

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PRISCILA LIMA MAGAROTTO DE PAULA

**CARACTERIZAÇÃO TECNOLÓGICA DE *Enterococcus faecium*  
ISOLADOS DE QUEIJOS ARTESANAIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LONDRINA

2019

PRISCILA LIMA MAGAROTTO DE PAULA

**CARACTERIZAÇÃO TECNOLÓGICA DE *Enterococcus faecium*  
ISOLADOS DE QUEIJOS ARTESANAIS**

Dissertação de mestrado, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Londrina, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora Dra. Marly Sayuri Katsuda  
Co-orientadora Dra. Luciana Furlaneto-Maia

LONDRINA

2019

## TERMO DE LICENCIAMENTO

Esta Dissertação está licenciada sob uma Licença Creative Commons *atribuição uso não-comercial/compartilhamento sob a mesma licença 4.0 Brasil*. Para ver uma cópia desta licença, visite o endereço <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/> ou envie uma carta para Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, Califórnia 94105, USA.



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

P324c Paula, Priscila Lima Magarotto de  
Caracterização tecnológica de *Enterococcus faecium* isolados de queijos artesanais / Priscila Lima Magarotto de Paula. - Londrina : [s.n.], 2019.  
63 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marly Sayuri Katsuda  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana Furlaneto-Maia  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Londrina, 2019.  
Bibliografia: f. 52-63.

1. Bactérias. 2. Enterococcus. 3. Probióticos. 4. Drogas - Resistência em micro-organismos. I. Katsuda, Marly Sayuri, orient. II. Furlaneto-Maia, Luciana, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. V. Título.

CDD: 664

Ficha catalográfica elaborada por Cristina Benedeti Guilhem - CRB: 9/911

**FOLHA DE APROVAÇÃO**  
**Título da Dissertação Nº 82**

**“CARACTERIZAÇÃO TECNOLÓGICA DE *Enterococcus faecium***  
**ISOLADOS DE QUEIJOS ARTESANAIS” por**

Priscila Lima Magarotto de Paula

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de MESTRE EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – Área de Concentração: Tecnologia de Alimentos, pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – PPGTAL, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR Câmpus Londrina às nove horas e trinta minutos de 14 de agosto de 2019. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta por:

---

**Profa. Dra. Marly Sayuri Katsuda**  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -  
Câmpus Londrina  
Orientadora

---

**Prof. Dr. Alexandre Rodrigo Coelho**  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -  
Câmpus Londrina  
Membro Examinador Titular

---

**Prof. Dr. Pedro Henrique Freitas Cardines**  
Centro Universitário Filadélfia - Londrina  
Membro Examinador Titular

Visto da coordenação:

---

**Profa. Dra. Lúcia Felicidade Dias**  
(Coordenadora do PPGTAL)

*A minha amada Bárbara, minha filha e ao  
meu esposo Estevão, por todo amor,  
dedicação, paciência e carinho. Por ser  
quem eu sou e por tudo o que eu  
alcansei.*

## **AGRADECIMENTOS**

Às minhas orientadoras Marly S. Katsuda e Luciana Furlaneto-Maia pelo apoio e ensinamentos ao longo do curso.

Aos meus colegas do PPGTAL Turma de 2017, Daiana, Eloisi, Ivison e Amanda que exemplificam a ética e competência profissionais, a dedicação e o aprimoramento contínuos, pelo incentivo e oportunidade de convívio.

Aos colegas de laboratório, em especial a Natara, Alane e Deyse por toda a força e paciência no decorrer deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação por me proporcionar a oportunidade de realizar um sonho pessoal e de poder alcançar um novo patamar de conhecimento científico.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, orgulho de terminar esta etapa nesta instituição que abriu as portas com todos os recursos para auxiliar seus alunos.

Enfim a todos os colegas e parceiros que tenham colaborado para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho o meu profundo agradecimento.

## RESUMO

A busca por bactérias com propriedades benéficas à saúde, qualidade nutricional, bem como preservação dos alimentos tem sido o foco de intensas pesquisas na área de alimentos. O isolamento e caracterização de nossas espécies são vantajosos para obtenção de isolados com características tecnológicas e funcionais diferenciadas. Nesta perspectiva, este estudo avaliou o perfil tecnológico de seis isolados de *Enterococcus faecium* (EFM 55, EFM 67, EFM 9A, EFM 16A, EFM19A e EFM 44) isolados de amostras de queijos. Foram avaliadas as atividades enzimáticas de proteólise e lipólise em diversos tempos de incubação. Teste da enzima beta-galactosidase, capacidade de acidificação, atividade antagônica contra patógenos alimentares, sensibilidade a antimicrobianos e medicamentos de uso contínuo também foram avaliados. Todos os isolados apresentaram atividade proteolítica a partir de 48 horas na temperatura de 20°C. Já atividade lipolítica e beta-galactosidase não foram detectadas. O isolado EFM 44 apresentou resistência intermediária à ciprofloxacina e eritromicina enquanto EFM 55 somente à eritromicina, os demais isolados foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. O isolado EFM 44 apresentou aumento significativo no pH e teores de acidez titulável a 20°C ao longo de 48 horas. As cepas EFM 9A e 19A não apresentaram resistência a dipirona, enquanto os demais foram resistentes a todos os medicamentos avaliados. O isolado EFM 9A apresentou inibição contra todos os patógenos avaliados, e os demais foram eficazes no controle de *E.coli*. Concluímos que os isolados de *Enterococcus faecium* estudados apresentaram perfil tecnológico para aplicação em produtos lácteos fermentados.

**Palavras-chave:** Medicamentos. Proteólise. Atividade antagônica. Antibióticos.

## ABSTRACT

The search for bacteria with beneficial properties to health, nutritional quality, as well as food preservation has been the focus of intense research in the area of food. The isolation and characterization of our species are useful for obtaining isolates with different technological and functional characteristics. From this perspective, this study evaluated the technological profile of six *Enterococcus faecium* (EFM 55, EFM 67, EFM 9A, EFM 16A, EFM19A and EFM 44) isolated from cheese. The enzymatic activities of proteolysis and lipolysis at different incubation times were evaluated. The enzymatic activities of proteolysis and lipolysis at different incubation times were evaluated. Beta-galactosidase enzyme testing, acidification capacity, antagonistic activity against food pathogens, antimicrobial susceptibility and continuous use medications were also performed. All isolates showed proteolytic activity from 48 hours at 20°C. Lipolytic activity and beta-galactosidase were not detected. Isolate EFM 44 showed intermediate resistance to ciprofloxacin and erythromycin, while EFM 55 were resistant just to erythromycin, the remaining isolates were sensitive to all antimicrobials tested. The EFM 44 showed increase in pH and titratable acidity at 20°C over 48 hours. The EFM 9A and 19A showed no resistance to dipyrone, while the others were resistant to all evaluated drugs. The EFM 9A isolate showed inhibition against all tested pathogens, and the others were effective in controlling *E. coli*. We conclude that the *Enterococcus faecium* isolates studied presented technological profile for application in fermented dairy products.

**Keywords:** Medicines. Proteolysis. Antagonistic activity. Antibiotics.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1.** Valores médios do pH de *E. faecium* ao longo do tempo de fermentação (0, 6, 12, 24 e 48 h). A - Médias de pH sob a temperatura de 20°C. B - Médias de pH sob a temperatura de 42°C.....45

**Figura 2.** Valores acidez das cepas de *E. faecium* ao longo do tempo de fermentação (0, 6, 12, 24 e 48 h). A - Acidez das cepas sob a temperatura de 20°C. B - Acidez sob a temperatura de 42°C.....47

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Lista de medicamentos de uso contínuo testados frente aos isolados de *E. faecium*..... 33
- Tabela 2.** Perfil de resistência e sensibilidade das cepas de *E. faecium* aos antimicrobianos: Cloranfenicol (CLO); Ciprofloxacina (CIP); Ampicilina (AMP); Tetraciclina (TET); Vancomicina (VAN); Eritromicina (ERI) e Gentamicina (GEN).....37
- Tabela 3.** Atividade antagonista de isolados de *Enterococcus faecium* (EFM 55, 67, 9A, 16A, 19A e 44) frente aos patógenos *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) 3001, *E. Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Listeria monocytogenes* CDC 4555.....38
- Tabela 4.** Sensibilidade dos isolados de *E. faecium* frente aos medicamentos.....41
- Tabela 5.** Atividade proteolítica das cepas de *E. faecium* em estudo incubados nas temperaturas de 20 e 42°C nos tempos 24, 48 e 120 h.....43

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AMP- Ampicilina  
BAL- Bactéria Ácido Lática  
BHI- Brain Heart Infusion  
CIM-Concentração Inibitória Mínima  
CIP- Ciprofloxacina  
CLO- Cloranfenicol  
ECA- Enzima Conversora de Angiotensina  
IE- Índice Enzimático  
ERI- Eritromicina  
GEN- Gentamicina  
MRS- Man Rogosa e ágar Sharp  
ONPG- o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosose  
PCA- Plate Count Agar  
pH- Potencial Hidrogeniônico  
TET- Tetraciclina  
VAN- Vancomicina

## **LISTA DE SIGLAS**

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
GRAS - Generally Recognized as Safe  
CLSI- Clinical Laboratory Standard Institute

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	12
2.1. OBJETIVO GERAL .....	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
3.1. PROBIÓTICOS .....	13
3.2. EFEITOS BENÉFICOS DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS.....	16
3.3. PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS E A DEMANDA POR PRODUTOS FUNCIONAIS.....	18
3.4. O GÊNERO <i>Enterococcus</i> spp.....	22
3.5. <i>Enterococcus</i> COMO PROBIÓTICOS E PROPRIEDADES ANTAGÔNICAS ...	24
3.6. PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DO <i>Enterococcus faecium</i> .....	27
3.7. RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS <i>Enterococcus faecium</i> A ANTIBIÓTICOS .....	28
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
4.1. ISOLADOS BACTERIANOS UTILIZADOS.....	31
4.2. REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS .....	31
4.3. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO .....	32
4.4. ATIVIDADE ANTAGONISTA.....	32
4.5. RESISTÊNCIA A MEDICAMENTOS .....	33
4.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E LIPOLÍTICA.....	34
4.7. DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DA ENZIMA BETA-GALACTOSIDASE.....	35
4.8. CAPACIDADE DE ACIDIFICAÇÃO .....	35
4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	35
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	37
5.1. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANO.....	37
5.3. RESISTÊNCIA DE <i>Enterococcus faecium</i> FRENTE A MEDICAMENTOS .....	42
5.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	44
5.5. DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DA ENZIMA BETA-GALACTOSIDASE.....	45
5.6. CAPACIDADE DE ACIDIFICAÇÃO .....	45
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	51
REFERÊNCIAS .....	52

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos acerca de novos isolados de bactérias ácido lácticas (BAL) com propriedades benéficas tem emergido nos últimos anos. Tais probióticos são efetivos na prevenção e no tratamento de doenças, despontando como uma ferramenta importante na manutenção da saúde humana e animal (KHALKHALI; MOJGANI, 2018). Portanto, o emprego probiótico das BALs apresenta elevado potencial tecnológico tanto para a indústria e segurança microbiológica de alimentos, quanto para o comércio internacional, considerando as propriedades antagônicas dessas bactérias (SETTANNI; CORSETTI, 2010).

Os benefícios variam, dependendo do tipo do probiótico a ser consumido, porém os especialistas recomendam o consumo frequente do produto funcional visando usufruir dos efeitos benéficos desejados pelo consumidor (INTERNATIONAL FOOD INFORMATION COUNCIL, 2014). Dentre os benefícios destacam-se a melhora na intolerância a lactose, constipação, doença inflamatória intestinal e gastroenterites agudas, as quais são alcançadas em decorrência da melhora no equilíbrio da microbiota intestinal e das defesas contra patógenos (HALÁSZ, 2009).

Os produtos lácteos compõem um importante veículo de bactérias probióticas, além de possuírem maior aceitação pelo consumidor (COSTA et al., 2013). A incorporação de probióticos em alimentos como queijos, iogurte, kefir e *buttermilk* é frequente (HALÁSZ, 2009).

O gênero *Enterococcus* possui caráter fermentativo e enzimas proteolíticas, podendo metabolizar peptídeos bioativos com propriedades antimicrobianas e antioxidantes, os quais podem ser aplicados no processamento de alguns produtos lácteos fermentados. Por conseguinte, algumas linhagens dessas bactérias são consideradas microrganismos seguros e potencialmente úteis para a indústria tecnológica de alimentos, exibindo multiplicação rápida em condições de baixa exigência nutricional durante o processamento e armazenamento dos alimentos (GIRAFFA; CARMINATI; NEVIANI, 1997; FERNÁNDEZ et al., 2015).

Baseado neste contexto, o presente trabalho propôs avaliar o perfil tecnológico de seis isolados de *E. faecium* obtidos a partir de queijos artesanais, visando a aplicação como cultura adjunta na elaboração de produtos lácteos fermentados.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar o perfil bioquímico, sensibilidade e atividade antagônica de seis cepas de *Enterococcus faecium*, no intuito de determinar o potencial probiótico na produção de produtos lácteos fermentados.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar o teste de susceptibilidade das cepas frente aos antimicrobianos;
- b) Determinar a atividade antagônica dos isolados de *E. faecium* frente as bactérias patogênicas;
- c) Avaliar a resistência de isolados de *E. faecium* aos medicamentos comerciais de uso clínico;
- d) Analisar a atividade proteolítica, lipolítica e beta-galactosidase dos isolados de *E. faecium*;
- e) Avaliar a capacidade de acidificação dos isolados de *E. faecium*.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. PROBIÓTICOS

Os probióticos, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, promovem benefícios à saúde do indivíduo” (BRASIL, 2018).

O conceito de probiótico foi introduzido pelo Nobel Elie Metchnikoff, “o pai dos probióticos”, no início do século 20. Metchnikoff propôs que o consumo de microrganismos benéficos poderia melhorar a saúde das pessoas, após confirmar tal hipótese, o termo “probióticos” (“para vida”), entrou em vigor (NCCIH, 2018).

Os microrganismos benéficos, ditos probióticos, encontrados no sistema gastrointestinal tem a mesma função que as bactérias comensais, que existem em outros sítios do corpo humano. Esses microrganismos ajudam a manter a microbiota equilibrada, estabilizando as paredes do trato digestivo contra microrganismos indesejáveis ou mesmo produzindo substâncias que inibam seu crescimento. Além disso, os probióticos podem colaborar com o reestabelecimento da microbiota intestinal após uma perturbação causada por antibióticos ou doenças, bem como no processo de digestão e degradação de componentes das proteínas e minerais importantes para o organismo, além de estimular a resposta imune (NCCIH, 2018; SIERRA, 2017).

Os critérios para classificar um microrganismo como probiótico incluem este ser naturalmente constituinte da microbiota do trato intestinal humano, não ser patogênico, ser resistente ao processamento, apresentar estabilidade e viabilidade após exposição aos sucos digestivos, capacidade de aderir, permanecer e colonizar, ao menos temporariamente, às células epiteliais do trato gastrointestinal humano (OLIVEIRA et al., 2002). Além disso, eles não podem produzir toxinas, devem promover o controle de microrganismos patogênicos por meio de múltiplos mecanismos, e se possível contribuir na atividade metabólica do intestino (NOGUEIRA, 2011; SZAJEWSKA et al., 2006; FERNADES et al., 2015).

Quando os probióticos são administrados oralmente devem ser protegidos de diversos fatores como o pH ácido do estômago, enzimas digestivas, sais biliares, entre outros (DIVYA; NAMPOOTHIRI, 2015).

