



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA**

ANA PAULA ALBUQUERQUE DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Lactiplantibacillus plantarum*
CNPC001 FRENTE A IMPORTANTES INDICADORES SANITÁRIOS DE
CONTAMINAÇÃO ALIMENTAR**

**CAMPINA GRANDE
2023**

ANA PAULA ALBUQUERQUE DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Lactiplantibacillus plantarum*
CNPC001 FRENTE A IMPORTANTES INDICADORES SANITÁRIOS DE
CONTAMINAÇÃO ALIMENTAR**

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: Bromatologia.

Orientador:

Dr. Giordanni Cabral Dantas

Coorientadora:

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.

S586a Silva, Ana Paula Albuquerque da.
Avaliação da atividade antibacteriana de *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC001 frente a importantes indicadores sanitários de contaminação alimentar [manuscrito] / Ana Paula Albuquerque da Silva. - 2023.
40 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2023.

"Orientação : Prof. Dr. Giordanni Cabral Dantas, Departamento de Farmácia - CCBS. "

"Coorientação: Prof. Dr. Flávia Carolina Alonso Buriti , Departamento de Farmácia - CCBS."

1. Bioconservante. 2. Ácido lático. 3. Bactéria nativa. 4. Probiótico. I. Título

21. ed. CDD 615

ANA PAULA ALBUQUERQUE DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Lactiplantibacillus plantarum*
CNPC001 FRENTE A IMPORTANTES INDICADORES SANITÁRIOS DE
CONTAMINAÇÃO ALIMENTAR**

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

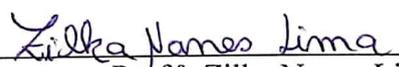
Área de concentração: Bromatologia.

Aprovada em: 22 / 11 / 2023.

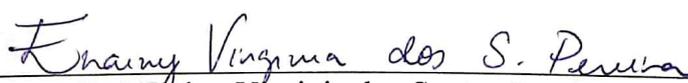
BANCA EXAMINADORA



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



Prof.ª Zilka Nanes Lima
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Dr.ª Elaine Virginia dos Santos Pereira
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

À minha mãe, pelo amor, educação,
companheirismo e esperança, DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre estar comigo me guiando e concedendo oportunidades de crescimento pessoal e espiritual.

À minha mãe, que sempre me incentivou a alcançar o inimaginável. Com suas palavras sábias me acalmava e direcionava-me pelos caminhos de bondade, empatia e compaixão, mostrando-me com maestria o que é conviver em sociedade.

A meus irmãos, minha tia, meu primo, minhas cunhadas e sobrinhas pelo incentivo e apoio.

À Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) por oferecer estrutura, profissionais e técnicos capacitados, projetos de extensão e de pesquisa, e bolsa auxílio, colaborando para minha permanência no curso e formação profissional.

À minha amiga, Vanda, pelo companheirismo e troca de conhecimentos durante a graduação.

Aos meus colegas de estágio, Alana, Arlindo, Arthur e Chirlane. Os dias de estágio tornaram-se mais leves com vocês.

Ao meu grupo de trabalhos, Alana, Lisley e Vanda.

A Ronald, secretário do Departamento de Farmácia, por sua dedicação, competência e educação nas orientações e resoluções de problemas.

Ao Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos (NUPEA), em especial ao Dr. Giordanni, meu orientador, pela disponibilidade e compartilhamento de conhecimentos, e à Professora Flávia, minha coorientadora, por ter me recebido de braços abertos, transmitindo aprendizados que contribuíram para a minha carreira de pesquisadora. Aos estagiários do NUPEA, Thaís e Leonardo, pelo auxílio durante as análises realizadas no presente trabalho.

À Dr^a. Elaine, por ter contribuído para o meu amadurecimento na ciência, despertando pensamento crítico de pesquisadora.

A Professora Zilka por ter colaborado com parte dos materiais utilizados no estudo, pelas orientações e conhecimentos transferidos que foram de suma importância para a realização desta pesquisa.

À professora Auxiliadora pela dedicação e responsabilidade na supervisão do estágio no décimo período. Sua procura por um local que possibilitasse maior aprendizado e experiência para o aluno me geraram grandes memórias.

Aos demais professores do Curso de Farmácia pelos ensinamentos e experiências transmitidas.

Aos técnicos do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Estadual da Paraíba, em especial George, Danilo e Niedja, pela paciência ao facilitar o aprendizado, didática e acolhimento.

Ao Laboratório de Microbiologia Básica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba, Campus I, e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária por também terem colaborado com parte dos materiais usados neste estudo. Ao Parque Tecnológico da Paraíba (PaqTcPB) e agências de fomento pelo apoio financeiro ao NUPEA, que foi de importância para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho e para a minha formação.

RESUMO

As bactérias lácticas exercem efeito bioconservante em alimentos pela produção de metabólitos como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. Produtos com conservantes naturais tornam-se mais atrativos e seguros quando comparados a conservantes químicos, contribuindo para a segurança e aumento da vida útil do alimento. Bactérias lácticas probióticas exercem importante atividade antagônica a patógenos e atuam contra estes no âmbito intestinal. Este estudo avaliou a atividade antibacteriana de *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC001 contra duas cepas de referência (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028) e um isolado clínico (*Escherichia coli*), representantes de importantes indicadores de contaminação em alimentos. Após cultivo em MRS (24 h), a cepa *L. plantarum* CNPC001 foi centrifugada ($11000 \times g$, 10 min) três vezes para obtenção dos sobrenadantes, sendo um neutralizado a pH 7,85 (SN) por adição de NaOH 4 N estéril e o outro permanecendo com pH inalterado (SI). A atividade antibacteriana do cultivo de *L. plantarum* CNPC001 (CC) também foi testada. Nas microplacas foram distribuídos 100 μ L de caldo Mueller-Hinton (MH), em seguida, adicionado diferentes concentrações (50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%) das amostras (SI, SN, CC) finalizando com adição de 100 μ L do patógeno (10^6 UFC/mL) em todos os poços. Usou-se como controle de turbidez o caldo MH com o patógeno, como controle negativo caldo MH e como controle positivo ciprofloxacino a 1 μ g/mL. Após incubação (20 h, 35 ± 2 °C), alíquotas (10 μ L) dos poços não turvos foram semeadas em ágar MH e ágar específico, confirmando a morfologia com coloração de Gram após incubação. A concentração inibitória mínima (CIM) do SI obtida para os três patógenos foi de 12,5%. Houve turvação em todos os poços com SN e com CC, não sendo possível determinar a CIM dessas amostras. Observou-se igualdade nos resultados da concentração bactericida mínima (CBM) entre SI e CC para os seus respectivos patógenos, contudo houve diferença na CBM com *E. coli* (12,5%) e demais patógenos (25%). Os indicadores de contaminação em alimentos não foram suscetíveis a 50% do sobrenadante neutralizado (SN). Portanto, evidenciou-se neste estudo que o SI e o CC de *L. plantarum* CNPC001 apresentaram atividade bacteriostática e bactericida contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa de interesse alimentar e clínico, possivelmente, por meio da produção de ácidos orgânicos.

Palavras-Chave: bioconservante; ácido láctico; bactéria nativa; probiótico.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria exert their biopreservative effects in foods through the production of metabolites such as organic acids, hydrogen peroxide and bacteriocins. Products with natural preservatives become more attractive and safer when compared to chemical preservatives, contributing to safety and increasing the shelf life of the food. Probiotic lactic acid bacteria develop important antagonistic activity on pathogens and act against them in the intestinal environment. This study aimed to evaluate the antibacterial activity of *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC001 against two reference strains (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028) and one from a clinical isolate (*Escherichia coli*), representatives of the main microorganisms that indicate contamination in food. After 24 h of cultivation in MRS, the *L. plantarum* CNPC001 strain was centrifuged ($11000 \times g$, 10 min) three times to obtain the supernatants. One of the supernatants was neutralized to pH 7.85 (SN) by addition of sterile 4N NaOH and the other supernatant remained at unchanged pH (SI). The antibacterial activity of *L. plantarum* CNPC001 cultivation was also tested (CC). Aliquots of 100 μ L of Mueller-Hinton broth (MH) were distributed in the microplates, then different concentrations (50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%) of the samples (SI, SN, CC) finishing with the addition of 100 μ L of the pathogen (1×10^6 CFU/mL) in all wells. The MH broth with the pathogen was used as a turbidity control, the MH broth was used as a negative control and ciprofloxacin at 1 μ g/mL was used as a positive control. After incubation for 20 h at 35 ± 2 °C, aliquots (10 μ L) were removed from the non-turbid wells to be sown on MH agar and specific agar, confirming the morphology with Gram staining after incubation. The SI MIC obtained for the three pathogens was 12.5%. All wells with SN and CC were cloudy, making it impossible to identify the MIC of these samples. There was equality in the CBM results between SI and CC for their respective pathogens, however there was a difference in the CBM with *E. coli* (12.5%) and other pathogens (25%). Contamination indicators in food were not susceptible to 50% neutralized supernatant (SN). Therefore, this study showed that the SI and CC of *L. plantarum* CNPC001 presented bacteriostatic and bactericidal activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria of food and clinical interest, possibly through the production of organic acids.

