



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO ISOLADAS DE UM
PRODUTO CÁRNEO FERMENTADO TRADICIONAL E DO AMBIENTE FABRIL**

SÍLVIA MARIA LOURENÇO GONÇALVES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António Salvador Ferreira Henriques Barreto

Doutor Luís Avelino Silva Coutinho Patarata

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

ORIENTADOR

Doutora Maria João dos Ramos

Fraqueza

2009

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO ISOLADAS DE UM
PRODUTO CÁRNEO FERMENTADO TRADICIONAL E DO AMBIENTE FABRIL**

SÍLVIA MARIA LOURENÇO GONÇALVES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António Salvador Ferreira Henriques Barreto

Doutor Luís Avelino Silva Coutinho Patarata

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

ORIENTADOR

Doutora Maria João dos Ramos

Fraqueza

2009

LISBOA

DEDICATÓRIA

A todos os que sempre confiaram no meu empenho e me apoiam incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. M^a João Fraqueza, pela ajuda e orientação deste trabalho,

À equipa técnica do Laboratório de Tecnologia da FMV- UTL, Lisboa, pela presença incansável nos momentos em que precisei de ajuda,

À equipa técnica do LAM- IAP SAS, Košice, Eslováquia, pelo empenho na transferência de conhecimentos,

Às equipas técnicas dos Núcleos de Nutrição e de Bioquímica da FMV- UTL, Lisboa, pela disponibilidade demonstrada,

À minha família e ao Ricardo, pelo apoio incondicional e fortalecedor,

A todos os que de forma directa ou indirecta contribuíram para que este trabalho se tornasse uma realidade.

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO ISOLADAS DE UM PRODUTO CÁRNEO FERMENTADO TRADICIONAL E DO AMBIENTE FABRIL

RESUMO:

Trinta e seis estirpes das espécies *L. plantarum*, *L. curvatus* e *L. sakei* isoladas de um produto cárneo fermentado tradicional (chouriço) e do ambiente fabril de duas unidades portuguesas de produção, previamente identificadas por testes bioquímicos, foram identificadas genotipicamente através das metodologias PCR e PCR *Fingerprinting*. Todas as estirpes foram caracterizadas relativamente à sensibilidade a nove antibióticos, tendo-se verificado uma elevada percentagem de estirpes resistentes para a maioria dos antibióticos testados.

As estirpes de *Lactobacillus* não demonstraram capacidades lipolítica e proteolítica.

Sendo as Bactérias do Ácido Lático (BAL) conhecidas pela produção de substâncias inibitórias, as estirpes identificadas foram estudadas nas suas capacidades de inibição de um agente indicador sensível (*E. avium* EA5), de microrganismos coabitantes (*E. coli* e *S. xylosum*) e patogénicos (*L. monocytogenes* e *S. aureus*). Diversas estirpes demonstraram capacidade inibitória destes agentes, e duas delas, *L. plantarum* PO5-15 e PO5-51, mantiveram esse comportamento após centrifugação, liofilização e ajuste do pH a 7,0, considerando-se a possibilidade de produção de substâncias bacteriocinogénicas ou de bacteriocinas. Estas estirpes demonstraram capacidade de sobrevivência em meio com pH 3 e com Oxgall (1%), características favoráveis quando usadas como agentes probióticos, resistindo à passagem no estômago e intestino.

O crescimento apresentado por algumas estirpes a várias temperaturas (10°C, 25°C, 30°C e 44,5°C), permite a sua possível aplicação em processos tecnológicos com temperaturas variáveis.

PALAVRAS CHAVE: Bactérias do Ácido Lático, *Lactobacillus*, produtos cárneos fermentados, probióticos, substâncias com actividade bacteriocinogénica

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM A FERMENTED TRADITIONAL MEAT PRODUCT AND WORKSHOP ENVIRONMENT

ABSTRACT:

Thirty six strains of *L. plantarum*, *L. curvatus* and *L. sakei* isolated from a traditional fermented meat product (chouriço) and workshop environment of two Portuguese production units, previously identified by biochemical tests, were genotypically identified using PCR and PCR Fingerprinting techniques. All strains were submitted to Antibiotic Sensibility Tests by disk diffusion method, using nine different antimicrobial substances. It was verified that a high percentage of strains were resistant to the antibiotic effects. All strains have not demonstrated lipolytic or proteolytic abilities.