Os probióticos podem ser incorporados em alimentos como iogurte, queijo, sorvetes, cereais matinais, salsichas, carnes, chocolates, pudins e também vendidos como cápsulas, pós e comprimidos de células liofilizadas (BEENA DIVYA et al., 2012). Todavia, as formas mais comuns de alimentos que contém microrganismos probióticos são os fermentados na forma de iogurtes e também suplementos (BEENA DIVYA et al., 2012). Independentemente da forma como esses microrganismos são consumidos, para que tragam benefícios a saúde do indivíduo é necessário que esses alimentos contenham um número suficiente de organismos vivos (BEENA DIVYA et al., 2012; KHALIGHI; BEHDANI; KOUHESTANI, 2016). Desta forma, para que hajam efeitos benéficos recomenda-se consumir em torno de  $10^7$  a  $10^{11}$  bactérias viáveis ao dia (KHALIGHI; BEHDANI; KOUHESTANI, 2016).

Nos últimos anos, pesquisas na área de probióticos avançaram significativamente na seleção e caracterização de culturas específicas, confirmando seus benefícios para a saúde humana (BEENA DIVYA et al., 2012). As cepas mais frequentemente usadas como probióticos incluem as bactérias ácido lácticas e bifidobactérias, além de algumas leveduras (BERMUDEZ-BRITO et al., 2012). Os gêneros mais comumente utilizados como probióticos são os *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* e as espécies *Bacillus coagulans*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium* e *Saccharomyces cerevisiae* (KHALIGHI; BEHDANI; KOUHESTANI, 2016). Contudo, outros microrganismos dos gêneros *Escherichia*, *Propionibacterium* e *Enterococcus* também tem sido investigados como probióticos, apresentando resultados promissores (ANDRABI et al., 2016; BAJAJ; CLAES; LEBEER, 2015; FONTANA et al., 2013).

Os estudos com o gênero *Escherichia* avançaram proeminentemente no início do século 20, quando Alfred Nissle em 1916, observou em laboratório que isolados de *E. coli* provenientes da microbiota de indivíduos saudáveis eram capazes de inibir o crescimento de *Salmonella* e cepas enteropatogênicas. Implementando o termo “atividade antagônica”, e estabelecendo um “índice antagônico”, classificando a atividade antagônica observada em forte ou fraca (SONNENBORN, 2016).

Nissle isolou e caracterizou a cepa *E. coli* em 1917, instituindo seu uso como probiótico na Alemanha, visto o efeito antagônico comprovado frente a bactérias e leveduras patogênicas, bem como o aumento na resistência da colonização intestinal (SONNENBORN, 2016). Ao decorrer dos anos, estudo de engenharia genética vem aprimorando este isolado, alavancando suas propriedades terapêuticas (HWANG et



al., 2017). Ademais outros isolados de *E.coli* (ED1 e M63), vem apresentando potencial probiótico em teste *in vivo* (MOURAND et al., 2017).

No Brasil até junho de 2018, a Anvisa mantinha uma lista com as bactérias aprovadas para serem utilizadas como probióticos. O órgão passou por uma série de mudanças para os modelos e processos regulatórios a serem adotados por todos os setores da indústria. Entre as principais mudanças, foi estipulado que todos os produtos destinados a alimentação de pessoas saudáveis, como nutrientes, substâncias bioativas, enzimas ou probióticos, são enquadrados como suplementos alimentares e devem atender as novas regras de rotulagem, qualidade, segurança e composição (MAIA, 2019). Um dos marcos mais significativo encontra-se na resolução da diretoria colegiada RDC Nº 241 de 26 de julho de 2018 que trata sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. A resolução esclarece que o uso de probióticos em alimentos requer a comprovação da sua segurança e benefícios à saúde, para tanto será necessário protocolar uma petição de avaliação de segurança e eficácia. A avaliação efetuada contempla três elementos principais: comprovação inequívoca da identidade da linhagem do microrganismo, de sua segurança e de seu efeito benéfico (BRASIL, 2019).

Os microrganismos potencialmente probióticos têm variações em níveis de cepa, espécie e gênero; assim, os benefícios de saúde associados a um determinado gênero ou espécie não podem ser essencialmente extrapolados para outros membros do mesmo gênero/espécie (ANDRABI et al., 2016). A RDC Nº 241 da Anvisa determina que para a caracterização e identificação inequívoca da linhagem do microrganismo a ser avaliado como probiótico, documentos técnicos ou estudos científicos que identifiquem a espécie devem ser considerados, adotando para tal a nomenclatura binomial mais atual. Com a finalidade de identificar e caracterizar a linhagem, por meio de métodos genotípicos e fenotípicos que especifiquem a origem da linhagem e comprovem o depósito da linhagem em uma coleção de cultura internacionalmente reconhecida (BRASIL, 2018).

Diversas bactérias ácido lácticas são seguras para a ingestão alimentar humana, contudo há relatos isolados de infecções sistêmicas, como sepse, endocardite, e abscesso hepático, diante disso são necessários estudos rigorosos para a inclusão de novas espécies para uso humano (BAJAJ; CLAES; LEBEER., 2015). A ANVISA determina que todos os produtos probióticos devem ter sua

segurança de uso testada e também ter seu efeito fisiológico e metabólico comprovado antes da sua comercialização (RESENDE et al., 2013). Ainda na resolução RDC Nº 241, a comprovação da segurança deve ser realizada por meio de documentos técnicos ou estudos científicos que demonstrem histórico de uso seguro; ausência de registros de eventos adversos relevantes, obtidos a partir de estudos clínicos ou vigilância pós-uso; ausência de fatores de virulência e patogenicidade relevantes para a saúde humana; ausência de produção de substâncias ou metabólitos que representem risco à saúde humana; ausência de resistência potencialmente transferível a antibióticos relevantes para a saúde humana; e susceptibilidade a, pelo menos, dois antibióticos para que em caso de infecções haja tratamento disponível e eficaz. (BRASIL, 2019).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e, em menor escala, *E. faecium*, são mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos, uma vez que elas têm sido isoladas de todas as porções do trato gastrointestinal do humano saudável (SAAD, 2006).

### 3.2. EFEITOS BENÉFICOS DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

Os probióticos são utilizados em todo o mundo visando à melhoria de diversas funções do trato gastrointestinal, contudo esses microrganismos podem ir além da manutenção da saúde. Atuando potencialmente na síntese de vitaminas como niacina, riboflavina, vitaminas B6, B12 e ácido fólico, prevenção da síndrome do cólon irritável, câncer de estômago, de cólon e de fígado, prevenção e tratamento de vários tipos de diarreia, auxílio na tolerância a lactose, imunomodulação, alívio em alergias e doenças atópicas (BAJAJ; CLAES; LEBEER., 2015; SIERRA, 2017; GARG, 2015).

Os microrganismos probióticos desempenham ainda diversas funções altamente benéficas para o organismo hospedeiro, como, efeito antioxidante, produção de compostos antimicrobianos, redução do colesterol, restauração da microbiota depois do tratamento com antibióticos, melhora nas funções intestinais e atuação na destruição de patógenos (BEENA DIVYA et al., 2012).

Os probióticos podem contribuir na digestibilidade de proteínas de derivados lácteos, bem como na hidrólise da lactose, durante o processamento do produto lácteo e ao longo do trato digestivo. Deste modo, a promoção do acesso aos produtos lácteos

pelos pacientes que possuem intolerância a lactose, emerge como uma alternativa para recompor a qualidade de vida desses indivíduos (PARVEZ et al., 2006).

Os probióticos exibem um efeito direto no intestino frente o tratamento de inflamações (PARVEZ et al., 2006). O uso de probióticos pode melhorar também o fluxo intestinal em pacientes com a síndrome do cólon irritável, sendo recomendado o consumo destes alimentos por mais de quatro semanas (QUIGLEY, 2015; SANTOS; WHORWELL, 2018).

Em sua revisão Cameron et al.(2017), também indica a administração de probióticos juntamente com reidratação oral em crianças com gastroenterites, indica também que em crianças hospitalizadas o uso de probióticos é recomendado para a prevenção de diarreia e infecções intestinais. Os probióticos previnem infecções do trato gastrointestinal devido à competição por sítios de ligação nas células epiteliais com bactérias patogênicas (PARVEZ et al., 2006).

O uso de probióticos também é indicado em casos de cólica em crianças, no tratamento contra *Helicobacter pylori* (GARG, 2015), bem como diarreia associada ao uso de antibióticos, com a finalidade de reconstituir a microbiota intestinal (CAMERON et al., 2017).

Estudos *in vivo* e *in vitro* fornecem consideráveis evidências de que os probióticos têm efeitos anticarcinogênico, principalmente o câncer de cólon (DENIPOTE; TRINDADE; BURINI, 2010; KUMAR; DHANDA, 2017). Entre as hipóteses de como os probióticos atuam contra a proliferação das células do câncer, está a de que eles diminuem a exposição do hospedeiro a compostos carcinogênicos. Os mecanismos, supostamente envolvidos são a alteração do ambiente intestinal e desse modo diminuindo o número de bactérias que podem vir a produzir metabólitos tóxicos; produção de metabólitos que melhoram a capacidade de uma célula morrer quando deve morrer (processo conhecido como apoptose); produção de compostos que inibem o crescimento tumoral; e também a estimulação do sistema imune contra a proliferação de células do câncer (PARVEZ et al., 2006).

Os probióticos podem atuar na regulação de respostas anti-inflamatórias e no controle de inflamações associadas a doenças como: colite ulcerosa, alergias, dermatites e câncer (YAHFOUFI et al., 2018). O teste *in vivo* com o probiótico *Lactobacillus* comprovou que os microrganismos promoveram benefícios no hospedeiro, regulando a resposta imune (REN et al., 2015)

A ação imunomoduladora causada pelo consumo de probióticos é complexa, pois envolvem relações entre intestino, tecidos linfóides associados ao intestino, células do sistema imune, entre outras células. Essa relação também envolve a presença de citocinas, metabólitos e a interferência da microbiota (YAHFOUFI et al., 2018). A resposta do sistema imune adaptativo e inato vinculado a receptores específicos em células do sistema imune e outros tecidos como o tecido do epitélio intestinal, parece também atuar na modulação, desse modo diferentes cepas podem modular o sistema imune de diferentes formas (QUINTO et al., 2014).

Os microrganismos probióticos participam também da resistência a colonização de bactérias patogênicas, dado que as bactérias benéficas do trato gastrointestinal atacam as bactérias patogênicas, por competição de sítio de adesão a mucosa intestinal (SIERRA, 2017). Visto isso, pode-se afirmar os efeitos benéficos de microrganismos probióticos, justificando seu uso e incorporação em diversas preparações alimentares.

### 3.3. PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DOS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS E A DEMANDA POR PRODUTOS FUNCIONAIS.

O uso de alimentos e suplementos que contém microrganismos probióticos tem crescido em todo o mundo. A demanda por probióticos é crescente devido a conscientização dos efeitos benéficos desses alimentos para a saúde humana, aliada a inovação / elaboração de produtos diversificados e atrativos do ponto de vista de sensorial (SAAD et al, 2008).

Dentre os alimentos funcionais acrescidos de probióticos estão os leites fermentados, iogurtes e queijos. Segundo a agência Euromonitor, espera-se um crescimento do setor de alimentos funcionais de 7%, previsto entre os anos de 2015 e 2020, fazendo com que esse mercado chegue a US \$ 64 bilhões (EUROMONITOR, 2018).

O Brasil é um dos países líderes em produção e consumo de alimentos funcionais, apresentando uma expansão progressiva de mercado, em torno de 10% ao ano, três vezes mais que o mercado de alimentos convencionais (EUROMONITOR, 2018). Em uma pesquisa com 450 consumidores no Sul do Brasil, revelou um mercado ainda incipiente para alimentos funcionais. Todavia, mesmo com poucos produtos funcionais no mercado gaúcho, os consumidores têm sido atraídos,

indicando que o mercado de alimentos funcionais e probióticos é promissor no Sul do país (BARCELLOS; LIONELLO, 2011).

A inovação, particularmente na indústria alimentícia, é uma importante fonte de diferenciação e uma oportunidade para agregar no desenvolvimento de novos produtos. Desse modo, a inovação é uma vantagem na competição por mercado no setor alimentar (BARCELLOS; LIONELLO, 2011). Ao longo do tempo, novos produtos contendo probióticos devem emergir como barras de cereais, cereais, sucos, fórmulas infantis e queijos (PARVEZ et al., 2006). Produtos alimentícios como os laticínios contribuem para a sobrevivência dos probióticos ao suco gástrico particularmente pelo seu efeito tamponante e protetor (ROSS; DESMOND; STANTON, 2003), devido a isto inúmeros laticínios probióticos estão disponíveis comercialmente e a variedade destes produtos continua em expansão (STANTON et al., 2003). Contudo, o leite fermentado é a primeira escolha para a fabricação e veiculação de bactérias probióticas devido à aceitabilidade e também a praticidade no consumo desses alimentos (BRUNARI; SALOTTI-SOUZA, 2017).

Para que um produto com propriedades probióticas seja fabricado e comercializado ele necessita ter suas propriedades benéficas à saúde e segurança alimentar cientificamente validadas. A seleção do microrganismo probiótico é essencial para a obtenção de bons resultados, com isso três características importantes devem ser observadas, a segurança, as características funcionais e as características tecnológicas (BALLUS et al., 2010). Com relação à segurança os microrganismos devem ser estudados quanto à virulência e susceptibilidade a antibióticos, para dar ao consumidor final garantias de que o alimento é seguro.

Uma seleção de cepas deve ser conduzida para o processamento de produtos probióticos. Essa seleção visa garantir a sobrevivência desses microrganismos à passagem pelo trato gastrointestinal, após a manutenção de sua viabilidade o próprio produto-alvo, durante a sua elaboração e o seu armazenamento, bem como conferir propriedades tecnológicas adequadas a esse produto. O veículo alimentício escolhido para a incorporação de cepas probióticas deve ser cuidadosamente estudado para a seleção conveniente da cepa probiótica-veículo, particularmente nos produtos fermentados, para as quais a multiplicação dos probióticos pode resultar em características não peculiares ou mesmo indesejáveis ao produto (SAAD et al., 2008). Assim todos os aspectos relacionados a obtenção das cepas probióticas, para sua posterior adição aos produtos alimentícios devem ser analisados, pois as tecnologias

de fermentação, de secagem, microencapsulação das culturas influenciam significativamente a funcionalidade dos probióticos (CAMPAGNE; GARDNER; ROY, 2005).

Dentre as características funcionais o microrganismo escolhido deve ter tolerância a sais biliares, a altas concentrações de cloreto de sódio e a valores baixos de pH, além de atividade antibacteriana contra patógenos humanos, produção enzimática (amilase, lipase, protease), aderência a mucina, potencial de hidrofobicidade e sensibilidade a antimicrobianos (DIVYA et al., 2012).

Dentre as propriedades tecnológicas estão à capacidade de produção em larga escala, incorporação a produtos alimentares sem perda da sua viabilidade e funcionalidade e sem características desagradáveis de sabor ou textura. Os microrganismos probióticos ainda devem ter alta taxa de sobrevivência a processos posteriores e também ao armazenamento. Alta sobrevivência após a passagem pelo trato gastrointestinal e alta atividade no ambiente intestinal são muito importantes (O'CONNOR et al., 2015; LACROIX; YILDIRIM, 2007; OLIVEIRA et al., 2002).

Novas pesquisas em tecnologia de alimentos para o desenvolvimento de produtos de qualidade devem incluir a escolha de cepas específicas e compatíveis ao processo de fabricação do produto. A composição do substrato alimentar como conteúdo de gorduras, tipo de proteínas, carboidratos e pH podem afetar o crescimento e sobrevivência das culturas probióticas (LACROIX; YILDIRIM, 2007).

O leite é o principal meio de veiculação de probióticos, já que permite a viabilidade funcional desses microrganismos. Contudo, outros produtos não lácteos como cereais, vegetais (soja), legumes e frutas podem ser usados potencialmente em processos fermentativos com adição de microrganismos probióticos (MISHRA; MISHRA, 2012).