Keywords: biopreservative; lactic acid; indigenous bacteria; probiotic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do sobrenadante centrifugado de pH inalterado (SI), do sobrenadante centrifugado de pH neutralizado (SN) e do cultivo de células (CC).....	23
Figura 2 – Avaliação da concentração bactericida mínima (CBM) do sobrenadante centrifugado de pH inalterado (SI) em ágar Mueller-Hinton de diferentes patógenos.....	24
Figura 3 – Fotomicrografia de Gram das bactérias crescidas em ágar MH com SI 12,5%.....	25
Figura 4 – Suscetibilidade de <i>S. enterica</i> ATCC 14028, <i>S. aureus</i> ATCC 25923 e <i>E.coli</i> a 50% do sobrenadante centrifugado de pH neutralizado (SN)	26
Figura 5 – Suscetibilidade de <i>S. enterica</i> ATCC 14028, <i>S. aureus</i> ATCC 25923 e <i>E.coli</i> a diferentes concentrações do cultivo de células de <i>L. plantarum</i> CNPC001.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Percentual (%) da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos sobrenadantes centrifugados obtidos de <i>L. plantarum</i> CNPC001 e do cultivo de células de <i>L. plantarum</i> CNPC001.....	28
Tabela 2 –	Valores de ácido láctico em mg/100 µL (média ± desvio padrão) nas diferentes concentrações de sobrenadante utilizados no presente estudo.....	28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivo geral	13
2.2	Objetivos específicos	13
3	REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1	Bactérias láticas (BALs)	14
3.1.1	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> CNPC001.....	15
3.2	Bioconservantes	15
3.3	Principais microrganismos indicadores de contaminação em alimentos	17
4	METODOLOGIA	19
4.1	Local da Pesquisa	19
4.2	Condições de ativação e cultivo da bactéria lática	19
4.3	Condições de cultivo e manutenção dos microrganismos indicadores de contaminação	19
4.4	Padronização dos inóculos	20
4.5	Preparo do sobrenadante centrifugado	20
4.6	Determinação da atividade antibacteriana da bactéria lática	20
4.7	Determinação da acidez titulável expressa em ácido lático	22
4.8	Morfologia das bactérias e identificação por meio da coloração de gram	22
5	RESULTADOS	23
5.1	Determinação da capacidade antibacteriana da bactéria lática	23
5.2	Determinação da acidez titulável expressa em ácido lático	28
6	DISCUSSÃO	29
6.1	Determinação da atividade antibacteriana da bactéria lática	29
6.2	Determinação da acidez titulável expressa em ácido lático	30
7	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

Segundo as Nações Unidas, a estimativa populacional mundial para 2030 é de 8,5 bilhões e de 9,7 bilhões em 2050 (United Nations, 2022). Diante disso, há uma elevada necessidade de aumento da produção de alimentos que atenda a esse número populacional. Porém, essa elevada demanda por produção alimentícia pode intensificar as condições inadequadas de transporte e de manuseio, associado à falta de higiene e saneamento básico favorecendo à disseminação de patógenos (Brasil, 2011). Dentre os principais agentes bacterianos indicadores de contaminação alimentar estão: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* (Bispo *et al.*, 2022; Gallo *et al.*, 2020). Alimentos contendo esses microrganismos são um risco potencial ao consumidor tanto pela presença do patógeno como das toxinas (Nascimento *et al.*, 2023).

Assim, produtos com conservantes naturais tornam-se mais atrativos e seguros quando comparados a conservantes químicos que podem acarretar algum dano ao consumidor e ao produtor (Moreira, 2005; Vincenzi; Mendes; Mota, 2021). Neste contexto, bioconservantes são microrganismos ou substâncias produzidas por eles, capazes de inibirem a multiplicação microbiana além de possuírem crescimento populacional competitivo, logo, possibilitando prolongamento do tempo de armazenamento com maior segurança (Stilles, 1996).

Dessa forma, existe um relevante interesse no desenvolvimento de alimentos contendo bactérias lácticas (BAL) como bioconservantes, principalmente as que possuem potencial probiótico (Echegaray *et al.*, 2023). Essas bactérias inibem a multiplicação de microrganismos deteriorantes e patogênicos em razão da produção e atividade de substâncias como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e/ou outros metabólitos (Buriti; Cardarelli; Saad, 2007; Rolim *et al.*, 2015).

Além disso, a descoberta de novas bactérias lácticas com ação antimicrobiana poderá fortalecer o ramo de isolamento dos microrganismos e seus metabólitos, possibilitando o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (Beleza, 2022; Carvalho *et al.*, 2023; Miranda *et al.*, 2021; Ribeiro, 2019; Silva, 2023; Spacova *et al.*, 2023), com alternativas para antibióticos ou sinergismo entre eles (Acharjee *et al.*, 2022; Hanchi *et al.*, 2017; Soltani, S. *et al.*, 2022). As bactérias lácticas com ação antimicrobiana em alimentos também podem beneficiar o consumidor, indústria alimentícia, pequenos e médios produtores pela atividade inibitória frente a patógenos, com potencial surgimento de inovações tecnológicas nesse ramo (Ribeiro *et al.*, 2020; Shafique *et al.*, 2022; Silva, 2021; Sulthana; Archer, 2021).

Atualmente, há vários estudos *in vitro* que comprovam a atividade antimicrobiana de diversas espécies de bactérias lácticas da família *Lactobacillaceae*, por exemplo, cepas de *Lactiplantibacillus plantarum*. Dentre os patógenos inibidos estão: *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente isolada de pacientes (Jamalifar *et al.*, 2011), *E. coli* isolada do trato urinário de pacientes (Soltani, N. *et al.*, 2022), *Streptococcus pyogenes* com redução da produção de hemolisina (Rather *et al.*, 2022), bem como bactérias patogênicas isoladas de alimentos, as quais tiveram inibição potencializada pelo sinergismo entre probióticos e antibióticos (Acharjee *et al.*, 2022). Além disso, bactérias lácticas também exerceram efeito antibiofilme formado por *E.coli* (Soltani, N. *et al.*, 2022) e por *S. pyogenes* (Rather *et al.*, 2022). Houve também a comprovação de atividade antibacteriana *in vitro* de *L. plantarum* CNPC001 contra *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028 (Galdino *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2022).

Portanto, diante do exposto sobre ação *in vitro* de algumas espécies de bactérias lácticas e a necessidade de conhecimento da ação bactericida de cepas pertencentes à família *Lactobacillaceae*, este trabalho teve como objetivo investigar a atividade antibacteriana da cultura nativa potencialmente probiótica *L. plantarum* CNPC001 contra microrganismos indicadores de contaminação em alimentos (cepas de referência de *S. aureus* ATCC 25923 e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028, além de um isolado clínico de *E. coli*).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana de *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC001, cepa nativa potencialmente probiótica pertencente a coleção da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, contra duas cepas de referência (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028) e um isolado clínico de *Escherichia coli*, representantes de importantes microrganismos indicadores de contaminação em alimentos.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- a) determinar as concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) do cultivo bacteriano de *L. plantarum* CNPC001, assim como do seu sobrenadante centrifugado com pH neutralizado e não neutralizado;
- b) determinar a acidez titulável presente nos sobrenadantes centrifugados.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Bactérias láticas (BALs)

As bactérias láticas são bastonetes ou cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, catalase-negativos e não formadores de endósporos. Abrange vários gêneros (ex: *Lactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* e *Enterococcus*), sendo a maioria mesófilas, com poucas cepas termófilas, e conseguem se multiplicar em pHs baixos, num intervalo de temperatura de 5 a 45 °C. As bactérias láticas podem ser encontradas em diversos habitats: microbiota intestinal do ser humano, animais, incluindo aves e insetos, produtos alimentícios, vegetais, vinhos, leite e carnes. Seu agrupamento em “láticas” é baseado em características bioquímicas (são chamadas assim por produzirem ácido láctico a partir de açúcares), e não taxonômicas, por isso não abrangem um único grupo monofilético de bactérias, integrando bactérias benéficas e maléficas (Echegaray *et al.*, 2023; Forsythe, 2013).

Conforme o produto final da fermentação, as bactérias láticas são divididas em dois grupos: homofermentativas e heterofermentativas. Para cada carboidrato fermentado pelas bactérias pertencentes ao grupo homofermentativas, são geradas moléculas de ácido láctico como único ou principal produto final, enquanto que as bactérias pertencentes ao grupo heterofermentativas produzem diversos produtos finais que incluem ácido láctico, etanol, ácido acético e dióxido de carbono (Florou-Paneri; Christaki; Bonos, 2013).

A atividade proteolítica dessas bactérias é de suma importância no ramo de lácteos fermentados, pois é necessária para a multiplicação das bactérias em leite e a degradação de suas proteínas (a caseína). Além disso, o metabolismo das proteínas e dos aminoácidos fazem parte da maturação de queijos, desenvolvimento de sabor e aroma característicos. Também produzem diacetil, que é um composto fornecedor de aroma característico da manteiga e determinados iogurtes (Forsythe, 2013).

Dentre os metabólitos produzidos pelas bactérias láticas estão moléculas que podem atuar na inibição de patógenos, a exemplo de ácidos orgânicos (ex: ácido láctico, acético, benzóico), peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (Forsythe, 2013; Stilles, 1996).

As BALs com propriedades probióticas, quando ingeridas em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro (Florou-Paneri; Christaki; Bonos, 2013; Hill, *et al.*, 2014). Para serem consideradas como probióticas, necessitam comprovação de vários requisitos dentre eles estão: comprovação de segurança, sobrevivência as condições do trato

gastrointestinal, permanecendo viáveis, capazes de se proliferarem e colonizar o intestino, dessa forma garantindo a transferência dos efeitos benéficos ao hospedeiro (Brasil, 2021).

Devido aos seus benefícios à saúde, são escolhidas para uso numa grande variedade de produtos lácteos, a exemplo de sobremesas, leites fermentados e queijos (Almeida Neta *et al.*, 2018; Galdino *et al.*, 2021; Lima Júnior, 2022), vegetais fermentados (Pereira, 2021), produtos cárneos fermentados (Fraqueza, 2015), pão fermentado (Costa, 2022), entre outros. De acordo com as informações apresentadas, bactérias lácticas probióticas que apresentam atividade conservante poderiam permitir a obtenção de duplo benefício, ao produto e ao consumidor.

3.1.1 *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC001

Lactiplantibacillus plantarum CNPC001, isolada de produtos lácteos caprinos coletados na região Nordeste do Brasil, faz parte da “Coleção de Microrganismos de Interesse para a Indústria de Alimentos”, pertencente à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (Lopes Neto *et al.*, 2022; Moraes *et al.*, 2017). A espécie *Lactiplantibacillus plantarum* é representada por bastonetes Gram-positivos, não formadores de endósporos e imóveis (Zheng *et al.*, 2020).