Lactic Acid Bacteria (LAB) are known by the production of inhibitory substances. The identified strains were evaluated for their ability to inhibit a sensitive indicator agent (*E. avium* EA5), cohabitant microorganisms (*E. coli* and *S. xylosus*) and pathogens (*L. monocytogenes* and *S. aureus*). Several strains have shown inhibitory capabilities to some of these agents. Two of them, *L. plantarum* PO5-15 and PO5-51, kept that skill even after centrifugation, liofilization and pH adjustment to 7,0, fact that enhances the possibility of production of bacteriocin-like substances or bacteriocins. These strains survived under pH 3,0 and Ovgall (1%) conditions, that reveals favorable characteristics for use as probiotic agents , with increased capability to pass through the stomach and intestine.

Growth demonstrated by some strains when submitted to different temperature conditions (10°C, 25°C, 30°C and 44,5°C), allows their application in technological processes with different temperatures.

KEYWORDS: Lactic Acid Bacteria (LAB), *Lactobacillus*, fermented meat products, probiotics, bacteriocin-like substances

ÍNDICE

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	2
2.1. O papel das bactérias do ácido láctico (BAL) nos alimentos: sua caracterização	2
2.1.1. Importância e caracterização de <i>Lactobacilli</i>	5
2.1.1.1. Características morfológicas.....	6
2.1.1.2. Taxonomia.....	6
2.1.1.3. Características genéticas.....	7
2.2. Aplicações tecnológicas das bactérias do ácido láctico	9
2.2.1. Actividade lipolítica e actividade proteolítica	14
2.3. Actividade antimicrobiana das bactérias do ácido láctico.....	15
2.4. Utilização de bacteriocinas em alimentos	16
2.4.1. Ecologia das bacteriocinas	18
2.4.2. Classificação das bacteriocinas	19
2.4.3. Utilização das bacteriocinas ou bactérias do ácido láctico com actividade bacteriocinogénica como conservantes em alimentos	19
2.5. Aplicações terapêuticas das bactérias do ácido láctico	21
2.6. Resistência das bactérias do ácido láctico aos antibióticos	23
2.7. Resistência das bactérias do ácido láctico às condições adversas do meio	25
2.7.1. Resistência a pH baixo	25
2.7.2. Resistência aos sais biliares.....	26
2.7.3. Resistência a enzimas.....	26
2.7.4. Resistência a diferentes temperaturas.....	26
3. Materiais e Métodos	27
3.1. Identificação genotípica de bactérias do ácido láctico isoladas de produtos cárneos fermentados	27
3.1.1. Origem das estirpes em estudo	27
3.1.1.1. Colheita das amostras e identificação das espécies.....	27
3.1.1.2. Cultura, isolamento e identificação fenotípica.....	28
3.1.2. Isolados de <i>Lactobacilli</i>	30
3.1.2.1. Estirpes em estudo: conservação e cultivo para revivificação	30
3.1.3. Identificação genética das espécies de <i>Lactobacillus spp.</i> por PCR.....	30
3.1.3.1. Extracção de DNA.....	30
3.1.3.2. Estirpes de referência: conservação e cultivo	30
3.1.3.3. Metodologia PCR para identificação das espécies	31
3.1.3.3.1. <i>Lactobacillus plantarum</i>	31
3.1.3.3.2. <i>Lactobacillus curvatus</i>	31
3.1.3.3.3. <i>Lactobacillus sakei</i>	32
3.1.3.4. Metodologia PCR <i>Fingerprinting</i>	32
3.2. Caracterização fenotípica das estirpes em estudo.....	33
3.2.1. Testes de sensibilidade a antibióticos.....	33
3.2.2. Actividade lipolítica	33
3.2.3. Actividade proteolítica.....	34
3.2.4. Produção de substâncias com actividade bacteriocinogénica.....	34
3.2.4.1. Método qualitativo para avaliação da actividade bacteriocinogénica das estirpes.....	34
3.2.4.2. Determinação da produção de substâncias com actividade bacteriocinogénica.....	35
3.2.4.2.1. Quantificação da produção de substâncias com actividade bacteriocinogénica.....	35
3.2.5. Capacidade de acidificação do meio envolvente	36
3.2.6. Determinação da tolerância a pH baixo das estirpes com actividade bacteriocinogénica.....	36
3.2.7. Determinação da tolerância aos sais biliares das estirpes com actividade bacteriocinogénica.....	37

