isolado de leite de ovelhas/Mayara Leal Fernandes. Orientação de Márcia de Aguiar Ferreira, 2017. 47p.: il.

Dissertação de mestrado (M) – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Veterinária, 2017.

1. Bactérias ácido-láticas. 2. Culturas iniciadoras. 3. Tecnologia do leite. I. Ferreira, Márcia de Aguiar. II. Título.

Dedico este trabalho a Deus, à Nossa Senhora, aos meus pais, Sostenis e Teresinha, ao meu irmão Marcel, ao meu namorado Renan, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos felizes, em todos os momentos tristes e, principalmente, em todos os momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido a graça de concluir essa etapa, pois é Dele toda honra e a vitória alcançada em minha vida; e a minha querida mãezinha, Nossa Senhora, por sempre estar na frente de todos os meus problemas e que por inúmeras vezes me deu força e coragem nos momentos de insegurança e ansiedade.

Agradeço à minha mãe, minha maior fonte de inspiração, determinação e alegria da minha vida. Se eu for metade do que ela é, serei muito mais do que já imaginei. Agradeço ao meu pai, meu mestre, meu maior exemplo de vida e de honestidade. Agradeço ao meu irmão, o mais maravilhoso de todos. Agradeço ao meu namorado, Renan, que sempre me ajudou a ser forte e acreditar que seria capaz! Você é a melhor companhia de todas as horas! Agradeço a toda minha família, minha base e motivação para tudo. Amo vocês!

Aos professores da Universidade de Brasília, meus mestres brilhantes e dedicados que são exemplo de profissionalismo e conhecimento, em especial, à professora Márcia, a melhor orientadora do mundo. Às meninas do laboratório, Jaqueline e Sabrina que sempre me ajudaram em tudo!

Ao Professor Luís Augusto Nero por autorizar a realização de uma parte da minha pesquisa em Viçosa e ao S.D. Todorov por ter me instruído nesta etapa. Às meninas fofas de Viçosa que me ajudaram muito! À Monique por ter me emprestado seu famoso “caderninho”, à Valéria por ter me ajudado na interpretação de alguns testes e à Luana, que me forneceu diversas dicas e conselhos, além de me auxiliar em alguns testes, sua ajuda foi imprescindível! E a todos de Viçosa que de alguma forma me ajudaram!

Aos meus queridos amigos, pelo companheirismo e apoio de sempre. Aos animais, principalmente, ao Éggus e à Bolota que foram a razão desse caminho. E a todos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!!

SUMÁRIO

Página

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1. Origem dos micro-organismos utilizados.....	15
2.2 Testes para Avaliação da Segurança	15
2.2.1 Atividade hemolítica.....	15
2.2.2 Produção de gelatinase.....	15
2.2.3 Produção de lipases	15
2.2.4 Produção de desoxirribonuclease.....	16
2.2.5 Produção de aminas biogênicas	16
2.3 Avaliação do Potencial Probiótico	16
2.3.1 Hidrofobicidade	16
2.3.2 Determinação da autoagregação e coagregação	17
2.3.3 Desenvolvimento em diferentes concentrações de pH e bile.....	17
2.3.4 Avaliação da atividade da enzima β -galactosidase	18
2.3.5 Resistência aos antimicrobianos e medicamentos	18
2.3.6 Potencial antagonista.....	20
2.4 Avaliação do Potencial Tecnológico.....	20
2.4. 1 Capacidade de acidificação.....	20
2.4.2 Atividade proteolítica extracelular	20
2.4.3 Formação exopolissacarídeos (EPS).....	20
2.4.4 Resistência a diferentes concentrações de NaCl.....	20
2.4.5 Atividade autolítica	21
2.4.6 Produção de diacetil	21
2.5. Delineamento Experimental.....	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21

3.1 Avaliação de Segurança	21
3.1.1 Fatores de virulência	21
3.1.2 Produção de aminas biogênicas (AB).....	22
3.2 Avaliação do Potencial Probiótico	23
3.2.1 Hidrofobicidade	23
3.2.2 Autoagregação e coagregação.....	25
3.2.3 Desenvolvimento em diferentes concentrações de pH e bile.....	28
3.2.4 Avaliação da atividade da enzima β -galactosidase	33
3.2.5 Resistência aos antimicrobianos e medicamentos	34
3.3 Avaliação do Potencial Tecnológico.....	36
3.3.1 Capacidade de acidificação	36
3.3.2 Produção de exopolissacarídeos (EPS).....	37
3.3.3 Produção de diacetil	37
3.3.4 Atividade proteolítica extracelular	38
3.3.5 Autólise.....	39
3.3.6 Desenvolvimento em diferentes concentrações de NaCl.....	39
4. CONCLUSÃO	40
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
6. BIBLIOGRAFIA.....	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Equações da regressão referentes ao desenvolvimento de seis isolados de <i>P. pentosaceus</i> em caldo MRS, em função do pH (x) e do tempo (h, y), e respectivos coeficientes de determinação (R^2).	31
TABELA 2	Equações da regressão referentes ao desenvolvimento de seis isolados de <i>P. pentosaceus</i> em caldo MRS, em função da concentração de bile (% x) e do tempo (h, y), e respectivos coeficientes de determinação (R^2).	33
TABELA 3	Efeito de antibióticos no desenvolvimento de <i>P. pentosaceus</i> apresentados como “R”-resistente, “S”-sensível e “I”-intermediário.	34
TABELA 4	Caracterização do Potencial Tecnológico de <i>P. Pentosaceus</i> isolados de leite de ovelha.	36

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Hidrofobicidade de isolados de *P. pentosaceus*. Valores médios seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. **24**
- FIGURA 2** Autoagregação de isolados de *P. pentosaceus*, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. sakei* ATCC 15521 e *E. faecalis* ATCC 19444. Valores médios seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. **25**
- FIGURA 3** Coagregação de isolados de *P. pentosaceus* com *L. monocytogenes* ATCC 7644 (A), *L. sakei* ATCC 15521 (B) e *E. faecalis* ATCC 19444 (C). Valores médios seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. **27**
- FIGURA 4** Desenvolvimento de seis isolados de *P. pentosaceus* em caldo MRS, em função do pH ao longo de 12h. **30**
- FIGURA 5** Desenvolvimento de seis isolados de *P. pentosaceus* em caldo MRS, em função da concentração de bile ao longo de 12h. **32**

RESUMO

Testes de avaliação de potencial de segurança, probiótico e tecnológicos foram realizados em seis isolados de *Pediococcus pentosaceus* (Ac1Pd, Ac3Pd, Ac4Pd, Ac5Pd, Ac7Pd, Ac22Pd) provenientes de leite de ovelha. Os resultados obtidos demonstraram que nenhum dos isolados foi capaz de produzir aminas biogênicas ou fatores de virulência. Os isolados testados apresentaram baixa hidrofobicidade, alta capacidade de autoagregação e coagregação com *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. sakei* ATCC 15521 e *E. faecalis* ATCC 19444, porém nenhum produziu β -galactosidase e bacteriocinas. Não foi observado desenvolvimento dos isolados em pH 3 e 12, sendo que na faixa de pH de 4 a 10 o desenvolvimento foi variável. Na ausência de bile todos os isolados apresentaram desenvolvimento, observando-se supressão quando em concentrações de 0,1%, 0,3%, 0,6% e 1%. No teste de disco-difusão os isolados testados foram resistentes a oxaciclina, sulfatrimetropim e vancomicina, mas foram sensíveis ao cloranfenicol e à tetraciclina e com resultados variáveis para a penicilina G e foram resistentes à maioria dos medicamentos testados, exceto à amoxicilina tri-hidratada e ibuprofeno. Todas as culturas apresentaram alta capacidade de acidificação do leite somente após 24h e nenhum produziu exopolissacarídeos. Os isolados de *P. pentosaceus* foram capazes de produzir diacetil, no entanto, nenhuma cultura apresentou atividade proteolítica extracelular e a produção de autólise foi variada de 21,3% a 30,5%, após 24h. Os isolados se desenvolveram em concentrações de NaCl a 4% e 6%, porém o desenvolvimento foi menor na concentração de 10%. Por fim, todos os isolados apresentaram boa capacidade de segurança, mas aplicação limitada como probióticos e alguns aspectos de potencial tecnológico.

Palavras chave: bactérias ácido-láticas, culturas iniciadoras, tecnologia do leite.

ABSTRACT

Potencial safety, probiotic and technological tests were performed on six isolates (Ac1Pd, Ac3Pd, Ac4Pd, Ac5Pd, Ac7Pd, Ac22Pd) from *Pediococcus pentosaceus* from sheep's milk. The results showed that none of the isolates were able to produce biogenic amines or virulence factors. The isolates tested showed low hydrophobicity, high self-aggregation capacity and coaggregation with *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. sakei* ATCC 15521 and *E. faecalis* ATCC 19444, but none produced β -galactosidase and bacteriocins. No growth of the isolates at pH 3 and 12 was observed, and in the pH range from 4 to 10 the growth was variable. In the absence of bile, all the isolates showed growth, with suppression at concentrations of 0,1%, 0,3%, 0,6% and 1%. In the disc-diffusion test the isolates tested were resistant to oxaciline, sulfatrimetropim and vancomycin but were sensitive to chloramphenicol and tetracycline and with variable results for penicillin G and were resistant to most of the drugs tested except for amoxicillin trihydrate and ibuprofen. All cultures showed high milk acidification capacity only after 24 hours and none produced exopolysaccharides. The isolates of *P. pentosaceus* were able to produce diacetyl, however, no culture showed extracellular proteolytic activity and the production of autolysis was varied from 21.3% to 30.5% after 24h. The isolates growth at concentrations of 4% and 6% NaCl, but the growth was lower at 10% concentration. Finally, all the isolates showed good safety, but limited application as probiotics and some aspects of technological potential.

Key words: dairy technology, lactic acid bacteria, starter.

1. INTRODUÇÃO

Diversos derivados lácteos são utilizados como alimentos funcionais, pois possuem micro-organismos probióticos. Segundo a FAO/WHO (2002) os probióticos são definidos como micro-organismos vivos com capacidade de conferir benefícios à saúde de seu hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas. A maioria dos micro-organismos probióticos são bactérias ácido-láticas (BAL).

Muitos são os benefícios que as BAL podem conferir aos alimentos, como a conservação de suas propriedades nutricionais, o incremento no sabor e a capacidade de conferir maior segurança ao produto (COSTA *et al.*, 2013). Além disso, os benefícios à saúde em produtos contendo probióticos já estão bem documentados cientificamente, por favorecerem o equilíbrio da microbiota intestinal, alívio da intolerância à lactose, além da prevenção e redução, de sintomas de diarreia associados com a administração de antibióticos (MEIRA, 2011). Entretanto, para um micro-organismo ser considerado probiótico é necessário apresentar características relativas à segurança, funcionalidade e aspectos tecnológicos.

Em relação à segurança, os micro-organismos probióticos devem ser provenientes de animais saudáveis, habitantes normais do intestino, não devem ser tóxicos nem patogênicos sendo preferível que os isolados utilizados sejam hospedeiro-específicos, para que se obtenha uma eficácia máxima do produto (SALMINEN *et al.*, 1998; ALVIM, 2011).

A funcionalidade da linhagem probiótica está ligada à sua capacidade de resistir às condições adversas do trato gastrointestinal (TGI) de seu hospedeiro e de sua habilidade antagonista contra patógenos residentes (ALVIM, 2011). Os micro-organismos componentes de um probiótico devem sobreviver à acidez gástrica e à atividade hidrolítica dos sais biliares e, ainda, ser capazes de reduzir os patógenos aderidos na superfície intestinal, seja pela produção de compostos antagonistas (bacteriocinas e antibióticos) ou pela competição por sítios de adesão (MORELLI, 2000; SAARELA *et al.*, 2000).

Outro aspecto importante na seleção de uma nova linhagem probiótica é a observação de suas propriedades tecnológicas. Um probiótico deve conter isolados que apresentam rápido crescimento “*in vitro*”, fácil manipulação, boas condições de produção industrial e que sobrevivam no produto final conservando sua função (PANCHENIAK, 2005). Além disso, deve ser observada a habilidade da cultura em co-existir com a microbiota do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Por exemplo, na produção

de queijo, uma das características mais importantes para culturas “starters” é a capacidade de produzir acidez rapidamente. Outras propriedades, tais como tolerância ao sal, a atividade autolítica, a atividade proteolítica extracelular, a produção de diacetil e exopolissacarídeos (EPS) são consideradas características tecnológicas comuns para determinar a seleção de potenciais culturas para aplicações industriais (DAL BELLO *et al.*, 2012).

