



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICA E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

VANDERLANIA DO NASCIMENTO SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE UMA BACTÉRIA LÁCTICA
POTENCIALMENTE PROBIÓTICA FRENTE A IMPORTANTES INDICADORES
DE CONTAMINAÇÃO EM ALIMENTOS**

Campina Grande
2023

VANDERLANIA DO NASCIMENTO SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE UMA BACTÉRIA LÁCTICA
POTENCIALMENTE PROBIÓTICA FRENTE A IMPORTANTES INDICADORES
DE CONTAMINAÇÃO EM ALIMENTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia Generalista.

Área de Concentração: Farmácia/
Bromatologia.

Orientadora:

Dr.^a Elaine Virginia dos Santos Pereira

Co-orientadora:

Dr.^a Flávia Carolina Alonso Buriti.

Campina Grande
2023

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S237a Santos, Vanderlania do Nascimento.
Avaliação da atividade antibacteriana de uma bactéria láctica potencialmente probiótica frente a importantes indicadores de contaminação em alimentos [manuscrito] / Vanderlania do Nascimento Santos. - 2023.
32 p.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2023.
"Orientação : Profa. Dra. Elaine Virginia dos Santos Pereira, Departamento de Química - CCT."
1. Bioconservantes. 2. *Limosilactobacillus mucosae*. 3. Ensaio in vitro. I. Título

21. ed. CDD 615.1

VANDERLANIA DO NASCIMENTO SANTOS

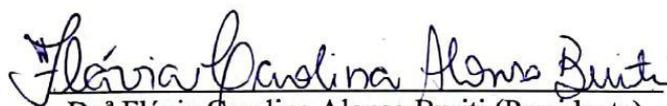
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE UMA BACTÉRIA LÁCTICA
POTENCIALMENTE PROBIÓTICA FRENTE A IMPORTANTES INDICADORES
DE CONTAMINAÇÃO EM ALIMENTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

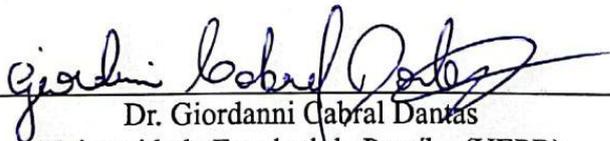
Área de Concentração: Farmácia/
Microbiologia dos alimentos.

Aprovada em: 23 / 11 / 2023.

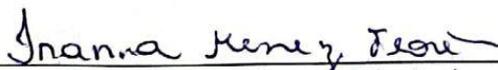
BANCA EXAMINADORA



Dr.^a Flávia Carolina Alonso Buriti (Presidente)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Dr. Giordanni Cabral Dantas
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Dr.^a Isanna Menezes Florêncio
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

*A minha mãe por toda confiança, amor e
esperança, DEDICO.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar saúde, força e esperança, e por iluminar meu caminho colocando pessoas incríveis ao meu lado e tornando tudo possível.

À minha mãe, Dalva, exemplo de caráter, personalidade e dedicação, aos quais busco diariamente me espelhar. Sempre se manteve presente em todos os meus momentos me fornecendo todo amor e apoio. Meus agradecimentos pela esperança na minha capacidade durante todos os anos de estudo e me motivando a sempre me tornar uma pessoa melhor.

À minha família, avó, *in memorian*, avô, tias, tios e amigos por todo apoio, confiança e atitudes que foram fundamentais para a conclusão do curso.

À minha amiga, Ana Paula, que desde o primeiro dia da graduação sempre caminhou ao meu lado provando o real significado da palavra amizade, companheirismo e lealdade. Meus agradecimentos por estar nos momentos felizes e sempre dividir as dores tornado tudo mais leve.

À minha orientadora Dr.^a Elaine por me mostrar a paixão na pesquisa e por todo afeto materno. À minha co-orientadora e Dr.^a Flávia Carolina por todos os ensinamentos, pela confiança, pela dedicação e por proporcionar as oportunidades de participação no âmbito da pesquisa.

A todos os profissionais e alunos do Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos (NUPEA), em especial ao Dr. Giordanni, que contribuíram diretamente e indiretamente para o desenvolvimento de todos os estudos. À Dr.^a Isanna, que gentilmente aceitou participar e colaborar com este trabalho.

A todos os professores da graduação por todo ensinamento e participação ativa no meu desenvolvimento profissional, especialmente ao Dr. Heronides, que observou o meu esforço, e a toda sua equipe que participaram ativamente no meu desenvolvimento profissional/pessoal.

Agradeço à Universidade Estadual da Paraíba, ao Departamento de Farmácia e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por oferecerem a oportunidade de ensino, pesquisa e as bolsas que auxiliaram a custear as despesas no período da graduação. Agradeço também à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, ao Laboratório de Microbiologia Básica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UEPB e à professora Zilka Nanes por contribuírem com parte dos insumos usados neste trabalho.

RESUMO

Probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício de saúde no hospedeiro”. Esses microrganismos também podem contribuir para a biopreservação dos alimentos, melhorando a segurança alimentar, por meio da inibição de microrganismos deteriorantes e patogênicos através da produção de metabólitos primários e/ou secundários. O presente estudo avaliou a atividade antimicrobiana de uma cultura nativa potencialmente probiótica de *Limosilactobacillus mucosae* CNPC007 frente a importantes indicadores de contaminação em alimentos. Foram utilizados o sobrenadante (S), sobrenadantes de neutralizado (SN) e o inóculo com o cultivo de células (I) da cultura *L. mucosae* em caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS) para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) frente às cepas referência *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, assim como a um isolado clínico de *Escherichia coli*. Utilizou-se o método de microdiluição em microplacas para a determinação da CIM, com concentrações de 50% a 3,12% de S, SN e I. Foram adicionadas as suspensões dos indicadores de contaminação a uma concentração de 10^5 UFC/100 μ L em cada poço e as microplacas foram incubadas por 24 h a 35 ± 2 °C. Para a determinação da CBM foram retiradas alíquotas de 10 μ L de cada um dos poços contendo S, SN e I nas concentrações de 50% a 6,25% e foram inoculadas em placas de Petri e incubadas a 35 ± 2 °C por 48 h. Nos testes de CIM, o S foi capaz de inibir a multiplicação de todos os indicadores na concentração de 12,5%, o SN não apresentou atividade inibitória e, devido a limitações do método, não foi possível determinar a CIM do I. Já na avaliação da CBM, o S e I eliminam toda a população de *S. enterica* e *E. coli*, porém, não foram capazes de eliminar toda população de *S. aureus*, enquanto que o SN não apresentou atividade bactericida. Desse modo, a cepa *L. mucosae* CNPC007 em caldo MRS e seu sobrenadante não neutralizado demonstraram capacidade bacteriostática e bactericida frente aos indicadores de contaminação estudados *in vitro*, podendo ser promissora como conservante natural para o setor de alimentos.

Palavras-chave: Bioconservantes; *Limosilactobacillus mucosae*; microdiluição; ensaio *in vitro*.

