UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE EDUCAÇÃO SUPERIOR DO OESTE – CEO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

VANESSA LANDO

PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE ISOLADOS DE *LACTOBACILLUS* OBTIDO DE LEITE *IN NATURA* COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA *SALMONELLA* ENTERETIDIS E *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

PINHALZINHO
2022

VANESSA LANDO

PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE ISOLADOS DE *LACTOBACILLUS* OBTIDO DE LEITE *IN NATURA* COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA *SALMONELLA* ENTERETIDIS E *SALMONELLA* TYPHIMURIUM

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos, Linha de Pesquisa Desenvolvimento e Otimização de Tecnologias e Processos, da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.
Orientadora: Profa. Dra. Liziane Schittler Moroni

PINHALZINHO

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da

Biblioteca Setorial do CEO/UDESC,

com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Lando, Vanessa
Propriedades probióticas de isolados de Lactobacillus obtido de leite in natura com atividade antimicrobiana contra Salmonella Enteretidis e Salmonella Typhimurium / Vanessa Lando. -- 2022.
55 p.

Orientadora: Liziane Schittler Moroni
Dissertação (mestrado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Chapecó, 2022.

1. Probióticos. 2. Gastrointestinal. 3. Adesão. 4. Biofilme. 5. Leite Fermentado. I. Schittler Moroni, Liziane . II. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Educação Superior do Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

VANESSA LANDO

Propriedades probióticas de isolados de *Lactobacillus* obtido de leite *in natura* com atividade antimicrobiana contra *Salmonella* Enteretidis e *Salmonella* Typhimurium

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos, Linha de Pesquisa Propriedade e Segurança dos Alimentos, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Professor(a) Dr(a).Liziane Schittler Moroni
Orientador/Presidente – (UDESC/OESTE)
Membros:

Professor(a) Dr(a). Aniela Pinto Kempka
Membro Interno Titular – (UDESC/OESTE)

Professor(a) Dr(a). Wladimir Padilha da Silva
Membro Externo Titular – (DCTA/UFPel)

Professor(a) Dr(a). Luciola Bagatini –
Membro Suplente (UDESC/OESTE)

Pinhalzinho, 27 de Julho de 2022.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir realizar este e tantos sonhos que tenho nesta vida. Sua presença nunca me permitiu desistir nos momentos em que o cansaço tomou conta. Por me mostrar em momentos simples e únicos o quanto sou abençoada por ter pessoas incríveis ao meu redor

A minha família, em especial meu pai Valdemar Lando, minha mãe Ivanete Tonello Lando, meu irmão Marcos Vinicius Lando e minha Vó Reilde Tonello, por me apoiarem de todas as formas, por serem meus exemplos de amor, dedicação e carinho. Por compreenderem minha ausência em tantos momentos, minha vontade de ser melhor a cada dia é por vocês.

Ao meu noivo Eduardo Marques Eckert, por me auxiliar tanto em todos os momentos da minha vida. Obrigada por me ouvir e permanecer ao meu lado com tanta atenção, cuidado, carinho e paciência, certamente a minha caminhada fica mais leve e feliz ao seu lado.

A minha segunda família, Jorge Eckert, Rosa Eckert e Daniela Eckert por todos os momentos de apoio e incentivo durante toda minha trajetória.

A minha orientadora Prof. Dra. Liziane Schittler Moroni, por esses anos de amizade, paciência, confiança e por todo o conhecimento compartilhado durante esse período. Levarei para a vida toda seus ensinamentos.

Aos bolsistas do Microlab, em especial a Natália Valduga pela parceria e apoio nos experimentos. Agradeço a todos os momentos de conversa, apoio e amizade. Levarei sempre comigo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UDESC e a todos os professores. É gratificante fazer parte dessa história.

A todos os meus amigos de longa data, por entenderem e me apoiarem durante os momentos de ausência, preocupações e estresse.