As BAL constituem um grupo composto por 13 gêneros de bactérias Gram-positivas: *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Paralactobacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactoshaepa*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Vagococcus* e *Weissela* (MEIRA, 2011).

Pediococcus é um gênero de BAL homofermentativas e Gram-positivas, oxidase-negativa, catalase-negativa que são envolvidas na fabricação de alimentos fermentados e abrange as espécies: *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus*, *P. cellicola*, *P. ethanolidurans*, *P. claussenii*, *P. stilesii*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, e *P. dextrinicus*. Essas BAL já foram isoladas a partir de várias fontes como solo, plantas, salsichas, picles, vinhos, bebidas e queijo. *Pediococcus* spp. têm grande importância econômica na indústria de alimentos fermentados por serem culturas “starter” em processos de fermentação de leites, carnes e embutidos, chucrute, pepino, feijão verde, soja, pão e silagem. *P. pentosaceus* em especial, possui relevância devido ao potencial biotecnológico (IVANOVA *et al.*, 2013; SHUKLA & GOYAL, 2013). Em contraste com o papel protetor desempenhado por várias espécies de *Pediococcus* em fermentações de alimentos, alguns apresentam propriedades indesejáveis como o oportunismo (IVANOVA *et al.*, 2013).

Embora haja um número razoável de linhagens probióticas bem caracterizadas e disponíveis para uso comercial, o isolamento e a caracterização de novas linhagens é desejável para a formulação de novos alimentos probióticos, devido aos benefícios à saúde serem específicos de cada linhagem. Desse modo, o presente trabalho busca avaliar *in vitro* o potencial de segurança, probiótico e tecnológico do *P. pentosaceus* isolados de leite de ovelhas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Origem dos micro-organismos utilizados

Os isolados testados foram do gênero *P. pentosaceus* provenientes de leite de ovelha e que fazem parte da coleção de BAL do Laboratório de Análises de Leite e Derivados, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, da UnB (LABLEITE/FAV), previamente identificados por Koch (2014). No total, seis isolados foram avaliados e identificados como: Ac1Pd, Ac3Pd, Ac4Pd, Ac5Pd, Ac7Pd e Ac22Pd. Os isolados são mantidos congelados (-80 ° C) em caldo de Man Rogosa e Sharpe (MRS), (Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) contendo glicerol a 20% (p / v). Para a pesquisa, os isolados foram recuperados em caldo MRS e estocados em ágar MRS até as análises, que foram realizadas no Laboratório de Inspeção de Produtos Animal – InsPOA, da Universidade Federal de Viçosa-MG.

2.2 Testes para Avaliação da Segurança

Os isolados foram submetidos a diferentes testes para identificação dos fatores de virulência, segundo Barbosa *et al.* (2010).

2.2.1 Atividade hemolítica

A atividade hemolítica foi avaliada ao estriar as culturas em ágar TSA (Oxoid) suplementado com sangue de cavalo desfibrinado a 5% (p / v). Posteriormente, incubaram-se a 37°C durante 48h. Nesse teste, a formação de halo indica hemólise. A hemólise formada por cada isolado foi classificada como total ou β -hemólise (halos claros em volta das colônias), parcial ou α -hemólise (halos em volta das colônias esverdeadas), e ausente ou γ -hemólise.

2.2.2 Produção de gelatinase

A produção de gelatinase foi verificada por meio de alíquotas de 1 μ L de culturas sobre a superfície de ágar de Luria Bertani (1% triptona; 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl) suplementado com 3% (p / v) de gelatina (BD) e incubou-se a 37°C durante 48h. Após a incubação, as placas foram mantidas a 4 ° C durante 4 h e a hidrólise de gelatina foi registrada pela formação de halos em volta das colônias opacas.

2.2.3 Produção de lipases

A produção de lipase foi avaliada por meio da identificação de 1 μ L de culturas em placas de ágar de Luria Bertani (1% triptona; 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl) suplementado com CaCl₂ (Sigma-Aldrich, a 0,2%, p / v) e Tween (Sigma-Aldrich, a 1%, p / v) 80 e incubou-se a 37°C durante 48 h. A formação de halos claros em volta das colônias foi registrada como produção de lipase.

2.2.4 *Produção de desoxirribonuclease*

A produção de desoxirribonuclease foi identificada por alíquotas de 1 µL de culturas sobre a superfície de ágar verde DNase (BD), e incubou-se a 37°C durante 48h. Os resultados positivos foram identificados pela formação de halos claros em volta das colônias.

2.2.5 *Produção de aminas biogênicas*

A produção de aminas biogênicas para os isolados selecionados foi avaliada de acordo com Bover-Cid & Holzapfel (1999). A produção descarboxilase foi induzida por cinco transferências sucessivas de 0,5 mL de alíquotas das culturas em caldo MRS (Oxoid) suplementado com piridoxal 5-fosfato a 0,005% (p / v, Sigma-Aldrich) e com cada um dos precursores de aminas biogênicas a 0,1 % (p / v): base de tirosina livre (para tiramina), monohidrocloreto de histidina (para histamina), monohidrocloreto de ornitina (para putrescina) e monohidrocloreto de lisina (para cadaverina), todos de Sigma Aldrich. Cada cultura foi incubada a 37°C durante 24h por 4 dias e as culturas finais foram semeadas em ágar descarboxilase – um ágar MRS modificado de acordo com Joosten e Northolt (1989) – suplementado com um de cada precursor de amina biogênica a 0,1% (p / v). As placas foram incubadas a 37°C por 24h. Os resultados positivos foram registrados por mudança de cor de amarelo para púrpura.

2.3 **Avaliação do Potencial Probiótico**

2.3.1 *Hidrofobicidade*

A capacidade dos isolados aderirem aos substratos hidrofóbicos foi determinada de acordo com a metodologia de Dos Santos *et al* (2014a). As células foram centrifugadas (7000 g por 5 min a 4°C), lavadas duas vezes com tampão fosfato 0,1 M, ressuspensas na mesma solução e realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 560 nm antes da incubação (DO0). N-hexadecano foi adicionado à suspensão celular, na proporção 1:5 (N-hexadecano (Sigma-Aldrich) / suspensão de células), e a mistura foi homogeneizada durante 2 min. Após 1 h de incubação a 37°C, o valor A560 (A) da camada aquosa foi medido. Um mililitro da fase aquosa foi removido para determinar a DO. Os experimentos foram conduzidos em triplicata. A porcentagem da hidrofobicidade foi calculada da seguinte equação: % H = [(A0-A) / A0] × 100, em que A0 e A são os valores de absorvância antes e, após extração com o solvente orgânico, respectivamente.

2.3.2 Determinação da autoagregação e coagregação

Conforme Todorov (2011) e Dos Santos *et al.* (2014), os isolados foram reativados em caldo MRS durante 24 horas a 37°C e as soluções foram centrifugadas (7000 g por 10 minutos a 20°C), lavadas, ressuspensas e diluídas em solução salina estéril 0,85%. Em seguida, 1 mL da suspensão das células foi transferido para recipiente para a leitura em espectrofotômetro obtendo a densidade óptica (DO) de aproximadamente 0,3. Posteriormente, as amostras foram incubadas em tubos eppendorf a 37°C durante uma hora. Foi realizada a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda 660 nm antes (DO 0) e após 60 minutos (DO 60) de incubação. Para a determinação da DO 60, as culturas foram centrifugadas a 3000 g durante 2 minutos a 20°C. A autoagregação foi determinada conforme Todorov *et al.* (2008), a partir da equação: % auto-agregação = $[(DO\ 0 - DO\ 60) / DO\ 0] \times 100$, onde: DO 0 refere-se a DO inicial e DO 60 refere-se a DO obtida após 60 minutos de incubação.

Para a avaliação de coagregação, culturas de *L. sakei* ATCC 15521 foram cultivadas em caldo MRS e *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *E. faecalis* ATCC 19444 em BHI (Oxoid), durante 24 h e 48h, respectivamente, a 37°C. As células foram preparadas de um modo semelhante para as suspensões de célula alcançarem uma DO 660 nm de 0,3. Em seguida, 750 µL de cada isolado foi misturado durante 30 segundos com 750 µL do micro-organismo indicador: *L. monocytogenes* ATCC 7644 (sensível a bacteriocinas), *L. sakei* ATCC 15521 e *E. faecalis* ATCC 19443 (resistentes a bacteriocinas); a DO 660 nm foi registrada no tempo 0 e após 60 min de incubação a 37°C. Para realizar a leitura após 60 minutos, as células foram centrifugadas a 3000 g por 2 min a 20°C. Para o cálculo foi utilizada a mesma fórmula citada anteriormente. Os testes foram realizados em triplicata.

2.3.3 Desenvolvimento em diferentes concentrações de pH e bile

Os isolados foram inoculados em caldo MRS ajustado para o pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, pH 7, pH 8, pH 10 e pH 12, adicionando-se 1 mol L⁻¹ HCl ou 1 mol L⁻¹ NaOH antes da esterilização na autoclave. Se necessário, o pH foi reajustado após adição de 1 mol L⁻¹ de HCl ou 1 mol L⁻¹ de NaOH.

Além disso, foram inoculados em caldo MRS contendo oxbile (sigma) ajustado para bile 0, bile 0,1%, bile 0,3%, bile 0,6% e bile 1,0% (p/v). Todos os testes foram submetidos a microtitulação de fundo de placas estéreis de 96 poços (TPP; testplatte Zellkultur, Trasadingen, Suíça). Cada poço foi preenchido com 150 µL de MRS e 10 µL de cultura obtida em caldo MRS (DO 650nm) a 37°C. A densidade óptica da leitura foi

feita de hora em hora por 12h a 650 nm usando a leitura de microtitulação de placas (TPP). Culturas cultivadas em caldo MRS sem bile serviram como controle. As experiências foram realizadas em triplicata (TODOROV *et al.*, 2011, adaptado).

2.3.4 Avaliação da atividade da enzima β -galactosidase

A atividade de β -galactosidase dos isolados foi determinada utilizando discos de papel impregnados com o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (Discos de ONPG, Fluka), de acordo com as instruções do fornecedor. Os isolados foram reativados por 24h a 37°C e foram estriados em placas de Petri contendo ágar MRS, e incubados a 37°C por 48h, em aerobiose. Uma colônia de cada cultura foi transferida e misturada em um tubo contendo 0,1 mL de solução salina estéril, e acrescentou-se o disco de ONPG. Os tubos foram incubados a 37°C, e foram observados durante 6h, em intervalos de 1h. A mudança de cor amarela pela liberação do composto cromogênico, o-nitrofenil, indica resultado positivo para produção de β -galactosidase (DOS SANTOS *et al.*, 2014).

2.3.5 Resistência aos antimicrobianos e medicamentos

O teste de discos-difusão (Oxoid) foi utilizado para avaliar a suscetibilidade e resistência de culturas de *P. pentosaceus* selecionados aos antibióticos que apresentam diferentes modos de ação: penicilina G (10 ug por disco), vancomicina (30 μ g por disco), tetraciclina (30 μ g por disco), cloranfenicol (30 μ g por disco), sulfatrimetoprim (23,75 μ g + 1,25 μ g) e oxacilina (1 μ g por disco). Placas de ágar MRS contendo 10^5 - 10^6 UFC mL⁻¹ de culturas dos *P. pentosaceus* investigados foram preparadas após cultura em caldo MRS a 37°C durante 48h. Os discos foram aplicados sobre as placas, subsequentemente, incubou-se a 37°C durante 24h. Zonas de inibição em torno dos discos foram medidas (mm) para avaliar a sensibilidade de tensão (CHARTERIS *et al.*, 1998). Os níveis de resistência e sensibilidade foram observados de acordo com o padrão do CLSI —Clinical and Laboratory Standards Institute— (CLSI, 2011), metodologia também preconizada pela Anvisa.