ABSTRACT

Probiotics are defined as “Live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host.” These microorganisms also can contribute for food biopreservation, improving food safety by inhibiting spoilage and pathogenic microorganisms through the production of primary and/or secondary metabolites. The present study evaluated the antimicrobial activity of potentially probiotic a native culture of *Limosilactobacillus mucosae* CNPC007 against important indicators of contamination in food. The supernatant (S), neutralized supernatants (SN) and the inoculum with cell culture (I) of *L. mucosae* CNPC007 in de Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth were used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) against the reference strains *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, as well as a clinical isolate of *Escherichia coli*. The microdilution method in microplates was used to determine MIC, between concentrations of S, SN and I from 50% to 3,12%. The suspensions of contamination indicators at a concentration of 10^5 CFU/100 μ L were added in each well and the microplates were incubated for 24 h at 35 ± 2 °C. To determine MBC, 10 μ L aliquots from concentrations of 50% to 6,25% were removed from each of the wells containing S, SN and I and were inoculated in Petri dishes and incubated at 35 ± 2 °C for 48 h. For the MIC test, it was found that S was able to inhibit the growth of all indicators at the concentration of 12.5%, SN did not show inhibitory activity and, due to limitations of the method, it was not possible to determine the MIC of I. Regarding the CBM evaluation, S and I eliminated the entire population of *S. enterica* and *E. coli*, however, they were not able to eliminate the entire population of *S. aureus*, meanwhile SN did not show bactericidal activity. Thus, the *L. mucosae* CNPC007 strain in MRS broth and its non-neutralized supernatant demonstrated bacteriostatic and bactericidal activity against the microbial indicators studied *in vitro*, becoming promising as a natural preservative for the food sector.

Keywords: Biopreservatives; *Limosilactobacillus mucosae*; microdilution; *in vitro* assay.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	OBJETIVOS.....	10
2.1	Objetivo geral.....	10
2.2	Objetivos específicos.....	10
3	REFERENCIAL TEÓRICO	11
3.1	Probióticos	11
3.2	Bactérias lácticas	11
3.3	Bioconservantes.....	12
3.4	<i>Limosilactobacillus mucosae</i>	13
4	MATERIAL E MÉTODO.....	15
4.1	Ativação e condições de cultivo da bactéria láctica nativa	15
4.2	Microrganismo indicadores de contaminação	15
4.3	Preparo dos sobrenadantes <i>Limosilactobacillus mucosae</i>	16
4.4	Determinação da atividade antimicrobiana da bactéria láctica nativa.....	16
4.4.1	Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas.....	16
4.4.2	Determinação das Concentrações Bactericidas Mínimas.....	17
4.5	Determinação da acidez titulável.....	18
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5.1	Teste de sensibilidade antimicrobiana	19
5.1.1	Determinações das Concentrações Inibitórias Mínimas.....	19
5.2.2	Determinação das Concentrações Bactericidas Mínimas	22
6	CONCLUSÕES	27
	REFERÊNCIAS.....	28

1 INTRODUÇÃO

Os probióticos são microrganismos que atuam como moduladores intestinais e, com isso, protegem o hospedeiro contra invasores e devem ser isentos de quaisquer efeitos adversos (citotoxicidade, resistência a antibióticos, hemólise) e dotados de efeitos benéficos (Saiz *et al.*, 2019).

Diversos gêneros de probióticos têm a característica de produzir substâncias, como ácidos orgânicos, bacteriocinas e metabólitos de aminoácidos, com as quais ajudam a manter as propriedades originais do alimento, aumentam seu sabor e prolongam sua vida útil, garantindo sua qualidade e segurança (Galdino *et al.*, 2023). Estudo relata a eficiência do uso de probióticos na inibição de microrganismos patogênicos como *Staphylococcus* spp. e *Listeria monocytogenes* (Buriti; Cardarelli; Saad, 2007).

Os processos de preservação dos alimentos, como a secagem, a salga, o enlatamento e a adição de conservantes químicos, são algumas alternativas para retardar a deterioração, eliminar os contaminantes dos alimentos e aumentar a vida útil do produto (Johnson *et al.*, 2018). Essas técnicas podem trazer efeitos adversos como as reações alérgicas a alguns desses conservantes químicos e a ameaça de formação de produtos finais cancerígenos, como nitrosaminas de nitritos, alteração das propriedades sensoriais e destruição dos nutrientes disponíveis nos alimentos por meio de tratamentos físicos e/ou químicos (Johnson *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, os consumidores estão se tornando cada vez mais conscientes do risco à saúde humana representado pelo uso de conservantes químicos em alimentos. Por outro lado, a crescente demanda da indústria de laticínios para evitar a deterioração dos produtos lácteos e prolongar a vida útil favoreceu a busca por novos conservantes e métodos de conservação (Silva *et al.*, 2018).

Neste contexto, os bioconservantes figuram como alternativa pois são seguros para o consumo humano, têm efeitos benéficos sobre a microbiota intestinal, são eficazes contra microrganismos patogênicos/deterioradores de alimentos e são estáveis na matriz alimentar em que são empregados (O'Connor *et al.*, 2020). Além disso, os bioconservantes produzem compostos inibidores, previnem a adesão de patógenos, competem por nutrientes, modulam o sistema imunológico do hospedeiro, melhoram a digestibilidade de nutrientes e reduzem biodisponibilidade de toxinas (O'Connor *et al.*, 2020; Saiz *et al.*, 2019).

Nos países em desenvolvimento, a busca pelo aumento do número de cepas probióticas e sua caracterização são de grande importância, pois impulsionam estudos,

elaborações de novos alimentos e aumentam a acessibilidade de pequenos produtores de derivados lácteos em produzir estes alimentos com a adição de probióticos de baixo custo (Silva *et al.*, 2022; Vinderola *et al.*, 2008).

Os probióticos possuem a característica de não serem tóxicos para células eucarióticas, e serem extremamente potentes contra muitos microrganismos deteriorantes e bactérias patogênicas, além de não interferirem na qualidade sensorial dos alimentos (Fiedel *et al.*, 2018).

Cepas com atividade antimicrobiana podem ser utilizadas diretamente na matriz alimentar como culturas protetoras ou como culturas iniciadoras em alimentos fermentados. Além disso, não é necessário nenhum procedimento rigoroso para a preparação dos bioconservantes (Johnson *et al.*, 2018).

Essas cepas probióticas, assim como os antibióticos, devem ser utilizadas na concentração em que são capazes de exercerem o efeito inibitório para evitar a seleção de patógenos resistentes que possam comprometer o seu papel potencial como bioconservantes (O'connor *et al.*, 2020).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana de uma cultura nativa potencialmente probiótica de *Limosilactobacillus mucosae* CNPC007 frente a importantes indicadores de contaminação em alimentos.

2.2 Objetivos específicos

São objetivos específicos do presente estudo:

- a) determinar as concentrações inibitória e bactericida mínimas frente às cepas referências *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 e a um isolado clínico de *Escherichia coli*;
- b) determinar a concentração de ácido láctico produzido por *L. mucosae* após 24 horas de incubação;
- c) verificar e comparar os efeitos do sobrenadante, do sobrenadante neutralizado e do inóculo obtidos a partir do cultivo de *L. mucosae* na inibição dos indicadores de contaminação.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Probióticos

Os probióticos podem ser definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício de saúde do hospedeiro” (Hill *et al.*, 2014). Desse modo, esses microrganismos devem sobreviver através do trato gastrointestinal, tolerando ácido, bile e enzimas gástricas, e então aderir e colonizar no epitélio intestinal em número suficiente, para que se tenha o efeito desejado à saúde (Ranadheera *et al.*, 2012).

Os probióticos promovem os benefícios à saúde através de três efeitos principais que são efeitos diretos contra bactérias patogênicas, efeitos indiretos contra estas bactérias e modulação do recebimento de respostas inflamatórias (Lima Júnior, 2022).

No Brasil, o uso de probióticos em alimentos requer prévia avaliação da Anvisa, segundo requisitos da Resolução RDC nº 241, de 27 de julho de 2018. A avaliação efetuada contempla três elementos principais: comprovação inequívoca da identidade da linhagem do microrganismo; de sua segurança; e de seu efeito benéfico (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2021).

A concentração de probióticos necessária para exercer o efeito benéfico ao organismo é específica para cada cepa, devendo ser avaliada individualmente pela empresa que deseja colocar um produto probiótico no mercado (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2021). No entanto, têm sido sugerido que, para os probióticos serem capazes de demonstrarem seus efeitos benéficos, eles devem ser consumidos diariamente em alimentos que, em 100 g de porção, contenham quantidades de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) (Silva *et al.*, 2022).