Dentre as atividades exercidas pela cepa *L. plantarum* CNPC001 em matriz láctea já elucidadas estão: atividade proteolítica, capacidade acidificante, capacidade de coagular o leite e produção de diacetil (Moraes *et al.*, 2017), ótima viabilidade, próxima ou acima de 8 log UFC/g, em leite fermentado em co-cultura com *Streptococcus thermophilus* (Galdino *et al.*, 2021) e em soros de leite caprino ou bovino fermentados (Lopes Neto *et al.*, 2022). Além disso foi capaz de inibir *in vitro* patógenos como *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 (Galdino *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2022) e inibir em matriz alimentar microrganismos contaminantes, como coliformes e *S. aureus* (Silva; Alonso Buriti, 2023).

3.2 Bioconservantes

A bioconservação é um método natural utilizado para o prolongamento seguro do tempo de armazenamento. Bioconservantes são definidos como microrganismos ou substâncias por eles produzidas, capazes de inibirem a multiplicação microbiana além de possuírem crescimento populacional competitivo na presença de microrganismos indesejados

(Stilles, 1996).

As bactérias lácticas com esse potencial tornam-se população dominante após um tempo ao serem adicionadas em diferentes alimentos (leite, vegetais salgados, cereais, carnes, peixes, sucos de frutas). Isso ocorre devido à produção de metabólitos no meio capazes de inibir a multiplicação de outros microrganismos, tornando o local inapropriado a sobrevivência e multiplicação desses microrganismos. As bactérias bioconservantes promovem alterações sensoriais benéficas ao produto, a exemplo da textura e do sabor (Muthuvelu *et al.*, 2023; Pereira, 2021; Stilles, 1996).

A procura do consumidor por alimentos minimamente processados e com menos aditivos químicos pode criar um novo nicho de mercado, favorecendo a elaboração de produtos com bioconservantes em substituição aos aditivos químicos. Enfatiza-se que métodos tradicionais de conservação (secagem, salga, defumação) e os métodos de conservação desenvolvidos após a revolução industrial (enlatamento, embalagem, aditivos químicos) com necessidade de conservar os alimentos produzidos em grande escala, podem causar a perda de nutrientes, do sabor natural e, em certos casos, apresentar risco à saúde do consumidor (Muthuvelu *et al.*, 2023; Stilles, 1996).

Os mecanismos de ação dos metabólitos produzidos pelas BALs são variados. Os ácidos orgânicos fracos, por exemplo, inibem a multiplicação de células bacteriana e fúngica devido à presença das moléculas do ácido não dissociadas. Em solução, esses ácidos são pH dependentes, pois em valores baixos de pHs apresentam uma atividade ótima de inibição por estarem em maior concentração na forma não dissociada, que é permeável à membrana plasmática. Uma vez dentro da célula, devido à neutralidade do citoplasma, esse ácido dissocia-se havendo acúmulo de ânions e cátions. Em fungos, a inibição pode ocorrer devido o gasto de energia na restauração da homeostase celular gerada pelo estresse (Forsythe, 2013).

O peróxido de hidrogênio produzido por bactérias lácticas pode causar oxidação da membrana bacteriana, além de ativar o sistema de lactoperoxidase no leite fresco, causando a formação de íons de hipotiocianato, composto antimicrobiano (Forsythe, 2013; Freitas, 2013).

As bacteriocinas, de acordo com Forsythe (2013) e Machado (2023) podem ser divididas em duas classes:

- a) bacteriocinas de classe I (lantibióticos), que são pequenos peptídeos de 19 a 38 aminoácidos de comprimento, com massa molar inferior a 5 kDa, produzidas como peptídeos precursores, e sofrem modificações pós-tradução;
- b) bacteriocinas classe II, compostas por peptídeos estáveis de massa molar inferior a 10 kDa, que não sofrem modificações pós-tradução.

As bacteriocinas possuem como principal local de ação a membrana celular bacteriana (Machado, 2023) e sua associação com outro método (ex.: campo elétrico pulsado, embalagem com atmosfera modificada) torna-se mais eficaz contra os microrganismos (Muthuvelu *et al.*, 2023).

As bacteriocinas de classe I (amplo espectro), em sua maioria, formam poros na membrana citoplasmática; contudo a condutividade e a estabilidade dos poros podem ser aumentadas quando algumas moléculas de ancoragem presentes na membrana-alvo funcionam como receptores. A nisina além de apresentar o mecanismo de atuação anterior, ainda pode inibir a germinação de endósporos, a síntese da parede celular e a atividade de enzimas autolíticas. Já as bacteriocinas de Classe II (espectro restrito) inibem o transporte de aminoácidos e conduzem a despolarização por dissipação da força próton motora por meio de sua inserção na membrana plasmática (Machado, 2023)

As bacteriocinas possuem outros mecanismos de ação contra o microrganismo-alvo já elucidados são clivagem do DNA ou RNA e digestão dos precursores de peptidoglicano (Radaic *et al.*, 2020). Elas podem ser usadas na conservação de alimentos como leite e produtos lácteos, carnes, aves, produtos do mar e produtos de origem vegetal. Não alteram a qualidade nutricional e sensorial do alimento, apresentam ação bactericida ou bacteriostática, podendo ser uma alternativa natural à resistência microbiana a antibióticos, além de apresentarem atividades de regulação da microbiota intestinal, e uso potencial na criação de animais, promovendo o seu crescimento saudável e redução das infecções (Machado, 2023; O'Connor *et al.*, 2020; Vieco-Saiz *et al.*, 2019).

Há muito tempo se fala sobre a conservação dos alimentos utilizando microrganismos e seus metabólitos, porém, na atualidade, há um maior conhecimento fisiológico e genético dos microrganismos candidatos à conservação mostrando maior repertório, funcionalidades e caracterização. A exemplo de microencapsulação e imobilização de bacteriocinas melhorando sua vida útil e estabilidade possibilitando prolongamento do tempo de armazenamento dos alimentos, além da preservação da qualidade natural com novas estratégias tecnológicas (Muthuvelu *et al.*, 2023).

3.3 Principais microrganismos indicadores de contaminação em alimentos

Os alimentos por serem ricos em nutrientes, são potenciais carreadores de microrganismos patogênicos, que são uma ameaça à saúde pública. Sua contaminação pode ocorrer em qualquer parte da linha de produção, transporte e preparo dos alimentos pelo

indivíduo. Além disso, o aumento do número de refeições realizadas fora de casa ou o consumo de refeições prontas requerem cumprimento de regras de higiene tanto para consumo imediato quanto aos prazos de validade (Gallo *et al.*, 2020).

As doenças veiculadas por alimentos podem ser causadas por bactérias, fungos, parasitas, vírus, dentre outros germes. A contaminação pode levar à intoxicação alimentar do indivíduo (quando são ingeridas toxinas produzidas pelos microrganismos no alimento), infecção alimentar (ingestão de microrganismo patogênico presente no alimento), e toxinfecção (ingestão do patógeno com suas substâncias tóxicas) (Bispo *et al.*, 2022). Porém para gerar danos ao consumidor é necessário conter no alimento a carga microbiana e toxigênica mínima necessária para causar sintomas, um outro fator contribuinte são as condições do sistema imunológico do hospedeiro (Gallo *et al.*, 2020).

De acordo com dados preliminares obtidos do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), a maioria dos surtos de doenças veiculadas por alimentos no Brasil foi causada por *Escherichia coli* (32,3%), seguida de *Salmonella* spp. (10,9%) e *Staphylococcus* spp. (10,8%) entre 2013 e 2022 (Brasil, 2023).

As bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. pertencem à família *Enterobacteriaceae*. São bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, que se multiplicam de 7 a 48 °C, com temperatura ótima em, aproximadamente, 36 °C, em valores de pH entre 4,5 e 9,3 (Bispo *et al.*, 2022; Noronha *et al.*, 2019).

Até a presente data, apenas duas espécies diferentes compõem o gênero *Salmonella*, *S. bongori* e *S. entérica*, englobando diversos sorotipos, porém havendo vários ainda sem classificação em nível de espécie (U. S. National Library of Medicine, 2023). A maioria destes sorotipos são patogênicos para o ser humano (Bispo *et al.*, 2022).

A espécie *E. coli* é um indicador de contaminação fecal nos alimentos, pois possui como habitat normal o intestino humano e de outros mamíferos, fazendo parte do grupo de coliformes. Algumas cepas são patogênicas podendo causar graves problemas à saúde, a exemplo de *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC) e *E. coli* enterohemorrágicas (EHEC) (Bispo *et al.*, 2022; Noronha *et al.*, 2019).

Staphylococcus aureus são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, encontrados em vários locais e pertencem à família *Micrococcaceae*. Suas toxinas são hidrossolúveis e termorresistentes, permanecendo ativas mesmo após a pasteurização. Os intervalos de temperatura e pH para multiplicação são os mesmos que os descritos anteriormente para *Salmonella* spp. e *E. coli* (Bispo *et al.*, 2022).

4 METODOLOGIA

4.1 Local da Pesquisa

Os experimentos foram realizados no Núcleo de Pesquisa e Extensão em Alimentos (NUPEA) do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual da Paraíba, Campus I.

4.2 Condições de ativação e cultivo da bactéria láctica

Lactiplantibacillus plantarum CNPC001 foi disponibilizada pela EMBRAPA na forma liofilizada, tendo sido necessária a realização de sua primeira ativação, cultivando em 5 mL de caldo de Man Rogosa e Sharpe (MRS) a 35 ± 2 °C por 24 h. Logo após, foi realizada a segunda ativação fazendo um novo cultivo transferindo 100 µL da primeira ativação para tubos de vidro contendo 5 ml de caldo MRS, posteriormente incubados em estufa bacteriológica a 35 ± 2 °C por 24 h. Desse modo, a bactéria estava apta a ser usada nos ensaios seguintes.

Com intuito de manter a bactéria láctica viável durante todo o experimento, foram realizados repiques a cada 20 dias, transferindo-se 100 µL do conteúdo do tubo de ensaio (MRS + bactéria láctica ativa) para outro tubo contendo 5 mL de caldo MRS, com as mesmas condições de cultivo. Em seguida, o repique foi armazenado em refrigerador a 4 ± 2 °C para conservação.