Para que seja satisfatório o processo de obtenção de um produto final com características ideais de textura, pH, aroma e sabor deve ser feita uma boa combinação entre a cultura *starter* com as bactérias probióticas (OLIVEIRA et al., 2002). Uma cultura *starter* pode ser definida como uma preparação microbiana contendo um grande número de células de pelo menos um organismo a ser adicionado a matéria-prima para produzir um produto alimentício fermentado. O papel central de bactérias lácteas nessa técnica está no fato de acelerar e conduzir o processo fermentativo (LEROY; DE VUYST, 2004). Por exemplo, para produtos em que o leite

é a base, cepas de probióticos são misturadas a *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* para alcançar o sabor e textura desejados (SAARELA; MOGENSEN; FONDE, 2000).

As culturas *starter* convencionais podem ser substituídas ou associadas a culturas probióticas. Ação dos probióticos nas fermentações durante a elaboração de produtos lácteos pode resultar em características favoráveis, tais como a conservação do leite (resultante da produção de ácido láctico e de outros compostos antimicrobianos); produção de compostos aromáticos (como acetaldeído em iogurte e queijo) que vão suprir o produto com as propriedades sensoriais desejadas pelo consumidor; melhoria no valor nutricional do produto alimentício através de liberação de aminoácidos livres ou da síntese de vitaminas e por fim o fornecimento de propriedades terapêuticas ou profiláticas (PARVEZ et al., 2006).

No desenvolvimento de novos produtos que contenham organismos probióticos, as etapas durante todo o processamento e estocagem até chegar às mãos do consumidor devem ser rigorosamente avaliadas. Durante a fermentação deve-se cuidar da composição do meio de crescimento, oxigênio dissolvido e a massa de células. Durante o processamento, deve-se estar atento a processos mecânicos que podem causar estresse ao microrganismo e temperaturas extremas. Na estocagem, a acidez do meio, competição com outros microrganismos no produto e temperatura são dignos de atenção (LACROIX; YILDIRIM, 2007).

A viabilidade durante todo o processamento e armazenamento representam desafios tecnológicos significantes, uma vez que muitas bactérias probióticas são sensíveis a exposição de oxigênio, calor e ácidos. Consequentemente em alimentos fermentados, o pH tende a ser baixo e o desempenho destes microrganismos é baixo. Devido a isto, produtos com uma menor vida de prateleira como o iogurte e leite fermentados são os mais comumente utilizados como veículos de probióticos, apesar de já existir produtos probióticos com maior vida de prateleira como o queijo tipo Cheddar (STANTON et al., 2003).

Ao final do processo de produção é importante que haja uma concentração aceitável de células de probióticos para que o alimento possa ter as características funcionais que são atribuídas ao produto (SAARELA; MOGENSEN; FONDE, 2000). A viabilidade dos microrganismos probióticos é parâmetro essencial para o desenvolvimento de alimentos probióticos, os produtos probióticos devem conter pelo menos  $10^6$  a  $10^7$  unidades formadoras de colônia (UFC)/g da bactéria probiótica, ou

$10^8$  a  $10^9$  UFC, somado de um consumo diário de no mínimo 100 g ou 100 mL do alimento para ter efeito terapêutico (FLACH et al., 2017).

Para que os microrganismos probióticos cheguem ao seu destino final ainda com viabilidade e um bom número de organismos a microencapsulação é uma alternativa (SIMEONI; MENEZES; MARTINS, 2014). A microencapsulação dos microrganismos probióticos pode garantir uma alta viabilidade após a passagem dos microrganismos pelo trato gastrointestinal. Essa fornece uma barreira física ao probiótico, defendendo-o das condições ambientais do intestino e permitindo que um número maior de células viáveis chegue ao destino (DIVYA; NAMPOOTHIRI, 2015; SIMEONI; MENEZES; MARTINS, 2014).

#### 3.4. O GÊNERO *Enterococcus* spp.

*Enterococcus* são bactérias Gram-positivas, cocos ovais e anaeróbias facultativas, que colonizam o intestino humano e de animais domésticos, mas podem ser encontradas no ambiente, como no solo, água, plantas, animais selvagens, pássaros e insetos (HAMMERUM, 2012). Existem 58 espécies descritas de *Enterococcus*, sendo duas subespécies. Dentro do gênero as espécies mais estudadas e predominantes no trato gastrointestinal são *E. faecalis* e *E. faecium* (FRANZ et al., 2003).

A maioria dos *Enterococcus* têm sua temperatura ótima em torno de 35°C, mas com variação entre espécies de 10°C a 45°C. Estes microrganismos são altamente ubíquos, sendo resistentes a concentrações elevadas de NaCl, chegando a resistir até 6,5%, bem como a extensivas variações no pH, que podem chegar a 9,6 (FOULQUIÉ MORENO et al., 2006). Além dessas características citadas, o *E. faecium* destaca-se por ter um tempo de geração de 19 minutos, diferente do *Lactobacillus* e o *Bifidobacterium* que é de aproximadamente 60 minutos. Com reprodução três vezes mais rápida, seu efeito na remoção de floras patogênicas nos intestinos, é mais efetivo. Além disso, é mais resistente ao ácido do estômago, sendo menos inibido quando veiculado por suplemento oral, resultando na colonização mais rápida das paredes intestinais (VAHJEN et al., 2005; POLLMAN et al., 2005). A atividade benéfica relatada em vários estudos refere-se ao aumento na absorção intestinal de nutrientes em relação aos demais microrganismos, quando comparada com os *Lactobacillus* (REDONDO, 2008).



*Enterococcus* spp. pertence ao grupo das bactérias ácido lácticas (BAL), extremamente importantes na área de alimentos, principalmente em produtos fermentados, como queijos e outros produtos derivados da fermentação do leite. A presença de *Enterococcus* nessas preparações contribui diretamente para o sabor de queijos da região do Mediterrâneo, por exemplo, e também para a maturação de embutidos, azeitonas e vegetais, contribuindo para a formação de seus sabores específicos (FOULQUIÉ MORENO et al., 2006; FRANZ et al., 2003). Em produtos lácteos são utilizados na melhoria dos procedimentos tecnológicos do sabor e da conservação, evitando o crescimento de patógenos (GIRAFFA, 2003).

Há espécies de *Enterococcus* com longa história de uso seguro no processamento de alimentos de grande interesse biotecnológico, devido à produção de bacteriocinas, além de outras características probióticas (REDONDO, 2008). Apesar de várias pesquisas terem demonstrado a importância dos *Enterococcus* na fermentação de alimentos, garantindo a qualidade sensorial dos produtos, seu uso ainda é muito controverso. *Enterococcus* spp. também são causadores de diversas infecções do trato gastrointestinal, urinário, endocardites e septicemias (FRANZ et al., 2003). Em hospitais, espécies do gênero *Enterococcus* spp. são consideradas patógenos oportunistas, pois podem vir a causar infecções em pacientes imunocomprometidos (CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA; ZADERNOWSKA; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, 2017).

Entre as espécies de *Enterococcus* observa-se a ocorrência natural de resistência a várias classes de antimicrobianos (ORSI; CIORBA, 2013). Em *E. faecalis* e *E. faecium*, as espécies de maior importância clínica, observa-se resistência intrínseca às cefalosporinas, resistência a baixas concentrações de aminoglicosídeos, lincosamidas e monobactâmicos (ARIAS; MURRAY, 2012; HAMMERUM, 2012).

A resistência adquirida aos aminoglicosídeos, penicilinas (principalmente ampicilina) e ao glicopeptídeo vancomicina causa prejuízo no tratamento de infecções por *Enterococcus* spp, uma vez que esses antimicrobianos são amplamente utilizados, e à vancomicina é o antimicrobiano mais indicado para tratamento de infecções por cepas multirresistentes (WILLEMS et al., 2011).

### 3.5. *Enterococcus* COMO PROBIÓTICOS E PROPRIEDADES ANTAGÔNICAS

As bactérias do gênero *Enterococcus* spp. tem sido intensamente estudadas visando comprovar características probióticas. Durante muitos anos *E. faecium* foi confundido com *E. faecalis* como uma espécie potencialmente patogênica, o que acabou prejudicando o andamento das pesquisas sobre as propriedades benéficas ao organismo humano por *E. faecium* (ECOLOGY HEALTH CENTER, 2011).

Isolados de *E. faecium* mostraram-se capazes de sobreviver nas condições encontradas no estômago, sendo submetidos ao *stress* ácido (pH 3,0) e exposição a pancreatina, sendo resistentes a 3 e 4 horas de exposição respectivamente (BRANDALIZE, 2013). Além de sobreviver em condições estomacais, cepas de *E. faecium* foram capazes de aderir ao epitélio intestinal e de impedir cerca de 60% a adesão de *E. coli* O157:H7 (REDONDO, 2008).

Nesse contexto estudos têm sido realizados para comprovar a atividade benéfica de cepas de *Enterococcus* com potencial para uso biotecnológico. Desde fevereiro de 2004, a União Europeia autorizou o uso de 9 variedades diferentes de *E. faecium* em alimentos (MORENO et al., 2006; SIM et al., 2018). Cepas de *E. faecium* SF 68 foram eficientes na redução da duração de diarreia em adultos e melhoraram significativamente as funções imunológicas, humorais e celulares em cães. Na Dinamarca, um leite fermentado contendo *E. faecium* em sua formulação tem sido comercializado há vários anos devido ao seu efeito hipocolesterolêmico em indivíduos (MORENO et al., 2006).

Nascimento (2017) relata que no caso de leite fermentado por *E. faecium*, a concentração de metabólitos e o tempo de estocagem contribui com o aumento da capacidade antioxidante, promovendo o sequestro de radicais livres. O autor menciona que a cepa de *E. faecium* SJRP20 potencialmente probiótica reúne as melhores características tecnológicas para utilização em produtos lácteos funcionais.

Segundo Bedani (2008), a aplicação de cultivos de *E. faecium* em “iogurte” de soja, mostrou que este microrganismo foi capaz de se manter no cólon de animais mesmo após 15 dias do término da administração do produto. De maneira geral, o estudo do referido autor demonstrou que o “iogurte” de soja fermentado com o *E. faecium* CRL 183, tem o potencial para reduzir o risco de câncer de cólon, principalmente pela sua capacidade de modular benéficamente a microbiota intestinal, aumentando a população de *Lactobacillus* spp. e reduzindo a de *Bacteroides* spp.,

além de diminuir a atividade das enzimas  $\beta$ -glucoronidase, azorredutase e nitrorredutase.

Estudos com as cepas de *E. faecium* têm sido desenvolvidos para avaliar seu uso potencial em preparações probióticas. A cepa *E. faecium* L11 ativou o sistema imune intestinal, diminuiu a expressão de genes relacionados ao envelhecimento, resultando no aprimoramento do sistema de defesa do organismo (SIM et al., 2018). A cepa *E. faecium* k1, extraída do Kalarei, um leite fermentado indígena, produziu polissacarídeos que tem alto valor bioativo como, diminuição do colesterol e capacidade antioxidante, revelando sua potencial aplicação na indústria de alimentos ou farmacêutica (BHAT; BAJAJ, 2018).

Os mecanismos de ação dos microrganismos probióticos que promovem respostas antagônicas no crescimento de patógenos na flora intestinal humana, ainda não são bem conhecidos. Pressupõe-se que aderência competitiva à mucosa e epitélio, fortalecimento da barreira epitelial intestinal, secreção de substâncias antimicrobianas e modulação do sistema imunológico sejam alguns dos fatores que podem interferir no crescimento de patógenos na flora intestinal (BERMUDEZ-BRITO et al., 2012).

Organismos patogênicos quando chegam ao trato gastrointestinal devem se associar ao epitélio para que a colonização seja efetiva. Contudo, algumas cepas de probióticos que estão aderidas ao epitélio constituem uma barreira impedindo que organismos patogênicos se alojem (FULLER; GIBSON, 1997; KHALIGHI; BEHDANI; KOUHESTANI, 2016).

Ao longo da mucosa intestinal, microrganismos e diversos corpos estranhos interagem com as células de defesa do hospedeiro, essa interação estimula o sistema de defesa, desencadeando uma resposta imune pela ação dos microrganismos probióticos (PARVEZ et al., 2006).

A contribuição de *Enterococcus* às características sensoriais dos alimentos fermentados e sua habilidade em produzir bacteriocinas são importantes características para sua aplicação na tecnologia de alimentos, e do seu uso potencial como aditivo seguro para a conservação dos alimentos (FOULQUIÉ MORENO et al., 2006).

As bacteriocinas são peptídeos pequenos, termoestáveis, com espectro de ação antimicrobiano diverso, podendo inibir o crescimento de bactérias patogênicas Gram-positivas, leveduras e algumas espécies de bactérias Gram-negativas. Diversas

espécies de BAL já foram testadas quanto ao seu potencial de produção de bacteriocinas, tais como *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. mundtii*, *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.*, *Pediococcus sp.*, *Carnobacterium piscicola*, entre outras (CLEVELAND et al., 2001; DHEWA, 2012). A ação antagônica contra patógenos do sistema gastrointestinal é importante para que os probióticos desempenhem a função de auxiliar na defesa do organismo contra invasores.

A secreção de substâncias bactericidas é importante para a eliminação de organismos não desejados na flora intestinal. As bacteriocinas constituem o principal mecanismo de defesa contra patógenos, contudo, outras substâncias, como peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e ácidos graxos de cadeia curtas, entre outras substâncias também são efetivas (BAJAJ; CLAES; LEBEER, 2015; KHALIGHI; BEHDANI; KOUHESTANI, 2016).

Braik et al. (2018) verificou que cepas de *Enterococcus* produzem altas quantidades de peróxido de hidrogênio, usado-o como mecanismo de defesa contra patógenos. *E. faecium* apresentou ação antimicrobiana contra patógenos comuns em alimentos como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *L. innocua*, comprovando sua eficiência na preservação de produtos probióticos (BARBOSA; BORGES; TEIXEIRA, 2014; SIM et al., 2018). Cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* isoladas de produtos lácteos também apresentaram atividade antibacteriana contra *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica* Typhimurium, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Y. enterocolitica* e *S. aureus* (GARCÍA-CANO et al., 2014).

Apesar da produção de bacteriocinas por *E. faecium* e *E. faecalis* ser conhecida há anos, o interesse por estes microrganismos vem recebendo mais atenção recentemente, após o reconhecimento da sua ação bactericida sobre algumas espécies de *Listeria spp* e *Clostridium spp* (GIRAFFA; CARMINATI; NEVIANI, 1997). Aspri e colaboradores (2017), também constataram que bacteriocinas produzidas por cepas de *E. faecium* apresentaram ação bactericida e bacteriostática contra cepas de *L. monocytogenes*. Essas enterocinas apresentaram termoestabilidade, fator importante para o emprego como conservante em alimentos (TULINI; GOMES; DE MARTINIS, 2011).

Apesar de vários pesquisadores terem demonstrado os benefícios do uso de *Enterococcus* na produção de alimentos, é necessário ter muita cautela no processo de comprovação deste gênero como probiótico, visto que esses podem transferir genes de resistência a outras bactérias no trato gastrointestinal, alterando o perfil de

sensibilidade das cepas nativas. Desta forma, faz-se necessário um detalhamento prévio do perfil de suscetibilidade, virulência e patogenicidade das cepas potencialmente probióticas (FRANZ et al., 2003).

### 3.6. PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DO *Enterococcus faecium*

*Enterococcus* spp participa como cultura adjunta nos produtos lácteos e cárneos fermentados contribuindo com a melhora em vários atributos sensoriais (FOLQUIÉ- MORENO et al., 2006; MORENO et al., 2006). O desenvolvimento de características sensoriais e organolépticas desejáveis, deve-se pela atividade bioquímica promovidas por reações como a proteólise, lipólise, utilização do citrato e produção de compostos aromáticos voláteis, relacionadas à consistência e aroma característicos. Bem como, pela produção de substâncias que atuam no flavor como diacetil e acetoína, além de enzimas, que durante a maturação e podem contribuir para a consistência e textura dos produtos, além da produção de compostos voláteis importantes (ARAÚJO et al., 2008; GIRAFFA; CARMINATI; NEVIANI, 1997; MANOLOPOULOU et al., 2003; SARANTINOPOULOS et al., 2001).