3.2 Bactérias lácticas

Os alimentos fermentados são um rico reservatório de microrganismos vivos e ativos e, além disso, são considerados as principais fontes de bactérias lácticas (BAL) da natureza (Galdino *et al.*, 2021). As BAL estão presentes naturalmente em diversos ambientes e podem ser isoladas de produtos alimentícios de origem vegetal, animal, e também do trato gastrointestinal humano (Margalho *et al.*, 2020).

As BAL são constituintes naturais de muitos alimentos fermentados presentes na dieta humana. Além disso, contribuem para a biopreservação dos alimentos melhorando a segurança alimentar por meio da inibição de microrganismos deteriorantes e patogênicos (Galdino *et al.*, 2021), através da produção de metabólitos antimicrobianos, incluindo ácidos orgânicos, diacetil, etanol, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (O'Connor *et al.*, 2020).

As BALs possuem como características serem Gram-positivas, não formadoras de endósporo, catalase negativas, imóveis, anaeróbias facultativas e possuem considerável tolerância a ácidos, conferindo vantagem competitiva sobre outras bactérias. A classificação do gênero é baseada na morfologia, multiplicação em diversas temperaturas, modo de fermentação dos carboidratos, configuração do ácido láctico produzido (Amelia *et al.*, 2021; Santos, 2023).

Outra classificação das BAL é de acordo com seus padrões de fermentação que, segundo Camesasca *et al.* (2021), podem ser classificadas como:

- a) homofermentadoras, quando utilizam a via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) e tem-se o ácido láctico como produto principal;
- b) heterofermentadoras, quando produzem ácido láctico, bem como dióxido de carbono, etanol ou ácido acético pela via 6-fosfogluconato-fosfocetolase (6-PG);
- c) heterofermentadoras facultativas, que podem usar ambas as vias.

As culturas de BAL de interesse comercial são isoladas, purificadas e submetidas a métodos de concentração ou secagem como, por exemplo, pelos métodos de liofilização e pulverização e, desse modo, mantêm a sua viabilidade para processamentos seguintes na fabricação de produtos das indústrias como, alimentícia, farmacêutica, de cosméticos, entre outras (Rama *et al.*, 2019).

3.3 Bioconservantes

Os probióticos podem atuar como microbiota competitiva natural ou serem utilizados como culturas iniciadoras específicas sob condições controladas (Parada, 2007). A fermentação dos carboidratos resulta na redução do pH devido à produção de ácidos lácticos e outros ácidos orgânicos é um fator importante para a inibição da multiplicação de microrganismos indesejáveis (Galdino *et al.*, 2021, 2023).

O baixo pH torna os ácidos orgânicos lipossolúveis, permitindo-lhes romper a membrana celular e atingir o citoplasma dos patógenos. Alguns probióticos produzem substâncias antagonistas, chamadas bacteriocinas que, em pequenas quantidades, são muito

ativas contra patógenos. As bacteriocinas são estáveis ao calor, incolores, inodoras, estáveis em uma ampla faixa de pH e capazes de serem inativadas por enzimas proteolíticas, sendo utilizadas como ferramenta biotecnológica nas indústrias alimentícia e farmacêutica (Parada, 2007; Bhattacharya *et al.*, 2022).

Os mecanismos de inibição que os bioconservantes podem atuar contra patógenos são distintos podendo tanto aumentar a permeabilidade da membrana celular do microrganismo alvo por meio da formação de poros (Field *et al.*, 2018), como impossibilitar a formação da parede celular (Chikindas *et al.*, 2018), ou mesmo transpassar no citoplasma bacteriano e clivar o DNA ou o RNA (Radaic *et al.*, 2020), promovendo, com estes mecanismos isolados ou combinados, efeito bactericida, com ou sem lise celular, ou ações bacteriostáticas (Silva *et al.*, 2018).

3.4 *Limosilactobacillus mucosae*

A cepa nativa *Limosilactobacillus mucosae* CNPC007 foi isolada do leite de cabra por um grupo de pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). A família *Lactobacillaceae* contém várias espécies potencialmente probióticas, incluindo *Limosilactobacillus mucosae* (Morais *et al.*, 2022).

A cepa apresentou genes relacionados à adesão ao muco gastrointestinal e tolerância a sais biliares (Morais *et al.*, 2017), além de alta taxa de sobrevivência às condições gástricas e entéricas simuladas *in vitro* (Galdino *et al.*, 2021; Lima Júnior, 2022), o que pode permitir uma colonização intestinal eficiente, concomitante à sua potencial capacidade de modular o sistema imunológico intestinal e inibir bactérias patogênicas. Tais características tornam esta cepa promissora no desenvolvimento de alimentos probióticos (Dantas *et al.*, 2022; Morais *et al.*, 2022).

Em estudo de Galdino *et al.* (2023) a cepa *L. mucosae* CNPC007 apresentou a capacidade de inibir a multiplicação dos microrganismos patogênicos, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* ATCC 14028 e *Escherichia coli* ATCC 25922 em estudos *in vitro*. A mesma cultura láctica presente em uma matriz alimentícia apresentou redução significativa de indicadores de contaminação em queijo de coagulação vegetal (Lima Júnior, 2022).

A viabilidade da cepa *L. mucosae* CNPC 007 ao longo do armazenamento foi descrita em diversos estudos de alimentos, entre eles: queijo de cabra (Morais *et al.*, 2018) e iogurte grego (Morais *et al.*, 2022), ambos acima de 8 log UFC/g por 28 dias; queijo de cabra de

coagulação vegetal, acima de 8 log UFC/g por 60 dias (Lima Júnior, 2022); bebida láctea isenta de lactose com polpa de jambolão (Dantas *et al.*, 2022) e sobremesa láctea não fermentada com casca de jabuticaba (Sousa *et al.*, 2021), ambas acima de 6,5 log UFC/g por 21 dias. A toxicidade *in vivo* deste microrganismo também foi avaliada em leite fermentado caprino, tendo sido demonstrado seguro para uso em roedores (Pereira *et al.*, 2023).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Ativação e condições de cultivo da bactéria láctica nativa

Neste estudo utilizou-se a cultura nativa de bactéria láctica *Limosilactobacillus mucosae* CNPC007 pertencente à coleção de microrganismos da Embrapa, que foi fornecida pela instituição na forma liofilizada. Para a ativação da cepa liofilizada, foram realizados dois repiques consecutivos, de 24 h cada, em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo Man Rogosa e Sharpe (MRS, distribuído pela Kasvi Importação e Distribuição de Produtos de Laboratório, Ltda., São José dos Pinhais, Brasil), mantidos em estufa a 35 ± 2 °C, obtendo, ao final do cultivo, contendo uma população de, aproximadamente, $1,2 \times 10^8$ UFC/ 100 µL. Para a manutenção da viabilidade do microrganismo foram realizados repiques em caldo MRS, em estufa a 35 ± 2 °C durante 24 h, no período máximo de 28 dias.

4.2 Microrganismos indicadores de contaminação

Como representantes de indicadores de contaminação em alimentos foram utilizadas duas cepas de referência, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, além de um isolado clínico de *Escherichia coli* cedido pelo Laboratório de Microbiologia Básica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba. Para a manutenção da viabilidade dos microrganismos indicadores sanitários foram realizados repiques em placas contendo ágar Mueller Hinton (MH, origem Itália, distribuído pela Kasvi Importação e Distribuição de Produtos de Laboratório, Ltda., São José dos Pinhais, Brasil) e mantidas na estufa a 35 ± 2 °C por 24h.