Por fim, agradeço de todo o meu coração a todos que acreditaram e que contribuíram direta ou indiretamente em mais essa etapa da minha vida.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo caracterizar isolados probióticos de *Lactobacillus* com atividade antimicrobiana contra Salmonella spp. e avaliar a viabilidade celular em produtos lácteos fermentados. Para isso, os isolados *L. fermentum* LBF233, *L. fermentum* LBF433, *L. casei* LBC 237 obtidos de leite cru foram avaliados e confirmaram a não atividade de DNAse, gelatinase e enzimas hemolíticas. Além disso, foram suscetíveis aos antibióticos testados, exceto *L. fermentum* LBF233 classificado como resistente à penicilina. Confirmou-se que os isolados apresentaram atividade de β-galactosidase e demonstraram capacidade de adesão à superfície celular, com hidrofobicidade entre 6,30 e 31,05% e autoagregação entre 15,36% e 45,23%. Além de moderada capacidade de formação de biofilme. Os isolados de *Lactobacillus* sobreviveram a condições gastrointestinais e demonstraram atividade anti-salmonella com zonas de inibição entre 7,33 ± 0,58 e 10,67 ± 1,15 mm. A capacidade de isolados de *Lactobacillus* em aderir e bloquear a inversão aos patógenos *S*. Enteretidis e *S*. Typhimurium foi avaliada por meio de coagregação, obtendo-se percentuais entre 4,66 e 18,15 %. Durante este estudo, o sobrenadante livre de células (CFS) dos isolados foi avaliado e demonstrou atividade anti-salmonella. Além disso, *Lactobacillus*, quando avaliados em co-cultivo com *S*. Enteretidis e *S*. Typhimurium, inibiu os patógenos. Por fim, os isolados *L. fermentum* LBF433, *L. casei* LBC 237 podem fermentar e manter a concentração de células viáveis entre 7,0 e 9,0 log UFC/mL durante o armazenamento, demonstrando o potencial probiótico.

Palavras-chave: Probióticos. Gastrointestinal. Adesão. Biofilme. Leite Fermentado.

ABSTRACT

The present study aimed to characterize probiotic Lactobacillus isolates with antimicrobial activity against Salmonella spp. and to evaluate cell viability in fermented dairy product. For this, the isolates L. fermentum LBF233, L. fermentum LBF433, L. casei LBC 237 obtained from raw milk were evaluated and confirmed the non-activity of DNAse, gelatinase and hemolytic enzymes. In addition, they were susceptible to the antibiotics tested, except for L. fermentum LBF233 classified as resistant to penicillin. It was confirmed that the isolates showed β-galactosidase activity and demonstrated the ability to adhere to the cell surface, with hydrophobicity between 6.30 and 31.05% and self-aggregation between 15.36% and 45.23%. In addition to moderate capacity for biofilm formation. Lactobacillus isolates survived gastrointestinal conditions and demonstrated anti-salmonella activity with zones of inhibition between 7.33 ± 0.58 and 10.67 ± 1.15 mm. The ability of Lactobacillus isolates to adhere and block inversion to S. Enteretidis and S. Typhimurium pathogens was evaluated through co-aggregation, obtaining percentages between 4.66 and 18.15 %. During this study, the cell-free supernatant (CFS) of the isolates were evaluated and demonstrated anti-salmonella activity. Furthermore, Lactobacillus, when evaluated in co-culture with S. Enteretidis and S. Typhimurium, inhibited the pathogens. Finally, the isolates L. fermentum LBF433, L. casei LBC 237 can ferment and maintain the concentration of viable cells between 7.0 and 9.0 log CFU/mL during storage, demonstrating the probiotic potential.

Keywords: Probiotics. Gastrointestinal. Accession. Biofilm. Fermented milk.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Critérios de seleção para probióticos.....18

Figura 2. Mecanismos de ação de culturas probióticas.....19

Figura 3. Contagens (log. UFC.mL-1) de *S*. Enteretidis e *S*. Typhimurium na presença de isolados de L. *fermentum* LBF433, L. f*ermentum* LBF233, L. *casei* LBC237 e L. *casei* comercial em experimento de co-cultura.....36

Figura 4. Contagens (log.UFC.mL-1) *Lactobacillus* (L. *fermentum* LBF433, L *fermentum* LBF233 e L. *casei* LBC237) e L. *casei* comercial na presença dos patógenos de *S*. Enteretidis e *S*. Typhimurium de em experimento de co-cultura 37

Figura 5. Produção da enzima de β-galactosidase pelos isolados L. *fermentum* LBF 433, L. *fermentum* LBF 233 e L. *casei* LBC 237.....40

Figura 6. Capacidade de formação de biofilme dos isolados L. *fermentum* LBF433, L. *fermentum* LBF 233 e L. *casei* LBC 237 e cultura comercial de L. *casei*.....41

Figura 7. Formação de agregados e capacidade de co-agregação e auto-agregação.....42

Figura 8. Contagem de L. *casei* LBC 237 e L. *fermentum* LFC433 (log de UFC. mL^{-1} e valores do pH durante fermentação em leite a 36 ºC por 72 h.....46

Figura 9. Avaliação do pH e viabilidade (log de UFC. mL-1) dos isolados de L. *casei* LBC 237 e L. *fermentum* LBF433, durante armazenamento em ambiente refrigerado de 4ºC durante 12 dias.....46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Zona de inibição (mm) produzida pelos isolados de de L. *fermentum* LBF 433, L. f*ermentum* LBF 233 e L. *casei* LBC 237 contra *S*. Enteretidis, *S*. Typhymurium, E. *coli* TACC 25922 (a), E. *coli* O157:H7 (b), S. *aureus* ATCC 25923 (a) e S. *aureus* ATCC 6538 (b)..... 35