4.3 Condições de cultivo e manutenção dos microrganismos indicadores de contaminação

Para estabelecer a atividade antibacteriana da cepa nativa, foram utilizadas duas cepas de referência – *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028 – e um isolado clínico – *Escherichia coli* –, cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Básica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba, Campus I. Essas cepas foram repicadas em ágar Mueller-Hinton (MH), posteriormente incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h e armazenadas sob refrigeração 4 ± 2 °C para conservação. A cada 20 dias fez-se um novo repique semeando em ágar MH, mantendo as mesmas condições de cultivo e armazenamento. Para a garantia da pureza dos microrganismos ao longo dos repiques, as colônias características de *S. aureus*, *Salmonella* spp. e *E. coli* foram avaliadas nos meios seletivos específicos ágar manitol

salgado, ágar diferencial RajHans, e ágar Levine eosina azul de metileno (EMB), respectivamente.

4.4 Padronização dos inóculos

Preparou-se suspensões dos patógenos em solução salina a 0,85% para padronizar a concentração de inóculo. A turbidez dessas suspensões foram ajustadas conforme o padrão 0,5 da escala de McFarland, obtendo-se 10^8 UFC/mL a 2×10^8 UFC/mL. As suspensões foram diluídas e padronizadas (100 μ L da suspensão em 9,9 mL de solução salina 0,85%), obtendo-se concentração final de inóculo bacteriano de aproximadamente 1×10^6 UFC/mL. Os protocolos referentes à padronização dos cultivos dos microrganismos indicadores de contaminação seguiram a metodologia do Clinical and Laboratory Standards Institute (2012).

Na padronização da cultura láctica nativa realizou-se diluições seriadas, em solução salina 0,85%, do cultivo prévio em MRS, que foram plaqueadas em triplicata para a determinação das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL). Colocou-se 1 mL das diluições em placas de Petri estéreis, onde foram adicionados 20 mL de ágar MRS acidificado a pH 5,4 fundido e resfriado (técnica de *pour plate*). Após a adição do meio de cultura, as placas foram homogeneizadas e incubadas por 48 h a 35 ± 2 °C. Os cultivos contabilizaram $1,9 \times 10^8$ UFC/mL de *L. plantarum* em caldo MRS.

4.5 Preparo do sobrenadante centrifugado

A fim de avaliar a atividade antibacteriana da cepa *L. plantarum* CNPC001, utilizou-se o sobrenadante centrifugado com pH inalterado (SI) e o sobrenadante centrifugado neutralizado a pH 7,0 (SN). Para a obtenção desses sobrenadantes, o cultivo de células foi centrifugado a $11000 \times g$ por 10 minutos a 25 °C (Fernandes, 2019). Após esse tempo, o sobrenadante foi transferido para outro tubo tipo Falcon estéril e centrifugado. Este processo foi repetido três vezes com intuito de retirar o máximo de células possíveis do sobrenadante, as quais poderiam interferir na turvação do caldo no ensaio em microplaca.

A obtenção do sobrenadante centrifugado com pH neutralizado (pH final 7,85), ocorreu por adição de NaOH a 4 N estéril.

4.6 Determinação da atividade antibacteriana da bactéria láctica

A atividade antibacteriana de *L. plantarum* CNPC001 foi determinada em duas etapas. Na primeira etapa fez-se o teste de microdiluição em caldo MH utilizando microplacas estéreis de fundo chato de 96 poços, determinando a concentração inibitória mínima (CIM). Já na segunda etapa, plaqueou-se alíquotas de poços que não apresentaram turvação no tempo determinado.

Na primeira etapa, foram distribuídos 100 µL do caldo Mueller Hinton (MH) nos poços para a realização das diluições seriadas, aos quais foram adicionados 100 µL do SI, do SN e do caldo com cultivo de células (CC) 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%). Por fim, adicionou-se em cada poço 100 µL da suspensão bacteriana dos patógenos previamente ajustada a 1×10^6 UFC/mL, atingindo volume final de 200 µL. Como controle de crescimento populacional bacteriano e de turbidez, foram utilizados 100 µL de caldo MH estéril e 100 µL do inóculo de cada patógeno. Já no controle negativo havia 200 µL de caldo MH estéril sem microrganismos. O controle positivo inibitório possuía 100 µL do inóculo patogênico e ciprofloxacino a 1 µg/mL. Tanto as amostras como os controles (de turbidez, negativo e positivo) foram preparados em triplicatas. A incubação das microplacas ocorreu por 20 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ em condições aeróbicas para a determinação da CIM, a qual é definida como a menor concentração da substância antimicrobiana capaz de inibir a multiplicação visível (ausência de turbidez) do microrganismo. O ensaio de microdiluição, conforme descrito, seguiu os procedimentos Clinical and Laboratory Standards Institute (2012).

Depois de avaliado os resultados da primeira etapa, dos poços que continham o sobrenadante SI e SN já testados, alíquotas de 10 µL foram retiradas, as quais foram plaqueadas em ágar MH. Quando as alíquotas foram retiradas dos poços que continham o cultivo de células de *L. plantarum* CNPC001 em caldo MRS (CC), os plaqueamentos foram realizados nos meios diferenciais para cada patógeno (ágar manitol salgado, ágar diferencial RajHans, e ágar Levine EMB, respectivamente para *S. aureus*, *Salmonella* spp. e *E. coli*) de modo que houvesse apenas a multiplicação dos microrganismos indicadores, sem a multiplicação da bactéria láctica.

A visualização da presença ou ausência de colônias nas placas da segunda etapa foi efetuada após o cultivo nas mesmas condições de tempo (20 h) e temperatura ($35 \pm 2^\circ\text{C}$) para *S. enterica* ATCC 14028 e *E. coli*. Para *S. aureus* ATCC 25923 o cultivo foi de 48 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. A partir desses resultados, foi determinada a concentração bactericida mínima (CBM) das amostras utilizadas (SN, SI e CC), definindo-se como CBM a menor concentração da

amostra capaz de eliminar o patógeno, inibindo totalmente sua multiplicação na superfície do ágar (Fernandes, 2019).

4.7 Determinação da acidez titulável expressa em ácido láctico

Com o propósito de investigar se havia relação da acidez do sobrenadante com a ação antimicrobiana, realizou a acidez titulável do sobrenadante SI. Depois do preparo do cultivo de *L. plantarum* CNPC001 descrito no item 4.2, ocorreu a centrifugação (conforme descrito no item 4.5) e, em seguida, titulou-se o sobrenadante em um frasco Erlenmeyer utilizando NaOH a 0,1 N como agente titulante e fenolftaleína como indicador.

Para expressar a quantidade de ácido láctico em mg/100 µL de sobrenadante, fez uso da seguinte equação (1):

$$\text{Ácido láctico (mg/100 } \mu\text{L)} = (V \times C \times F \times PM) \div (VP \times n \times 10) \quad (1)$$

onde:

V = volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação em mL

C = concentração da solução de hidróxido de sódio em moles/L

F = fator de correção da solução de hidróxido de sódio

PM = peso molecular do ácido correspondente em g (ácido láctico = 90)

VP = volume pipetado em mL

n = número de hidrogênios ionizáveis (ácido láctico = 1)

4.8 Morfologia das bactérias e identificação por meio da coloração de gram

Como o sobrenadante foi apenas centrifugado e não esterilizado por filtração, houve necessidade de efetuar a coloração de Gram das colônias presentes no ágar MH (2ª etapa) para confirmação dos microrganismos indicadores de contaminação presentes. Foram usadas as seguintes características: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (cocos gram-positivos), *Salmonella enterica* ATCC 14028 (bastonetes gram-negativos) e *Escherichia coli* (bastonete gram-negativo). Para avaliação da multiplicação de *L. plantarum* CNPC001, sua característica na coloração de Gram deve ser apresentada como bastonete gram-positivo. A técnica empregada foi a descrita no manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (Brasil, 2013).

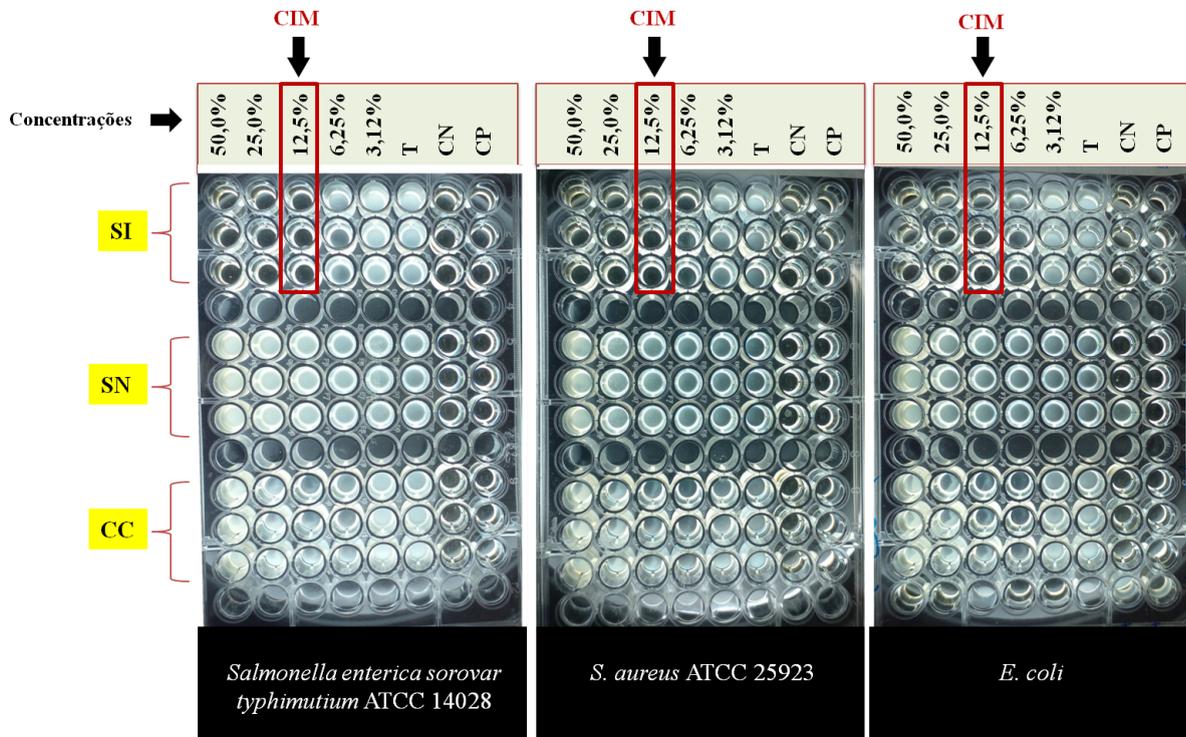
5 RESULTADOS

5.1 Determinação da capacidade antibacteriana da bactéria láctica

O método de microdiluição em caldo MH com posterior semeio de alíquotas em ágar advinda de poços não turvos foi o método empregado para avaliação da atividade bactericida do cultivo de células (CC), do sobrenadante centrifugado de pH neutralizado (SN) e do sobrenadante centrifugado de pH inalterado (SI). Com esses métodos foi possível determinar a concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima de cada amostra testada.