As colônias dos microrganismos patogênicos foram ressuspensas em solução salina 0,85% e a diluição da suspensão foi ajustada para obter uma turbidez equivalente ao padrão McFarland de 0,5 contendo aproximadamente 1×10^8 UFC/mL. Foram realizadas diluições transferindo 100 µL de cada uma das suspensões padronizadas para 9,9 mL (diluição 1:100) de solução salina 0,85% resultando em suspensões de 10^6 UFC/mL (International Organization of Standards, 2019).

4.3 Preparo dos sobrenadantes *Limosilactobacillus mucosae*

Foram utilizados o sobrenadante e o sobrenadante neutralizado, os quais foram obtidos após a centrifugação da cultura do repique de *L. mucosae* CNPC007, conforme descrito na subseção 4.1. Para este fim, as amostras foram centrifugadas 3 vezes por 10 minutos a $11000 \times g$ obtendo-se os sobrenadantes. Para a obtenção do sobrenadante neutralizado utilizou-se hidróxido de sódio a 4 N estéril, a fim de neutralizar o sobrenadante a pH 7.

4.4 Determinação da atividade antimicrobiana da bactéria láctica nativa

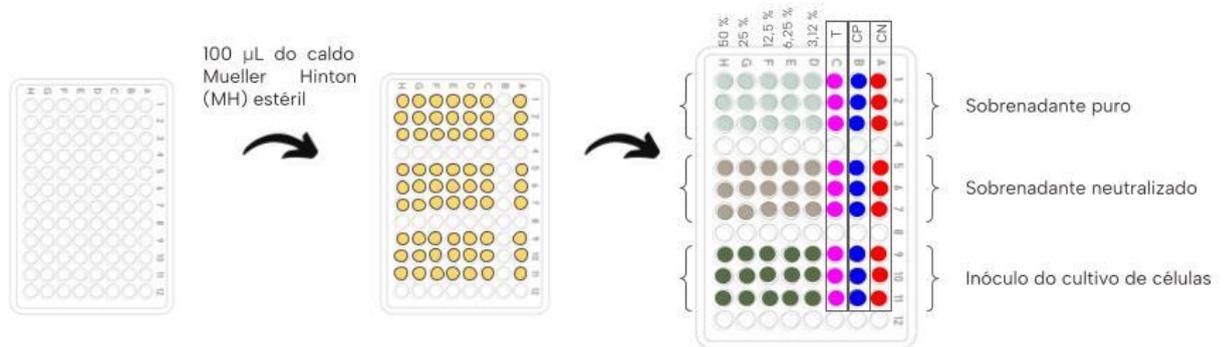
4.4.1 Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas

A atividade antimicrobiana foi verificada através dos testes de microdiluição padronizados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (2012), utilizando uma microplaca estéril para microdiluição de 96 poços de fundo chato (marca Olen, origem China, distribuído pela Kasvi Importação e Distribuição de Produtos de Laboratório, Ltda., São José dos Pinhais, Brasil) Para a realização do teste de sensibilidade dos agentes patogênicos foram utilizados o sobrenadante puro, sobrenadante neutralizado e inóculo com o cultivo de células.

Foram distribuídos 100 μL do caldo Mueller Hinton (MH) estéril nos poços para realização das diluições seriadas, aos quais foram adicionados 100 μL do sobrenadante puro, sobrenadante neutralizado e inóculo do cultivo de células nos primeiros poços de cada série (50%), seguidos de homogeneização e retirada de 100 μL para o segundo poço (25%) e assim sucessivamente para as demais concentrações (12,5%, 6,25% e 3,12%). No que diz respeito ao inóculo com o cultivo de células, as concentrações da bactéria láctica resultantes das diluições foram de, aproximadamente, 6×10^7 , 3×10^7 , $1,5 \times 10^7$, $7,5 \times 10^6$, e $3,7 \times 10^6$ UFC/100 μL , respectivamente. Em seguida, foram adicionados 100 μL da suspensão padronizada dos indicadores de contaminação (como descrito no item 4.2) obtendo-se um volume final de 200 μL em cada poço e uma concentração final dos patógenos de aproximadamente 10^5 UFC/200 μL (International Organization of Standards, 2019).

Como controle positivo de turbidez, empregou-se 100 μL da suspensão padronizada dos indicadores de contaminação adicionados de 100 μL do caldo MH estéril. Como controle negativo, utilizou-se 100 μL do caldo MH estéril como apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Imagem esquematizando o preparo do teste de Concentração Inibitória Mínima



Fonte: Canva® (2023), com adaptações da autora.

Como controle positivo da atividade antimicrobiana, foram utilizados 100 µL da suspensão padronizada dos indicadores de contaminação adicionada de 100 µL de ciprofloxacino (Laborclin, Pinhais, Brasil) a uma concentração de 0,3 µg/100 µL.

As microplacas de microdiluição foram incubadas na estufa a 35 ± 2 °C por 24 h em condições aeróbicas. Foi considerada concentração inibitória mínima (CIM) a menor concentração da substância capaz de inibir visualmente o crescimento da população bacteriana após 24 h de incubação (Fernandes, 2019).

4.4.2 Determinação das Concentrações Bactericidas Mínimas

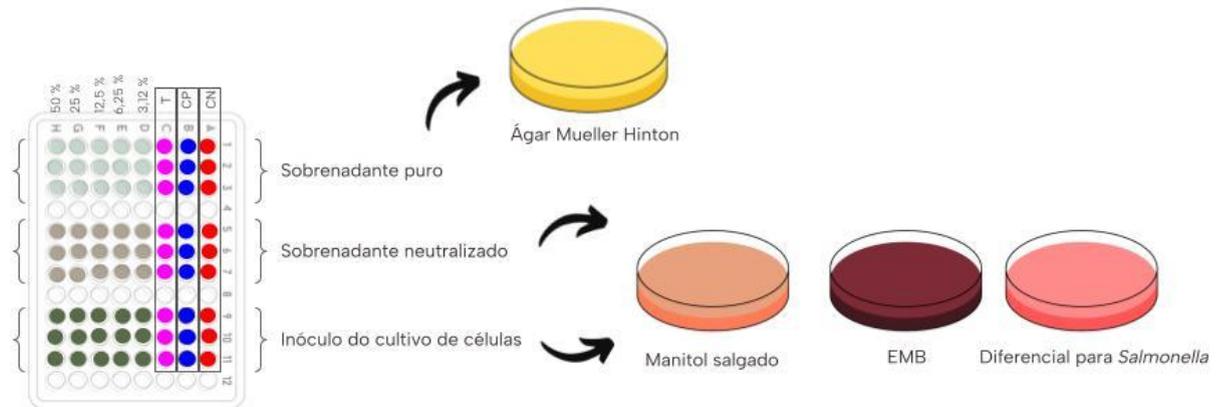
Para determinação da concentração bactericida mínima (CBM) do sobrenadante para cada indicador de contaminação foram retiradas alíquotas de 10 µL de cada um dos poços contendo este sobrenadante nas concentrações de 50% a 6,25% que foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar MH.

Para os testes de CBM usando o sobrenadante neutralizado, as alíquotas de 10 µL de cada um dos poços contendo este sobrenadante neutralizado na concentração de 50% foram inoculadas em meios seletivos para *S. aureus* (ágar Manitol Salgado), *Salmonella* (ágar diferencial para *Salmonella* RajHans) e para *E. coli* (ágar Levine Eosin Methylene Blue EMB).

Já para os testes de CBM usando o inóculo do cultivo de células, as alíquotas de 10 µL de cada um dos poços contendo o inóculo nas concentrações de 6,25% a 50% também foram inoculadas em meios seletivos para *S. aureus* (ágar Manitol Salgado), *Salmonella* (ágar

diferencial para *Salmonella* RajHans) e para *E. coli* (ágar Levine EMB) representado na Figura 2.

Figura 2 - Imagem esquematizando o preparo do teste de Concentração Bactericida Mínima



Fonte: Canva® (2023), com adaptações da autora.