A presença de *Enterococcus* em produtos lácteos tem sido proposta em decorrência de seu papel relevante no desenvolvimento de aroma e maturação de alguns queijos tradicionais. Essas atividades benéficas foram atribuídas a suas atividades proteolíticas, lipolíticas, esterolíticas, utilização de citrato e produção de compostos aromáticos voláteis (HOLZAPFEL; GUIGAS; FRANZ, 2003; AMARAL et al., 2017).

A atividade proteolítica é altamente desejável para o rápido crescimento de bactérias no leite e contribui para a textura e sabor do queijo (SOUSA et al., 2001). A proteólise consiste na quebra da proteína formando peptídeos de médio e baixo peso molecular e aminoácidos livres, através da ação de enzimas, resultando no sabor e aroma específicos de queijos, bem como na modificação na textura do produto (BEZERRA, 2015).

Em contrapartida, a lipólise é um processo importante principalmente no amadurecimento do queijo devido ao seu papel no desenvolvimento do sabor e textura do produto final (MORANDI et al., 2006). Isto se dá através da hidrólise enzimática dos triglicéridos em ácidos graxos, que podem ser precursores de compostos aromáticos como metilcetonas, álcoois secundários, ésteres e lactonas. *E. faecalis* é

considerada a espécie mais lipolítica, seguida por *E. faecium* e *E. durans* (GIRAFFA, 2003; SARANTINOPOULOS et al., 2001).

Desse modo, estudos inovadores que promovam características aprazíveis de aroma, sabor e textura no produto final, são extremamente importantes na escolha e ingestão pelos consumidores.

### 3.7. RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS *Enterococcus faecium* A ANTIBIÓTICOS

Após sua ingestão os microrganismos probióticos compõe parte da flora intestinal, por esta razão a seleção de novas cepas probióticas deve considerar diversas características que deem segurança aos consumidores desses produtos. Dentre essas, a capacidade da bactéria resistir à exposição aos antimicrobianos deve ser analisada, pois representa uma ameaça à saúde humana e animal (SHARMA et al., 2015).

Dentre as propriedades essenciais aos microrganismos com potencial uso está a suscetibilidade a antibióticos comumente utilizados é a ausência de genes de resistência. O desenvolvimento de resistência a antibióticos é baseado na presença de genes de resistência e pela pressão seletiva realizada pelo uso de antibióticos (QUINTO et al., 2014; SHARMA et al., 2015).

O desenvolvimento de resistência a antibióticos dá-se, predominantemente por dois fatores: intrínseco e/ou por transferência de genes. O fator intrínseco pode ser natural da espécie bacteriana ou adquirido por mutações espontâneas (MATHUR; SINGH, 2005). A transferência horizontal de genes de resistência entre bactérias pode ocorrer pelo processo de conjugação, transdução (por fagos) ou por incorporação do DNA livre no ambiente (transformação) (SHARMA et al., 2015). Quando os probióticos atingem o intestino, eles interagem com a microbiota, criando um ambiente favorável a transferência de genes de resistência a antibióticos para bactérias comensais ou patogênicas presentes no trato gastrintestinal (QUINTO et al., 2014). Desse modo, é indesejável que culturas probióticas possuam genes de resistência, pois além da incapacidade de combatê-las elas podem transferir esses genes para outras bactérias patogênicas.

*Enterococcus* tem mostrado que cepas de diversas origens, possuem fatores de virulência e resistência a antibióticos (FRANZ et al., 2003). Cepas dos principais

probióticos utilizados na indústria alimentícia, dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* apresentaram resistência a diversos antibióticos de referência no mercado, como vancomicina, tetraciclina, estreptomicina, polimixina B, ampicilina, penicilina, cloranfenicol, entre outros (MATHUR; SINGH, 2005). Em um estudo com 87 cepas de *E. faecalis*, foi observada alta resistência a gentamicina e tetraciclina, sendo 6% dos isolados multirresistentes. No entanto, todas as foram suscetíveis a ampicilina (CARNEIRO, 2015).

A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, por *Enterococcus* é convencionalmente atribuída a presença de  $\beta$ -lactamases e a expressão de uma proteína de ligação à penicilina de baixa afinidade (*penicillin-binding protein-PBP*), denominada PBP4 em *E. faecalis* e PBP5 em *E. faecium*. Isolados que contêm esses genes exibem alteração na concentração inibitória mínima (CIM) aos  $\beta$ -lactâmicos (GARCÍA-SOLACHE; RICE, 2019).

A vancomicina é um glicopeptídeo usado no tratamento de doenças causadas por bactérias Gram-positivas ou em casos de alergia aos  $\beta$ -lactâmicos. *Enterococcus* sp. tem apresentado resistência crescente à vancomicina, as quais em sua maioria são atribuídas a alterações na síntese da parede celular que interferem na ação do antimicrobiano (TAVARES, 2009). Nove operons de resistência à vancomicina foram descritos nas últimas décadas, predominantemente em isolados clínicos. Estes operons estão divididos em duas categorias: os que substituem o domínio terminal D-Ala por um D-lactato (*vanA*, *vanB*, *vanD* e *vanM*) e aqueles que substituem o D-Ala terminal por uma D-serina (*vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL* e *vanN*). Os operons do tipo D-Lac, codificam os níveis mais altos de resistência à vancomicina (GARCÍA-SOLACHE; RIC., 2019).

Tal resistência aos agentes antimicrobianos é fruto da necessidade da bactéria de sobreviver e persistir em ambientes altamente competitivos, como o trato gastrointestinal (BIRRI et al., 2013).

Entretanto, ressaltamos que isolados de *Enterococcus* derivados de produtos lácteos tem apresentado alta sensibilidade a maioria dos antibióticos, em particular ampicilina, clindamicina, aminoglicosídeos, eritromicina, cloranfenicol e tetraciclina do que cepas de fonte ambiental ou clínicas (GIRAFFA; CARMINATI; NEVIANI, 1997).

### 3.8. RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS A DROGAS DE DIFERENTES CLASSES

Os pacientes que fazem uso de probióticos podem ser acometidos por outras doenças, sendo estas esporádicas ou não. Assim, é importante determinar o efeito de diversos medicamentos no crescimento de cepas probióticas (TODOROV; DICKS, 2008). Este fator deve ser considerado, pois é possível ocorrer uma interação negativa, reduzindo o efeito desses alimentos funcionais. O CIM da droga é um fator fundamental para sobrevivência e desenvolvimento da cepa probiótica, visto que dose diária da droga consumida deve ser relacionada com o CIM para a BAL probiótica (TODOROV et al., 2011).

Outro ponto a ser considerado é o tratamento de indivíduos com drogas não antibióticas utilizados de forma contínua para tratar, por exemplo, a hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus e/ou problemas de saúde mental. O uso dessas drogas em combinação com o consumo de alimentos probióticos pode gerar uma interação negativa, reduzindo o efeito dos alimentos funcionais (JERONYMO, 2013).

Estudos recentes demonstraram o efeito negativo desses fármacos de uso contínuo frente às bactérias probióticas. Contudo a literatura mostra-se ainda incipiente, não sendo encontrados testes com uma grande variedade de drogas. Em seu trabalho, Jeronymo (2013), demonstrou que 4 cepas de BAL testadas frente a diferentes grupos farmacológicos foram inibidas por anti-inflamatórios (ibuprofeno, cetoprofeno e diclofenaco de potássio), anti-hipertensivos (enalapril) além de anti-histamínico (loratadina). Resultado semelhante foi observado por Todorovov e Dicks (2008) em que o diclofenaco de potássio inibiu *L. plantarum* ST8KT e STD 341LD, *E. faecium* ST311LD e *Lc. Mesenteroides* ST33LD. Em um estudo anterior, o diclofenaco e o ibuprofeno inibiram o *Lactococcus lactis* subsp *lactis* HV219 (TODOROV et al., 2007). Todorov et al. (2007), salientam que é muito importante mencionar que a concentração dessas substâncias medicamentosas é crítica. Além deste fator, em seu experimento, o crescimento dos mesmos isolados tratados com ibuprofeno proveniente de um laboratório diferente não apresentaram inibição.



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. ISOLADOS BACTERIANOS UTILIZADOS

Este estudo foi conduzido utilizando 6 isolados de *E. faecium* (EFM 55, EFM 67, EFM 9A, EFM 16A, EFM 19A E EFM 44), provenientes de queijos produzidos artesanalmente e comercializados na cidade de Londrina-PR. Estes isolados pertencem a bacterioteca do Laboratório de microbiologia básica e aplicada (LaMBA), da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Londrina, coordenado pela Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciana Furlaneto Maia. As cepas selecionadas se apresentaram resistentes ao teste de simulação *in vitro* do trato gastro-intestinal (resistência à lisozima, stress em meio ácido e tolerância à pancreatina) e de auto-agregação, os quais apresentaram desempenho similar a cepa comercial de *Lactobacillus acidophilus* (BRANDALIZE, 2013). Os isolados estavam estocados em caldo Brain Heart Infusion (BHI) com 20% de glicerol e mantidos em freezer a -20°C.

Os microrganismos patogênicos testados foram *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Listeria monocytogenes* CDC 4555, *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) 3001, *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC). As cepas de *E. coli* são provenientes de surtos alimentares e foram gentilmente doadas pela prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Katsuko T. Kobayashi do Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

### 4.2. REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS

Em cada isolado retirou-se uma alíquota de 20 µL e inoculou-se em 10 mL de caldo BHI e foi incubado por 24 horas a 37°C, em condição de aerobiose. Após a turvação do meio, uma alíquota da cultura foi semeada em ágar BHI e incubada nas mesmas condições. A cultura proveniente deste cultivo foi utilizada para os testes e repiques foram realizados para a manutenção das culturas puras.

#### 4.3. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM DISCO

A avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizada pela técnica do teste de disco-difusão em ágar, conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2017) pelo método Kirby-Bauer (disco difusão em ágar). Os isolados foram testados quanto a susceptibilidade para a gentamicina (10 µg), vancomicina (30 µg), tetraciclina (30 µg), eritromicina (15 µg), ampicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg) e ciprofloxacina (5 µg) todos da Laborclin.

Para a realização do teste, uma alçada de cada isolado foi suspensa em um tubo contendo solução fisiológica (solução salina) 0,85% até atingirem a turbidez da escala 0,5 de McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL), e em seguida foram semeados em três direções na superfície do ágar Muller-Hinton com o auxílio de um suabe. Discos de antibiótico foram depositados sobre o meio inoculado. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e posteriormente observados a presença ou ausência de halo de inibição. Os halos de inibição foram mensurados e interpretados de acordo com os critérios de interpretação preconizados pelo CLSI (2017).

#### 4.4. ATIVIDADE ANTAGONISTA

Para avaliação da atividade antagonista, cada isolado de *E. faecium* foi estriado em forma de linha em placas de Petri contendo o meio BHI sólido separadamente e incubados na temperatura de 37°C por 24h (OGAKI et al., 2016). Na sequência, 1 mL de clorofórmio foi adicionado nas tampas das placas e a base foi invertida, permanecendo fechadas por 20 minutos em fluxo laminar, no intuito de promover a morte das colônias bacterianas, eliminando a hipótese de uma possível competição entre os microrganismos. Após a evaporação total do clorofórmio, foi depositada uma sobrecamada de 8 mL de meio BHI semi-sólido (suplementado de 0,8% de ágar) contendo o microrganismo teste (patógeno alimentar) na concentração final  $1,0 \times 10^6$  células/mL.

As placas foram incubadas a 37°C por 24h e a inibição foi analisada pela presença de halo translúcido ao redor da colônia. A inibição foi considerada positiva quando à borda do halo de inibição foi superior a 0,5 mm. Os diâmetros de inibição foram mensurados e expressos com base nos critérios de interpretação preconizados

pelo CLSI. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada tipo de patógeno estudado.

#### 4.5. RESISTÊNCIA A MEDICAMENTOS

A resistência dos isolados de *E. faecium* foi testada frente a drogas de diferentes grupos farmacológicos (analgésicos, anti-inflamatório, anti-hipertensivo, antipirético, antiulceroso, inibidor da bomba de prótons e antilipêmico) seguindo protocolo descrito por Todorov et al. (2011). As drogas foram adquiridas em farmácia de manipulação da cidade, solubilizadas em água estéril na concentração indicada para uso estabelecido pelo fabricante (Tabela 1).

**Tabela 1.** Lista de medicamentos de uso contínuo testados frente aos isolados de *E. faecium*.

Princípio ativo	Concentração (mg/mL)	Grupo de medicamento
Ácido Acetilsalicílico	100	Anti-inflamatório e analgésico
Losartana Potássica	20	Anti-hipertensivo e inibidor da ECA
Dipirona Sódica	100	Analgésico, antipirético
Paracetamol	200	Analgésico, antipirético
Maleato de Enalapril	4	Anti-hipertensivo
Ibuprofeno	40	Anti-inflamatório, antipirético
Loratadina	2	Anti-histamínico
Nimesulida	80	Analgésico, Anti-inflamatório e Antipirético
Omeprazol	4	Antiulceroso e inibidor da bomba de prótons
Sinvastatina	4	Antilipêmico

As colônias de cada isolado foram incubadas em 20 mL de MRS soft ágar (1.0 %; Difco) no período de 18 horas a 37°C visando obter contagem de 10<sup>8</sup> UFC/mL. Na sequência, foram distribuídos na superfície do meio, discos de papel filtro com diâmetro de 5 mm, acrescentados 10 µL da droga ressuspendida.

As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C e examinadas quanto a zonas de inibição. As que apresentaram zonas de inibição acima de 2 mm de diâmetro foram consideradas sensíveis.

#### 4.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA E LIPOLÍTICA

As atividades enzimáticas de proteólise e lipólise foram determinadas pelo método de Hankin e Anagnostakis (1975) pela relação entre o diâmetro da zona de inibição do substrato e o diâmetro da colônia, expresso como Índice Enzimático (IE).

A avaliação da atividade proteolítica consistiu na adição de 10 µL de cada isolado, com concentração padronizada em  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL, em placas contendo Plate Count Ágar (PCA) suplementado com 1% de leite Molico® 10%. Para a avaliação da atividade lipolítica, os isolados foram inoculados em meio Luria-Bertani (LB) suplementado com 0,5% de Tween 20.

As placas de ambos os testes foram incubadas a temperatura de 20°C e 42°C por período de até 120 horas e a mensuração do IE foi realizada nos tempos 6, 12, 24 horas para as placas incubadas a 42°C e nos tempos 24, 48 e 120 horas para as placas incubadas a 20°C.

Estas temperaturas foram escolhidas pela possível aplicação em produtos lácteos fermentados (leite fermentado e queijos). No caso de queijos de curta maturação (60 dias), a temperatura de 20°C foi escolhida devido o processo de fabricação ocorrer na temperatura de 35°C e a maturação sob temperaturas inferiores a 25°C. Já no caso do leite fermentado, o processo de fermentação poderá ocorrer em temperaturas superiores a 35°C, considerando que a temperatura ótima de atividade do *E. faecium* é de 38°C. Para melhor visualização do halo de proteólise foi adicionada uma alíquota de 5 mL de ácido acético 5% à superfície das placas por 1 minuto e descartado o excesso. A revelação da atividade lipolítica ocorreu submetendo a cultura à refrigeração (4°C) por aproximadamente 6 horas (STAMFORD et al., 1998).

Os resultados para ambas análises foram revelados pela formação de um halo ao redor do inóculo. Todos os testes foram feitos em duplicata.

#### 4.7. DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DA ENZIMA BETA-GALACTOSIDASE

A atividade da enzima beta-galactosidase foi determinada utilizando discos de papel impregnados com o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosose (Discos de ONPG da Sigma-Aldrich). Para tal, foi preparada uma solução com água destilada estéril e 100  $\mu$ g de ONPG.