Os isolados foram testados quanto à resistência a 34 medicamentos (Quadro 1), os quais foram adquiridos em estabelecimento farmacêutico e dissolvidos em água estéril para alcançar a concentração desejada.

As culturas foram inoculadas, separadamente, em 10 mL de caldo MRS e incubadas a 37°C durante 24h e misturou-se em ágar MRS (2,0%, p/v; Oxoid), a fim de alcançar uma população de 10^6 UFC mL. Após solidificação do ágar, uma gota de cada medicamento (34) foi adicionada sobre a superfície das placas e incubou-se a 37°C

durante 24h. As placas foram examinadas quanto à presença de zonas de inibição em torno da gota do medicamento.

Quadro 1: Princípios ativos utilizados no teste de medicamentos para isolados de *P. pentosaceus*.

Medicamento	Princípio Ativo	Dosagem
Medicamento simples	Dipirona sódica	500 mg
Medicamento composto	Butilbrometo de escopolamina	10 mg
	Dipirona	250 mg
Medicamento simples	Allergosan	25 mg
Medicamento simples	Suplemento de vitaminas e minerais de A a Z	-
Medicamento simples	Polivitamínico	-
Medicamento composto	Cafeína	50 mg
	Citrato de orfenadrina	35 mg
	Dipirona sódica	300 mg
Medicamento composto	Cloridrato de piridoxina	10 mg
	Dimenidrato	50 mg
Medicamento simples	Bisacodil	5 mg
Medicamento simples	Acetilcisteína	600 mg
Genérico	Aceclofenaco	100 mg
Genérico	Acetilcisteína	100 mg
Genérico	Ácido mefenâmico	500 mg
Genérico	Aminofilina	100 mg
Genérico	Amoxicilina tri-hidratada	500 mg
Genérico	Bromoprida	10 mg
Genérico	Cinarizina	75 mg
Genérico	Cloridrato de propanolol	40 mg
Genérico	Diclofenaco de potássio	50 mg
Genérico	Fumarato de cetotifeno (Xarope)	0,2 mg/mL
Genérico	Lisinopril	20 mg
Genérico	Loratadina	10 mg
Genérico	Paracetamol	500 mg
Genérico	Paracetamol	750 mg
Medicamento simples	Peumus boldus (Boldo)	67 mg
Medicamento simples	Ibuprofeno	600 mg
Medicamento simples	Prenoxdiazine hydrochloride	100 mg
Medicamento simples	Loperamide	2 mg
Medicamento simples	Nimesulida	100 mg
Medicamento composto	Cloridrato de fenilefrina	4 mg
	Maleato de clorfeniramina	4 mg
	Paracetamol	400 mg
Medicamento simples	Omeprazol	20 mg
Medicamento composto	Besilato de anlodipino	2,5 mg
	Cloridrato de benazepril	10 mg
Medicamento composto	Cafeína	50 mg
	Paracetamol	250 mg
	Propifenazona	150 mg
Medicamento composto	Ácido acetilsalicílico	325 mg
	Ácido cítrico	1575 mg
	Carbonato de sódio	400 mg
	Carbonato ácido de sódio	1700 mg
Medicamento composto	Ácido ascórbico	40 mg
	Cloridrato de fenilefrina	2 mg
	Maleato de dimedinteno	0,5 mg
	Paracetamol	500 mg
	Rutosídeo	15 mg

2.3.6 *Potencial antagonista*

Esses isolados já foram previamente avaliados em trabalho desenvolvido por Koch (2014), sendo que os isolados apresentaram formação de halo a partir da metodologia de Ortolani *et al.* (2009) frente a *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *S. aureus* ATCC. Entretanto, nenhum dos isolados apresentou potencial bacteriocinogênico.

2.4 **Avaliação do Potencial Tecnológico**

2.4.1 *Capacidade de acidificação*

Os isolados foram revitalizados em caldo MRS com incubação *overnight* 37°C. Para o teste de atividade acidificante, tubos contendo 10 mL de leite em pó desnatado reconstituído estéril (10% p/ v) (Oxoid) foram inoculados (1% p / v) com isolados revitalizados e incubados a 37°C. O pH foi medido após 6 e 24h com um medidor de pH (Microprocessor Medidor de pH 213, instrumentos Hanna, Irlanda). Os dados foram expressos com a média da duplicata da análise (DAL BELLO *et al.*, 2012).

2.4.2 *Atividade proteolítica extracelular*

Atividade proteolítica extracelular foi determinada segundo Franciosi *et al.* (2009) e Dal Bello *et al.* (2012). Um microlitro de cada cultura revitalizada foi inoculado sobre a superfície de ágar constituído de 10% (p / v) de leite desnatado em pó (Oxoid) e 2% (p/ v) de ágar (Oxoid) e incubou-se a 37°C durante 4 dias. A atividade proteolítica foi indicada por uma zona clara em torno das colônias.

2.4.3 *Formação exopolissacarídeos (EPS)*

As alíquotas (1% p/v) de cada cultura foram inoculadas em 10 mL de leite em pó desnatado reconstituído (10% p/v) e incubadas a 37°C por 24h. A produção de EPS a partir de lactose foi determinada de forma qualitativa pela mensuração do grau de formação do fio, segundo Cogan (1996) e Dal Bello *et al* (2012).

2.4.4 *Resistência a diferentes concentrações de NaCl*

Alíquotas de 100 µL das culturas foram inoculadas em 350µL de caldo MRS previamente distribuídos em placas de microtitulação com diferentes concentrações de NaCl 0, 4, 6 e 10% (p/v). A capacidade das culturas para crescer em diferentes concentrações foi avaliada após 24h a 37°C por medição da densidade óptica (DO 650 nm) usando Spectrophotometer DU® 640 UV / Vis (Beckman Coulter, CA, EUA). O potencial de multiplicação das culturas nas diferentes concentrações de NaCl será avaliado pela diferença das DO registradas nas duas leituras (DAL BELLO *et al.*, 2012).

2.4.5 Atividade autolítica

A autólise das células foi medida como descrito por Mora *et al.* (2003) e Dal Bello *et al.* (2012) com adaptações. As culturas foram cultivadas em caldo MRS (Oxoid) durante 24h a 37°C para atingir DO 650 nm de 0,8-1. As células foram lavadas em solução tampão fosfato tripotássio (50 mmol-1, pH 6,5) (Sigma-Aldrich, Irlanda) e ressuspensas na mesma solução tampão e incubadas a 37°C. O grau de autólise foi expresso pela porcentagem de decréscimo na DO 650 nm, após 24h.

2.4.6 Produção de diacetil

A produção de diacetil foi determinada de acordo com King (1948) e Dal Bello *et al.* (2012). Culturas revitalizadas (1% p / v) foram inoculadas em 10 mL de leite em pó reconstituído e incubadas a 37°C durante 24h. Um mililitro de cada suspensão de células foi combinado com 0,5 mL de α -naftol (1% p / v) e KOH (16% p / v) (Sigma-Aldrich) e incubou-se a 37°C durante 10 min. A produção de diacetil é indicada pela formação de um anel vermelho no topo dos tubos.

2.5. Delineamento Experimental

Adotou-se Delineamento Inteiramente Casualizado, com três repetições. Inicialmente realizou-se análise de variância, a 5% de probabilidade e o teste de média de Scott-Knott, para as variáveis hidrofobicidade, autoagregação e coagregação. Com relação ao desenvolvimento dos isolados, em função do pH e concentração de bile ao longo do tempo, utilizou-se análise de regressão, com metodologia de superfície resposta. Utilizaram-se o software Assistat Versão 7.7 beta para análise de variância e teste de média de Scott-Knott, e o software SigmaPlot 10.0 para obtenção das equações de regressão e plotagem dos gráficos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação de Segurança

3.1.1 Fatores de virulência

Todos os isolados de *P. pentosaceus* (Ac1Pd, Ac3Pd, Ac4Pd, Ac5Pd, Ac7Pd, Ac22Pd) apresentaram resultados negativos para a expressão dos fatores de virulência testados (gelatinase, hemólise, lipase, DNase) por métodos fenotípicos.

Como há interesse na utilização de BAL como culturas iniciadoras, o uso de isolados exige cautela devido à sua possível virulência, já que alguns tipos de BAL podem apresentar genes de virulência e, conseqüentemente, expressá-los em produtos alimentares, o que representaria risco para os consumidores (MORAES *et al.*, 2012, DOS SANTOS *et al.*, 2014). BAL também podem apresentar resistência a diferentes

antibióticos e carregar seus genes característicos, aumentando seu potencial de virulência (LEVY E MARSHALL, 2004; PERIN *et al.*, 2014). Deve-se ressaltar, a possibilidade de transferência horizontal desses genes entre BAL e outras bactérias, o que aumenta ainda mais a preocupação na indústria de alimentos. Estes genes são normalmente localizados em plasmídeos transferíveis (DOS SANTOS *et al* 2014).

A investigação de fatores de virulência em BAL com potencial aplicação na preservação de alimentos é um dos principais motivos relevantes para determinar a patogenicidade. Fatores de virulência podem ser caracterizados como fatores de colonização, como aqueles que promovem a adesão de bactérias em células hospedeiras, ou de invasão, os quais promovem a invasão de células epiteliais, causando desordem no sistema imunológico e, assim, estabelecem uma vantagem competitiva (SOUSA, 2003).

3.1. 2 Produção de aminas biogênicas (AB)

Todos os isolados apresentaram resultados negativos para a produção de aminas biogênicas. Os compostos nitrogenados possuem uma importante função metabólica nas células, sendo essenciais para a formação das proteínas presentes no organismo humano. A degradação destes compostos através de enzimas ocorre naturalmente em humanos e esta reação origina AB. As AB são fontes de nitrogênio e precursoras para a síntese de hormônios, alcalóides, ácidos nucleicos e proteínas (GOMES *et al.*, 2014).

Muitos gêneros bacterianos, incluindo os produtores de ácido lático, são capazes de descarboxilar aminoácidos. Entre as BAL, culturas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* podem estar aptas à produção de aminas em vários alimentos como queijo, carne fermentada, vegetais e bebidas (BOVER-CID & HOLZAPFEL, 1999; GARAI *et al.*, 2007).

Os queijos representam um bom ambiente para produção e acúmulo de AB produzidos por cepas iniciadoras e não iniciadoras. Altas concentrações de AB nos produtos lácteos indicam baixa qualidade microbiológica do leite e falta de práticas higiênicas de fabricação. Além disso, há vários problemas toxicológicos resultantes da ingestão de alimentos que contêm níveis relativamente elevados de enzimas específicas de substrato de histamina e tiramina dos micro-organismos (PERIN *et al.*, 2016). No estudo de Collins *et al.* (2011) voluntários saudáveis apresentaram sintomas como cefaléia e rubor, quando ingeriram peixes com dosagem elevada de AB.

Por essas razões, é importante monitorar os níveis de AB nos alimentos e recorrer a estratégias para evitar seu acúmulo nos alimentos. A monitorização das quantidades de AB de matérias-primas e produtos ao longo da cadeia alimentar é necessária para avaliar os fatores que contribuem para a formação e acumulação de AB. Uma estratégia para evitar a acumulação de AB nos alimentos é escolher cepas não produtoras de AB (BOVER-CID & HOLZAPFEL, 1999; PERIN *et al.*, 2016).

Por outro lado, algumas culturas positivas podem participar da fermentação de alguns alimentos como salsichas, no caso das culturas de *L. curvatus*, ou, ainda, estirpes AB-positivas de *S. thermophilus* podem auxiliar no processo de produção de iogurte. Assim, a incapacidade de formar AB também precisa ser confirmada para micro-organismos geralmente considerados seguros (BOVER-CID & HOLZAPFEL, 1999).

No estudo de Perin *et al.* (2016), nenhuma cultura foi capaz de produzir putrescina, histamina, cadaverina, porém 12 culturas (cinco *Lactococcus spp.* e sete *Enterococcus spp.*) foram capazes de formar tiramina. Na pesquisa de Bover-Cid & Holzapfel (1999), a tiramina foi a principal amina formada pelas culturas BAL investigadas. Além disso, os isolados de *P. pentosaceus* e *P. acidilactici* não apresentaram atividade descarboxilase.

Os resultados obtidos, que comprovaram ausência dos fatores de virulência pesquisados e de aminas biogênicas, demonstram a segurança de todos isolados de *P. pentosaceus* avaliados.