Em todos os testes de CBM, as placas foram incubadas em temperatura de $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 48 h.

4.5 Determinação da acidez titulável do sobrenadante

Para a determinação da acidez titulável do sobrenadante da centrifugação da cultura *L. mucosae* CNPC007 cultivada em MRS, puro, sem neutralizar, foi utilizada uma adaptação da metodologia 426/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008), de modo que os resultados fossem expressos em mg de ácido láctico/100 μL de sobrenadante sem neutralizar não diluído (100%). A acidez titulável das diluições do sobrenadante utilizadas nas placas foi estimada por cálculo a partir das proporções empregadas (50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,12%) considerando o valor de acidez titulável inicialmente obtido para o sobrenadante não diluído (100%).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de acidez titulável, expressos em ácido láctico (mg/100 μ L), obtido para o sobrenadante não diluído (100%) resultante da centrifugação da cultura de *L. mucosae* incubada em caldo MRS por 24 h e das proporções desse sobrenadante diluído utilizadas no estudo (50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,12%) estão apresentados na Tabela 1. Para o sobrenadante não diluído (100%) foi obtido o resultado médio de 0,0185 mg de ácido láctico/100 μ L.

Tabela 1 - Valores de ácido láctico em mg de ácido láctico/100 μ L (média \pm desvio padrão) nas diferentes concentrações de sobrenadante utilizados no estudo

Sobrenadante	Acidez titulável (mg de ácido láctico/100 μ L)
100%	1,85 \pm 0,07
50%	0,923 \pm 0,035
25%	0,462 \pm 0,018
12,5%	0,231 \pm 0,009
6,25%	0,115 \pm 0,004
3,12%	0,0577 \pm 0,0022

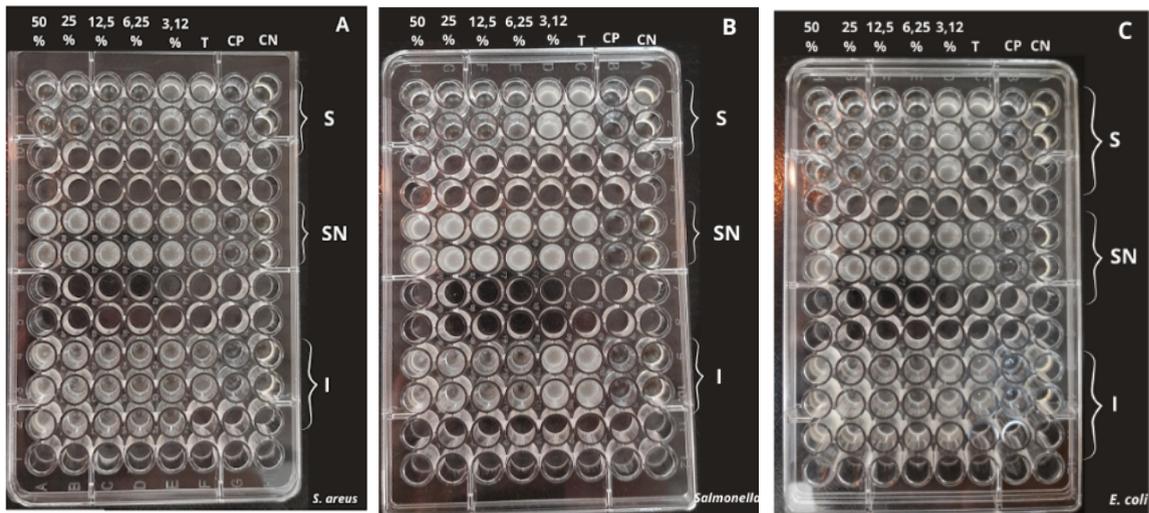
Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

5.1 Teste de sensibilidade antimicrobiana

5.1.1 Determinações das Concentrações Inibitórias Mínimas

De acordo com a definição do Clinical and Laboratory Standards Institute (2012), CIM é a concentração mais baixa de um agente antimicrobiano que impede a multiplicação visível de um microrganismo em um teste de suscetibilidade de diluição em ágar ou caldo. As imagens obtidas para as microplacas incubadas com os microrganismos estão apresentadas na Figura 3.

Figura 3 - Imagens das microplacas após 24 horas de incubação



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Nota: S = Sobrenadante; SN = sobrenadante neutralizado; I = inóculo do cultivo de células; T= controle positivo de turbidez; CP = controle positivo da atividade antimicrobiana e CN = controle negativo.

As imagens mostram a atividade de inibição frente aos indicadores de contaminação em alimentos.

A imagem A mostra a microplaca com diferentes concentrações das amostras determinando o controle de inibição do *S. aureus*. Na imagem B mostra controle de inibição frente a *Salmonella enterica*. Já na imagem C mostra o controle de inibição frente *E. coli*.

Os valores obtidos para a CIM das amostras de sobrenadante, sobrenadante neutralizado e inóculo estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das amostras de sobrenadante, sobrenadante neutralizado e inóculo do cultivo de *L. mucosae* frente aos indicadores de contaminação *S. aureus*, *Salmonella enterica* e *E. coli*

Amostras	CIM (%)		
	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>E. coli</i>
Sobrenadante	12,5	12,5	12,5
Sobrenadante Neutralizado	—	—	—
Inóculo do cultivo de células	Indeterminado	Indeterminado	Indeterminado

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Nota: — atividade inibitória ausente.

No presente estudo, o sobrenadante não neutralizado na concentração de 12,5 % foi capaz de inibir a multiplicação de todos os indicadores sanitários. De acordo com os dados de acidez titulável da Tabela 1, a concentração de ácido láctico presente em 12,5% de sobrenadante não neutralizado foi de 0,231 mg/100 µL. Para o sobrenadante não diluído

(100%) foi obtido o resultado médio de 0,0185 mg de ácido láctico/100 µL. (Tabela 1). Por outro lado, não foi observada inibição dos patógenos pelo sobrenadante neutralizado nas concentrações estudadas (Tabela 2). Este fato e os resultados de acidez titulável da Tabela 1 sugerem que a atividade antimicrobiana de *L. mucosae* está relacionada à produção de ácidos orgânicos (Lima Júnior, 2022), como aqueles gerados pelas bactérias lácticas durante a utilização da glicose presente no caldo MRS.

No presente estudo, não foi possível determinar a CIM do inóculo do cultivo de células, pois a presença das células de *L. mucosae* já presentes no MRS também contribuíram para a turvação do meio contendo os indicadores de contaminação, sendo que a bactéria láctica também consegue se desenvolver no caldo MH. Porém, no estudo de Galdino *et al.* (2023), utilizando a técnica de difusão em ágar, alíquotas de 50 µL de *L. mucosae* CNPC007 foram capazes de resultar em atividade bacteriostática frente aos indicadores de contaminação *S. enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922 devido à formação de halos de inibição. De acordo com o controle interno do grupo de pesquisa, um volume de 50 µL cultivo de *L. mucosae* CNPC007 em caldo MRS, como o usado por Galdino *et al.* (2023) teria, aproximadamente, 6×10^7 UFC (dados não mostrados).

Sobrenadantes do cultivo de outras bactérias lácticas, diferentes de *L. mucosae*, foram capazes de inibir o crescimento populacional de *E. coli*, a exemplo dos sobrenadantes das cepas *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 e *Lacticaseibacillus rhamnosus* 9595 (anteriormente *Lactobacillus rhamnosus* 9595) em ensaio de microdiluição em poços no estudo de Fernandes (2019). No mesmo estudo, os sobrenadantes neutralizados dos cultivos de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 e *Lacticaseibacillus rhamnosus* 9595 não demonstraram efeito inibitório sobre *E. coli*, de modo similar ao observado no presente estudo para *L. mucosae* CNPC007.