Na Figura 1 é ilustrada a concentração inibitória mínima (CIM) do SI em 12,5% nas microplacas dos três microrganismos indicadores de contaminação alimentar, pois foi a menor concentração que resultou em ausência de turvação.

Figura 1 – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) do sobrenadante centrifugado de pH inalterado (SI), do sobrenadante centrifugado de pH neutralizado (SN) e do cultivo de células (CC)



Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

T: Controle de turbidez.

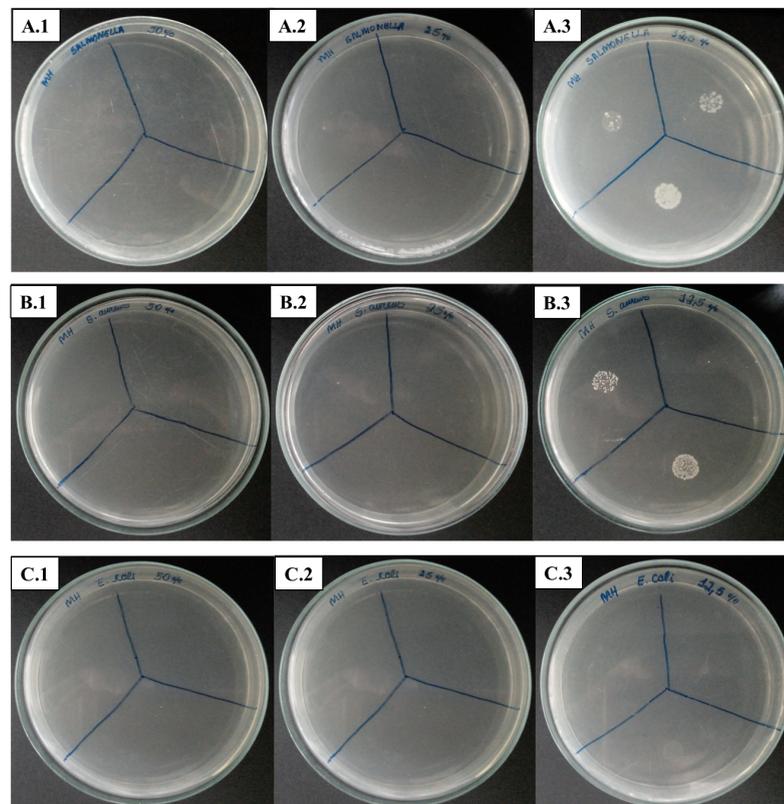
CN: Controle negativo.

CP: ontrole positivo.

A ausência de turvação indica inibição do crescimento exponencial rápido do patógeno. Por outro lado, observou-se turvação em todos os poços do SN e do cultivo de células, não sendo possível a determinação da CIM dessas amostras.

A Figura 2 mostra a atividade bactericida desempenhada pelo SI nas concentrações de 25% e 50%, porém houve a presença de colônias nas placas de *S. enterica* ATCC 14028 e *S. aureus* ATCC 25923 em 12,5%. Também houve presença de colônias nas placas de *E. coli* (pequenas colônias, imperceptível na imagem) em 12,5%. Uma vez que o sobrenadante não foi filtrado, havia possibilidade dessas colônias serem bactérias lácticas que não foram totalmente eliminadas pela centrifugação. Por isso fez-se a coloração de Gram das colônias contidas nas três regiões do ágar MH 12,5%, cujo resultado das lâminas coradas resultou na identificação de bacilos Gram-negativo (Figura 3A), cocos Gram-positivo (Figura 3B) e bacilos Gram-positivo (Figura 3C) atribuindo a CBM de 25% do SI a *S. enterica* ATCC 14028 e *S. aureus* ATCC 25923.

Figura 2 – Avaliação da concentração bactericida mínima (CBM) do sobrenadante centrifugado de pH inalterado (SI) em ágar Mueller-Hinton de diferentes patógeno



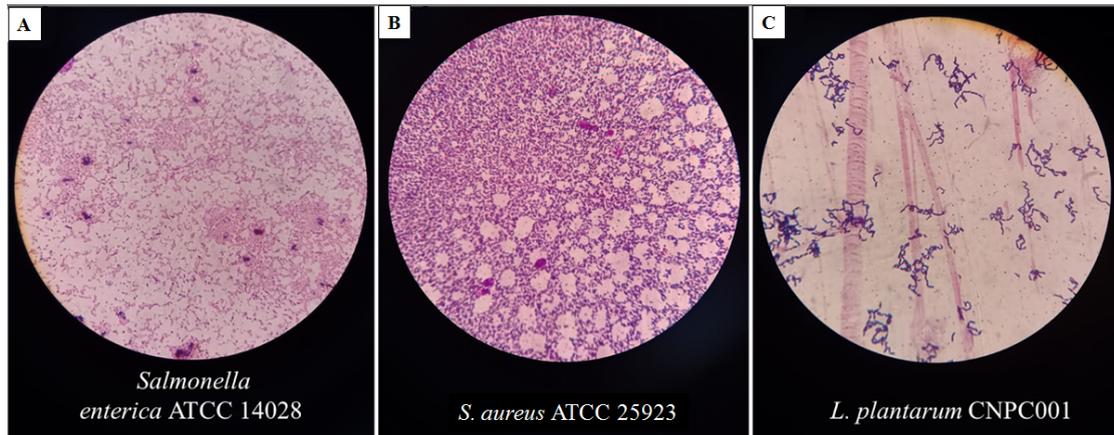
Fonte: Própria autora, 2023.

A.1, A.2; A.3: Suscetibilidade da *S. enterica* ATCC 14028 às concentrações de 50 %, 25 % e 12,5 % do SI.

B.1; B.2; B.3: Suscetibilidade de *S. aureus* ATCC 25923 às concentrações de 50 %, 25 % e 12,5 % do SI.

C.1, C.2, C.3: Suscetibilidade da *E. coli* às concentrações de 50 %, 25 % e 12,5 % do SI.

Figura 3 – Fotomicrografia de Gram das bactérias crescidas em ágar MH com SI 12,5%



Fonte: Própria autora, 2023.

A: Bactérias Gram-negativas isoladas da placa com 12,5% do SI em *S. enterica* ATCC 14028.

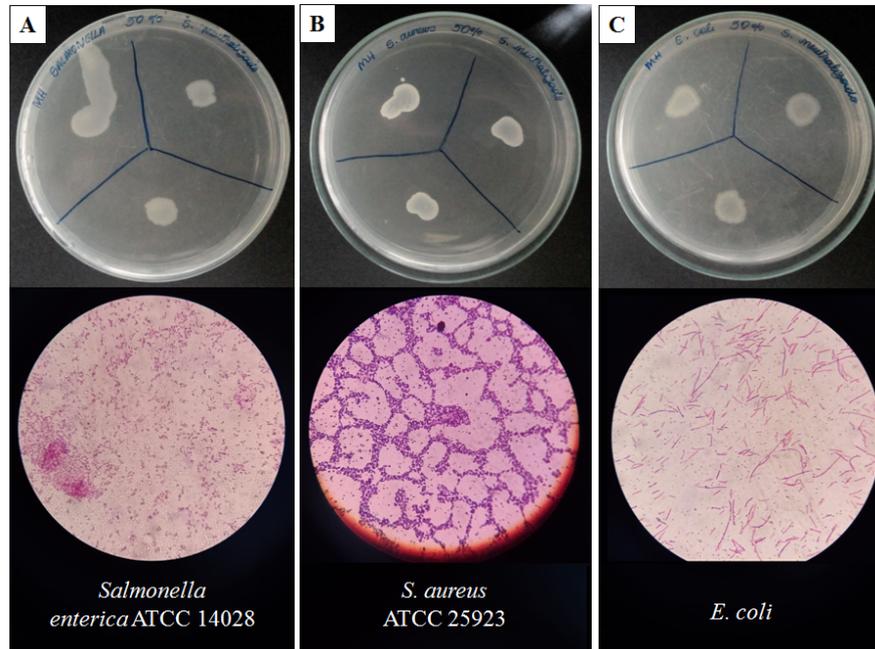
B: Bactérias Gram-positivas isoladas da placa com 12,5% do SI em *S. aureus* ATCC 25923.

C: Bactérias Gram-positivas isoladas da placa com 12,5% do SI em *E. coli*.

Na lâmina de *E. coli* havia bacilos Gram-positivo sinalizando que a centrifugação, apesar de ter sido repetida três vezes, não foi o suficiente para separar todo o inóculo de *L. plantarum* CNPC001 do caldo.

Na Figura 4 é exibido o resultado da CBM do SN e suas respectivas confirmações dos patógenos por meio da coloração de Gram. Comprovou-se pela coloração das bactérias que o SN não possuiu atividade inibitória sobre os patógenos em nenhuma das concentrações testadas.

Figura 4 – Suscetibilidade de *S. enterica* ATCC 14028, *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* a 50% do sobrenadante centrifugado de pH neutralizado (SN)



Fonte: Própria autora, 2023.