3.2 Avaliação do Potencial Probiótico

3.2.1 Hidrofobicidade

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) da hidrofobicidade entre os isolados de *P. pentosaceus*. Os isolados de *P. pentosaceus* que apresentaram maiores valores de hidrofobicidade foram Ac4Pd e Ac22Pd (Figura 1). Ressalta-se que todos os isolados apresentaram valores de hidrofobicidade inferiores a 10%.

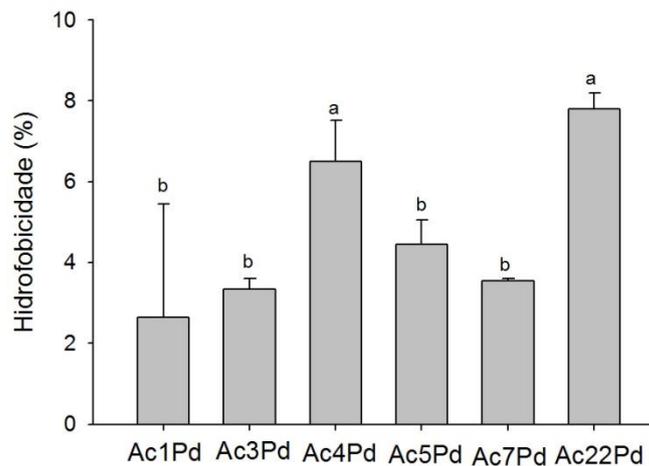


Figura 1. Hidrofobicidade de isolados de *P. pentosaceus*. Valores médios seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A determinação de adesão microbiana a N-hexadecano é considerada uma abordagem qualitativa válida para estimar a capacidade de aderir a células epiteliais (KIELY & OLSON, 2000).

A adesão no trato gastrointestinal é um fator determinante para colonização e residência no hospedeiro, sendo considerado um dos principais critérios de seleção dos potenciais probióticos (KAUSHIK *et al.*, 2009). A hidrofobicidade das células está relacionada com a capacidade dos micro-organismos em aderir em células epiteliais intestinais. Geralmente, as células bacterianas com uma elevada hidrofobicidade apresentam fortes interações com células da mucosa, além de poderem tornar as células mais competitivas, o que proporciona uma forte ancoragem ao trato gastrointestinal (TODOROV *et al.*, 2011; DOS SANTOS *et al.*, 2014).

Entretanto, essa característica não é um pré-requisito para forte adesão, uma vez que esse processo envolve vários mecanismos. Mesmo as células que exibem baixa hidrofobicidade podem aderir eficazmente à superfície da célula (TODOROV *et al.*, 2007).

Segundo Bautista-Gallego *et al.* (2013) de um total de 109 isolados de salmouras de azeitona verde espontaneamente fermentadas, a maioria de seus isolados de *Lactobacillus* apresentou hidrofobicidade entre 0% e 5%. Dos Santos *et al.* (2014) descreveram que o queijo coalho produzido na região Nordeste do Brasil apresentou oito isolados de *Lactobacillus* com baixos índices de hidrofobicidade, em especial, *L. plantarum* que apresentou 5,4%.

Em constraste, Vidhyasagar & Jeevaratnam (2013) obtiveram seis culturas de *P. pentosaceus* do Idli (alimento típico da Índia) que apresentaram alta hidrofobicidade com n-hexadecano, com destaque para os isolados VJ49 e VJ13 que apresentaram 79% e 77%, respectivamente. A hidrofobicidade das culturas deve ser sempre observada, pois varia geneticamente tanto entre espécies quanto entre as culturas da mesma espécie (TODOROV *et al.*, 2011).

3.2.2 Autoagregação e coagregação

No que se refere a autoagregação (Figura 2), observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os isolados de *P. pentosaceus* e os micro-organismos indicadores. Destaca-se que os isolados de *P. pentosaceus* apresentaram valores superiores a 82%. Maior autoagregação foi observada nos isolados Ac7Pd, Ac3Pd e Ac4Pd, com valores médios iguais a 92,2; 90,9 e 89,9%, respectivamente. Por outro lado, o micro-organismo indicador, *L. monocytogenes* ATCC 7644, apresentou o menor valor de autoagregação, sendo equivalente a 41,5%.

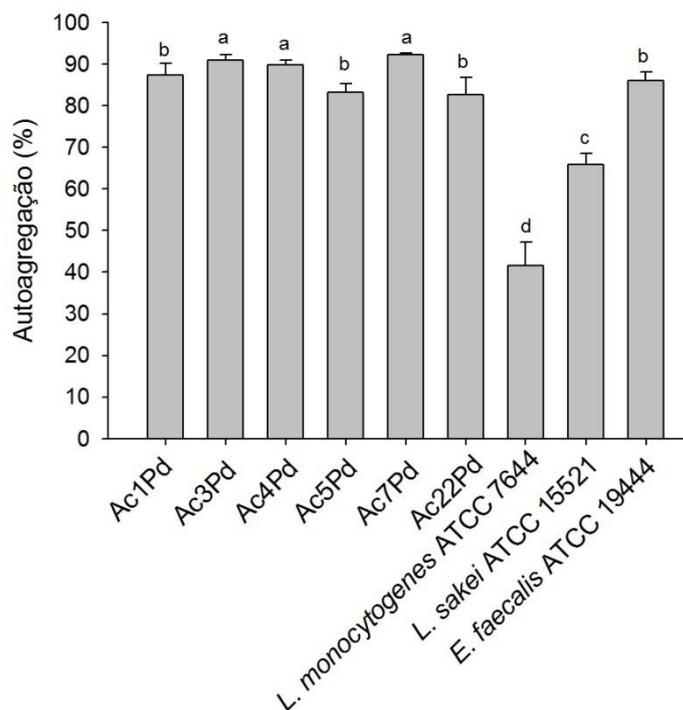


Figura 2. Autoagregação de isolados de *P. pentosaceus*, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. sakei* ATCC 15521 e *E. faecalis* ATCC 19444. Valores médios seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A agregação entre as células bacterianas é considerada um critério importante na adesão e na formação de biofilme em várias superfícies, como na mucosa do TGI. A agregação celular, além de facilitar a colonização transitória do TGI, contribui para a persistência de micro-organismos benéficos no TGI e seus efeitos na saúde, e ainda, pode evitar a adesão de patógenos (DOS SANTOS *et al.*, 2014). Assim, para ser um probiótico efetivo, a cultura deve ser capaz de, pelo menos transitoriamente, colonizar a mucosa intestinal para conseguir produzir efeitos benéficos tais como a exclusão competitiva de agentes patogênicos a partir do epitélio intestinal ou a imunorregulação.

No estudo de Vidhyasagar & Jeevaratnam (2013), o *P. pentosaceus* apresentou um resultado semelhante, no qual seu isolado exibiu uma agregação máxima de 89%, a VJ41, o que corrobora a presente pesquisa.

Conforme Todorov *et al.* (2011), a autoagregação é cultura-específica e pode variar dentro do mesmo grupo taxonômico, como observado em pesquisa realizada pelos autores na qual os percentuais encontrados foram de 7,2% para *L. fermentum* e de 12,1% para *E. faecium*. Dos Santos *et al.* (2014) relataram que isolados de *Lactobacillus* spp. demonstraram uma variação de 28,8% para *L. rhamnosus* e de 83,7% para *L. plantarum*.

Na Figura 3 são apresentados os valores médios de coagregação entre os isolados de *P. pentosaceus* e diferentes micro-organismos indicadores. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) quando se analisou a coagregação entre os isolados de *P. pentosaceus* com os micro-organismos indicadores *L. monocytogenes* ATCC 7644 (Figura 3A) e *L. sakei* ATCC 15521 (Figura 3B). Ressalta-se que os percentuais de coagregação dos isolados de *P. pentosaceus* com *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. sakei* ATCC 15521 foram superiores a 60% e 83%, respectivamente. No que se refere à coagregação com *E. faecalis* ATCC 19444 (Figura 3C), o isolado Ac7Pd foi o que possibilitou maior coagregação com valor equivalente a 93,3%, de acordo com o Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

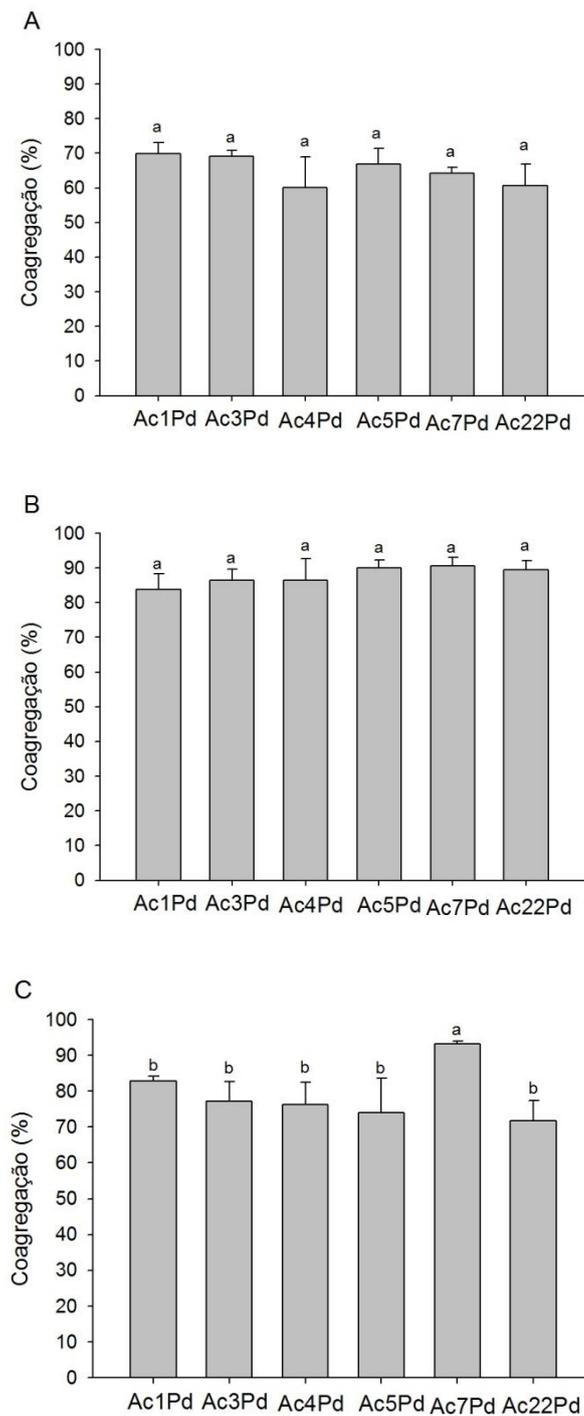


Figura 3. Coagregação de isolados de *P. pentosaceus* com *L. monocytogenes* ATCC 7644 (A), *L. sakei* ATCC 15521 (B) e *E. faecalis* ATCC 19444 (C). Valores médios seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

É importante ressaltar que os micro-organismos selecionados para esse teste possuem características particulares: *L. monocytogenes* ATCC 7644 é sensível a bacteriocinas e *L. sakei* ATCC 15521 e *E. faecalis* ATCC 19443 são resistentes a bacteriocinas.

Agregação entre mesmas células (autoagregação) e com organismos geneticamente diferentes (coagregação) são critérios probióticos essenciais para manter a população bacteriana no intestino. A coagregação de BAL pode ser considerada uma característica positiva, uma vez que pode exercer efeitos antagonistas contra os agentes patogênicos, como *L. monocytogenes*, através de mecanismos envolvendo a produção de compostos antimicrobianos, tais como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, que competem pelo substrato (CHEN *et al.*, 2007, DOS SANTOS *et al.*, 2014).

Os baixos níveis de coagregação com agentes patogênicos podem desempenhar um papel importante na prevenção da formação de biofilmes, e, desta forma, eliminar os agentes patogênicos a partir do TGI. A coagregação entre BAL e outras células, especialmente, *L. monocytogenes*, pode ser considerada uma característica positiva, uma vez que é uma das etapas necessárias para a eliminação das culturas não desejáveis do TGI (TODOROV & DICKS, 2008). Em contrapartida, os níveis mais elevados de coagregação com *L. sakei* ATCC 15521, um micro-organismo não patogênico, pode facilitar a presença dos probióticos no TGI humano (TODOROV *et al.*, 2011).