Outras metodologias, diferentes da utilizada no presente estudo, também comprovaram o efeito inibitório de culturas de bactérias lácticas frente a indicadores de contaminação. A partir da metodologia de multicamadas realizada por Pereira e Gómez (2007), a cepa probiótica *Lactobacillus acidophilus* LA-5 apresentou resultados positivos de inibição sobre *E. coli* e *S. aureus* obtidos a partir de isolados clínicos. Através do método de sobreposição, realizado por Santos *et al.* (2021), a cepa *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 23271 apresentou atividade bacteriostática frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *E. coli* enteroagregativa e *Salmonella enterica* (ATCC 13076).

5.2.2 Determinação das Concentrações Bactericidas Mínimas

A atividade bactericida foi realizada através do método de determinação CBM (Fernandes, 2019), a qual é definida pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (2012) como a menor concentração capaz de eliminar determinada bactéria após o tempo de incubação realizado. Os valores das CBMs obtidos para o sobrenadante, o sobrenadante neutralizado e o inóculo do cultivo de células de *L. mucosae* CNPC007 em caldo MRS estão apresentados na Tabela 3

Tabela 3 - Resultados da concentração bactericida mínima das amostras de *L. mucosae* frente aos indicadores de contaminação

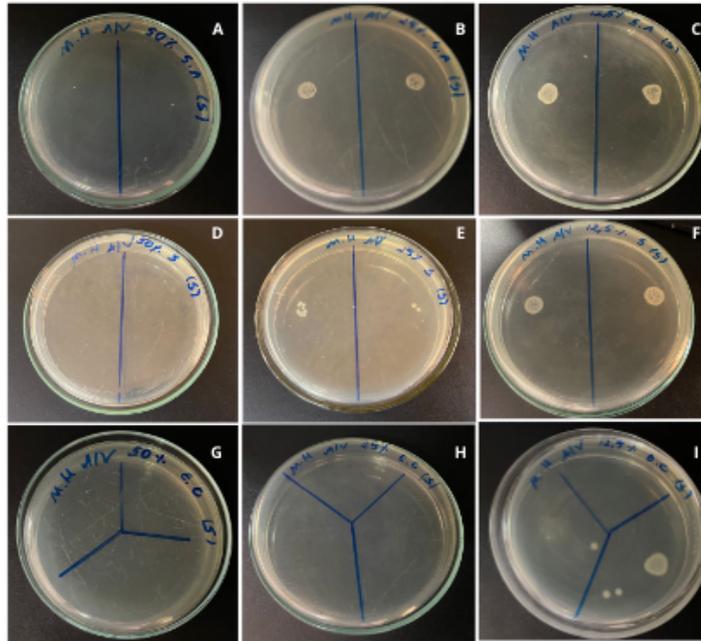
Amostras	CBM (%)		
	<i>S. aureus</i>	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i>
Sobrenadante	-	50	25
Sobrenadante Neutralizado	-	-	-
Inóculo do cultivo de células	-	25	25

Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Nota: - atividade bactericida ausente.

As imagens das placas, após o período de incubação, que foram utilizadas no ensaio de CBM contendo o sobrenadante obtido do cultivo de células de *L. mucosae* CNPC007 estão apresentadas nas Figuras 4A a 4I.

Figura 4 - Imagens das placas do ensaio de CBM utilizando o sobrenadante do cultivo de *L. mucosae* CNPC007 em caldo MRS frente aos indicadores de contaminação



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Nota: A, B e C = concentrações de sobrenadante de *L. mucosae* a 50%, 25% e 12,5%, respectivamente, frente a *S. aureus*.

D, E e F= concentrações de sobrenadante de *L. mucosae* a 50%, 25% e 12,5%, respectivamente, frente a *S. enterica*.

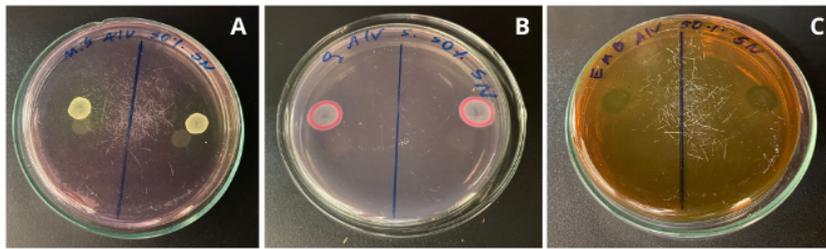
G, H e I = concentrações de sobrenadante de *L. mucosae* a 50%, 25% e 12,5%, respectivamente, frente à *E. coli*.

Como observado na Tabela 3 e Figura 4A, o sobrenadante de *L. mucosae* na concentração de 50% não foi capaz de eliminar toda a população de *S. aureus*, visto que, em uma das duplicatas da concentração de 50% ainda foi possível visualizar o desenvolvimento de uma colônia, que foi confirmada como sendo de *S. aureus* após realizar a coloração de Gram (dados não mostrados). Esse fator pode ser explicado devido ao mecanismos de atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas serem diferentes. Nas bactérias Gram-negativas, o mecanismo de morte bacteriana baseia-se na produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, hidroxiácidos graxos e dióxido de carbono no entanto, em bactérias Gram-positivas, está relacionado com bacteriocinas sensíveis à protease (Falah *et al.*, 2019). Consequentemente, nas concentrações menores desse sobrenadante, maior desenvolvimento de colônias de *S. aureus* foi observado.

Já para *S. enterica* e *E. coli*, foram capazes de atuarem como CBM os sobrenadantes nas concentrações de 50% (Figura 4D) e 25% (Figura 4H), respectivamente, as quais estão indicadas na Tabela 3.

As imagens das placas, após o período de incubação, que foram utilizadas no ensaio de CBM contendo o sobrenadante neutralizado obtido do cultivo de células de *L. mucosae* CNPC007 estão apresentadas nas Figuras 5A a 5C.

Figura 5 - Imagens das placas do ensaio de CBM utilizando o sobrenadante neutralizado do cultivo de *L. mucosae* CNPC007 em caldo MRS frente aos indicadores de contaminação



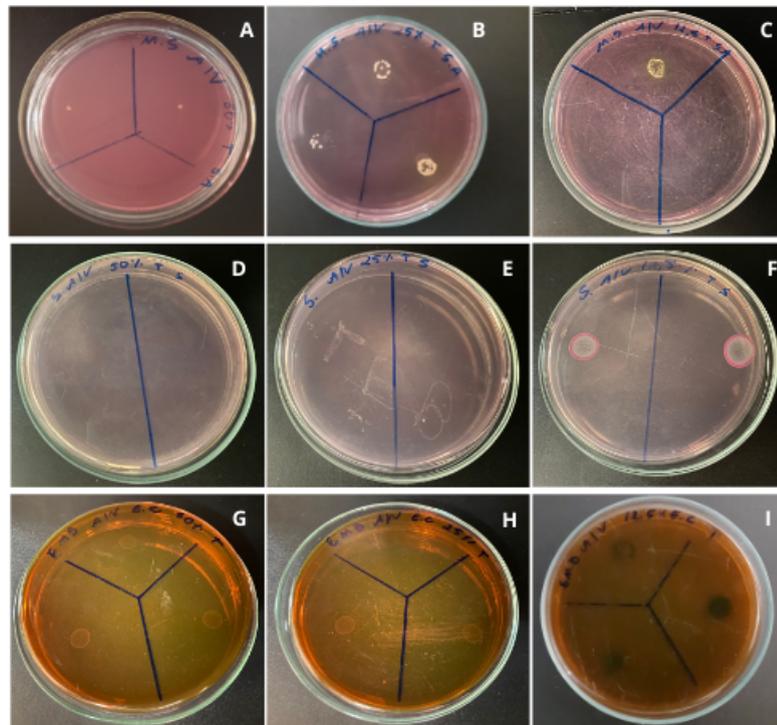
Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Nota: A, B e C = sobrenadante neutralizado na concentração de 50% frente a *S. aureus*, *S. enterica* e *E. coli*, respectivamente.