Os discos de papel filtro (6 mm), foram embebidos com 10  $\mu$ L da solução de ONPG e mantidos em fluxo laminar por alguns minutos para secagem da solução. Na sequência, os discos foram adicionados/mergulhados em tubos contendo  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL do isolado em solução fisiológica (0,85%). Os tubos foram incubados por 4 horas a 37°C e posteriormente, os discos foram avaliados quanto a ocorrência de alteração colorimétrica, presença e ausência da cor amarela. A presença de cor amarela nos disco deve-se a liberação do composto cromogênico, o-nitrofenol, o qual indica a produção de  $\beta$ -galactosidase pelo isolado.

Os ensaios foram realizados no escuro, no intuito de preservar a atividade enzimática. Todos os testes foram feitos em duplicata.

#### 4.8. CAPACIDADE DE ACIDIFICAÇÃO

A avaliação da capacidade de acidificação dos isolados de *E. Faecium* pautou-se na inoculação de 250  $\mu$ L de cada isolado ativo ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ mL) em 25 mL de leite Molico® reconstituído a 10% (p/v), esterilizado em autoclave sob fluxo contínuo por 15 minutos e acondicionados em erlenmeyer de 50 mL. Estas soluções foram incubadas nos tempos (0, 6, 12, 24 e 48 horas) em duas temperaturas diferentes (20 e 42°C) de acordo com os procedimentos descritos por Araújo (2008). Mediu-se o pH e acidez titulável em cada tempo (AOAC, 2003). As análises foram realizadas em duplicata.

#### 4.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Nos testes de acidificação, os experimentos foram conduzidos de acordo com o delineamento inteiramente casualizado, com uma repetição.

Os dados obtidos ao longo do estudo foram submetidos à análise da variância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5% através do programa Statistica 7 (Statsoft®, EUA).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANO

O resultado do teste de sensibilidade de *E. faecium* aos antimicrobianos de uso clínico estão apresentados na tabela 2. Dos 6 isolados avaliados, 83% apresentaram sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. O isolado EFM 55 foi o único que apresentou resistência á eritromicina.

Nossos dados corroboram com outros estudos que relatam que isolados de enterococos, provenientes de leite e derivados, apresentaram perfil relativamente alto de sensibilidade frente aos antimicrobianos (ANDERSON et al., 2017; ISPIRLI; DEMIRBAS; DERTLI, 2017; Khalkhali e Mojgani 2018). Tais resultados são relevantes, visto que microrganismos com potencial probiótico para uso humano devem ser susceptíveis a pelo menos dois antibióticos clinicamente relevantes, para que em caso de infecções haja tratamento disponível e eficaz (BRASIL, 2019).

Ademais, o desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos convencionalmente utilizados no controle de procaríotos emerge como um problema relevante para o contexto clínico e industrial, visto que dificulta o controle microbiológico prejudicando o hospedeiro e os meios de produção, sendo considerado um mecanismo promotor de virulência (BRASIL, 2019).

Presume-se que a resistência intrínseca (aquela que faz parte das características naturais do microrganismo, transmitida verticalmente à prole) apresenta um potencial mínimo para a disseminação horizontal, enquanto a resistência mediada por genes encontrados em elementos móveis do genoma apresenta alto potencial de disseminação horizontal (EFSA, 2012).

No que concerne a utilização de produtos probióticos, a principal preocupação é que a bactéria utilizada apresente genes de resistência a antibióticos, uma vez que, tais genes podem eventualmente ser transferidos para outros microrganismos presentes na microbiota intestinal humana (BRASIL, 2019). Portanto, todas as linhagens microbianas candidatas a probióticos devem ser avaliadas quanto à susceptibilidade a um número relevante de antimicrobianos de importância humana e veterinária.

**Tabela 2.** Perfil de resistência e sensibilidade das cepas de *E. faecium* aos antimicrobianos: Cloranfenicol (CLO); Ciprofloxacina (CIP); Ampicilina (AMP); Tetraciclina (TET); Vancomicina (VAN); Eritromicina (ERI) e Gentamicina (GEN).

		ISOLADOS					
		EFM 55	EFM 67	EFM 9A	EFM 16A	EFM 19A	EFM 44
ANTIMICROBIANOS	Gentamicina	S	S	S	S	S	S
	Vancomicina	S	S	S	S	S	S
	Tetraciclina	S	S	S	S	S	S
	Eritromicina	R	S	S	S	S	I
	Ampicilina	S	S	S	S	S	S
	Cloranfenicol	S	S	S	S	S	S
	Ciprofloxacina	S	S	S	S	S	I

S – sensível, R – resistente, I – resistência intermediária

A resistência de *Enterococcus* ao antibiótico eritromicina foi descrita por diversos autores, sendo os isolados provenientes de tecido animal (Zou et al. 2011; HOLZAPFEL, 2017). Em nosso estudo, devido os isolados serem provenientes de queijo, já era esperado baixa resistência. No entanto, Nascimento (2017) e Triveldi et al., (2011), relataram altos índices de resistência á eritromicina, vancomicina e eritromicina em *E. faecium* provenientes do queijo de búfala

Ressalta-se que neste estudo, nenhum isolado exibiu resistência à vancomicina, semelhante ao descrito por Fracalanza et al. (2007), quando todas as cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de carne de frango e leite apresentaram-se altamente sensíveis à vancomicina e por Rivas et al. (2012), quando todas as cepas de *E. faecium*, produtoras de bacteriocina (TW15, TW20 e TW22), isoladas de leite e queijo de ovelha produzidos na região da Patagônia Argentina, foram sensíveis ao mesmo antibiótico.

## 5.2. ATIVIDADE ANTAGÔNICA

Foram realizados 42 testes para avaliação da atividade antagônica dos isolados de *E. faecium*, dos quais vinte e nove (69,05%) apresentaram resultado positivo contra bactérias patogênicas. Destes, o isolado EFM 9A apresentou atividade antagônica contra todos os patógenos (Tabela 3).

As cepas EFM 55 e 67 tiveram boa atividade antagônica contra seis bactérias patogênicas, das sete estudadas. Todos os isolados apresentaram atividade antagonista contra os sorotipos de *E. coli* EHEC e EPEC, enquanto 83,33% dos



isolados inibiram o crescimento de *S. enteritidis*. Resultados expressivos de inibição foram constatados também frente a *L. monocytogenes* (66,66%), *S. typhimurium* (50%) e ETEC (50%).

Apenas 33,33% dos isolados foram efetivos contra *E. faecalis*, sendo que estudos também relataram pouco ou nenhum efeito na interação destas espécies. Conforme descrito por Giazzi (2017), isolados de *E. faecium* provenientes de queijos da região de Londrina não apresentaram capacidade inibitória contra *E. faecalis*, bem como por Barbosa et al (2014), que relataram que cepas de *E. faecium* isoladas de produtos fermentados não inibiram *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Estes trabalhos justificam o percentual diminuto de inibição observado neste estudo.

Entre os isolados testados, a cepa EFM 16A foi a que apresentou menor atividade inibitória, uma vez que conseguiu inibir apenas duas das sete bactérias testadas (28,57%).

As indústrias de alimentos têm demonstrado interesse por *Enterococcus* spp. tendo em vista que várias espécies têm capacidade de produzir substâncias antagonistas capazes de controlar ou inibir o desenvolvimento de microrganismos patogênicos em alimentos. Dentre as possíveis substâncias secretadas destacamos subprodutos do metabolismo que incluem o ácido lático, diacetil, peróxido de hidrogênio, agentes líticos, exotoxinas e também bacteriocinas (PARVEZ, et al., 2006; PERRI, 2010; BAJAJ; CLAES; LEBEER, 2015; KHALIGHI; BEHDANI; KOUHESTANI, 2016).

**Tabela 3.** Atividade antagonista de isolados de *Enterococcus faecium* (EFM 55, 67, 9A, 16A, 19A e 44) frente aos patógenos *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) 3001, *E. Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Listeria monocytogenes* CDC 4555.

Isolados	Patógenos						
	<i>S.typhimurium</i>	<i>S. enteritidis.</i>	EHEC	ETEC	EPEC	<i>E.faecalis</i>	<i>L. monocyt.</i>
EFM 19A	-	+	+	-	+	-	-
EFM 44	-	+	+	+	+	-	+
EFM 55	+	+	+	+	+	-	+
EFM 9A	+	+	+	+	+	+	+
EFM 16A	-	-	+	-	+	-	-
EFM 67	+	+	+	-	+	+	+

\* + resultado positivo, - resultado negativo.

As enterocinas destacam-se por apresentarem atividade contra uma gama de microrganismos, incluindo os Gram-positivos como *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium botulinum* (CAMPOS et al., 2006; FRANZ et al., 2007) e Gram-negativos como *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae* e *Shigella dysenteriae* (LINE et al., 2008; ANNAMALAI et al., 2009; ACUÑA et al., 2012).

Dentre as bactérias patogênicas testadas neste trabalho, foi observado que os isolados apresentaram melhor atividade antagônica contra às bactérias patogênicas Gram-negativas quando comparado com os Gram-positivas (Tabela 3). Visto que os sorotipos EHEC e EPEC foram sensíveis a todos os isolados testados, e o sorotipo ETEC apresentou sensibilidade a 50% deles.

Tais sorotipos são difundidos pela natureza (animais, solo e água), sendo caracterizados como patógenos oportunistas de ampla relevância clínica, e como patógenos de origem alimentar, causando prejuízos a indústria de laticínios (NGUYEN; SPERANDIO, 2012)

O controle de EHEC em alimentos é dificultoso, em razão das suas características particulares, tais como a elevada tolerância a meios ácidos, ao contrário do observado em outras enterobactérias (NGUYEN; SPERANDIO, 2012; ONCUL; YILDIRIM, 2019). Tosoni (2019) avaliou a atividade antagônica produzidas por *Enterococcus* sp contra *S. typhimurium* e sorovares *E. coli*, evidenciando atividade inibitória frente EHEC e EPEC e não apresentou contra ETEC, resultado semelhante ao encontrado neste estudo. Por conseguinte, os resultados obtidos neste estudo chamam a atenção e vislumbram a possibilidade de empregar os isolados de *E. faecium* como probióticos com potencial biopreservativo na indústria de alimentos, visto a eficiência destes no controle de diferentes sorotipos de *E. coli*, no entanto, serão necessários mais estudos para conferir esta atividade.

Estudos têm sido conduzidos no intuito de detectar isolados de *E. faecium* que inibam o crescimento de *E. coli*, porém os dados observados são tímidos frente aos detectados neste trabalho (GAAMOUCHE et al., 2014; ERA PINGITORE et al., 2012). Tendo como exemplo o estudo de Albuquerque (2010), em que isolados de *E. faecium* e *E. faecalis* oriundos do queijo coalho artesanal de Cachoeirinha e Arcoverde – PE, produziram enterocinas com atividade antimicrobiana frente à *L. innocua*, *Staphylococcus aureus* e *E. coli*. Belgacem et al. (2010) também

testou a atividade antimicrobiana de *E. faecium* oriundo de leite fermentado da Tunísia apresentando resultados de inibição frente a *E. coli*

A dificuldade na detecção de substâncias antagonicas eficientes no controle de bactérias Gram-negativas está relacionada com a parede e a membrana plasmática, uma vez que possuem dupla camada lipídica na porção externa a parede (DIAS, 2014). As bacteriocinas atuam formando poros na bicamada fosfolipídica, levando a um colapso na força motriz do próton, sem alterar as propriedades físico-químicas dos alimentos, no entanto tendem a ter respostas menos eficientes em Gram-negativos devido a tais características de parede intrínsecas a estas bactérias (DEVLIEGHIERE et al., 2004).

Estudos com linhagens de *E. faecium* são capazes de produzir as enterocinas A, B, P, L50, E86 e AS48 (FOULQUIÉ-MORENO et al., 2006; KLAN; FLINT; YU, 2010), das quais as enterocinas A, B, P e L50, possuem atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* (KLAN; FLINT; YU, 2010); e ainda possuem a citolisina, que é um peptídeo exclusivo do gênero *Enterococcus* que tem atividade inibitória contra bactérias Gram-positivas (BIRRI et al., 2013).

Em estudo realizado por Barbosa et al (2014) quatro cepas de *E. faecium* isoladas de produtos fermentados foram avaliadas quanto ao uso potencial como cepas probióticas. Destas a cepa *E. faecium* 120, inibiu o crescimento da *L. monocytogenes* 7946, *L. monocytogenes* 7947, *L. innocua* 2030c e *L. innocua* NCTC 11286.

Nesse sentido, outro estudo foi conduzido para avaliar a atividade antibacteriana de três cepas de *E. faecium* produtoras de bacteriocina (TW15, TW20 e TW22) isoladas de leite e queijo de ovelha amostrados na região da Patagônia, Argentina. As cepas foram testadas frente a microrganismos patogênicos, mostrando atividade antimicrobiana frente a 4 cepas de *L. monocytogenes*, uma cepa de *Listeria innocua* e 2 cepas de *Staphylococcus aureus* (RIVAS et al., 2012). Ghrairi et al (2008) avaliaram também a atividade de enterocinas produzidas por *E. faecium* MMT21 e obtiveram resultados inibitórios frente a *L. monocytogenes* e *Clostridium* spp.

A propriedade de uma BAL inibir o crescimento de *L. monocytogenes* em produtos lácteos contribui para o controle deste patógeno na produção de queijos, visto que este possui a capacidade de crescer em temperaturas de refrigeração e sobreviver às condições ácidas durante a estocagem de queijos (PAPAGIANNI,

2003). Diversos estudos comprovam a ação inibitória de *E. faecium* frente a *L. monocytogenes* (BRAIK et al., 2018; BARBOSA; BORGES; TEIXEIRA, 2014; SIM et al., 2018; GARCÍA- CANO et al., 2014; ASPRI et al., 2017 ; TULINI; GOMES; DE MARTINIS, 2011; COCOLIN, 2007; ALVARADO et al., 2005).

Cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* isoladas de produtos lácteos também apresentaram atividade antibacteriana para *S. typhimurium* (GARCIA- CANO et al., 2014; HERMANNNS et al., 2013). A atividade antimicrobiana de *E. faecium* frente a microrganismos patogênicos é importante para o controle biológico de produtos lácteos fermentados contribuindo para o desenvolvimento das bactérias ácido lácticas e conseqüentemente a textura e o sabor desejado.

### 5.3. RESISTÊNCIA DE *Enterococcus faecium* FRENTE A MEDICAMENTOS

Todos os isolados foram resistentes aos medicamentos, com exceção das cepa EFM 19A e EFM 9A frente ao medicamento dipirona sódica (Tabela 4).

**Tabela 4.** Resistência dos isolados de *E. Faecium* frente aos medicamentos.

Medicamentos	Isolados					
	EFM19A	EFM 44	EFM55	EFM9A	EFM16A	EFM67
Ácido Acetilsalicílico	R	R	R	R	R	R
Losartana Potássica	R	R	R	R	R	R
Dipirona Sódica	S	R	R	S	R	R
Paracetamol	R	R	R	R	R	R
Maleato de Enalapril	R	R	R	R	R	R
Ibuprofeno	R	R	R	R	R	R
Loratadina	R	R	R	R	R	R
Nimesulida	R	R	R	R	R	R
Omeprazol	R	R	R	R	R	R
Sinvastatina	R	R	R	R	R	R

S- sensível, R - resistente

Estes resultados sugerem que o uso destes medicamentos em pacientes concomitantemente a utilização de produtos lácteos fermentados suplementados com probióticos, não interfere no desempenho dos probióticos, pelo contrário, pode proporcionar bem-estar a saúde do indivíduo.