Segundo estudo de Todorov *et al.* (2011) com isolados de *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii*, *P. acidilactici* e *E. faecium* foram observados baixos níveis de coagregação com *L. monocytogenes* e *E. faecalis* ATCC 19443, mas altos níveis de coagregação com *L. sakei* ATCC 15521. Dos Santos *et al.* (2014) observaram diferentes níveis de coagregação de *L. rhamnosus* e *L. plantarum* com *L. monocytogenes*, sendo que três culturas de *L. plantarum* apresentaram maiores taxas de autoagregação e coagregação com *L. monocytogenes* em comparação com a cultura *L. rhamnosus* e, ainda, uma cultura *L. plantarum* apresentou autoagregação com valores superiores a 80%, e coagregação com *L. monocytogenes* de até 60%. Vidhyasagar & Jeevaratnam (2013) relataram que seus isolados de *P. pentosaceus* (cultura VJ13) agregaram com *L. monocytogenes* e *E. coli* em 90% e 81%, respectivamente.

3.2.3 Desenvolvimento em diferentes concentrações de pH e bile

Todos os isolados de *P. pentosaceus* apresentaram desenvolvimento intenso quando se adotou pH na faixa entre 6 e 10, sobretudo depois de 8 h (Figura 4 e Tabela 1). Por outro lado, verificou-se desenvolvimento inexpressivo dos isolados de *P. pentosaceus* em faixa de pH entre 3 e 5 e em pH 12.

A capacidade de sobreviver através da passagem do TGI e persistir temporariamente no ambiente intestinal do hospedeiro são as principais características

funcionais de uma cultura probiótica (DOS SANTOS *et al.*, 2014). Assim, devido às condições do estômago, onde o pH é cerca de 2,0, torna-se essencial selecionar probióticos com alta tolerância a condições ácidas (BAUTISTA-GALLEGO *et al.*, 2013; PATEL *et al.*, 2014). Da mesma forma, os sais biliares secretados para o intestino delgado também representam um desafio para a sobrevivência bacteriana no TGI, assim, é importante selecionar isolados probióticos com resistência a altas concentrações de bile porque elas poderiam desenvolver-se melhor no intestino delgado (TODOROV *et al.*, 2011; BAUTISTA-GALLEGO *et al.*, 2013).

No estudo de Brink *et al.* (2006) o desenvolvimento de *L. plantarum*, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. curvatus*, inclusive *P. pentosaceus* foi suprimido nas primeiras 10h de incubação com pH 3,0, porém foi mais vigoroso em pH entre 5,0 e 6,5. Em ensaio *in vitro* conduzido por Todorov *et al.* (2008), o desenvolvimento de várias culturas *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. pentosus* e *L. paracasei* foi suprimido em pH 3,0 e 4,0, com crescimento em pH entre 11,0 e 13,0 sendo registrado um crescimento fraco para linhagens de *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* e *L. pentosus* em pH 13,0. Argyri *et al.* (2013) demonstraram que cinco culturas de *L. plantarum* apresentaram alta resistência a pH baixo, resultado semelhante ocorreu com as culturas de referência *L. casei* Shirota e *L. rhamnosus* GG, que são reconhecidas por manter a viabilidade em pH 2,5 a 4,0.

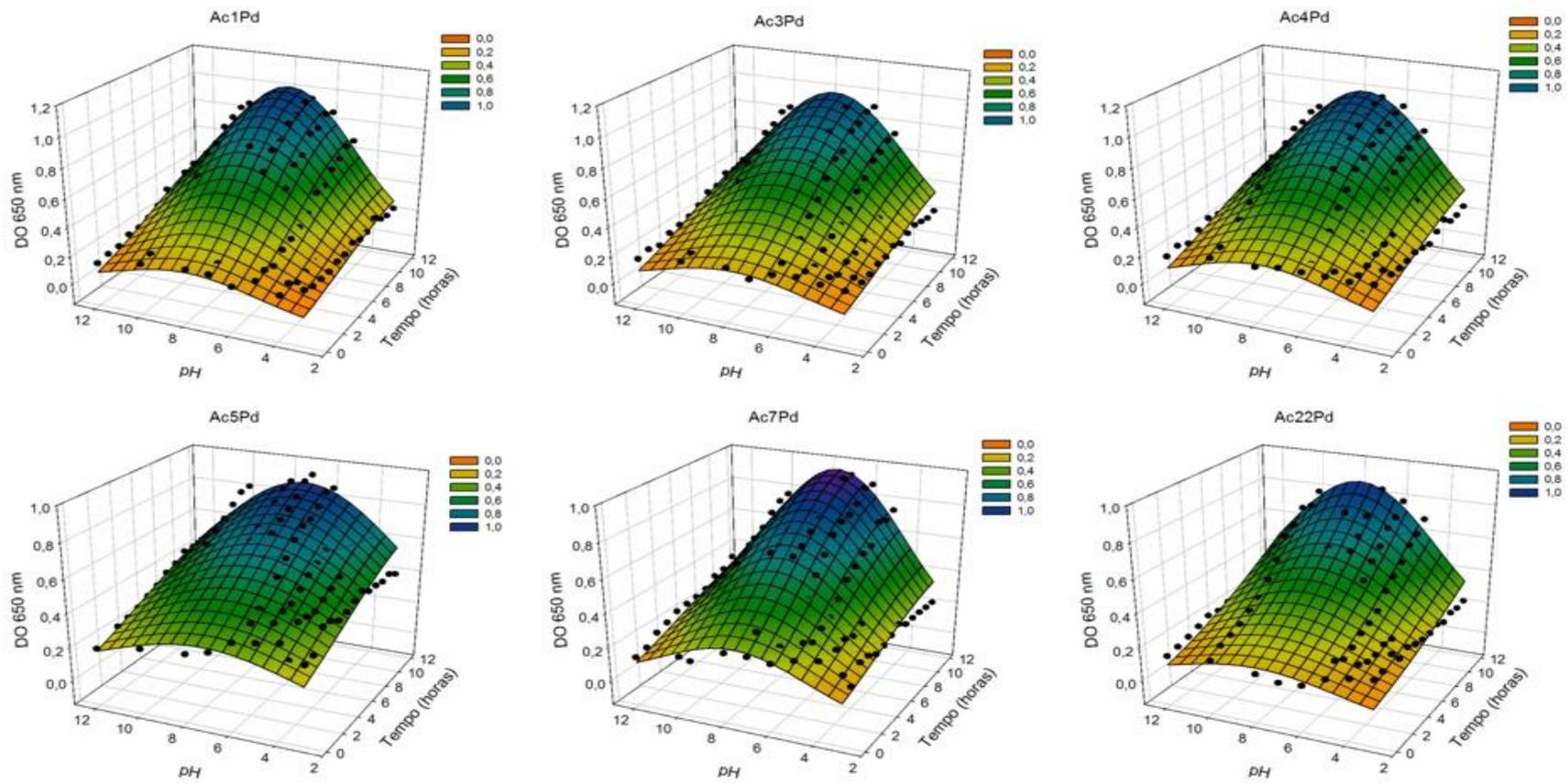


Figura 4. Desenvolvimento de seis isolados de *P. pentosaceus* em caldo MRS, em função do pH ao longo de 12h.

Tabela 1. Equações da regressão referentes ao desenvolvimento de seis isolados de *P. pentosaceus* em caldo MRS, em função do pH (x) e do tempo (h, y), e respectivos coeficientes de determinação (R²).

Isolados	Equações ajustadas	R ²
Ac1Pd	$\widehat{D\bar{O}} = 1,000e^{-0,5\left[\left(\frac{x-8,040}{3,100}\right)^2 + \left(\frac{y-12,274}{6,925}\right)^2\right]}$	0,95
Ac3Pd	$\widehat{D\bar{O}} = 0,980e^{-0,5\left[\left(\frac{x-7,827}{3,321}\right)^2 + \left(\frac{y-13,523}{7,869}\right)^2\right]}$	0,92
Ac4Pd	$\widehat{D\bar{O}} = 0,977e^{-0,5\left[\left(\frac{x-7,794}{3,354}\right)^2 + \left(\frac{y-12,863}{8,000}\right)^2\right]}$	0,93
Ac5Pd	$\widehat{D\bar{O}} = 0,905e^{-0,5\left[\left(\frac{x-7,311}{4,452}\right)^2 + \left(\frac{y-15,219}{10,542}\right)^2\right]}$	0,86
Ac7Pd	$\widehat{D\bar{O}} = 0,949e^{-0,5\left[\left(\frac{x-7,614}{3,179}\right)^2 + \left(\frac{y-13,258}{8,694}\right)^2\right]}$	0,93
Ac22Pd	$\widehat{D\bar{O}} = 1,315e^{-0,5\left[\left(\frac{x-8,010}{3,625}\right)^2 + \left(\frac{y-22,364}{11,247}\right)^2\right]}$	0,88

Observa-se, na Figura 5 e na Tabela 2, o desenvolvimento dos isolados de *P. pentosaceus* quando submetidos a diferentes concentrações de bile em função do tempo. Verificou-se desenvolvimento inexpressivo dos isolados de *P. pentosaceus* quando se testaram concentrações de bile equivalentes a 0,1%, 0,3%, 0,6% e 1%. Então, tais condições são inadequadas para o desenvolvimento desses micro-organismos. Todavia, todos os isolados se desenvolveram satisfatoriamente na ausência de bile ao longo de 12 horas.

No estudo de Patel *et al.* (2014), verificou-se que nenhuma das culturas de *Lactobacillus* spp., *Weissella* spp. e *Pediococcus* spp. mostraram desenvolvimento na presença de bile a 0,3%. Contudo, em outra pesquisa, todas as culturas de *L. rhamnosus* e *L. plantarum* resistiram bem ao fluido entérico simulado contendo 0,5% de sais biliares (DOS SANTOS *et al.*, 2014).

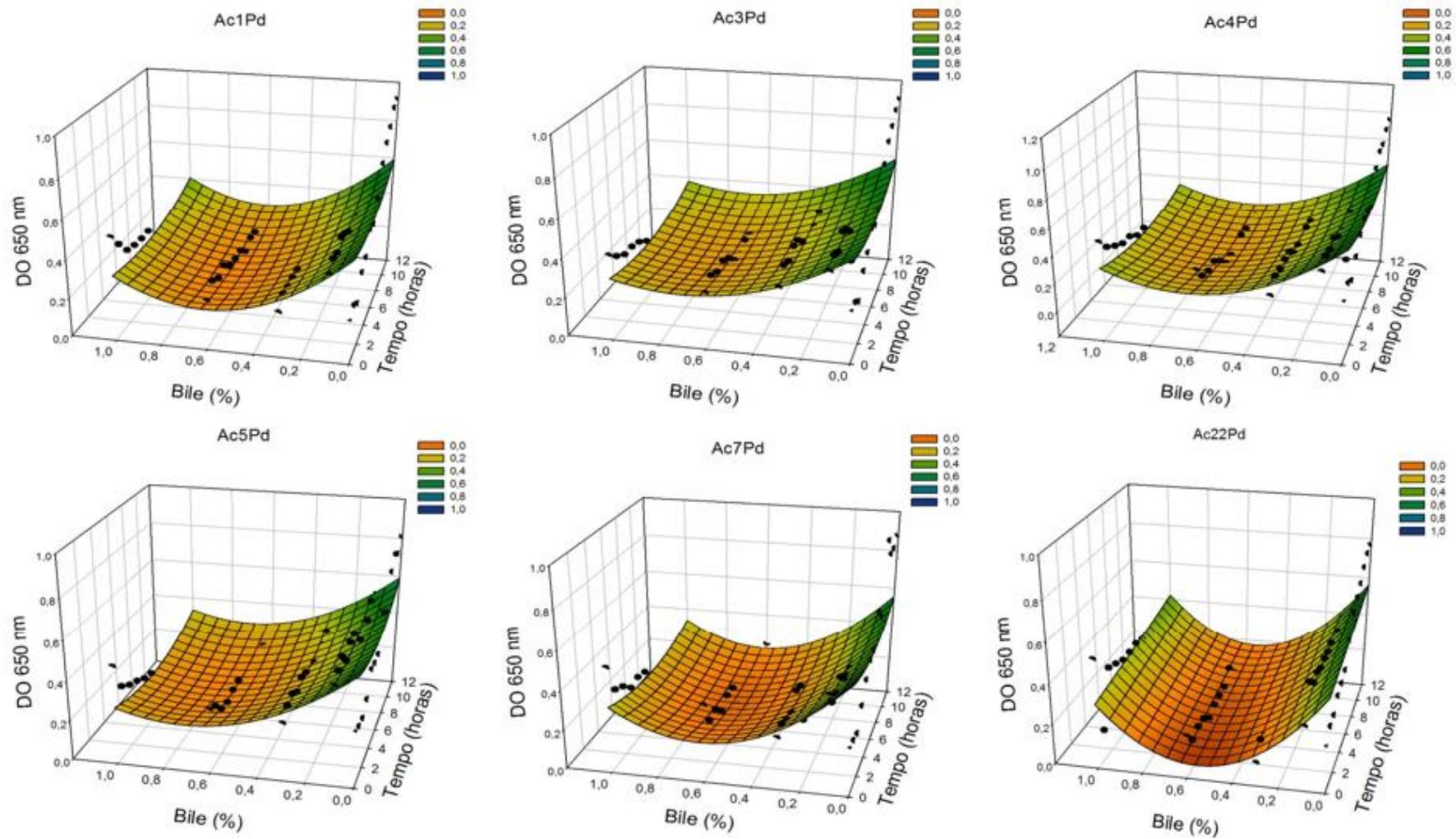


Figura 5. Desenvolvimento de seis isolados de *P. pentosaceus* em caldo MRS, em função da concentração de bile ao longo de 12h.