Conforme observado na Tabela 3 e na Figura 5, o sobrenadante neutralizado não foi capaz de exercer a atividade bactericida frente aos indicadores de contaminação. Estes resultados corroboram com aqueles observados no ensaio CIM realizado nas microplacas, no qual também não foi possível observar efeito inibitório uma vez que houve a turvação naqueles meios, resultado da multiplicação dos microrganismos indicadores estudados no ambiente sem acidez.

As imagens das placas, após o período de incubação, que foram utilizadas no ensaio de CBM contendo o cultivo de células de *L. mucosae* CNPC007 estão apresentadas nas Figuras 6A a 6I.

Figura 6 - Imagens das placas do ensaio de CBM utilizando o inóculo do cultivo células de *L. mucosae* CNPC007 em caldo MRS frente aos indicadores de contaminação



Fonte: Dados da pesquisa, 2023.

Nota: A, B e C = concentrações do inóculo de *L. mucosae* a 50%, 25% e 12,5%, respectivamente, frente a *S. aureus*.

D, E e F = concentrações do inóculo de *L. mucosae* a 50%, 25% e 12,5%, respectivamente, frente a *S. enterica*.

G, H e I = concentrações do inóculo de *L. mucosae* a 50%, 25% e 12,5%, respectivamente, frente a *E. coli*.

Assim como foi observado para o sobrenadante não neutralizado, o inóculo do cultivo de células de *L. mucosae* não foi capaz de eliminar toda a população de *S. aureus* (Tabela 3), havendo também a presença de uma colônia desse indicador em duas replicatas (Figura 6A). Já para *S. enterica* e *E. coli*, o cultivo apresentou uma CBM com o inóculo de 25% que seria equivalente a uma população de *L. mucosae* de 3×10^7 UFC/ 100 μ L, aproximadamente.

Apesar dos resultados mostrarem que não houve completa inibição de *S. aureus* pelas amostras de sobrenadante e inóculo de *L. mucosae* CNPC007, este fato não inviabiliza a utilização desta bactéria láctica como bioconservante para este indicador sanitário, uma vez que, em grande parte dos alimentos, a legislação não exige a ausência deste microrganismo devido à sua baixa virulência quando comparado com outros indicadores de contaminação, a exemplo dos queijos em que *Staphylococcus* coagulase positiva é aceito até 10^3 UFC/g (Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2022).

No que diz respeito à atividade bactericida frente a *S. enterica*, observou-se que a CBM do inóculo do cultivo de *L. mucosae* foi menor (25%) que a de seu sobrenadante (50%), sugerindo que possa haver um sinergismo relativo à união das células viáveis dessa bactéria láctica e seus metabólitos secundários frente àquele patógeno. Outra explicação possível seria o fato das células viáveis de *L. mucosae* continuarem a produzir ácido láctico e/ou outros ácidos orgânicos após sua inoculação no poço da microplaca, no período em que esta permaneceu incubada.

Já para *E. coli*, as CBMs obtidas para o sobrenadante e para o inóculo foram as mesmas (concentração de 25%), mostrando que este microrganismo foi mais sensível ao sobrenadante que *S. enterica*.

No estudo de Lima Júnior (2022) foi observado a possível utilização da cepa *L. mucosae* CNPC007 como bioconservante quando inserido no queijo caprino com coagulação enzimática, uma vez que, houve a redução acentuada do número de coliformes totais que estavam presente no alimento ao longo do período de armazenamento (60 dias) em que foi analisado.

6 CONCLUSÃO

Devido à sua capacidade de acidificar *Limosilactobacillus mucosae* CNPC007 o meio MRS durante o seu período de incubação, esta cultura apresentou características bacteriostáticas e bactericidas frente a *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* e reduziu consideravelmente a população de *Staphylococcus aureus*. Neste estudo, a atividade antimicrobiana de *Limosilactobacillus mucosae* foi atribuída muito provavelmente aos ácidos orgânicos, tendo em vista que a neutralização do sobrenadante de seu cultivo em MRS resultou na incapacidade de inibição dos microrganismos indicadores sanitários.

De modo relativamente próximo ao verificado para o sobrenadante, o inóculo do cultivo em MRS também demonstrou atividade bactericida contra *Salmonella enterica* e *Escherichia coli*, assim como reduziu consideravelmente a população de *Staphylococcus aureus*. Devido à multiplicação de *Limosilactobacillus mucosae* nas microplacas, não foi possível determinar a concentração inibitória mínima do inóculo de seu cultivo frente aos contaminantes, tendo sido considerada esta uma limitação da metodologia.

Diante do exposto, conclui-se que a cepa *Limosilactobacillus mucosae* CNPC007 é promissora para uso como bioconservante para o setor de alimentos, bem como para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas, sendo sugerido estudos para avaliação do potencial desta cultura láctica em substituir o uso de conservantes químicos em diferentes produtos.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos**, versão 2. Brasília, DF: ANVISA, 2021. (Guia n. 21/2021)
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Diretoria Colegiada. Resolução RDC nº 161, de 1 de julho de 2022. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, ano 160, n. 126, p. 235-237, 2022.
- AMELIA, R.; PHILIP, K.; PRATAMA, Y. E.; PURWATI, E. Characterization and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from dadiah sampled in West Sumatra. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 41, suppl. 2, p. 746-752, Dec. 2021.
- BHATTACHARYA, D.; NANDA P. K.; PATEIRO, M.; LORENÇO, J. M.; DHAR, P.; DAS, A. K. Lactic acid bacteria and bacteriocins: novel biotechnological approach for biopreservation of meat and meat products. **Microorganisms**, Basel, v. 10, n. 10, p. 2058, 2022.
- BURITI, F. C. A.; CARDARELLI, H. R.; SAAD, S. M. I. Biopreservation by *Lactobacillus paracasei* in coculture with *Streptococcus thermophilus* in potentially probiotic and synbiotic fresh cream cheeses. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 70, n. 1, p. 228–235, 2007.
- CAMESASCA, L.; MATTOS, J. A.; VILA, E.; CEBREIROS, F.; LAREO, C. Lactic acid production by *Carnobacterium* sp. isolated from a maritime Antarctic lake using eucalyptus enzymatic hydrolysate. **Biotechnology Reports**, [Amsterdam], v. 31, 2021.
- CANVA®. [Sidney]: Canva Inc, 2023. Disponível em: https://www.canva.com/pt_br/. Acesso em: 20 nov. 2023.
- CHIKINDAS, M. L.; WEEKS, R.; DRIDER, D.; CHISTYAKOV, V. A.; DICKS, L. M. Functions and emerging applications of bacteriocins. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 49, p. 23-28, 2018.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; approved standard. 9th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. (Documento CLSI M07-A9).
- DANTAS, D. S.; GOMES, L. S.; GONÇALVES, L. S. C.; CORREIA, J. O.; SILVA, G. M.; QUEIROGA, A. P. R.; SANTOS, K. M. O.; FLORENTINO, E. R.; ALONSO BURITI, F. C. Lactose hydrolysis implications on dairy beverages with autochthonous *Limosilactobacillus mucosae* and *Syzygium cumini* pulp. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 155, p. 112963, 2022.
- FALAH, F.; VASIEE A.; BEHBAHANI, B. A.; YAZDI F. T.; MORADI, S.; MORTAZAVI, S. A.; ROSHANAK, S. Evaluation of adherence and anti-infective properties of probiotic

Lactobacillus fermentum strain 4-17 against *Escherichia coli* causing urinary tract infection in humans. **Microbial Pathogenesis**, London, v. 131, p. 246-253, 2019.