3.2.8. Determinação do crescimento a diferentes temperaturas das estirpes com actividade bacteriocinogénica.....	37
3.3. Análise estatística dos resultados.....	38
4. Resultados	38
4.1. Caracterização genética das estirpes	38
4.1.1. Identificação genética das estirpes de <i>Lactobacillus</i> por PCR	38
4.1.2. PCR <i>Fingerprinting</i>	43
4.2. Caracterização fenotípica das estirpes	45
4.2.1. Sensibilidade a Antibióticos	45
4.2.2. Actividade lipolítica e proteolítica das estirpes em estudo.....	47
4.2.3. Actividade bacteriocinogénica das estirpes	48
4.2.4. Quantificação da actividade bacteriocinogénica das estirpes	50
4.2.5. Capacidade de acidificação do meio envolvente	50
4.2.6. Tolerância a pH baixo das estirpes com actividade bacteriocinogénica	51
4.2.7. Tolerância aos sais biliares das estirpes com actividade bacteriocinogénica..	51
4.2.8. Crescimento a diferentes temperaturas das estirpes com actividade bacteriocinogénica.....	52
4.2.9. Diferenciação de estirpes pelas suas características fenotípicas e genotípicas	53
5. Discussão.....	55
6. Conclusões	65
7. Bibliografia.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Organização taxonómica até às famílias das BAL de acordo com o “ <i>Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea</i> ” (TOBA, versão 05.12.09) e com a “ <i>List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature</i> ” (LPNSN, versão 05.12.09).....	5
Figura 2: Identificação genética de 12 estirpes de <i>L. plantarum</i> por metodologia PCR	41
Figura 3: Identificação genética de 11 estirpes de <i>L. plantarum</i> por metodologia PCR	41
Figura 4: Identificação genética de 6 estirpes de <i>L. curvatus</i> por metodologia PCR	42
Figura 5: Identificação genética de 7 estirpes de <i>L. sakei</i> por metodologia PCR	42
Figura 6: Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes <i>L. plantarum</i> obtido por PCR <i>Fingerprinting</i> . A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança dado pela análise de <i>clusters</i>	43
Figura 7: Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes <i>L. curvatus</i> obtido por PCR <i>Fingerprinting</i> . A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança dado pela análise de <i>clusters</i>	44
Figura 8: Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes identificadas como <i>L. sakei</i> obtido por PCR <i>Fingerprinting</i> . A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança dado pela análise de <i>clusters</i>	44
Figuras 9 A e B: Zonas de inibição formadas na presença de discos de antibióticos, da estirpe PO5-8 (<i>L. curvatus</i>) em placas MRS 1,5% agar	47
Figura 10: Ausência de formação de halos transparentes na avaliação da actividade proteolítica em estirpes de <i>Lactobacilli</i> (estirpe não proteolítica).	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Codificação das estirpes e sua relação com as unidades de produção e locais de colheita	28