Tabela 2. Equações da regressão referentes ao desenvolvimento de seis isolados de *P. pentosaceus* em caldo MRS, em função da concentração de bile (% , x) e do tempo (h, y), e respectivos coeficientes de determinação (R²)

Isolados	Equações ajustadas	R ²
Ac1Pd	$\widehat{DO} = 0,525 - 1,030x + 0,845x^2 - 0,015y + 0,002y^2$	0,44
Ac3Pd	$\widehat{DO} = 0,528 - 0,732x + 0,526x^2 - 0,018y + 0,002y^2$	0,40
Ac4Pd	$\widehat{DO} = 0,617 - 1,220x + 0,950x^2 - 0,029y + 0,002y^2$	0,51
Ac5Pd	$\widehat{DO} = 0,549 - 0,887x + 0,626x^2 - 0,022y + 0,002y^2$	0,56
Ac7Pd	$\widehat{DO} = 0,556 - 1,140x + 0,922x^2 - 0,023y + 0,002y^2$	0,45
Ac22Pd	$\widehat{DO} = 0,482 - 1,399x + 1,263x^2 + 0,007y$	0,69

Ressalta-se que o pH utilizado para a seleção de probióticos potenciais é muito seletivo e ainda não é o valor de pH mais comum no estômago humano porque a alimentação pode alterá-lo. Por isso, esse valor apenas assegura o isolamento de tolerantes ao ácido. Deve-se salientar que as culturas probióticas podem ser tamponadas por alimento ou outro suporte de matriz molecular após o consumo e, desse modo, não vão ser expostas ao pH do estômago. De maneira análoga, alguns componentes dos alimentos poderiam proteger e promover a resistência da cultura ao sal biliar (ARGYRI *et al.*, 2013; BAUTISTA-GALLEGO *et al.*, 2013).

3.2. 4 Avaliação da atividade da enzima β -galactosidase

Todas as culturas testadas não apresentaram mudança de cor, o que indica resultado negativo para produção de β -galactosidase. Essa atividade é considerada uma característica positiva em isolados probióticos (BELICOVÁ *et al.*, 2013) e de culturas iniciadoras, dando-lhes como vantagens o crescimento e a proliferação no leite. Essa atividade é essencial para remover o açúcar do leite, permitindo que indivíduos com intolerância à lactose possam consumir o produto (ROSSETO *et al.*, 2012; VIDHYASAGAR & JEEVARATNAM, 2013).

Além disso, a capacidade de fermentar a lactose é uma importante propriedade tecnológica para as BAL, pois assim podem ser amplamente empregadas na indústria de laticínios, uma vez que tem implicações para os atributos sensoriais dos produtos lácteos. Em estudo de Dos Santos *et al.* (2014), um isolado de *L. rhamnosus* também apresentou resultado negativo para esse teste. Na análise de Vidhyasagar & Jeevaratnam (2013), entre isolados *P. pentosaceus*, o isolado VJ49 produziu o valor máximo de β -galactosidase.

3.2.5 Resistência aos antimicrobianos e medicamentos

No presente estudo, todos os isolados de *P. pentosaceus* foram resistentes a oxaciclina, sulfatrimetoprim e vancomicina. Porém, foram sensíveis a cloranfenicol e tetraciclina. Em relação à penicilina G, as culturas apresentaram resultado variado conforme apresentado na Tabela 3.

Medicamentos antimicrobianos podem reduzir os efeitos das BAL e ainda podem torná-las resistentes. Outro problema relacionado é que pode haver a transferência horizontal de genes de resistência das BAL para as outras bactérias presentes no TGI humano (DICKS *et al.*, 2009; TODOROV *et al.*, 2011). A resistência pode ser inerente a um gênero ou espécie bacteriana, mas também pode ser por meio de intercâmbio de material genético, mutações e incorporação de novos genes (AMMOR *et al.*, 2007). A transferência de culturas iniciais já foi documentada por Levy e Marshall (2004).

Tabela 3. Efeito de antibióticos no desenvolvimento de *P. pentosaceus* apresentados como “R”-resistente, “S”-sensível e “I”-intermediário.

Isolados	<i>Ac1Pd</i>	<i>Ac3Pd</i>	<i>Ac4Pd</i>	<i>Ac5Pd</i>	<i>Ac7Pd</i>	<i>Ac22Pd</i>
Tetraciclina	S	S	S	S	S	S
Oxaciclina	R	R	R	R	R	R
Sulfatrimetoprim	R	R	R	R	R	R
Vancomicina	R	R	R	R	R	R
Cloranfenicol	S	S	S	S	S	S
Penicilina G	S	I	I	R	I	I

A resistência de BAL aos antibióticos glicopéptidos como a vancomicina é descrito como intrínseco de acordo com Franz *et al.* (2005). No estudo de Dos Santos *et al.* (2014), culturas de *Lactobacillus* spp. apresentaram um alto nível de resistência para vancomicina. Danielsen & Wind (2003) também encontraram resistência para este antibiótico entre a maioria de *L. rhamnosus* e *L. plantarum*. Já foi relatado que culturas de *Pediococcus* spp. são resistentes à vancomicina (ZHOU *et al.*, 2005). De acordo com Ivanova *et al.* (2013) como os pediococos são resistentes à vancomicina podem ser confundidos com enterococos em análises de rotina, e isso acarretaria a subnotificação de *Pediococcus* spp. em ambientes clínicos.

No estudo de Hummel *et al.* (2007) duas culturas de *Pediococcus* (*P. acidilactici* e *P. pentosaceus*) mostraram baixa resistência à tetraciclina, porém *P. pentosaceus* foi resistente à ampicilina. Dos Santos *et al.* (2014) relataram que todas as culturas testadas

demonstraram susceptibilidade à penicilina G, ao cloranfenicol e à tetraciclina, entretanto, apresentaram resistência ao cotrimoxazol (sulfatrimetoprim). Por outro lado, Belicová *et al.* (2013) descreveram que todas as linhagens de *L. plantarum* foram sensíveis a ampicilina, gentamicina, tetraciclina e cloranfenicol. Todorov *et al.* (2007) relataram que a cultura *L. lactis* subsp. *lactis* foi sensível à maioria dos antibióticos testados, mas resistente a oxacilina, sulfatrimetoprim e tetraciclina. Isso demonstra a variação de resistência para gênero e espécie.

Sabe-se que a introdução comercial de probióticos contendo culturas resistentes a antibióticos pode ter consequências negativas, por exemplo, quando a resistência é transferida para patógenos intestinais. Contudo, às vezes a resistência aos antibióticos pode ser considerada como intrínseca ou natural porque é codificada cromossomicamente e, desse modo, não transmissível (ARGYRI *et al.*, 2013). O estudo de Morrow *et al.* (2012) demonstrou que os genes de lactobacilos resistentes à vancomicina são também cromossômicos e, assim, não são transferíveis facilmente para outras espécies.

Por razões de segurança, a ausência de resistência das BAL aos antimicrobianos é de suma importância para serem usadas como culturas iniciais ou co-culturas. Entretanto, neste estudo as culturas de *P. pentosaceus* apresentaram uma baixa porcentagem de sensibilidade a todos os antibióticos testados.

É importante determinar também o efeito de diversos medicamentos e a sobrevivência das culturas probióticas. Todas as culturas avaliadas foram resistentes à maioria dos medicamentos testados, com exceção de amoxicilina tri-hidratada (500 mg) e ibuprofeno (600 mg). Como o protocolo do CLSI é basicamente de antimicrobianos, para os outros tipos de medicamentos apenas observou-se a formação do halo de inibição.

Todos os isolados apresentaram sensibilidade a amoxicilina tri-hidratada, o que é um bom resultado. Há estudos como de Botes *et al.* (2008) que relataram culturas de *L. casei* Shirota sendo inibidas por diversos antibióticos comerciais, inclusive a amoxicilina.

O ibuprofeno, um anti-inflamatório não esteroidal (AINE), que já foi relatado em outro estudo, inibiu o crescimento de *L. lactis* subsp. *lactis* (TODOROV *et al.*, 2007). A interferência de outros fármacos AINE como o diclofenaco, também foi relatada em outros estudos. Todorov & Dicks (2008) observaram que este fármaco inibiu o crescimento de *L. plantarum*, *E. faecium* e *Leuc. mesenteroides* subsp.

mesenteroides. Carvalho *et al.* (2009) descreveram que *L. casei* Shirota e *L. casei* foram inibidos por medicamentos contendo diclofenaco ou ibuprofeno. Assim, a ação dessas substâncias no TGI pode afetar o potencial das BAL. Entretanto, a dose diária recomendada talvez nem afetasse a sobrevivência das BAL em testes *in vivo*.

3.3 Avaliação do Potencial Tecnológico

Os resultados da caracterização do Potencial Tecnológico (Capacidade de acidificação; Produção de EPS e Diacetil; e Atividade Proteolítica Extracelular) estão contidos na Tabela 4.

Tabela 4. Caracterização do Potencial Tecnológico de *P. Pentosaceus* isolados de leite de ovelha

Isolados	Capacidade de Acidificação			Produção EPS *	Produção de Diacetil*	Atividade Proteolítica Extracelular	Autólise**	Desenvolvimento em diferentes concentrações NaCl***				
	pH no leite em pó desnatado reconstituído							24h	0%	4%	6%	10%
	0h	6h	24h									
<i>Ac1Pd</i>	6,45	6,19	4,68	-	+	-	22,55	+++	+++	+++	+	
<i>Ac3Pd</i>	6,45	6,26	5,26	-	+	-	29,27	+++	+++	+++	+	
<i>Ac4Pd</i>	6,45	6,23	5,10	-	+	-	26,70	+++	++	+++	+	
<i>Ac5Pd</i>	6,45	6,21	4,64	-	+	-	23,48	+++	++	+++	+	
<i>Ac7Pd</i>	6,45	6,22	4,73	-	+	-	25,90	+++	++	+++	+	
<i>Ac22Pd</i>	6,45	6,17	4,95	-	+	-	23,23	+++	+++	+++	+	

* Resultado positivo (+), resultado negativo (-)

** Percentual de autólise foi determinada como $100-A1/A2 \times 100$, onde A1 representa o tempo 0 e A2 representa o tempo 24h medido durante a incubação.

*** Medição do desenvolvimento em NaCl pelo método espectrofotômetro $DO_{650} \leq 0,1 = (+)$; $DO_{650} \leq 0,5 = (++)$; $DO_{650} \geq 0,5 = (+++)$

3.3.1 Capacidade de acidificação

Nesta pesquisa, nenhuma cultura foi capaz de reduzir significativamente o pH após 6h e apresentaram alta acidificação do leite somente após 24h. Diversos estudos corroboram com esses resultados, pois demonstraram também que a maioria dos isolados de laboratório são inicialmente lentas na produção de ácidos (FRANCIOSI *et al.*, 2009; MORANDI *et al.*, 2011; DAL BELLO *et al.*, 2012, PICON *et al.*, 2015). Segundo Ribeiro *et al.* (2013), micro-organismos com baixa capacidade de acidificação podem ser usados como organismos auxiliares, dependendo de outras características.