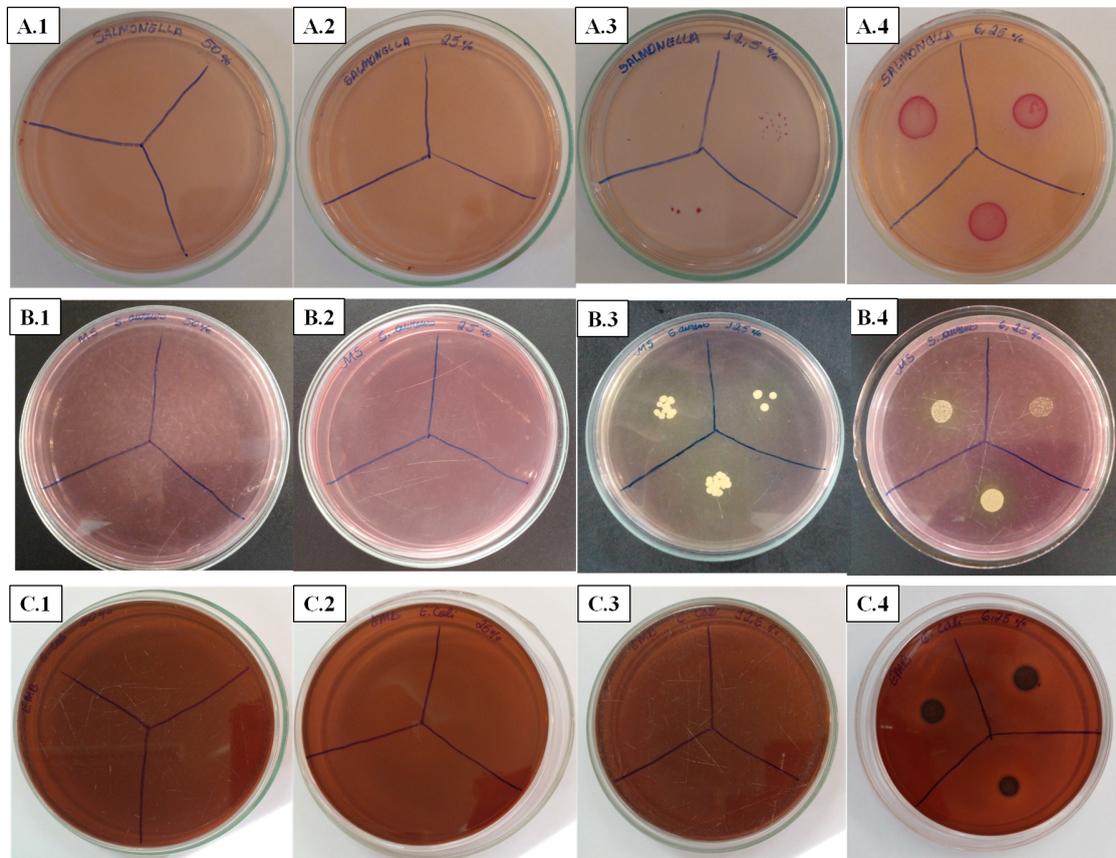
A: Crescimento de *S. enterica* ATCC 14028 em ágar MH e sua coloração.

B: Crescimento de *S. aureus* ATCC 25923 em ágar MH e sua coloração.

C: Crescimento de *E. coli* em ágar MH e sua coloração.

O mesmo comportamento do SI no ágar MH repetiu-se com o cultivo de células em ágar seletivo (Figura 5). Ocorreu a multiplicação da *S. enterica* ATCC 14028 em 12,5% com 20 h de incubação. Por outro lado, nas placas de *S. aureus* ATCC 25923 foram notadas minúsculas colônias em 12,5%, cuja multiplicação do patógeno confirmou-se com 48 h de incubação (Figura 5B.3). Nas placas de EMB não houve crescimento de colônias.

Figura 5 – Suscetibilidade de *S. enterica* ATCC 14028, *S. aureus* ATCC 25923 e *E.coli* a diferentes concentrações do cultivo de células de *L. plantarum* CNPC001



Fonte: Própria autora, 2023.

A.1, A.2, A.3, A.4: Placas de Petri com ágar diferencial para *Salmonella* spp.

B.1, B.2, B.3, B.4: Placas de Petri com ágar manitol salgado.

C.1, C.2, C.3, C.4: Placas de Petri com ágar Levine EMB.

Com os resultados obtidos (Tabela 1) nota-se que os três indicadores de contaminação alimentar foram suscetíveis à atividade antibacteriana do SI e do CC, exceto do SN onde houve crescimento do patógeno em todas as concentrações da amostra, comprovado pela coloração de Gram. As CIMs do SI foram iguais (12,5%) entre os três indicadores, porém diferiram na CBM. A CBM de *E. coli* foi 12,5%, enquanto que para os outros dois patógenos foi de 25%. Para o CC, as CBMs obtiveram os mesmos valores do SI e devido ao crescimento da bactéria láctica no meio não foi possível determinar a CIM dessas amostras, pois todos os poços turvaram após a incubação.

Tabela 1 – Percentual (%) da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos sobrenadantes centrifugados obtidos de *L. plantarum* CNPC001 e do cultivo de células de *L. plantarum* CNPC001

Amostras	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923		<i>Escherichia coli</i> (isolado clínico)	
	CIM (%)	CBM (%)	CIM (%)	CBM (%)	CIM (%)	CBM (%)
SI	12,5	25,0	12,5	25,0	12,5	12,5
SN	–	–	–	–	–	–
CC	N.D.	25,0	N.D.	25,0	N.D.	12,5

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

Nota: – Atividade inibitória ausente em até 50% do SN.

N.D.: Não determinado.

CIM: Concentração inibitória mínima.

CBM: Concentração bactericida mínima.

SI: Sobrenadante centrifugado com pH inalterado.

SN: Sobrenadante centrifugado com pH neutralizado.

CC: Cultivo de células de *L. plantarum* CNPC001.

5.2 Determinação da acidez titulável expressa em ácido láctico

Diante da atividade antibacteriana exercida pelo SI e inefetividade do SN fez-se necessário determinar a acidez titulável para a estimativa da quantidade de ácido láctico por μL . Com isso, obteve-se 1,73 mg de ácido láctico por 100 μL do sobrenadante centrifugado de pH inalterado, estimando as concentrações de ácido láctico presentes nos poços demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores de ácido láctico em mg/100 μL (média \pm desvio padrão) nas diferentes concentrações de sobrenadante utilizados no presente estudo

Sobrenadante	Acidez titulável (mg de ácido láctico/100 μL)
100%	1,734 \pm 0,46
50%	0,867 \pm 0,023
25%	0,433 \pm 0,012
12,5%	0,217 \pm 0,006
6,25%	0,108 \pm 0,003
3,12%	0,054 \pm 0,001

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

6 DISCUSSÃO

6.1 Determinação da atividade antibacteriana da bactéria láctica

Em concordância com o presente estudo, Fernandes (2019) mostrou o potencial antibacteriano do sobrenadante livre de células de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 e *Lactocaseibacillus rhamnosus* ATCC 9595 (anteriormente *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595) contra cepas (P12, P25, P35, P36) de *E. coli* farmacorresistentes. As CIMs e CBMs encontradas do sobrenadante para a cepa P35 foram iguais aos valores obtidos neste trabalho (CIM de 12,5% e CBM de 25%). Resultados similares foram evidenciados por Danilova *et al.* (2019) com sobrenadante livre de células de *L. plantarum* frente a *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922, enquanto que Evangelista *et al.* (2021) demonstraram que o sobrenadante de cepas de *L. plantarum* exibiu ação inibitória, com CIM de 12,5%, contra cepas de *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium (ATCC 14028), Gallinarum (AL 1133) e Enteritidis (33SUSUP, 9SUSP, 56301, CRIFS 1016).

No presente estudo, as CBMs diferiram entre os patógenos (*E. coli* com 12,5%; *S. aureus* ATCC 25923 e *S. enterica* ATCC 14028 com 25%). Essa diferença pode ser justificada pela padronização dos patógenos com escala visual de McFarland. Esse método, por ser subjetivo, pode gerar variação na padronização dos inóculos. Foi verificado que as suspensões bacterianas padronizadas e diluídas na proporção de 1:100, mantidas sob refrigeração por 24 h, estavam em concentrações diferentes. *E. coli* estava a uma concentração de $1,65 \times 10^6$ UFC/mL (concentração adequada), *S. enterica* ATCC 14028 e *S. aureus* ATCC 25923 estavam em uma concentração superior à estabelecida com $4,04 \times 10^6$ UFC/mL e $3,14 \times 10^6$ UFC/mL, respectivamente. Causando, assim, uma CBM maior.

Analisando os resultados da CBM entre o SI e o CC percebe-se que não houve diferença entre eles, indicando que a presença da cepa (*L. plantarum* CNPC001) não causou alteração na atividade bactericida com o método empregado e que as substâncias antibacterianas estavam presentes no sobrenadante. Por isso, ao neutralizá-lo (SN), o mesmo não exibiu atividade bactericida nem bacteriostática, indicando, portanto, possível ação dos ácidos orgânicos presentes no sobrenadante, cuja neutralização anulou seu efeito (Forsythe, 2013; Presser; Ratkowsky; Ross, 1997).

Estudos mostram que o pH do meio influencia a proporção de ácidos dissociados e não dissociados, além de aumentar o pH mínimo inibitório com a presença de ácido láctico (Forsythe, 2013). Presser, Ratkowsky e Ross (1997) avaliaram a multiplicação de *E. coli* não

patogênica em função do pH e concentração de ácido lático não dissociado, concluindo que a inibição do crescimento populacional foi proporcional a concentração de ácido lático não dissociado e que o pH mínimo o qual ocorre a multiplicação da *E. coli* foi aumentado. Em outro estudo, Presser, Ratkowsky e Ross (1998) mostraram a influência da temperatura, atividade de água, pH e concentração de ácido lático não dissociado atuando sinergicamente no pH mínimo de multiplicação.

Empregando a mesma metodologia do presente estudo, Fernandes (2019) ao neutralizar o sobrenadante livre de células de *L. acidophilus* ATCC 4356 e *L. rhamnosus* ATCC 9595 também não obteve êxito na atividade inibitória. O mesmo ocorreu com Evangelista *et al.* (2021) em algumas cepas de *Salmonella* spp. (serovar Gallinarum AL 1133 e serovar Enteritidis 33SUSUP). No presente estudo, provavelmente houve ausência de atividade inibitória de bacteriocinas nos sobrenadantes utilizados, fato indicado pela ausência de inibição dos patógenos pelo sobrenadante neutralizado. Tal fato pode ser justificado por Zheng *et al.* (2014), os quais relatam que apenas algumas cepas isoladas produziram bacteriocinas.