Tabela 2: Identificação fenotípica por API 50CHL (bioMérieux S.A., França) e grau de certeza da identificação (%) das estirpes isoladas nas unidades de produção A e B.....	29
Tabela 3: Condições de PCR para identificação genética de <i>L. plantarum</i>	31
Tabela 4: Condições de PCR para identificação genética de <i>L. curvatus</i>	32
Tabela 5: Condições de PCR para identificação genética de <i>L. sakei</i>	32
Tabela 6: Condições de PCR <i>Fingerprinting</i> para diferenciação de espécies e subespécies de <i>Lactobacillus</i> em estudo.....	33
Tabela 7: Relação entre as diluições dos sobrenadantes e a actividade bacteriocinogénica manifestada em Unidades Arbitrárias por mililitro (UA/ ml)	36
Tabela 8: Identificação genética por PCR convencional, obtida por aplicação das condições definidas para <i>L. plantarum</i> , <i>L. curvatus</i> e <i>L. sakei</i> às várias estirpes previamente isoladas.	39
Tabela 9: Identificação fenotípica por API 50CHL (bioMérieux, França) e genotípica por PCR das estirpes isoladas em duas unidades de produção.	40
Tabela 10: Resistência (R), sensibilidade intermédia (I) ou sensibilidade (S) apresentada pelas estirpes de <i>Lactobacillus</i> à presença de antibióticos (cloranfenicol (30 µg), estreptomicina (10 µg), vancomicina (30 µg), kanamicina (30 µg), rifampicina (30 µg), clindamicina (10 µg), ampicilina (10 µg), gentamicina (10 µg) e eritromicina (15 µg))	45
Tabela 11: Actividade lipolítica e proteolítica demonstrada pelas estirpes de <i>Lactobacillus</i> . 48	
Tabela 12: Dimensão das zonas de inibição formadas pelas estirpes de <i>Lactobacillus</i> quando cultivadas na presença de outros agentes: EA5 (estirpe indicadora), <i>L. monocytogenes</i> 4A CECT 934, <i>S. aureus</i> ATCC 29213, <i>S. xylosus</i> CIP 81.66 e <i>E. coli</i> CCUG42744	49
Tabela 13: Actividade bacteriocinogénica de diferentes estirpes de <i>L. plantarum</i> , <i>L. curvatus</i> e <i>L. sakei</i> (em Unidades Arbitrárias por ml)	50
Tabela 14: Valor de pH do meio de cultura apresentado por estirpes que apresentaram maiores zonas de inibição contra EA5, após 24h de cultivo a 30°C.	51
Tabela 15: Contagem das colónias que resistiram em meio com pH 3 durante 3 horas.	51
Tabela 16: Resistência das estirpes seleccionadas à presença de Oxgall (resultados expressos em DO _{600 nm} e em UFC/ ml às 0h, 18h e 24h de cultivo.	52
Tabela 17: Densidade óptica (600 nm) dos meios de cultura das estirpes de <i>Lactobacillus</i> que formaram zonas de inibição ≥15 mm no Método de Skalka modificado, após 24h a diferentes temperaturas (10°C, 25°C, 30°C e 44,5°C).	52
Tabela 18: Subgrupos de estirpes <i>L. plantarum</i> com grau de semelhança superior a 90%, pela análise de <i>clusters</i> e caracterização fenotípica.	54