A rápida queda do pH é muito importante durante a produção do queijo, que contribui com a sua textura e o sabor, e, ainda, para controlar micro-organismos indesejáveis e patogênicos (PERIN *et al.*, 2016). Além disso, pode contribuir não só

para a conservação de propriedades organolépticas, mas também para estender a vida de prateleira de alimentos fermentados (BERESFORD *et al.*, 2001; SALVUCCI *et al.*, 2016). De acordo com Beresford *et al.* (2001), culturas iniciadoras devem ser capazes de produzir ácido suficiente para reduzir o pH do leite para 5,3 ou inferior, depois de 6h a 30 até 37°C.

3.2.2 Produção de exopolissacarídeos (EPS)

Neste teste, as colônias positivas deveriam apresentar uma aparência viscosa, o que não foi verificado no presente estudo. Nenhuma das culturas estudadas apresentou tal capacidade, assim como no estudo de Franciosi *et al.* (2009), Dal Bello *et al.* (2012), Perin *et al.* (2016).

A geração de polissacarídeos extracelulares - EPS é considerada um importante recurso para culturas utilizadas em ambientes lácteos, principalmente, na produção de iogurtes. Durante este processo, eles auxiliam as características reológicas do produto, como, por exemplo, aumentam a viscosidade e melhoram a ligação de água. Assim, criam uma textura lisa e cremosa e, ainda, podem conferir efeitos benéficos para a saúde (BROADBENT *et al.*, 2001; FRANCIOSI *et al.*, 2009; PERIN *et al.*, 2016). Além disso, a produção de EPS pelas BAL pode aumentar a eficiência na adesão do trato gastrointestinal (DE PALÊNCIA *et al.*, 2009).

3.3.3 Produção de diacetil

Todos os isolados do *P. pentosaceus* foram capazes de produzir diacetil. No estudo de Perin *et al.* (2016), os isolados de *L. lactis* subsp. *lactis* e de *Enterococcus spp.* também foram capazes de produzir diacetil. Resultado similar foi observado em estudo de Dal Bello *et al.* (2012), no qual de 20 isolados de *L. lactis* testados, sete apresentaram níveis elevados de diacetil.

O diacetil é um composto volátil e aromatizado gerado como um produto final da conversão de citrato em piruvato, o que contribui para “flavour”, uma interação de gosto e cheiro, além de contribuir com aroma e sabor na manteiga, no "buttermilk" e em outros produtos lácteos (LEROY & DE VUYST, 2004; PERIN *et al.*, 2016) e ainda pode influenciar a textura e o aroma de produtos fermentados (RIBEIRO *et al.*, 2013). A produção de diacetil é considerada cultura-dependente, porque nem todas as BAL têm capacidade de metabolizar o citrato. Portanto, este comportamento pode diferir entre as espécies e as culturas (PERIN *et al.*, 2016).

Além disso, sabe-se que as BAL homofermentativas transformam o açúcar em ácido láctico, resultando numa rápida acidificação da matéria-prima e produzindo outros

metabólitos, como etanol, diacetil, acetato, acetaldeído, e outros, que melhoram o sabor, a textura, o armazenamento e a segurança dos produtos finais. Por isso, estratégias que visem uma modificação direta do equilíbrio têm levado à superprodução dos desejados acima mencionados. Exemplos incluem o aumento da produção de diacetil por *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* no “buttermilk” por redirecionamento de catabolismo de piruvato (LEROY & DE VUYST, 2004).

3.3. 4 Atividade proteolítica extracelular

Nenhuma cultura apresentou formação de halos transparentes nas placas, o que representa resultado negativo para o teste de atividade proteolítica extracelular. A atividade proteolítica é uma propriedade essencial para culturas iniciadoras, uma vez que contribui para o sabor e para a textura do produto (RIBEIRO *et al.*, 2013).

Durante a maturação do queijo, vários compostos aromáticos são gerados devido à ação de enzimas do leite como, por exemplo, as enzimas proteolíticas que são derivadas das BAL presentes no queijo. A atividade proteolítica de BAL consiste na ação de proteinases e peptidases, que hidrolisam a caseína em pequenos peptídeos e aminoácidos livres, o que gera a maior parte dos precursores aromáticos, influenciando as características de sabor em iogurte e queijos. Além disso, o sistema proteolítico das BAL pode contribuir para a liberação de peptídeos bioativos que pode melhorar a absorção no trato intestinal, ao funcionar como carreadores de minerais, especialmente, o cálcio (LEROY & DE VUYST, 2004). Dessa forma, as enzimas proteolíticas desempenham um papel importante na fermentação dos produtos lácteos (PERIN *et al.*, 2016).

No entanto, é preferível não utilizar culturas com elevada atividade proteolítica para a produção de alguns tipos de queijo, porque a proteólise excessiva pode produzir peptídeos, que conferem sabor amargo, e outros compostos indesejáveis ou, a hidrólise excessiva de caseína que pode gerar problemas na textura do queijo (NIETO-ARRIBAS *et al.*, 2009, PERIN *et al.*, 2016).

No estudo de Perin *et al.* (2016) alguns isolados de *Enterococcus* e *L. lactis* subsp. *Lactis* não apresentaram atividade proteolítica extracelular. Resultado similar foi encontrado para alguns isolados de *Enterococcus* e *L. lactis* em outras pesquisas (Dal Bello *et al.*, 2012, Ribeiro *et al.*, 2013). Os resultados das atividades proteolíticas por diferentes autores devem, contudo, ser tomadas com cautela devido a diferenças nos métodos utilizados (PICON *et al.*, 2015).

3.3. 5 Autólise

As porcentagens de autólise após 24h apresentadas pelas culturas de *P. pentosaceus* são mostrados na tabela 4. Após esse período, os isolados apresentaram uma capacidade de realizar autólise que variou de 22% a 29%.

A autólise das BAL favorece o acesso das peptidases intracelulares aos seus substratos, mas também acelera a maturação dos queijos. Os peptídeos e aminoácidos gerados também contribuem para sabor específico do queijo (PIRAINO *et al.*, 2008). As células bacterianas intactas são necessárias para as atividades fisiológicas, tais como fermentação e remoção de oxigênio de lactose, e por uma série de reações de sabor. Entretanto, a principal consequência da autólise no queijo é acelerar as reações peptidolíticas (PERIN *et al.*, 2016).

Em comparação com outros trabalhos como de Perin *et al.* (2016), a autólise para o isolado *L. lactis* subsp. *lactis* foi de 16,45%, após 24h. No estudo de Dal Bello *et al.* (2012), a capacidade de autólise variou entre 20% e 40% para todas as culturas de *L. lactis*, após 24h. A pesquisa de Mora *et al.* (2003) demonstrou que a característica autolítica é amplamente distribuída entre as espécies de *P. acidilactici* e *P. pentosaceus*.

Embora a autólise das culturas “starters” seja benéfica, se for muito rápida, podem ocorrer consequências indesejáveis, tais como a produção de ácidos e remoção insuficiente de lactose residual. Na prática, um equilíbrio na autólise é necessário para a maturação ideal de determinados queijos e para o desenvolvimento do sabor. Além disso, isolados com baixa atividade autolítica podem ser desejáveis, pois se produzirem bacteriocinas ou outra atividade antagonista podem sobreviver por mais tempo no produto e continuar a produzir tais atividades (PERIN *et al.*, 2016).

3.3.6 Desenvolvimento em diferentes concentrações de NaCl

A tolerância apresentada pelos isolados de *P. pentosaceus* para as diferentes concentrações de cloreto de sódio (4%, 6% e 10%) está contida na Tabela 4.

O desenvolvimento em meio MRS sem NaCl e com NaCl 4% não foi significativamente diferente ($p < 0,05$). Resultado semelhante foi encontrado em diversas pesquisas nas quais a maioria dos isolados testados foram capazes de crescer em concentração de 4% (DAL BELLO *et al.*, 2012, PERIN *et al.*, 2016).

Observou-se desenvolvimento de todos os isolados em NaCl a 6%. No estudo de Salvucci *et al.* 2016, cerca de 88% das culturas avaliadas foram capazes de crescer na presença de 6,5% de NaCl, porém os autores não observaram crescimento de *P. pentosaceus* nessa concentração. No estudo de Dal Bello *et al.* (2012), nenhum dos

isolados foi capaz de crescer em concentrações acima de 6%. Na pesquisa de Perin *et al.* (2016), a adição de NaCl a 6 e 10% (p/ v) resultou em crescimento menor quando comparados ao grupo controle.

Na concentração de NaCl 10% o desenvolvimento dos isolados foi significativamente menor quando comparado às demais. Ribeiro *et al.* (2013), relataram que apenas um isolado de *E. faecalis* apresentou baixo crescimento à maior concentração de sal testado (10%), sendo que a maioria foi resistente.

A capacidade de adaptação e sobrevivência de BAL em diferentes concentrações de sal é importante, especialmente na produção de determinados tipos de queijos e também para outros alimentos que contenham elevadas concentrações de sal. Além disso, o crescimento em meios com alto teor de sal é desejável para culturas iniciadoras, uma vez que o NaCl é um dos aditivos mais importantes para a conservação de alimentos (SALVUCCI *et al.*, 2016).

4. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que os isolados de *P. pentosaceus* provenientes de leite de ovelha são seguros em relação aos fatores analisados, entretanto, demonstraram limitada aplicação como probióticos, por não apresentarem características essenciais como a sobrevivência em ambiente ácido. Na avaliação do potencial tecnológico os isolados também não apresentaram resultados necessários para serem utilizados na produção de derivados do leite.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em relação aos medicamentos, é importante salientar que o uso indiscriminado de antimicrobianos pode levar a resistência de múltiplos fármacos, por isso muitas vezes é necessário encontrar tratamento alternativo para combater infecções e, assim, também diminuir a resistência das BAL.

A presente pesquisa fornece evidências de que o leite de ovelha pode ser considerado como fonte apropriada de culturas BAL. Deve-se ressaltar ainda, que os dados gerados foram obtidos a partir de testes *in vitro* e se os testes fossem realizados *in vivo*, os resultados poderiam ser diferentes. Como futuras perspectivas de pesquisas, pretende-se iniciar estudos de melhoramento genético, de forma a alterar características dos isolados para que eles apresentem condições de utilização como probióticos.

6. BIBLIOGRAFIA

- ALVIM, L. B. Identificação molecular e seleção de bactérias lácticas com potencial probiótico isoladas de diferentes mucosas de suínos. **Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, MG, 2011.
- AMMOR, M. S.; FLÓRES, A. B.; MAYO, B. Antibiotic resistance in not-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiol** 24, 559–570, 2007.
- ARGYRI A. A.; ZOUMPOPOULOU, G.; KARATZAS, K. G; TSAKALIDOU, E.; NYCHAS, G. E.; PANAGOU, E. Z.; TASSOU, C. C. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. **Food Microbiology** 33, 282-291,2013.
- BARBOSA, J.; GIBBS, P. A.; TEIXEIRA, P. Virulence factors among *enterococci* isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. **Food Control** 21, 651–656, 2010.
- BAUTISTA-GALLEGO, J.; ARROYO-LÓPEZ, F. N.; RANTSIOU, K.; JIMÉNEZ-DÍAZ R.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, A.; COCOLIN, L. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. **Food Research International** 50, 135–142, 2013.
- BELICOVÁ, A.; MIKULÁŠOVÁ, M.; DUŠINSKÝ, R. Probiotic potential and safety properties of *Lactobacillus plantarum* from Slovak bryndza cheese. **Biomed Res Int Article** ID 760298, doi:10.1155/2013/760298, 2013.
- BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International dairy journal** 11(4): 259-274, 2001.
- BOTES, M.; VAN REENEN, C. A.;DICKS, L. M. T. Evaluation of *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 as probiotics by using a gastrointestinal model with infant milk formulations as substrate. **Int J Food Microbiol** 128, 362–370, 2008.
- BOVER-CID, S.;& HOLZAPFEL, W. H. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. **Int. J. Food Microbiol.** 53, 33–41,1999.
- BRINK, M.; TODOROV, S. D.; MARTIN, J. H.; SENEKAL, M.; DICKS, L. M. T. The effect of prebiotics on production of antimicrobial compounds, resistance to growth at low pH and in the presence of bile, and adhesion of probiotic cells to intestinal mucus. **J Appl Microbiol** 100, 813–820, 2006.