O cultivo de células de *L. plantarum* CNPC001 demonstrou capacidade inibitória contra *S. enterica* ATCC 14028, *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922 *in vitro* utilizando a técnica de perfuração de ágar em poços (Galdino *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2022), porém nesses estudos não foi pesquisada a concentração mínima necessária para inibir ou eliminar o patógeno. Sabe-se também que essa cepa, potencialmente probiótica, possui bom desempenho como bioconservante, visto que, ao adicioná-la em leite cru, foi capaz de reduzir significativamente a carga de coliformes a 35 °C e a 45 °C, *S. aureus* e *E. coli* ao longo de 28 dias de armazenamento, além de aumentar a acidez do meio devido à produção de ácidos orgânicos (Silva; Alonso Buriti, 2023).

6.2 Determinação da acidez titulável expressa em ácido lático

O ácido lático tem sido o ácido orgânico isolado em maior quantidade nos sobrenadantes obtidos do cultivo de diferentes cepas de *Lactiplantibacillus plantarum*, tendo isto ocorrido para as cepas LUC0219, LYC0289 e LYC1031 no estudo de Chen *et al.* (2021) e para Lp03, Lp289, and Lp291 no estudo de Selis *et al.* (2021). No presente estudo, a concentração de ácido lático no SI foi de 1,733 mg/100 µL. A partir disso, estima-se que, para inibir a multiplicação dos patógenos a uma concentração de, aproximadamente, 5×10^5 UFC/mL, foi requerida a concentração de 0,217 mg de ácido lático/100 µL (CIM) e, para

eliminar o patógeno, foi necessária a concentração de 0,433 mg de ácido láctico/100 μ L (CBM).

7 CONCLUSÃO

Foi evidenciado nesse estudo que o sobrenadante centrifugado de pH inalterado e o cultivo de células de *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC001 apresentaram atividade bacteriostática e bactericida contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativas de interesse alimentar e clínico (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028 14028 e *Escherichia coli*). Diante das diferenças dos resultados obtidos para os sobrenadantes neutralizado e sem a neutralização, conclui-se que, possivelmente, a inibição ocorreu devido à presença de ácidos orgânicos produzidos por *L. plantarum*. Dessa forma, o presente estudo contribuiu para reforçar o potencial desta cepa nativa como um promissor bioconservante, que poderá atuar na produção de alimentos, porém o uso da bactéria láctica em questão não isenta a utilização das medidas de higiene em toda a cadeia de produção, transporte e manuseio.

Além disso, espera-se que esses novos resultados para *L. plantarum* CNPC001 contribuam para o incentivo de pesquisas futuras de investigação, implementação e produção de bioconservantes, bem como para o uso dessa cultura, de outras cepas probióticas, e dos metabólitos por elas produzidos, em alimentos funcionais inovadores, disponibilizando-os para a sociedade.

REFERÊNCIAS

- ACHARJEE, M. *et al.* *In-vitro* antibacterial activity of commercially available probiotics on food-borne pathogens along with their synergistic effects with synthetic drugs. **Metabolism Open**, [Maryland Heights], v. 14, p. 100187, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.metop.2022.100187>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9149184/>. Acesso em: 15 maio 2023.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. módulo 4: procedimentos laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final**. Brasília, DF: Anvisa, 2013. Disponível em: https://www.saude.gov.br/images/imagens_migradas/upload/arquivos/2017-02/modulo-4--procedimentos-laboratoriais---da-requisicao-do-exame-a-analise-microbiologica-e-laudo-final.pdf. Acesso em: 15 out. 2023.
- ALMEIDA NETA, M. C. *et al.* Fermented dessert with whey, ingredients from the peel of jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) and an indigenous culture of *Lactobacillus plantarum*: composition, microbial viability, antioxidant capacity and sensory features. **Nutrients**, Basel, v. 10, n. 9, p. 1214, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/nu10091214>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6643/10/9/1214>. Acesso em: 15 maio 2023.
- BELEZA, L. P. P. N. **Utilização de probióticos tópicos no controle da dermatite atópica**. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2022. Disponível em: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/11868/1/PPG_34288.pdf. Acesso em: 3 nov. 2023.
- BISPO, V. G. *et al.* Principais agentes etiológicos envolvidos em surtos de doenças veiculadas por alimentos nos últimos anos. *In: CARVALHO JÚNIOR, F. F.; SILVA, D. A. Ciências da saúde: desafios e potencialidades em pesquisa*. Guarujá: Científica Digital, 2022. v. 1, n. 1, cap. 25, p. 276-284. ISBN 978-65-5360-200-7. DOI <http://dx.doi.org/10.37885/220909926>. Disponível em: <https://downloads.editoracientifica.com.br/articles/220909926.pdf>. Acesso em: 23 out. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. **Surtos de doenças de transmissão hídrica e alimentar no Brasil: informe 2023**. [Brasília, DF]: Ministério da Saúde, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2023>. Acesso em: 15 nov. 2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.**: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*. Ministério da Saúde: Brasília, 2011. (Série A, Normas e manuais técnicos).
- 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**, Des Moines, v. 70, n. 1, p. 228-235, Jan. 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-70.1.228>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0362028X22058999?via%3Dihub>. Acesso em: 10 maio 2023.

CARVALHO, J. V. L. *et al.* Probiotic topical application for acne management. **Research, Society and Development**, Vargem Grande Paulista, v. 12, n. 5, p. e17412541661, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v12i5.41661>. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/41661>. Acesso em: 3 nov. 2023.

CHEN, C. *et al.* Antimicrobial ability and mechanism analysis of *Lactobacillus* species against carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Taipei, v. 54, n. 3, p. 447-456, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.01.005>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1684118220300062?via%3Dihub#fig4>. Acesso em: 10 maio 2023.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; approved standard. 9th ed.. Wayne, PA: CLSI, 2012. v. 32, n. 2. (Document M07-A9).

COSTA, B. L. P. **Utilização de probióticos em alimentos de origem vegetal como alternativa para lanches funcionais: uma revisão de literatura**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/26613/1/BLPC12122022.pdf>. Acesso em: 26 out. 2023.

DANILOVA, T. A. *et al.* Antimicrobial activity of supernatant of *Lactobacillus plantarum* against pathogenic microorganisms. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, New York, v. 167, p. 751-754, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10517-019-04615-9>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31656002/>. Acesso em: 10 out. 2023.

ECHEGARAY, N. *et al.* A novel approach to *Lactiplantibacillus plantarum*: from probiotic properties to the omics insights. **Microbiological Research**, Munich, v. 268. p. 127289, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127289>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501322003299?via%3Dihub#bib40>. Acesso em: 14 nov. 2023.

EVANGELISTA, A. G. *et al.* Cell-free supernatants produced by lactic acid bacteria reduce *Salmonella* population *in vitro*. **Microbiology**, New York, v. 167, n. 11, p. 001102, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.001102>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.001102#tab2>. Acesso em: 15 out. 2023.

FERNANDES, M. S. M. **Atividade antimicrobiana e antibiofilme do sobrenadante de cepas de *Lactobacillus* cell-free sobre isolados de *Escherichia coli* farmacorresistentes**. 2019. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2019. Disponível em: https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/40355/1/2019_dis_msmfernandes.pdf. Acesso em: 20 maio 2023.

FLOROU-PANERI, P.; CHRISTAKI, E.; BONOS, E. Lactic acid bacteria as source of functional ingredients. *In*: KONGO, M. **Lactic acid bacteria-R & D for food, health and**

livestock purposes. London: IntechOpen, 2013. Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/42328>. Acesso em: 17 nov. 2023.

FREITAS, W. R. *et al.* **Atividade da lactoperoxidase no leite de vacas Girolando**. 2013 Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013. Disponível em: <http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/bitstream/tede2/6906/2/Wandemberg%20Rocha%200Freitas.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2023.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. Tradução: Andréia Bianchini *et al.* 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 607 p.

FRANÇA, K. Topical probiotics in dermatological therapy and skincare: a concise review. **Dermatology and Therapy**, Auckland, v. 11, p. 71-77, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13555-020-00476-7>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13555-020-00476-7>. Acesso em: 25 out. 2023.

FRAQUEZA J. M. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 212, p. 76-88, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.035>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26002560/>. Acesso em: 01 nov. 2023.

GALDINO, I. K. C. P. O. *et al.* Fermentative behavior of native lactobacilli in goat milk and their survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **LWT**, Amsterdam, v. 135, p. 109905, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109905>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364382030894X>. Acesso em: 20 maio 2023.

GALDINO, I. K. C. P. O. *et al.* β -Glucosidase activity and antimicrobial properties of potentially probiotic autochthonous lactic cultures. **PeerJ**, London, v. 11, p. e16094, 2023. DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.16094>. Disponível em: <https://peerj.com/articles/16094/>. Acesso em: 31 out. 2023.

GALLO, M. *et al.* Relationships between food and diseases: what to know to ensure food safety. **Food Research International**, Amsterdam, v. 137, p. 109414, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109414>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996920304397?via%3Dihub>. Acesso em: 20 set. 2023.

HANCHI, H. *et al.* Inhibition of MRSA and of *Clostridium difficile* by durancin 61A: synergy with bacteriocins and antibiotics. **Future Microbiology**, London, v. 12, n. 3, p. 205-212, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.2217/fmb-2016-0113>. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb-2016-0113>. Acesso em: 20 maio 2023.

HILL, C. *et al.* The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, Berlin, v. 11, p. 506–514, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2014.66>. Acesso em: 18 maio 2023.

JAMALIFAR, H. *et al.* Antimicrobial activity of different *Lactobacillus* species against multi-drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Iranian Journal of Microbiology**, Tehran, v. 3, n. 1, p. 21-25, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3279796>. Acesso em: 15 maio 2023.

LIMA JÚNIOR, D. C. **Queijo de cabra com extrato de semente de *Helianthus annuus* (girassol) e cultura nativa de *Limosilactobacillus mucosae***: avaliação do potencial funcional e sobrevivência da bactéria lática *in vitro*. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2022. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1144405/1/CNPC-2022-Art12.pdf>. Acesso em: 20 maio 2023.