Tabela 19: Subgrupos de estirpes *L. curvatus* com grau de semelhança superior a 90%, pela análise de *clusters* e caracterização fenotípica. 54

Tabela 20: Subgrupos de estirpes *L. sakei* com grau de semelhança superior a 90%, pela análise de *clusters* e caracterização fenotípica. 55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Resultados dos testes de sensibilidade aos nove antibióticos apresentados pelas 36 estirpes de *Lactobacillus* em estudo. O eixo vertical representa o número de estirpes resistentes aos vários antibióticos e o eixo horizontal as designações dos antibióticos usados. R- resistência, I- sensibilidade intermédia, S- sensibilidade..... 46

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP- *Amplified Fragment Length Polymorphism*
ARDRA- *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*
BAL- *Bactérias do Ácido Lático*
BHI- *Brain- Hart- Infusion*
BLIS- *Bacteriocinogenic- Like Inibitory Substances*
BPW- *Buffered Peptoned Water*
BSH- *Bile Salt Hidrolase*
DNA- *Desoxiribonucleic Acid*
EA5- *Enterococcus avium*
EFSA- *European Food Safety Authority*
EK13- *Enterococcus faecium*
FAO- *Food and Agriculture Organisation*
FDA- *Food and Drugs Administration*
GRAS- *Generally Recognized As Safe*
IFIC- *International Food Information Council*
ISO- *International Organization for Standardisation*
LH- PCR- *Length-Heterogeneity PCR*
LPNSN- *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*
MIC- *Minimal Inibitory Concentration*
MRS- *Man- Rogosa- Sharpe*
NCCLS- *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
PCR- *Polymerase Chain Reaction*
PCR- DGGE- *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*
PCR- TGGE- *Temperature Gradient Gel Electrophoresis*
PFGE- *Pulsed Field Gel Electrophoresis*
QPS- *Qualified Presumpcion of Safety*
RAPD- *Random Amplification of Polymorphic DNA*
REP-PCR- *Repetitive Extragenic Palindromic*
RFLP- *Restriction Fragment Length Polymorphism*
RNA- *Ribonucleic Acid*
RT- PCR- *Real Time- PCR*
TOBA- *Taxonomic Outline of e Bacteria and Archaea*
TTGE- *Temporal-Temperature-Gradient Gel Electrophoresis*
TSA- *Testes de Sensibilidade a Antibióticos*
UV- *Ultravioleta*
WHO- *World Health Organization*

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

AMP- ampicilina
B- Branco
cm²- centímetros quadrados
°C- graus Celsius
C- cloranfenicol
CC- clindamicina
CO₂- dióxido de carbono
DO- densidade óptica
E- eritromicina
GM- gentamicina
h- horas
HgCl₂- bicloreto de mercúrio
I- com resistência intermédia
K- kanamicina
kDa- kiloDalton
M- Marcador
mg- miligrama
MgCl₂- bicloreto de magnésio
mg/ l- miligrama por litro
ml- mililitro
mm- milímetro
mM- milimolar
nm- nanómetro
NaCl- Cloreto de sódio
p.b.- pares de bases
R- resistentes
RA- rifampicina
S- estreptomicina
S- sensíveis
UA/ ml- *Unidades Arbitrárias* por mililitro
UFC- Unidades Formadoras de Colónias
µg- micrograma
µm- micrometros
VA- vancomicina
w/v- peso/ volume
%- percentagem

1. Introdução

A produção e conservação de alimentos sem recorrer a compostos químicos têm sido cada vez mais equacionadas pela comunidade científica, o que tem influenciado a opinião dos consumidores a nível mundial. Os produtos alimentares assumidos como mais saudáveis e designados de “biológicos”, “naturais”, “probióticos”, “isentos de aditivos”, estão em franca expansão. Estes são muitas vezes procurados por conterem substâncias biologicamente activas que possuem funções nutricionais funcionais, promotoras da saúde por prevenirem doenças, protegerem órgãos e manterem as reacções orgânicas básicas. Segundo um estudo apresentado pela *International Food Information Council* (IFIC) com dados relativos ao consumo de alimentos funcionais nos EUA entre 1998 e 2002, reportou-se um aumento de 10% no consumo de alimentos funcionais sendo que 62% dos inquiridos consumia 1 a 3 alimentos específicos para obter benefícios funcionais ao nível da saúde. Segundo Bento (2008), nos últimos anos, o mercado global dos alimentos funcionais tem aumentado a uma taxa de 10% nos países ocidentais face a uma taxa de 2% verificada para os restantes alimentos e bebidas.

A procura de alternativas ao uso de químicos nos alimentos tem-se tornado evidente, designadamente no que toca aos conservantes. Os microrganismos e os produtos do seu metabolismo, tais como a flora láctica e as bacteriocinas são um exemplo desta aplicação.