A sensibilidade apresentada pelos isolados EFM 9A e EFM 19A à dipirona, corrobora com o evidenciado por Amaral e colaboradores (2017), em estudo similar, o qual avaliou a sobrevivência de *E. faecium* e *E. durans* isolados de queijo, quanto a presença de diferentes medicamentos. Os autores observaram que ambos exibiram resistência à maioria dos medicamentos testados, no entanto, mostraram uma grande sensibilidade a analgésicos (dipirona sódica, ibuprofeno, paracetamol e metamizola) e anti-hipertensivos, indicando que a utilização destes pode afetar a ação de cepas probióticas.

Estudos anteriores que comprovaram o efeito negativo a medicamentos frente a bactérias probióticas (TODOROV; LEBLANC; FRANCO, 2012). Casarotti (2017) avaliou que o efeito de medicamentos para tratamento de doenças crônicas não transmissíveis, tais como, analgésicos, antimetabólico e anti-hipertensivos afetam a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) devido ao acúmulo dos princípios ativos no intestino em consequência da ingestão a longo prazo.

Em estudo semelhante, Jeronymo (2013) avaliou a resistência a diferentes classes de medicamentos de uso contínuo frente as cepas de BAL isoladas de queijo de búfala. As cepas de BAL foram inibidas por anti-histamínicos contendo cloridrato de prometazina e loratadina, por medicamentos da classe dos anti-hipertensivos contendo na sua composição maleato de enalapril e medicamentos da classe dos anti-inflamatórios contendo ibuprofeno, cetoprofeno e diclofenaco de potássio. O diclofenaco de potássio e o ibuprofeno tem apresentando efeito negativo frente diferentes probióticos, como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HV219, *L. platarum* ST8KF e ST341LD, *E. faecium* ST311LD e *Lactococcus lactis* subsp. *mesenteroides* ST33LD (TODOROV et al., 2007; TODOROV; DICKS, 2008)

Hoje é comum pacientes que estão consumindo alimentos probióticos estarem ao mesmo tempo fazendo uso de algum medicamento para o tratamento de doenças crônico-degenerativas, como a hipertensão arterial sistêmica e o diabetes mellitus, bem como de problemas de saúde mental, enfermidades estas que apresentam prevalências crescentes no Brasil em decorrência do envelhecimento populacional. Por isso, é interessante determinar o efeito de medicamentos na viabilidade das cepas de BAL (TODOROV et al., 2011). Neste estudo observamos que com exceção da dipirona sódica, os isolados não sofreram efeito inibitório frente aos demais medicamentos, indicando que pacientes que venham a utilizar este

microrganismo para fins probióticos teriam a atividade terapêutica deste garantida mesmo quando utilizarem de forma concomitante os medicamentos testados.

#### 5.4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Todos os isolados apresentaram atividade proteolítica após 48 horas de incubação na temperatura de 20°C (Tabela 5). Contudo, não foi observada atividade proteolítica dos mesmos sob temperatura de 42°C.

**Tabela 5.** Atividade proteolítica das cepas de *E. faecium* em estudo incubados nas temperaturas de 20 °C nos tempos 24, 48 e 120 h e e 42°C nos tempos de 6,12 e 24 h.

Isolados	Tempo (h) / 20°C			Tempo (h) / 42°C		
	24	48	120	6	12	24
EFM 55	-	+	+	-	-	-
EFM 67	-	+	+	-	-	-
EFM 9A	-	+	+	-	-	-
EFM 16A	-	+	+	-	-	-
EFM 19A	-	+	+	-	-	-
EFM 44	-	+	+	-	-	-

(-): sem formação de halo aparente; (+) formação de halo aparente.

Estes resultados concordam com diversos estudos sobre a atividade proteolítica, a semelhança do observado por Perri (2010) em seu estudo, quando culturas de *Enterococcus* isoladas do processamento de queijo de coalho resistiram ao processo de pasteurização e foram capazes de produzir diacetil e atividade proteolítica. Outrossim, Ghrairi et al (2008) evidenciaram propriedades proteolíticas na cepa *E. faecium* MMT21 isolada de queijo Rigouta, a qual apresentou alta atividade de peptidase e média atividade de proteases, sugerindo que estas características são vantajosas para o sabor e textura em leites fermentados. Além disso, a adição de *E. faecium* como cultura “starter” na elaboração de queijo curado, apresentam aumento da proteólise da caseína quando comparada a cura do queijo sem a adição de *E. faecium* (SARANTINOPOULOS et al., 2001).

Os isolados avaliados neste estudo, não apresentaram atividade lipolítica em meio LB com tween 20, situação já descrita em outros estudos (JAOUANI et al., 2015). A ausência de atividade observada neste estudo, pode ser vantajosa, já que a lipólise

da gordura do leite pode induzir a produção de aromas e sabor rançoso ao produto final (HERRERO et al., 1996).

#### 5.5. DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DA ENZIMA BETA-GALACTOSIDASE

Não foi observado atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase em nenhum dos isolados em estudo, corroborando com o constatado por Araújo (2008) ao analisar dois isolados de *E. faecium* (A2P6 e A2P1) provenientes de fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra.

Em contraste, pesquisas recentes relataram que algumas espécies de *E. faecium* provenientes de produtos lácteos produzem  $\beta$ -galactosidase (NASCIMENTO, 2017; SANTOS et al., 2015; TODOROV et al., 2014). Esta característica contribui para a produção de produtos lácteos fermentados voltados ao consumidor com intolerância a lactose (NASCIMENTO, 2017). O indivíduo intolerante à lactose não é capaz de produzir a enzima  $\beta$ -galactosidase no intestino delgado, responsável pela hidrólise da lactose. Deste modo, a lactose é fermentada pelas bactérias presentes no intestino produzindo ácidos orgânicos e gases, ocasionando sintomas caracterizados por diarreia, flatulência e dor abdominal (HONDA et al., 2007).

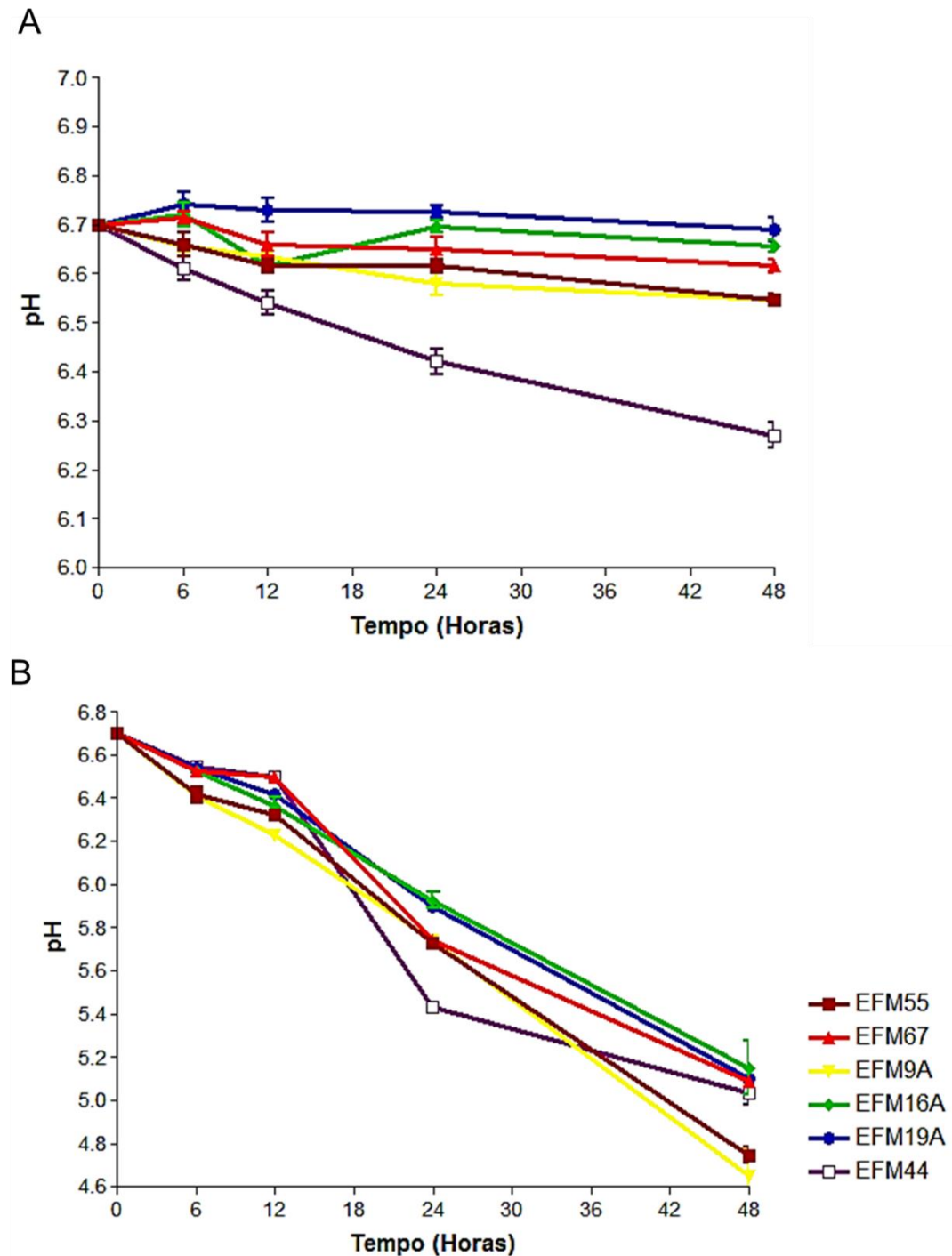
A maioria das espécies de lactobacilos, por sua vez, são produtoras desta enzima (HONDA et al., 2007). Conforme descrito por Casarotti et al (2017) ao avaliarem o potencial probiótico de dez estirpes *Lactobacillus* spp. (*Lactobacillus fermentum* SJRP30, *Lactobacillus casei* SJRP37, SJRP66, SJRP141, SJRP145, SJRP146 e SJRP169, e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* SJRP50, SJRP76 e SJRP149), observaram que apenas uma delas, cepa SJRP145 de *L. casei*, não era produtora da enzima  $\beta$ -gal (HONDA et al., 2007).

#### 5.6. CAPACIDADE DE ACIDIFICAÇÃO

A capacidade de acidificação foi monitorada pela variação dos valores de pH nos tempos de incubação ao longo de 48 horas sob as temperaturas de 20°C e 42°C (Figura 1).

Os isolados EFM 67, 16A e 19A não apresentaram redução no valor de pH ao longo do tempo de fermentação na temperatura de 20°C. O EFM 44 apresentou maior atividade fermentativa nesta temperatura (Figura 1 A).

**Figura 1.** Valores médios do pH de *E. faecium* ao longo do tempo de fermentação (0, 6, 12, 24 e 48 h). A - Médias de pH sob a temperatura de 20°C. B - Médias de pH sob a temperatura de 42°C.



Por outro lado, todos os isolados apresentaram atividade fermentativa na temperatura de 42°C, os quais tiveram redução no valor do pH ao longo das 48 horas. Em 24 horas, as cepas EFM 44 e 55 apresentaram redução significativa no valor do pH (Figura 1 B).



A produção de ácido é uma das propriedades mais relevantes de culturas iniciadoras, pois colabora com a fermentação inicial do leite e na produção de queijo contribui na coagulação do leite e prensagem do queijo, pois durante esta etapa ocorre a fermentação promovendo o controle do crescimento de microrganismos indesejáveis. Uma boa cultura iniciadora produtora de ácido deveria reduzir o pH do leite para 5,3 em 6 h (COGAN et al. 1997). Em queijos de meia cura podem apresentar pH em torno de 5,2 após 24 h de elaboração (FURTADO, 2005).

Nessa perspectiva o isolado EFM 44 foi o mais eficiente em ambas temperaturas, enquanto o isolado EFM 55 foi efetivo em relação aos demais na temperatura de 42°C (Figura 1), estes isolados foram capazes de variar o pH em mais de 1 unidade. No entanto, para que as alterações no pH fossem perceptíveis foram necessários tempos prolongados de cultivo, visto que os melhores valores de acidificação ocorreram em um período superior a 48 horas.

Joauani et al (2015), obtiveram resultados muito semelhantes aos obtidos neste estudo, visto que todas as cepas de *Enterococcus* foram classificadas como produtoras de ácido lento, dado que nenhuma das cepas reduziu o pH do leite mais de 1 unidade (variando entre 0 e 1 unidade), após 6 horas do período de incubação. Araújo (2008), estudando queijos minas da região da Canastra, constatou que 45 isolados de *Enterococcus* não apresentaram boa capacidade de fermentação cujos os valores de pH foram ligeiramente inferiores a 6,0 (0,14 a 0,02 unidades) após 6 h de incubação.

Contudo, considerando as diferentes espécies do gênero *Enterococcus*, *E. faecium* tem apresentado valor de acidificação significativamente melhores que *E. faecalis* e *E. durans* (SUZZI et al., 2000; ANDRIGHETTO et al., 2001).

No entanto, cabe ressaltar que *Enterococcus* não apresentam rápida atividade acidificante quando inoculados em leite se comparado com outros gêneros de cocos Gram positivos, catalase negativo como *Lactococcus* e *Streptococcus*, microrganismos presentes em diversos fermentos industriais (ARAUJO, 2008).

Sarantinopoulos et al (2001), avaliaram 129 microrganismos identificados como *Enterococcus*, provenientes de produtos lácteos, animal e humanos quanto à capacidade acidificante. Os resultados demonstraram estirpes pobres quanto à capacidade de acidificação em leite. Estes resultados são semelhantes ao encontrados por Villani e Coppola (1994) ao examinarem a capacidade acidificante de estirpes de *E. faecium* e *E. faecalis*, inoculada em leite por 6h a 37°C, os quais

observaram baixa redução no pH, variando o pH do leite entre 0,4 a 0,8 em relação ao pH inicial.

Deste modo, o este estudo permitiu observar que os isolados de *E. faecium* apresentam capacidade acidificante limitada, necessitando de culturas iniciadoras ou homofermentativas para atuar como fermento primário na produção dos queijos. Nas etapas iniciais de processamento dos queijos estas podem auxiliariam na redução do pH do leite, o que é fundamental para auxiliar na coagulação e seleção das culturas ácido-tolerantes (SARANTINOPOULOS et al., 2001; WALSTRA et al., 2006).

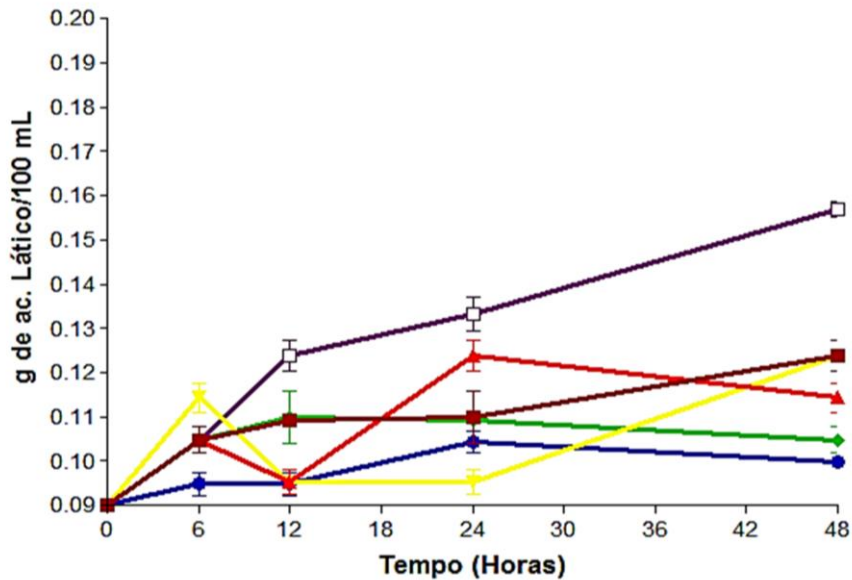
No que tange a acidez titulável, o isolado EFM 44 destacou-se perante aos demais, apresentando 0,15% de acidez após 48 horas de fermentação a 20°C, no entanto os demais isolados não diferiram quanto a capacidade de acidificação nesta temperatura (Figura 2 A).