FERNANDES, M. S. M. **Atividade antimicrobiana e antibiofilme do sobrenadante de cepas de *Lactobacillus cell-free* sobre isolados de *Escherichia coli* farmacorresistentes**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2019.

FIELD, D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives, **Current Opinion in Food Science**, Oxford, v. 20, p. 1-6, 2018.

GALDINO, I. K. C. P. O.; OLIVEIRA, M. M.; OLIVEIRA, A. T.; SILVA, G. M.; OLIVEIRA, T. A.; SANTOS, K. M. O.; EGITO, A. S.; ALONSO BURITI, F. C. Fermentative behavior of native lactobacilli in goat milk and their survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 135, p. 109905, 2021.

GALDINO, I. K. C. P. O.; OLIVEIRA, M. M.; SILVA, A. P. A.; SANTOS, V. N.; FEITOSA, R. L. P.; FERREIRA, L. C. N.; DANTAS, G. C.; PEREIRA, E. V. S.; OLIVEIRA, T. A.; SANTOS, K. M. O.; EGITO, A. S.; BURITI, F. C. A.; CARDARELLI, H. R. β -Glucosidase activity and antimicrobial properties of potentially probiotic autochthonous lactic cultures. **PeerJ**, London, v. 11, p. 16094, 2023

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, London, v. 11, p. 506–514, 2014.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed. 1. ed. digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

INTERNATIONAL ORGANIZATION OF STANDARDS. **Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices: part 1: broth micro-dilution reference method for testing the *in vitro* activity of antimicrobial agents rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases**. Genova: ISO, 2019. (ISO 20776-1:2019).

JOHNSON E. M.; JUNG Y. G.; JIN Y. Y.; JAYABALAN R.; YANG S.H.; SUH J.W. Bacteriocins as food preservatives: challenges and emerging horizons. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v. 58, n. 16, p. 2743-2767, 2018.

LIMA JÚNIOR, D. C. **Queijo de cabra com extrato de sementes de *Helianthus annuus* (girassol) e cultura nativa de *Limosilactobacillus mucosae*: avaliação do potencial funcional e sobrevivência da bactéria láctica *in vitro***. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2022.

MARGALHO, L. P.; FELICIANO, M. D.; SILVA, C. E.; ABREU, J. S.; PIRAN, M. V. F.; SANT'ANA, A. S. Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of non-starter lactic acid bacteria in relation to technological, biopreservative and safety properties –

Insights through multivariate analysis. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 9, p. 7908-7926, 2020.

MORAES, G. M. D.; ABREU, L. R.; EGITO, A. S.; SALLES, H. O.; SILVA, L. M. F.; TODOROV, S. D.; SANTOS, K. M. O. Functional properties of *Lactobacillus mucosae* strains isolated from Brazilian goat milk. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, New York, v. 9, p. 235-245, 2017.

MORAES, G. M. D., SANTOS, K. M. O., BARCELOS, S. C., LOPRES, S. A., EGITO, A. S. Potentially probiotic goat cheese produced with autochthonous adjunct culture of *Lactobacillus mucosae*: microbiological, physicochemical and sensory attributes. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 94, p. 57–63, 2018.

MORAIS, J. L.; GARCIA, E. F.; VIERA, V. B.; PONTES, E. D. S.; ARAÚJO, M. G. G.; FIGUEIRÊDO, R. M. F.; MOREIRA, I. S.; EGITO, A. S.; DOS SANTOS, K. M. O.; SOARES, J. K. B.; QUEIROGA, R. C. R. E.; OLIVEIRA, M. E. G. Autochthonous adjunct culture of *Limosilactobacillus mucosae* CNPC007 improved the technofunctional, physicochemical, and sensory properties of goat milk Greek-style yogurt. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 105, n. 3, 2022.

O'CONNOR, P. M.; KUNIYOSHI, T. M.; OLIVEIRA, R. P. S.; HILL, C.; ROSS, R. P.; COTTER, D. P. Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 61, p. 160-167, 2020.

PARADA, J. L.; CARON, C. R.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, vol. 50, n. 3, p. 512–42, 2007.

PEREIRA, Á. M. S.; LIMA, L. C. A. S.; LIMA, L. W. W.; MENEZES, T. M.; VIEIRA, A. M.; FRANCO, E. S.; PAZ, S. T.; MAIA, C. S.; EGITO, A. S.; DOS SANTOS, K. M. O.; ALONSO BURITI, F. C.; MAIA, M. B. S. Safety evaluation of goat milk added with the prebiotic inulin fermented with the potentially probiotic native culture *Limosilactobacillus mucosae* CNPC007 in co-culture with *Streptococcus thermophilus* QGE: analysis of acute and repeated dose oral toxicity. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, New York, vol. 15, n. 3, p. 716-727, 2023.

PEREIRA, V. G.; GOMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, p. 229-239, 2007.

RADAIC, A.; DE JESUS, M. B.; KAPILA, Y. L. Bacterial anti-microbial peptides and nanosized drug delivery systems: The state of the art toward improved bacteriocins. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 321, p. 100-118, 2020

RANADHEERA, C. S.; EVANS, C. A.; ADAMS, M. C.; BAINES, K. S. *In vitro* analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, Amsterdam, v. 49, p. 619-625, 2012.

RAMA, G.R.; KUHN, D.; BEUX, S.; MACIEL, M. J.; SOUZA, C. F. V. Potential

applications of dairy whey for the production of lactic acid bacteria cultures. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 98, p. 25-37, 2019.

SANTOS, K. B. **Bioprospeção de bactérias lácticas isoladas do soro-fermento de queijo porungo com potencial tecnológico**. 2023. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) - Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2023.

SANTOS, C. I.; CAMPOS, C. DL, NUNES NETO, W. R.; CARMO, M. S.; NOGUEIRA, F.; FERREIRA, R. M.; COSTA, E. P. S.; GONZAGA, L. F. ARAÚJO, J. M. M.; MONTEIRO, J. M.; MONTEIRO, C. R. A. V.; PLATNER, F. S.; FIGUEIREDO, I. F. S.; HOLANDA, R. A.; MONTEIRO, S. G.; FERNANDES, E. S.; MONTEIRO, S. G.; FERNANDES, E. S.; MONTEIRO, A. S.; MONTEIRO NETO, V. Genomic analysis of *Limosilactobacillus fermentum* ATCC 23271, a potential probiotic strain with anti-*Candida* activity. **Journal of Fungi**, Basel, v. 7, n. 10, p. 794, 2021.

SAIZ, N. V.; BELGUESMIA, Y.; RASPOET, R.; AUCLAIR, E.; GANCEL, F.; KEMPF, I.; DRIDER, D. Benefits and inputs from lactic acid bacteria and their bacteriocins as alternatives to antibiotic growth promoters during food-animal production. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 10, n. 57, 2019.

SILVA, C. C. G.; SILVA, S. P. M.; RIBEIRO, S. C. Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, p. 1-15, 2018.

SILVA, M. O. M.; SANTOS, K. M. O.; SAAD, S. M. I.; ALONSO BURITI, F. C. Prospective applications of probiotics and prebiotics in foods. *In*: BRANDELLI, A. (ed.). **Probiotics advanced food and health applications**. London: Academic Press, 2022. p. 209-231.

SOUSA, M. C.; SANTOS, W. M.; SILVA, J. M. O.; RAMOS, F. P.; FREITAS, A. S.; NETA, M. C. A.; SANTOS, K. M. O.; ALONSO BURITI, F. C.; FLORENTINO, E. R. Non-fermented dairy desserts with potentially probiotic autochthonous lactobacilli and products from peel of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Probiotics Antimicrobial Proteins**, New York, v. 3, p. 765-775, 2021.

VINDEROLA, G.; CAPELLINI, B.; VILLARREAL, F.; SUARÉZ, V.; QUIBERONI, A.; REINHEIMER, J. Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 41, p. 1678-1688, 2008.