Perante o exposto, o conhecimento da microflora dos produtos cárneos fermentados portugueses reveste-se de especial importância pelo facto de poder ser usada em aplicações tecnológicas, permitindo melhoria das características higio-sanitárias dos alimentos onde for introduzida, assim como com fins terapêuticos ou funcionais.

Neste trabalho pretendeu-se (1) contribuir para a caracterização fenotípica e genotípica da flora ácido láctica isolada em produtos cárneos fermentados e dos ambientes de produção; (2) avaliar a aptidão tecnológica de algumas estirpes seleccionadas dos grupos estudados; (3) averiguar quais as potencialidades bacteriocinogénicas das mesmas; (4) avaliar a resistência das várias estirpes em estudo a diferentes factores (pH, presença de sais biliares e temperatura).

A estrutura global da dissertação divide-se em: Revisão Bibliográfica, em que se faz uma discussão actual da temática escolhida; Materiais e Métodos, em que se apresentam as metodologias aplicadas para o desenrolar do trabalho experimental, com o intuito de obter informações que permitam caracterizar as estirpes em estudo e atingir os objectivos propostos; apresentação dos Resultados obtidos na aplicação das metodologias com a sua Discussão e Conclusões gerais face a outros estudos publicados no âmbito deste tema.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. O papel das bactérias do ácido láctico (BAL) nos alimentos: sua caracterização

Diversos microrganismos têm vindo a ser usados ao longo dos tempos com fins tecnológicos, quer na alimentação humana, quer animal. Alguns têm uma longa história de utilização e outros são pouco conhecidos, podendo representar perigo para os consumidores. Há portanto que estabelecer uma avaliação formal do risco relativamente ao seu uso, de modo a poderem ser utilizados com segurança sem prejuízo da saúde dos consumidores nem desrespeito pelos requisitos legislativos estabelecidos pela Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (EFSA). Neste grupo de microrganismos com interesse tecnológico e terapêutico incluem-se as bactérias do ácido láctico (BAL).

As BAL são consideradas o maior grupo de bactérias com acção probiótica (Collins, Thornton & Sullivan, 1998).

Morfologicamente, são bacilos ou cocos Gram positivos não móveis ou raramente móveis e que não formam endosporos. São microrganismos quimioorganotróficos com metabolismo estritamente fermentativo (Stamer, 1979; Kandler, 1983; Holzapfel & Wood, 1995) e incapazes de sintetizar grupos porfirínicos, tais como o grupo heme.

Apesar de serem aerotolerantes, são bactérias características de ambientes anaeróbios, muito exigentes do ponto de vista nutritivo e que suportam valores de pH muito baixos, sendo a tolerância à acidez uma característica variável entre estirpes.

Genericamente, não são patogénicas, usadas na indústria alimentar com fins tecnológicos, são acidificantes, tolerantes aos sais biliares, têm capacidade de adesão ao tecido epitelial do intestino e são produtoras de substâncias antimicrobianas, designadamente ácidos orgânicos, peróxido de hidrogénio e bacteriocinas (Dunne *et al.*, 1999).

Este grupo bacteriano inclui um conjunto de microrganismos procariotas capazes de produzir ácido láctico como produto final da fermentação dos hidratos de carbono. As BAL estão presentes em ambientes muito diversos tais como alimentos e bebidas fermentados, plantas, frutos, solo, águas residuais, e também fazem parte da microbiota dos tractos respiratório, intestinal e genital do homem e de animais (Holzapfel & Wood, 1995; Chambel, 2001).

O termo "*Milchsauerbacillus*" foi introduzido por Hueppe, em 1884, para descrever a flora microbiana responsável pela acidificação do leite e dos produtos lácteos.