A capacidade de acidificação foi mais eficiente na temperatura de 42°C para todos os isolados (EFM 55; EFM 67; EFM 9A; EFM 16A; EFM 19A; EFM 44), nos diferentes tempos avaliados. Considerando os diferentes tempos de incubação, observamos uma acidificação proeminente do isolado EFM 44 (0,30%), após as primeiras 24 horas de incubação. No entanto, em 48 horas apenas os isolados EFM55 apresentou acidez superior a 0,60% (Figura 2 B). Estes resultados indicam que embora todos os isolados apresentem capacidade de acidificação, faz-se necessário o emprego de uma cultura iniciadora visando acelerar o desenvolvimento da acidez desejada para leite fermentado. O Enterococos apresenta sua atividade ótima na temperatura de 38°C (SILVA, 2017), ou seja, a temperatura de 42°C pode não ter colaborado com a sua capacidade fermentativa.

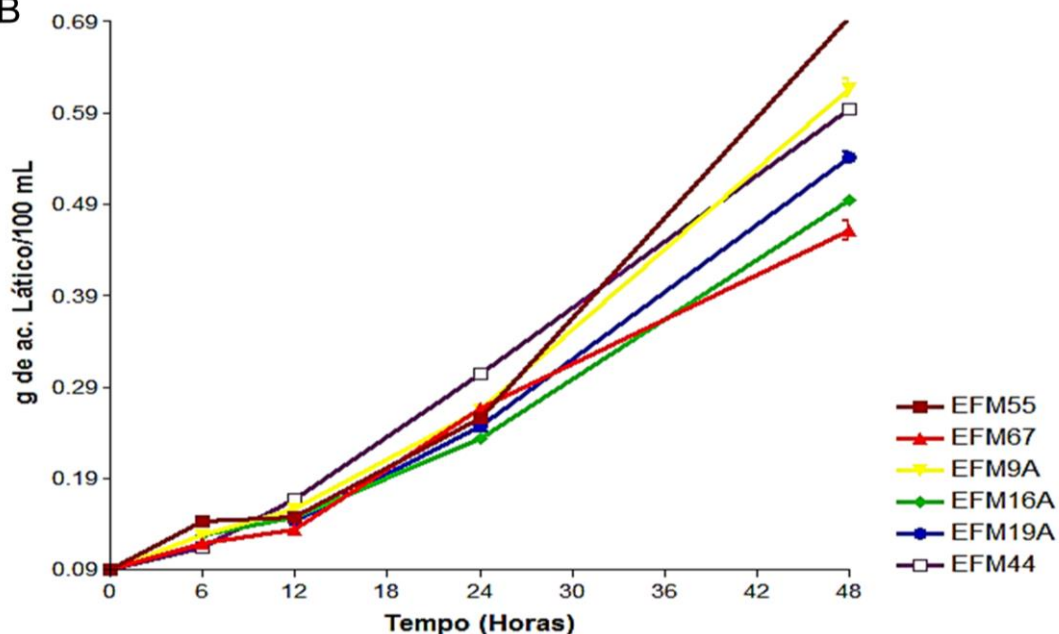
A acidez titulável está relacionada com a produção de ácido láctico, bem como com a formação de lactado de cálcio, com o equilíbrio iônico e o pH, promovendo a inibição de alguns patógenos e assim influenciando diretamente a qualidade do queijo produzido. As culturas *starters* promovem níveis expressivos de acidez e podem ser incorporadas de forma adjunta aos probióticos, fornecendo níveis satisfatórios de acidez, enquanto os probióticos atuam inibindo o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis (EL-GARHI et al., 2018).

**Figura 2.** A- Valores acidez das cepas de *E. faecium* ao longo do tempo de fermentação (0, 6, 12, 24 e 48 h). A - Acidez das cepas sob a temperatura de 20°C. B - Acidez sob a temperatura de 42°C.

A



B



Nossos isolados apresentaram uma acidificação tardia, a qual desfavorece sua utilização em queijos de média maturação, tal como o queijo Minas Padrão ou meia cura, no entanto outros queijos de produção e armazenamento prolongados podem ser beneficiados pela utilização de linhagens com acidez titulável tardia, tal como em queijo tipo Parmesão (MORENO et al., 2003).

Giazzi (2017) observou que entre as BAL isoladas de queijos, o *E. faecium* não desenvolveu acidez em temperaturas de 20°C e 37°C. Por outro lado, algumas cepas de *Enterococcus* sp apresentaram melhor desempenho fermentativo apresentando acidez superior a 0,65% de ácido lático após 24 horas de fermentação a 37°C. Cabral et al (2016) avaliou o perfil de produção de ácido lático de *Enterococcus* sp proveniente de queijo coalho produzidos no estado de Pernambuco e obteve acidez titulável variando de 0,46 a 0,75% de ácido lático após 24 horas incubados a temperatura de 30°C. Ao incubar as cepas em temperatura de 37°C, produziram acidez entre 0,63 e 1,69% de ácido lático no mesmo tempo. O queijo coalho apresenta majoritariamente maior proporção de enterococos entre as BAL, sendo responsável pelo aroma, sabor e controle de bactérias patogênicas conferidos pelos referidos autores.

As cepas EFM 9A e EFM 55 exibiram elevado potencial tecnológico considerando a atividade proteolítica lipolítica e acidificante, bem como o crescimento satisfatório expresso nas temperaturas de 20°C e 37°C. A cepa EFM 9A, despontou como a melhor alternativa para fins industriais frente os demais isolados avaliados, exibindo sensibilidade a todos os antibióticos testados e ação antagônica contra todos os patógenos estudados. Apesar de não apresentar boa atividade acidificante a 20°C, possui potencial para aplicação na produção de queijos, e na condição de termófilos, apresentando boa capacidade fermentativa para produção de leites fermentados. A segunda cepa de maior destaque tecnológico foi a EFM 55, a qual, apesar de resistente a Eritromicina, apresenta resultados satisfatórios de atividade antagônica frente aos patógenos, resistência a todos os medicamentos avaliados e boa atividade acidificante em ambas as temperaturas (20°C e 37°C), fatores que corroboram para como seu potencial probiótico em produtos lácteos fermentados. Destacamos que, ambas as cepas precisariam de culturas iniciadoras para serem aplicadas na produção de lácteos fermentados, pois possuem potencial aplicação como culturas lácticas adjuntas para controle de patógenos e atividade proteolítica principalmente para a produção de queijos maturados. Nesta perspectiva, o queijo coalho pode ser considerado um candidato ao emprego dos isolados probióticos EFM55 e EFM9A, caracterizados neste estudo, visto que esse modelo não demanda de alta acidez titulável, conforme evidenciado para tais isolados.

## 6. CONCLUSÃO

A maioria das cepas de *Enterococcus faecium* foram sensíveis aos antimicrobianos cloranfenicol, ampicilina, tetraciclina, vancomicina e gentamicina. Somente as cepas EFM 44 e EFM 55 apresentaram resistência intermediária para ciprofloxacina e eritromicina.

O isolado EFM 9A apresentou atividade antagônica a todos os patógenos avaliados neste estudo. Todos os isolados inibiram o crescimento de *E.coli* EHEC e EPEC.

Os isolados EFM 9A e 19A foram sensíveis a dipirona, enquanto os demais apresentaram resistência a todos os medicamentos avaliados.

A temperatura de 20°C todos os isolados apresentaram atividade proteolítica a partir de 48 horas, mas não foi observado atividade proteolítica em temperatura de 42°C em nenhum dos tempos testados.

Nenhuma cepa de *E. faecium* apresentou atividade lipolítica e da enzima beta-galactosidase.

Os isolados não apresentaram atividade de acidificação na temperatura de 20°C, porém demonstraram atividade promissora a temperatura de 42°C, indicando a possibilidade de utilização dessas linhagens em queijos de maturação tardia.

Os isolados EFM55 e EFM9A apresentaram acidez superior a 0,60%, podendo ser utilizados como probióticos em queijos que necessitam de baixa concentração de ácido láctico.

## REFERÊNCIAS

- ACUÑA, L. et al. A new hybrid bacteriocin, Ent35–MccV, displays antimicrobial activity against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria. **FEBS open bio**, v. 2, n. 1, p. 12-19, 2012.
- ALVARADO, C. et al. Anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocin-like inhibitory substances from *Enterococcus faecium* UQ31 isolated from artisan mexican-style cheese. **Current Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 110-115, 2005.
- ANDERSON, A. C. et al. Antibiotic resistance genes and antibiotic susceptibility of oral *Enterococcus faecalis* isolates compared to isolates from hospitalized patients and food. In: **Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health**. Springer, Cham, 2017. p. 47-62.
- ANDRABI, S. T. et al. Phytase-Producing Potential and Other Functional Attributes of Lactic Acid Bacteria Isolates for Prospective Probiotic Applications. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 8, n. 3, p. 121–129, 2016.
- ANDRIGHETTO, C. et al. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. **Journal of Dairy Research**, v. 68, n. 2, p. 303-316, 2001.
- ANNAMALAI, N. et al. Enterocin from *Enterococcus faecium* isolated from mangrove environment. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 22, 2009.
- AMARAL, D. F. M et al. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolated from cheese: Survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 933-949, 2017.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 17. ed. Washington, DC: AOAC, 2003.
- ARAÚJO, T. F. **Caracterização e identificação de *Enterococcus* spp. isolados do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Minas artesanal da região da Canastra, Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa. 74f., Viçosa, 2008.
- ARIAS, C. A.; MURRAY, B. E. The rise of the enterococcus: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 16, n. 10, p. 266-278, 2012.
- ASPRI, M. et al. Application of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* isolated from donkey milk, in the bio-control of *Listeria monocytogenes* in fresh whey cheese. **International Dairy Journal**, v. 73, p. 1–9, 2017.
- BAJAJ, B; CLAES, I. J. J; LEBEER, S. Functional mechanisms of probiotics. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences.--**, v. 4, n. 4, p. 321-327, 2015.
- BALLUS, C. A. et al. Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: revisão. **Boletim CEPPA**,

v. 28, n. 1, p. 85-96, 2010.

BARBOSA, J.; BORGES, S.; TEIXEIRA, P. Selection of potential probiotic *Enterococcus faecium* isolated from Portuguese fermented food. **International Journal of Food Microbiology**, Portugal, v.191, p. 144-148, 2014.

BARCELLOS, M. D. DE; LIONELLO, R. L. Consumer Market for Functional Foods in South Brazil. **International Journal on Food System Dynamics**, v. 2, n. 2, p. 126–144, 2011.

BEDANI, R. **Influencia do consume de “iogurte” de soja fermentado com *Enterococcus faecium* na microbiota de animais e humanos**. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Araraquara, 2008. 122 p.

BEENA DIVYA, J. et al. Probiotic fermented foods for health benefits. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 4, p. 377–390, 2012.

BELGACEM, Z.B. et al. Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. **Food Control**, v.21, n.4, p. 462-470, 2010.

BERMUDEZ-BRITO, M. et al. Probiotic mechanisms of action. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 61, n. 2, p. 160–174, 2012.

BEZERRA, T. K. A. **Estudo da proteólise, lipólise e compostos voláteis em queijo de coalho caprino adicionado de bactérias ácido lácticas probióticas**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraíba, João Pessoa, 111f, 2015.

BIRRI, D. J.; BREDE, D. A.; TESSEMA, G. T.; NES, I. F. Bacteriocin production, antibiotic susceptibility and prevalence of haemolytic and gelatinase activity in faecal lactic acid bacteria isolated from healthy ethiopian infants. **Microbial Ecology**, New York, v. 65, p. 504-516, 2013.

BHAT, B.; BAJAJ, B. K. Hypocholesterolemic and bioactive potential of exopolysaccharide from a probiotic *Enterococcus faecium* K1 isolated from kalarei. **Bioresource Technology**, v. 254, n. January, p. 264–267, 2018.

BRAIK, A. M. et al. PT. **Sensors & Actuators: B**. Chemical, 2018.

BRANDALIZE, C.C. **Potencial probiótico de *Enterococcus faecium* isolados de queijo**. 2013. 70 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Campo Mourão, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 02, de 07 de janeiro de 2002. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde**. Diário Oficial da União, Brasília, seção 1, p.191, 17 de jul. de 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução**

da **Diretoria Colegiada – RDC nº RDC nº 241, de 26 de julho de 2018**. Diário Oficial da União, Brasília, seção 1, p.97, 27 de jul. de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para Instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos**. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/5280930/21.pdf/1c99eeb1-7143-469a-93ff-7b2b0f9187c0>. Acesso em 12 de maio de 2019.

BRUNARI, N. C.; SALOTTI-SOUZA, B. M. **Bactérias probióticas e sua aplicação em leites**. p. 22–29, 2017.

CABRAL, M. L. B. et al. Artisan cheese: a potential source of wild lactic acid bacteria to obtain new starter cultures. **Journal of bioenergy and food science**, v. 3, n. 4, p. 207-215, 2016.

CAMERON, D. et al. Probiotics for gastrointestinal disorders: proposed recommendations for children of the Asia-Pacific region. **World journal of gastroenterology**, v. 23, n. 45, p. 7952, 2017.

CAMPOS, C. A.; RODRÍGUEZ, Ó.; CALO-MATA, P.; PRADO, M.; BARROSVELÁZQUEZ, J. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). **Food Research International**, v. 39, n. 3, p. 356-364, 2006.

CARNEIRO, C. S. et al. Antagonistic Activity, Antimicrobial Susceptibility and Potential Virulence Factors of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Life Sciences**, v. 10, n. 7, p. 318-326, 2015.

CASAROTTI, S. N. et al. In vitro assessment of safety and probiotic potential characteristics of *Lactobacillus* strains isolated from water buffalo mozzarella cheese. **Annals of microbiology**, v. 67, n. 4, p. 289-301, 2017.

CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W.; ZADERNOWSKA, A.; ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, Ł. Virulence factors of *Enterococcus* spp. presented in food. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 670-676, 2017.

CLEVELAND, Jennifer et al. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International journal of food microbiology**, v. 71, n. 1, p. 1-20, 2001.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**. ed. 27. 2017.

COCOLIN, L.; FOSCHINO, R.; COMI, G.; FORTINA, M. G. Description of the bacteriocins produced by two strains of *Enterococcus faecium* isolated from Italian goat milk. **Food Microbiology**. v.24, p.752-758, 2007.



COGAN, T. M. et al. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. **Journal of Dairy Research**, v. 64, n. 3, p. 409-421, 1997

COSTA, M. P. et al. Leite fermentado: potencial alimento funcional. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, p. 1387-1408, 2013.

DE, U. et al. **Caracterização molecular de Enterococcus spp . resistentes à vancomicina em amostras clínicas , ambientes aquáticos e alimentos**  
**Caracterização molecular de Enterococcus spp . resistentes à vancomicina em amostras clínicas , ambientes aquáticos e alimentos.** 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

DENIPOTE, F. G.; TRINDADE, E. B. S. D. M.; BURINI, R. C. Probiotics and prebiotics in primary care for colon cancer. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 47, n. 1, p. 93–98, 2010.

DEVLIEGHIERE, F; VERMEIREN, L; DEBEVERE, J. New preservation technologies: Possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 273–285, 2004.

DHEWA, Tejpal. Screening, production purification and potential use of bacteriocins from lactic acid bacteria of meat and dairy food origin. In: **International Conference on Nutrition and Food Sciences**. p. 35-41,2012

DIAS, G. M. P. **Potencial tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de coalho artesanal produzido no município de Venturosa – Pernambuco.** 114 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de ciência biológicas. Universidade Federal de Pernambuco. Recife-PE. 2014.

DIVYA, J. B.; NAMPOOTHIRI, K. M. Encapsulated *Lactococcus lactis* with enhanced gastrointestinal survival for the development of folate enriched functional foods. **Bioresource Technology**, v. 188, p. 226-230, 2015.