LOPES NETO, J. H. P. *et al.* Influência do tempo fermentação na viscosidade dos soros de leite bovino e caprino utilizando *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC001. *In: FIGUEIREDO, M. J. et al (org.). Inovações em ciência e tecnologia de alimentos*. Jardim do Seridó: Agron Food Academy, 2022. cap. 18, p. 179-186. Disponível em: <https://agronfoodacademy.com/livro-inovacoes-em-ciencia-e-tecnologia-de-alimentos/>. Acesso em: 10 out. 2023.

MACHADO, T. F. **Potencial uso de bacteriocinas na conservação de alimentos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2023. ISSN 2179-8184; 199. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1151945/1/DOC-199.pdf>. Acesso em: 18 maio 2023.

MIRANDA, B. *et al.* Probióticos naturais para prevenção e tratamento de doenças crônicas: uma revisão. **Research, Society And Development**, Vargem Grande Paulista, v.10, n. 5, p. e30810514930, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i5.14930>. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/14930>. Acesso em: 3 nov. 2023.

MORAES, G. M. D. *et al.* Aptidão tecnológica de 13 cepas de *Lactobacillus plantarum* para fabricação de produtos lácteos. *In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS*, 6., 2017. Belém. **Segurança e qualidade de alimentos**. Belém, PA: LACEN: UFPA, 2017. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1074918>. Acesso em: 10 maio 2023.

MOREIRA, M. A. C. *et al.* Insuficiência respiratória aguda após exposição a conservantes de alimentos. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 464-9, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-37132005000500015>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jbpneu/a/4CbZ8nyQz76L5MvbRjb7fDJ/?lang=pt>. Acesso em: 10 maio 2023.

MUTHUVELU, K. S. *et al.* Biopreservative technologies of food: an alternative to chemical preservation and recent developments. **Food Science and Biotechnology**, Seoul, v. 32, n. 10, p. 1-14, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10068-023-01336-8>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10068-023-01336-8>. Acesso em: 10 maio 2023.

NASCIMENTO, M. S. G. *et al.* A importância do controle microbiológico de alimentos. *In: OPEN Science Research*. Guarujá: Científica Digital, 2023. v. 11, n. 1, cap. 1 p. 25-33. DOI: <http://dx.doi.org/10.37885/230412820>. Disponível em:

<https://downloads.editoracientifica.com.br/books/978-65-5360-350-9.pdf>. Acesso em: 24 out. 2023.

NORONHA, T. H. *et al.* Indicador de contaminação fecal alimentar e prevenção de doenças. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, Brasília, v. 2, n. 4, p. 150-157, 2019. Disponível em: <http://www.revistajrg.com/index.php/jrg/article/view/201/313>. Acesso em: 15 nov. 2023.

O'CONNOR, P. M. *et al.* Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 61, p. 160-167, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.023>. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez121.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0958166919301612>. Acesso em: 18 maio 2023.

PEREIRA, C. B. **Bioconservação por *Lactocaseibacillus casei* de suco de maçã prensado a frio**. 2021. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021. Disponível em: <https://tede.ufrrj.br/handle/jspui/6728>. Acesso em: 10 nov. 2023.

PRESSER, K. A.; RATKOWSKY, D. A.; ROSS, T. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 6, p. 2355-2360, 1997. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.63.6.2355-2360.1997>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.63.6.2355-2360.1997>. Acesso em: 14 nov. 2023.

PRESSER, K. A.; ROSS, T.; RATKOWSKY, D. A. Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 5, p. 1773-1779, 1998. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.64.5.1773-1779.1998>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC106229/>. Acesso em: 14 nov. 2023.

RADAIC, A.; JESUS, M. B.; KAPILA, Y. L. Bacterial anti-microbial peptides and nano-sized drug delivery systems: the state of the art toward improved bacteriocins. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 321, p. 100-118, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.02.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S016836592030078X?via%3Dihub>. Acesso em: 10 nov. 2023.

RATHER, I. A. *et al.* *Lactiplantibacillus plantarum* KAU007 extract modulates critical virulence attributes and biofilm formation in sinusitis causing *Streptococcus pyogenes*. **Pharmaceutics**, Basel, v. 14, n. 12, p. 2702, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122702>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9780990/#B17-pharmaceutics-14-02702>. Acesso em: 15 maio 2023.

RIBEIRO, A. P. O. *et al.* Development of a probiotic non-fermented blend beverage with juçara fruit: effect of the matrix on probiotic viability and survival to the gastrointestinal tract. **LWT**, Amsterdam, v. 118, p. 1-7, Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108756>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643819310989>. Acesso em: 10 maio 2023.

RIBEIRO, F. C. **Desenvolvimento de formulações probióticas para prevenção da candidose bucal: estudo *in vitro* e *in vivo***. 2019. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2019. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/server/api/core/bitstreams/03b5f244-a94d-4dfd-a4d8-1e1b0dc92ed8/content>. Acesso em: 25 out. 2023.

ROLIM, F. R. L. *et al.* Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. **LWT**, Amsterdam, v. 63, n. 2, 807-813, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.05.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815003539>. Acesso em: 10 maio 2023.

SELIS, N. N. *et al.* *Lactiplantibacillus plantarum* strains isolated from spontaneously fermented cocoa exhibit potential probiotic properties against *Gardnerella vaginalis* and *Neisseria gonorrhoeae*. **BMC Microbiology**, London, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02264-5>. Disponível em: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-021-02264-5>. Acesso em: 16 nov. 2023.

SHAFIQUE, B. *et al.* Recent trends and applications of nanoencapsulated bacteriocins against microbes in food quality and safety. **Microorganisms**, Basel, v. 11, n. 1, p. 85, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms11010085>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9864013/>. Acesso em: 30 out. 2023.

SILVA, A. P. A.; ALONSO BURITI, F. C. Investigação de atividade bioconservante de culturas nativas de lactobacilos com potencial probiótico para uso em alimentos. *In*: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 29., 2022, Campina Grande. [**Resumos**] [...], Campina Grande: Eduepb, 2023. p. 395.

SILVA, M. O. M. *et al.* Efeito inibitório da cultura nativa potencialmente probiótica *Lactiplantibacillus plantarum* CNPC001 frente a indicadores microbiológicos sanitários. *In*: WORKSHOP do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba: probióticos e moléculas bioativas aplicadas no desenvolvimento de alimentos/medicamentos e suas tecnologias, 3., 2022, Campina Grande. **Livro de resumos** [...]. João Pessoa: Creative, 2022. p. 41, RS. 027. Disponível em: <https://creativeeventos.com.br/wp-content/uploads/2023/01/LIVRO-DE-RESUMOS-III-Workshop-PPGCF.pdf>. Acesso em: 30 out. 2023.

SILVA, M. T. N. M. Desenvolvimento de formulação inovadora para cápsulas vaginais à base de probióticos para o tratamento da candidíase vaginal. **Jornal de Assistência Farmacêutica e Farmacoeconomia**, Salvador, v. 7, p. 80, 2023. supl. 1. Trabalho apresentado no 10º Fórum Brasileiro sobre Assistência Farmacêutica e Farmacoeconomia, 2022. Brasília, DF. DOI: <http://dx.doi.org/10.22563/2525-7323.2022.v1.s1.p.80>. Disponível em: <https://www.ojs.jaff.org.br/ojs/index.php/jaff/article/view/397>. Acesso em: 3 nov. 2023.

SILVA, S. Â. D. **Microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactiplantibacillus plantarum* em alginato e gelatina**: estudo da produção, caracterização e estabilidade visando aplicação em alimentos. 2021. Dissertação (Mestrado em nutrição) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2021. Disponível em:

https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/46570/1/MicroencapsulacaoLactobacillusacidophilus_Silva_2021.pdf. Acesso em: 31 out. 2023.

SOLTANI, N. *et al.* Antibacterial and antibiofilm activity of *Lactobacillus* strains secretome and extraction against *Escherichia coli* isolated from urinary tract infection. **Biotechnology Reports**, Amsterdam, v. 36, p. e00760, 2022. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00760>. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9445990/>. Acesso em: 15 maio 2023.

SOLTANI, S. *et al.* Bacteriocin-based synergetic consortia: A promising strategy to enhance antimicrobial activity and broaden the spectrum of inhibition. **Microbiology Spectrum**, Washington, v. 10, n. 1, p. e00406-21, 2022. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1128/spectrum.00406-21>. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8849083/>. Acesso em: 25 out. 2023.

SPACOVA, I. *et al.* Development of a live biotherapeutic throat spray with lactobacilli targeting respiratory viral infections. **Microbial Biotechnology**, Hoboken, v. 16, n. 1, p. 99-115, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.14189>. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9803329/>. Acesso em: 31 out. 2023.

STILLES, M. E. Biopreservation by lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 70, p. 331-345, 1996. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00395940>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00395940>. Acesso em: 15 maio 2023.

SULTHANA, R.; ARCHER, A. C. Bacteriocin nanoconjugates: Boon to medical and food industry. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 131, n. 3, p. 1056-1071, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jam.14982>. Disponível em:

<https://academic.oup.com/jambio/article-abstract/131/3/1056/6715504?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 25 out. 2023.

UNITED NATIONS. Department of Economic and Social Affairs Population Division. **World population prospects 2022**: summary of Results. New York: United Nations, 2022.

U. S. National Library of Medicine. **Taxonomy browser: *Salmonella***. [Bethesda]: NCBI, 2023. Disponível em: [ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=590](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=590). Acesso em: 17 nov. 2023.

VIECO-SAIZ, N. *et al.* 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, p. 57, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00057>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00057/full>. Acesso em: 1 nov. 2023.

VINCENZI, D.; MENDES, L. de J.; MOTA, V. M. Aditivos como conservantes químicos. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, São Paulo, v. 7, n. 9, p.

821–849, 2021. DOI: <https://doi.org/10.51891/rease.v7i9.2283>. Disponível em: <https://www.periodicorease.pro.br/rease/article/view/2283>. Acesso em: 18 maio 2023.

ZHENG, J. *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus Beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, London, v. 70, n. 4, p. 2782-2858, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004107>. Acesso em: 25 out. 2023.