- BROADBENT, J. R.; MCMAHON, D. J.; OBERG, C. J.; WELKER, D. L. Use of exopolysaccharide-producing cultures to improve the functionality of low fat cheese. **International Dairy Journal**, 11, 433–439, 2001.
- CARVALHO, K. G.; KRUGER, M. F.; FURTADO, D. N.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M. Evaluation of the role of environmental factors in the human gastrointestinal tract on the behaviour of probiotic cultures *Lactobacillus casei* Shirota and *Lactobacillus casei* LC01 by the use of a semi-dynamic in vitro model. **Ann Microbiol** 59, 439–445, 2009.
- CHARTERIS, W. P.; KELLY, P.M.; MORELLI L.; COLLINS J. K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **J Food Prot** 61:1636–1643, 1998.
- CHEN, X.; XU, J.; SHUAI, J.; CHEN, J.; ZHANG, Z.; FANG, W. The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. **Int J Food Microbiol** 115:307–312, 2007.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement. Pennsylvania: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2011.
- COGAN, T. M. History and taxonomy of starter cultures. In: Cogan, T.M., Accolas, J.P. (Eds.), **Dairy Starter Cultures**. John Wiley and Sons Inc., New York, pp. 1–23, 1996.
- COLLINS, J.; NOERRUNG, B.; BUDKA, H. Scientific Opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. **EFSA Journal** 9: 2393, 2011.
- COSTA, H. H. S.; SOUZA, M. R.; ACÚRCIO, L.B.; CUNHA, A. F.; RESENDE, M.F.S, NUNES, A. C. Potencial probiótico in vitro de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra, MG. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, n.6, p.1858-1866, 2013.
- DAL BELLO, B.; COCOLIN, L.; ZEPPA, G.; DES FIELD, D.; COTTER, P.; HILL, C. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. **International Journal of Food Microbiology** 153, 58–65, 2012.
- DANIELSEN, M.; WIND, A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. **Int J Food Microbiol** 82:1–11, 2003.
- DE PALENCIA, F. P.; WERNING, M. L.; SIERRA-FILARDI, E.; DUENAS, M. T.; IRASTORZA, A.; CORBI, A. L. Probiotic properties of the 2-substituted (1,3)-D-

glucan-producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. **Applied and Environmental Microbiology**, 75, 4887–4891, 2009.

DICKS, L. M. T.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M. Current status of antibiotic resistance in lactic acid bacteria. In Antibiotic Resistance: Causes and Risk Factors, Mechanisms and Alternatives. **Pharmacology – Research, Safety Testing and Regulation** ed. Bonilla, A.R. and Muniz, K.P. pp. 379–425. New York, USA: Nova Publisher, 2009.

DOS SANTOS, K. M. O.; VIEIRA, A. D. S.; SALLES, H. O.; OLIVEIRA, J. S.; ROCHA, C. R. C.; BRUNO, L. M.; BORGES, M. F.; FRANCO, B. D. G. M.; TODOROV S. D. Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses. **Braz J Microbiol in press**, 2014a.

DOS SANTOS, K. M. O.; VIEIRA, A. D. S.; BURITI, F. C. A.; DE MELO FRANCO, B. D. G.; BRUNO, L. M.; BORGES, M. F.; TODOROV, S. D.; DO NASCIMENTO, J. C. F.; ROCHA, C. R. C.; DE MELO, M. E. S.; DE SOUZA LOPES A. C. Artisanal Coalho cheeses as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Dairy Sci. & Technol.** DOI 10.1007/s13594-014-0201-6, INRA and Springer-Verlag France, 2014.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Health Organization. **Organization Guidelines for Evaluation of Probiotics in Food**, London, Ontario, Canadá, p. 1 – 11, 2002.

FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. **International Dairy Journal** 19, 3–11, 2009.

FRANZ, C. M. A. P.; HUMMEL, A.; HOLZAPFEL, W. H. Problems related to the safety assessment of lactic acid bacteria starter cultures in probiotics. **Mitt Lebensm Hyg**, 96:39–65, 2005.

GARAI, G.; DUENAS M.T.; IRASTORZA A.; MORENO-ARRIBAS, M.V. Biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from cider. **Lett Appl Microbiol**; 45(5):473-478, 2007.

GOMES, M. B.; PIRES, B. A. D.; FRACALANZZA, S. A. P.; MARIN, V. A. O risco das amins biogênicas nos alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, 19(4):1123-1134, 2014.

HUMMEL, A. S.; HERTEL, C.; HOLZAPFEL, W. H.; FRANZ, C. M. A. P. Antibiotic Resistances of Starter and Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria. **Applied and environmental microbiology**, p. 730–739 Vol. 73, No. 3, Feb., 2007.

IVANOVA, I.; ILIEV, I.; HAERTLÉ, T.; CHOBERT, J. Food or Medicine? Future of Lactic Acid Bacteria. Sofia University. Layout & prepressed: Georg Iliev. **Printed by Diagalprint Printing House**, pp. 26 -30, 2013.

JOOSTEN, H.M.L.J., NORTHOLD, M.D. Detection, growth and amine-producing capacity of *lactobacilli* in cheese. **Appl. Environ. Microbiol.** 55 (9), 2356–2359, 1989.

KAUSHIK, J. K.; KUMAR, A.; DUARY, R. K.; MOHANTY, A. K.; GROVER, S.; BATISH, V. K. Functional and probiotic attributes of an indigenous isolate of *Lactobacillus plantarum*. PLoS One 4(12):8099. doi:10. 1371/**journal.pone.0008099**, 2009.

KIELY, L. J.; OLSON, N. F. The physicochemical surface characteristics of *Lactobacillus casei*. **Food Microbiol** 17:277–291, 2000.

KING, N. Modifications of the Voges–Proskauer test for rapid colorimetric determination of acetylmethylcarbinol plus diacetyl in butter cultures. **Dairy Industry** 13, 800, 1948.

KOCH, A. C. C. Características físico-químicas e microbiológicas do leite de ovelha e atividade antagonista de sua microbiota láctica. **Tese de doutorado em ciências animais. Universidade de Brasília**, 2014.

LEROY, F.; DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology** 15(2): 67-78. 2004.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nat. Med.** 10, S122–S129, 2004.

MEIRA, S. M. M. Potencial probiótico de bactérias lácticas e atividades biológicas de leite e queijos de ovelha. **Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, RS, 2011.

MORA, D.; MUSACCHIO, F.; FORTINA, M. G.; SENINI, L.; MANACHINI, P. L. Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. **Journal of Applied Microbiology** 94, 561–570, 2003.

MORANDI, S.; BRASCA, M.; LODI, R. Technological, phenotypic and genotypic characterisation of wild lactic acid bacteria involved in the production of Bitto PDO Italian cheese. **Dairy Science & Technology** 91(3): 341-359, 2011.

MORAES, P. M.; PERIN, L. M.; TODOROV, S. D.; SILVA, J. R. A.; FRANCO, B. D. G. M.; NERO, L. A. Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. **J. Appl. Microbiol.** 113, 318–328, 2012.

MORELLI, L. *In vitro* selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, Norfolk, v. 1, n. 2, p. 59 - 67, 2000.

MORROW, L. E.; GOGINENI, V.; MALESKER, M. A. Probiotics in the intensive care unit. **Nutr. Clin. Pract.** 27 (2), 235e241, 2012.

NIETO-ARRIBAS, P.; SESEÑA, S.; POVEDA, J. M.; PALOP, L.; CABEZAS, L. Genotypic and technological characterization of *Leuconostoc* isolates to be used as adjunct starters in Manchego cheese manufacture. **Food microbiology** 27(1): 85-93, 2009.

PANCHENIAK, E. F. R. Isolamento, seleção, caracterização bioquímica e molecular para produção e avaliação do potencial probiótico de *Lactobacillus reuteri* LPB P01-001 em suínos. 154 f. **Tese de Doutorado em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná**, 2005.

PATEL, A.; PRAJAPATI, J. B.; HOLST, O.; LJUNGH A. Determining probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from vegetables and traditional Indian fermented food products. **Food Bioscience** 5, 27–33, 2014.

PERIN, L. M.; MIRANDA, R. O.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; NERO, L. A. Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic *Lactococci* and *enterococci* isolated from goat milk. **International Journal of Food Microbiology** 185 121–126, 2014.

PERIN, L. M.; BELVISO, S.; DAL BELLO, B.; NERO, L. A.; COCOLIN, L. Technological Properties and Biogenic Amines Production by Bacteriocinogenic *Lactococci* and *Enterococci* Strains Isolated from Raw Goat Milk, **Journal of Food Protection**, Vol. 80, No. 1, 2017, Pages 151–157, 2016.

PICON, A.; GARDE, S.; ÁVILA, M.; NUÑEZ, M. Microbiota dynamics and lactic acid bacteria biodiversity in raw goat milk cheeses. **International Dairy Journal** 58: 14-22, 2015.

PIRAINO, P.; ZOTTA, T.; RICCIARDI, A.; MCSWEENEY, P. L. H.; PARENTE, E. Parentea Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid

bacteria isolated from pasta filata cheeses: A multivariate screening study. **International Dairy Journal** 18, 81–92, 2008.

RIBEIRO, S. C.; COELHO, M. C.; TODOROV, S. D.; FRANCO, B. D. G. M.; DAPKEVICIUS, M. L. E.; SILVA, C. C. G. Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico cheese an artisanal cow's milk cheese. **Journal of Applied Microbiology** 116(3): 573-585, 2013.

ROSSETO, B. P.; MORAES, F.; ZANIN, G. M. Determination of the Activity of the Enzyme β -Galactosidase. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports** DOI 10.5433/2316-5200. v1 n2 p28, 2012.

SAARELA, M. *et al.* Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 84, p. 197 - 215, 2000.

SALMINEN, S. *et al.* Demonstration of safety of probiotics - a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 44, p. 93 - 106, 1998.

SALVUCCI, E.; LEBLANC, J.; PEREZ, G. Technological properties of Lactic Acid Bacteria isolated from raw cereal material. **LWT - Food Science and Technology**. DOI: 10.1016/j.lwt.2016.02.043, 2016.

SHUKLA, R.; GOYAL, A. Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* CRAG3: A New Isolate from Fermented Cucumber. *Probiotics & Antimicro. Prot.* (2014) 6:11–21 DOI 10.1007/s12602-013-9149-8, **Springer Science Business Media**, New York, EUA, 2013.

SOUSA, C. P. Pathogenicity mechanisms of prokaryotic cells: an evolutionary view. **Braz. J. Infect. Dis.** 7, 23–31, 2003.

ORTOLANI, M. B. T. Bactérias ácido lácticas autóctones de leite cru e queijo minas frescal: isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular. 107f. **Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade Federal de Viçosa**, 2009.

TODOROV, S. D.; BOTES, M.; DANOVA, S. T.; DICKS, L. M. T. Probiotic properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* HV219, isolated from human vaginal secretions. **Journal of Applied Microbiology**, 103, 629–639, 2007.

TODOROV, S. D. & DICKS, L. M. T. Evaluation of lactic acid bacteria from kefir, molasses and olive brine as possible probiotics based on physiological properties. **Ann Microbiol** 58, 661–670, 2008.

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. **J Appl Microbiol** 104:465–477, 2008.

TODOROV, S. D.; FURTADO, D. N.; SAAD, S. M. I.; TOME, E.; FRANCO, B. D. G. M. Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. **Journal of Applied Microbiology** 110, 971–986, 2011.

VIDHYASAGAR, V.; & JEEVARATNAM, K. Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties *in vitro*. **Journal of functional foods** 5, 235 –243, 2013.

ZHOU, J. S.; PILLIDGE, C. J.; GOPAL, P. K.; GILL, H. S. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **Int. J. Food Microbiol.** 98, 211 e 217, 2005.