DIVYA, J.B. et al. Probiotic fermented foods for health benefits. **Biotechnology of fermented food systems**, v.12, n. 4, p. 377-390, 2012.

ECOLOGY HEALTH CENTER. Disponível em <https://www.hivprobiotics.com/probiotics/>. Acesso em 21 de outubro de 2018.

EL-GARHI, H-E. M. et al. Quality improvement of spreadable processed cheese made from ultrafiltered milk retentates using commercial starter cultures. **Food Science and Technology International**, v. 24, n. 6, p. 465-475, 2018.

ERA PINGITORE, E. et al. Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. **Food Microbiology** (Print), v. 32, p. 38-47, 2012.

EFSA (European Food Safety Authority).Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance prepared by the EFSA Panel on Additives and Products of Substances used in Animal Feed (FEEedAP). **EFSA J.**, v.10, p.2740, 2012.

EUROMONITOR. **Probiotics: Evolution of Digestion and Immune Support Probiotics (Part One)**. Disponível em <https://www.euromonitor.com/probiotics-evolution-of-digestion-and-immune-support-probiotics-part-one/report> .Acesso em 12 de maio de 2018.

EUZÉBY, J.P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature - genus *Enterococcus*. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>. Acessado em 12 set 2018.

FAO FOOD AND NUTRITION PAPER. **Probiotics In Food: Health And Nutritional Properties And Guidelines For Evaluation**. n. 85, 2006. Disponível em <<http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>>. Acesso em: 11 nov. 2017.

FERNÁNDEZ, M. et al. Impact on Human Health of Microorganisms Present in Fermented Dairy Products: Na Overview. **BioMed Research International**, v. 2015, p.1-13, 2015.

FONTANA, L. et al. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. SUPPL. 2, 2013.

FOULQUIÉ MORENO, M. R. et al. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 1, p. 1–24, 2006.

FLACH, J. et al. The underexposed role of food matrices in probiotic products: Reviewing the relationship between carrier matrices and product parameters. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, n. 15, p. 2570-2584, 2018.

FLORES, Rafael V. Probióticos: Una Alternativa Para la Industria de Alimentos. **Ingeniería Industrial**, Lima, n. 33, p. 265-275, jan./fev. 2015.

FRACALANZZA, S. A. P. et al. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 853-859, 2007.

FRANZ, C. M. A. P. et al. Enterococci in foods - A conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 2–3, p. 105–122, 2003.

FULLER, R.; GIBSON, G. R. Modification of the Intestinal Microflora Using Probiotics and Prebiotics. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 32, n. sup222, p. 28–31, 1997.

GAAMOUCHE, S.; ARAKRAK, A.; BAKKALI, M.; LAGLAOUI, A. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and bacteriocins isolated from a traditional brine table olives against pathogenic bacteria. **International journal of Current Microbiology and applied sciences**. Volume 3 Number 11 (2014) pp. 657-666.

GARCÍA-CANO, I. et al. Antibacterial activity produced by *Enterococcus* spp. isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 1, p. 26–34, 2014.

GARCÍA-SOLACHE, M.; RICE, L. B. The *Enterococcus*: a Model of Adaptability to Its Environment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, 2019.

GARG, N. **Lactic Acid Bacteria : Probiotic Applications**. v. 4, n. 4, p. 12–15, 2015.

GHRAIRI, T. et al. Purification and characterisation of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. **Food Control**, v.19, p.162 -169, 2008.

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

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E. *Enterococci* isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 6, p. 732–737, 1997.

GIAZZI, A. Caracterização e estudo do perfil tecnológico de bactérias ácido lácticas isoladas de queijos tipo Minas artesanais e leite cru. 2017. 77 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2017.

HALÁSZ, A. **Latic Acid Bacteria**. In: **LASZTITY, Radomir**. Food Quality and Standards. Volume 3. United Kingdom: EOLSS Publishers Co. Ltd, 2009. p. 70-82.

HAMMERUM, A. M. Enterococci of animal origin and their significance for public health. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 7, p. 619–625, 2012.

HANKIN, L. & ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia** 67:597-607. 1975.

HERMMANS, G.; FUNCK, G. D.; SCHIMIDT, F.T.; RICHARD, N. S. P. S. Isolation and identification of supposedly bacteriocinogenic lactic acid bacteria from milk and cheese. **Rev. Acad., Ciênc. Agrár. Ambient**. v. 11, n. 2, p. 191196, Curitiba . 2013.

HERRERO, M. et al., Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. **Journal of Applied Microbiology**, v. 81, p. 565-570, 1996.

HOLZAPFEL, W. H. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.73, n.2, p.365-373, 2001.

HOLZAPFEL, W. H; GUIGAS, C.; FRANZ, C. M. A. P. **General Overview of the Enterococci**. In: *Enterococci in Foods: Functional and Safety Aspects*, Germany, 2002. Disponível em <[http://www.bfr.bund.de/cm/343/enterococci\\_may\\_02\\_abstracts00.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/343/enterococci_may_02_abstracts00.pdf)>. Acesso em: 11 nov. 2017.

HONDA, H. et al.  $\beta$ -Galactosidase, phospho- $\beta$ -galactosidase and phospho- $\beta$ -

glucosidase activities in lactobacilli strains isolated from human faeces. **Letters in applied microbiology**, v. 45, n. 5, p. 461-466, 2007.

HWANG, I. Y. et al. Engineered probiotic *Escherichia coli* can eliminate and prevent *Pseudomonas aeruginosa* gut infection in animal models. **Nature communications**, v. 8, p. 15028, 2017.

IFIC, International Food Information Council. **Functional Foods Fact Sheet: Probiotics and Prebiotics**, 2014. Disponível em: <[http://www.foodinsight.org/Functional Foods Fact Sheet Probiotics and Prebiotics](http://www.foodinsight.org/Functional_Foods_Fact_Sheet_Probiotics_and_Prebiotics)>. Acesso em: 27 out. 2017.

ISPIRLI, H; DEMIRBAS, F; DERTLI, E. **Characterization of functional properties of Enterococcus spp. isolated from Turkish white cheese**. Food Science and Technology, v. 75, p. 358-365, 2017.

JERONYMO, A. B. de O. Avaliação do potencial probiótico de bactérias acidoláticas produtoras de substância antimicrobiana isoladas de mussarela de búfala. 2013. 108 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, 2013.

JAOUANI, I. et al. Safety and technological properties of bacteriocinogenic enterococci isolates from Tunisia. **Journal of applied microbiology**, v. 119, n. 4, p. 1089-1100, 2015.

KHALIGHI, A; BEHDANI, R; KOUHESTANI, S. **Probiotics: A comprehensive review of their classification, mode of action and role in human nutrition**. InTech Publishers, 2016.

KHAN, H.; FLINT, S.; YU, P.-L. Enterocins in food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 1-2, p. 1-10, 2010.

KUMAR, R.; DHANDA, S. Mechanistic Insight of Probiotics Derived Anticancer Pharmaceuticals : A Road Forward for Cancer Therapeutics Mechanistic Insight of Probiotics Derived Anticancer Pharmaceuticals : A Road. **Nutrition and Cancer**, v. 0, n. 0, p. 1–6, 2017.

LACROIX, C.; YILDIRIM, S. Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 176-183, 2007.

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

LINE, J.E. et al., Isolation and Purification of Enterocin E-760 with Broad Antimicrobial Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p. 1094–1100, 2008.

MAIA, L.P. Anvisa avançou em temas relevantes e se reestruturou. Revista **Consultor**

**Jurídico**, 8 de janeiro de 2019. Acesso em 05/03/2019. <https://www.conjur.com.br/2019-jan-08/layla-maia-anvisa-avancou-temas-relevantes-reestruturou>

MANOLOPOULOU, E. et al. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 153-161, 2003.

MATHUR, S; SINGH, R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. **International journal of food microbiology**, v. 105, n. 3, p. 281-295, 2005.

MISHRA, S; MISHRA, H. N. Technological aspects of probiotic functional food development. **Nutrafoods**, v. 11, n. 4, p. 117-130, 2012.

MORENO, M. R. F. et al. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 1-24, 2006.

MORANDI, S. et al. Technological and molecular characterisation of enterococci isolated from north–west Italian dairy products. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 8, p. 867-875, 2006

MOURAND, G; PABOEUF, F; FLEURY, M. A; JOUY, E; BOUGEARD, S; DENAMUR, E; KEMPF, I; *Escherichia coli* Probiotic Strain ED1a in Pigs Has a Limited Impact on the Gut Carriage of Extended-Spectrum-Lactamase-Producing *E. coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, p. 1-16, 2017.

NASCIMENTO, L. C. S. **Seleção de novas linhagens de bactérias ácido-láticas probióticas e aplicação de *E. faecium* em leite**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de alimentos) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 132f., São José do Rio Preto-SP, 2017.

NGUYEN, Y; SPERANDIO, V. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, 2012.

NCCIH, NIH. **Probiotics: In Depth**. Disponível em <https://nccih.nih.gov/health/probiotics/introduction.htm>. Acesso em 17 de janeiro de 2018.

NOGUEIRA, J. C. R. Probióticos - Revisão da Literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 4, p. 487–492, 2011.

O’CONNOR, P. M. et al. Antimicrobial antagonists against food pathogens: A bacteriocin perspective. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 51–57, 2015.

OGAKI, M. B. et al. Screening of the Enterocin-Encoding Genes and Antimicrobial Activity in Enterococcus Species. **J. Microbiol. Biotechnol.** V.26, n.6, p.1026–1034, 2016.

OLIVEIRA, M. N. DE et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 1–21,

2002.

ONCUL, N; YILDIRIM, Z; Inhibitory effect of bacteriocins against *Escherichia coli* O157:H7. **Food Science and Technology International**, p. 1-11, 2019.

ORSI, G. B.; CIORBA, V. Vancomycin resistant enterococci healthcare associated infections. **Ann Ig**, v. 25, n. 6, p. 485-92, 2013.

PAPAGIANNI, M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. **Biotechnology Advances**, Baltimore, v.21, p.465-499, 2003.

PARVEZ, S. et al. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 6, p. 1171–1185, 2006.

PERRI, J. M. **Bactérias do gênero Enterococcus em queijo de coalho influência do processamento na seleção microbiana, perfil tecnológico e implicações em segurança de alimentos**. 2010. 93 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

POLLMANN, M. et al. Effects of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on the rate of natural chlamydia infection in swine. **Infection and immunity**, v. 73, n. 7, p. 4346-4353, 2005.

QUIGLEY, E. M. M. Probiotics in irritable bowel syndrome: the science and the evidence. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 49, p. S60-S64, 2015.

QUINTO, E. J. et al. Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. **Food and Nutrition Sciences**, v. 05, n. 18, p. 1765–1775, 2014.

REN, D. et al. Evaluation of immunomodulatory activity of two potential probiotic Lactobacillus strains by in vivo tests. **Anaerobe**, v. 35, p. 22-27, 2015.

REDONDO, N.C. Avaliação in vitro de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus* spp *jugurti* 416. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Araraquara, 2008. 109 p.

RESENDE, D. DE O. et al. **Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes**. Brasil ,Anvisa, p. 45, 2013.

RIVAS, F. P. et al. Antibacterial potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from ewes' milk and cheese. **LWT-Food Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 428-436, 2012.

ROSS, R. P. et al. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1410-1417, 2005.

SAARELA, M. et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of biotechnology**, v. 84, n. 3, p. 197-215, 2000.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências da Farmaceuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006.

SAAD, S. M. I.; BURITI, F. C. A. ; CARDARELLI, H. R. . Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* e inulina.. **RBCF. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 75-84, 2008.

SANTOS, A. R.; WHORWELL, P. J. Irritable bowel syndrome: the problem and the problem of treating it—is there a role for probiotics?. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 73, n. 4, p. 470-476, 2014.

SANTOS, K. M. O. et al. Safety, beneficial and technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from Brazilian cheeses. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 46, n. 1, p. 237-249, Mar. 2015.

SARANTINOPOULOS, P.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 76, n. 1-2, p. 93-105, 2002.

SARANTINOPOULOS, P. et al. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 8, p. 621-647, 2001.

SETTANNI, L; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v. 27, n. 6, p. 691-697, 2010.

SHARMA, V. K. et al. A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes. **Chemosphere**, v. 150, p. 702-714, 2016.

SIERRA, G. J. **Microbiota intestinal y sus generalidades en el organismo del ser humano Intestinal microbiota and its generalities in the organism of the human being Microbiota gastrointestinal**. p. 23–31, 2017.

SILVA, Neusely et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. Editora Blucher, 2017.

SIM, I. et al. Probiotic potential of *Enterococcus faecium* isolated from chicken cecum with immunomodulating activity and promoting longevity in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 883-892, 2018.

SIMEONI, C. P. et al. Microencapsulação de probióticos: inovação tecnológica na indústria de alimentos. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, p. 66-75, 2014.

SONNENBORN, U. *Escherichia coli* strain Nissle 1917—from bench to bedside and back: history of a special *Escherichia coli* strain with probiotic properties. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 19, 2016.

SOUSA M.J. et al. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 327-345, 2001.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Atividade enzimática de microrganismos isolados do jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 382-385, 1998.

STANTON, C.; DESMOND, C.; COAKLEY, M.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In: FARNWORTH, E.R., ed. Handbook of fermented functional foods. Boca Raton: CRC Press. p.27-58, 2003.

SUZZI, G. et al. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese (semicotto caprino). **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 2, p. 267-274, 2000.

SZAJEWSKA, H. et al. Probiotics in Gastrointestinal Diseases in Children. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 42, n. 5, p. 454–475, 2006.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico**. 2 ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 620p. 2009.

TODOROV, S. et al. Bacteriocin production and resistance to drugs are advantageous features for *Lactobacillus acidophilus* La-14, a potential probiotic strain. **New Microbiologica**, Pavia, v. 34, n. 4, p. 357-370, 2011.

TODOROV, S. D.; BOTES M ; DANOVA ST ; LMT DICKS . Probiotic properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* HV219, isolated from human vaginal secretions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 629-639, 2007.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. Evaluation of lactic acid bacteria from kefir, molasses and olive brine as possible probiotics based on physiological properties. **Annals of Microbiology**, London, v. 58, n. 4, p. 661-670, 2008.

TODOROV, S. D.; LE BLANC, J. G.; FRANCO, B. D. G. M. Evaluation of the probiotic potential and effect of encapsulation on survival for *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v.28, n, 3, p. 973-984, 2012.

TOSONI, N.F. **Potencial antibacteriano de enterocinas em células plactônicas e em biofilme de *Salmonella typhimurium* e sorotipos de *Escherichia coli*** . Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade tecnologica Federal do Paraná. 50f., Campo Mourão- PR, 2019.

TRIVELDI, K.; CUPAKOVA, C.; KARPISKOVA, R. Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. **Veterinarni Medicina**, v.56, p.353-



357, 2011.

TULINI, F. L.; GOMES, B. C.; MARTINIS, E. C. P. de. Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* 130 isolated from mozzarella cheese. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 1, p. 155-159, 2011.

VAHJEN, W. et al. Effects of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on the rate of natural chlamydia infection in swine. **Infec. Immun.**, v.73, n.7, p.4346-4353, 2005.

VILLANI, F.; COPPOLA, S. Selection of enterococcal strains for water-buffalo Mozzarella cheese manufacture. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia (Italy)**, 1994.

WILLEMS, R.J. et al. Comparative genomic analysis reveals significant enrichment of mobile genetic elements and genes encoding surface-structure proteins in hospital-associated clonal-complex 2 *Enterococcus faecalis*. **BMC Microbiology**, v.11, p.3, 2011.

YAHFOUFI, N. et al. **Accepte duscrt.** Current Opinion in Food Science, 2018.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J.T.M.; GEURTS, T.J. **Dairy Science and Technology**. Ed. 2. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, 2006, 744p.