Tabela 2. Taxa (%) de inibição de *S*. Typhimurium e *S*. Enteretidis em concentrações de 10 e 20 % de sobrenadante livre de células (SLC) dos isolados de L. *fermentum* LBF433, L *fermentum* LBF233 e L. *casei* LBC237 e cultura comercial de L*. casei*. 39

Tabela 3. Capacidade de co-agregação com *S*. Enteretidis *S*. Typhimurium e auto-agregação das cepas de cepas comerciais e cepas de *Lactobacillus* (*L. fermentum* LBF433, *L. fermentum* LBF 233 e *L. casei* LBC 237) e cultura comercial de L. *casei.* 43

Tabela 4 Contagens (log. UFC.mL-1) e taxa de sobrevivência dos isolados L. fermentum LBF433, L. fermentum LBF 233 e L. casei LBC 237 após para simulação das condições gástricas, intestinais e gastrointestinais in vitro.....44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL Bactérias Ácido Láticas
BHI Brain Heart Infusion Broth
CaCl2 Cloreto de Cálcio
CIM Concentração inibitória mínima
CLSI Clinical & Laboratory Standards Institute
D.O Densidade ótica
FDA Food and Drug Authority
GRAS Generally recognized asSafe
HDS Hidrofobicidade de Superfície
LB Luria Bertani
LDR Leite Desnatado Reconstituído
LOG Logarítmico
MH Ágar Muller-Hinton
MRS Man Rogosa e Shape
NaCl Cloreto de Sódio
NaOH Hidróxido de Sódio
OMS Organização Mundial da Saúde
ONPG Orto-nitrofenil- β-d-galactopiranosídeo
PCA Agar Plate Count
pH Potencial hidrogeniônico
RPM Rotações Por Minuto
SBH Sal Biliar Hidrolase
SLC Solução livre de célula
TSA Triptona de Soja
UDESC Universidade do Estado de Santa Catarina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
2. OBJETIVOS 14
2.1 OBJETIVO GERAL 14
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO 14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15
3.1 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS (BAL) 15
3.2 PROBIÓTICOS 17
3.3 GÊNERO *LACTOBACILLUS* spp. 21
3.4 GÊNERO *SALMONELLA* SPP. 22
3.5 LEITE FERMENTADO 23
4. MATERIAL E MÉTODOS 24
4.1 ISOLADOS E CEPAS BACTERIANAS 24
4.2 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DOS ISOLADOS DE *LACTOBACILLUS* . 25
4.2.1 Gelatinase 25
4.2.2 DNAse 25
4.2.3 Atividade Hemolítica 25
4.2.4 Lipase 26
4.2.5 Proteólise 26
4.3 SENSIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS CLÍNICOS 26
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA CONTRA MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS 27
4.5 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DOS ISOLADOS *LACTOBACILLUS* CONTRA *S*. TYPHIMURIUM E *S*. ENTERETIDIS 27
4.6 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES PROBIÓTICA DOS ISOLADOS DE *LACTOBACILLUS* 28
4.6.1 Atividade de β-galactosidase 28
4.6.2 Hidrofobicidade de superfície 29
4.6.3 Formação de Biofilme 29
4.6.4 Capacidade de co-agregação entre *Lactobacillus* e *Salmonella* 30
4.6.5 Capacidade de auto-agregação 30
4.7EXPERIMENTO DE CO-CULTURA ENTRE *LACTOBACILLUS* E *SALMONELLA* 31
4.8 RESISTÊNCIA AS CONDIÇÕES GÁSTRICAS E INTESTINAIS SIMULADAS *IN VITRO* 31
4.9 PREPARAÇÃO DE LEITE FERMENTADO PROBIÓTICO 32
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA 33
5. RESULTADOS 33

5.1 SEGURANÇA DOS ISOLADOS DE *LACTOBACILLUS* 33
5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ISOLADOS 34
5.3 ATRIBUTOS ANTI-SALMONELLA 36
5.3.1 Atividade de co-cultura de *Lactobacillus* e *Salmonella* 36
5.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) 38
5.4 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADE PROBIÓTICAS 39
5.4.1 Produção de β-galactosidase 39
5.4.2 Hidrofobicidade de Superfície 40
5.4.3 Produção de Biofilme 41
5.4.4 Capacidade de co-agregação e auto-agregação 42
5.5 RESISTÊNCIA A CONDIÇÕES GÁSTRICAS E INTESTINAIS SIMULADAS *IN VITRO* 43
5.5 VIABILIDADE EM LEITE FERMENTADO 45
6.CONCLUSÃO 48
7. REFERÊNCIAS 49