No âmbito do fabrico de produtos cárneos fermentados, existe um conjunto de microrganismos considerados interessantes e que se pretende conservar, pelo facto de conferir características organolépticas e higio-sanitárias benéficas aos produtos. Esta microflora pode chegar ao produto através das matérias-primas usadas no fabrico, por retro-inoculação usando material proveniente de um lote fermentado ou em fermentação, ou através do uso de culturas de arranque comercializadas na forma congelada ou liofilizada.

Dos microrganismos envolvidos habitualmente na fermentação dos produtos cárneos encontram-se as BAL, elementos de *Micrococcaceae* e, em alguns casos, bolores e leveduras. As primeiras são utilizadas principalmente pela produção de compostos com capacidade antimicrobiana, cujas consequências ao nível da capacidade de conservação e de segurança são inquestionáveis; aos restantes têm sido atribuídas faculdades na redução de nitrato e degradação de peróxido de hidrogénio, com vantagens ao nível da qualidade e estabilidade da cor dos produtos, assim como de compostos azotados e lipídicos, com interações ao nível do *flavour* dos mesmos (Patarata, 2002).

Foi em 1919 que Orla- Jensen (citado por Inês, Tenreiro, Tenreiro & Mendes- Faia, 2008) definiu com razoável precisão este grupo de bactérias acidificantes, estabelecendo a sua diferenciação taxonómica com base em características morfológicas, metabólicas e fisiológicas (Stamer, 1979; Kandler, 1983; Axelsson, 1993). Na classificação que propôs existiam os seguintes géneros: *Betabacterium*, *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, *Streptococcus*, *Betacoccus*, *Tetracoccus*, *Microbacterium* e *Bacterium bifidum*. As alterações ocorridas na taxonomia das BAL, com a criação de novos géneros, espécies e sua reclassificação e reorganização, conduziram a que destes géneros apenas persista actualmente o género *Streptococcus*, embora não incluindo as espécies transferidas para os novos géneros *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Vagococcus* (Inês *et al.*, 2008).

A abordagem tradicional na classificação das BAL em diferentes géneros baseava-se fundamentalmente em características fenotípicas, nomeadamente: (i) morfológicas das células (forma, endósporos, flagelos e reacção de Gram) e das colónias (cor, dimensões e forma); (ii) bioquímicas (modo de fermentação da glucose e configuração do ácido láctico produzido); e (iii) fisiológicas (crescimento a diferentes temperaturas, capacidade de crescer em elevadas concentrações de sal e tolerância a diferentes pH do meio) (Inês *et al.*, 2008).

As características supracitadas continuam a ser usadas para diferenciação de alguns géneros de BAL, todavia outros métodos fenotípicos foram introduzidos na classificação das BAL tais como (i) os perfis metabólicos e enzimáticos; (ii) a tipagem fágica e bacteriocínica; (iii) a serotipagem. Com o desenvolvimento dos métodos quimiotaxonómicos surgiu também a análise de perfis de ácidos gordos ou de perfis de proteínas celulares totais ou a análise de constituintes da parede celular (Curck, Peladan & Hubert, 1994; Dellaglio, Roissart, Torriani, Curk & Janssens, 1994; Vandamme *et al.*, 1996; citados por Inês *et al.*, 2008).

A aplicação de técnicas moleculares na classificação e identificação das BAL permitiu substituir e/ou complementar as metodologias clássicas baseadas nas características fenotípicas. Dos métodos moleculares destacam-se, entre outros, a sequenciação do rDNA 16S e de outros genes, a determinação do teor molar de Guanina e da Citosina, as hibridações DNA-DNA e DNA-RNA, a análise de polimorfismos de dimensão de fragmentos de restrição (RFLP- *Restriction Fragment Length Polymorphism*), a macrorestrição (PFGE- *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) e diversas técnicas baseadas em PCR (*Polymerase Chain*

Reaction) tais como RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*).

Trabalhos exaustivos e extensos de determinação de sequências de RNA e DNA ribossómico, particularmente do rRNA 16S, têm permitido estabelecer as relações filogenéticas que servem de base à taxonomia actual das BAL. As BAL típicas pertencem ao ramo “*Clostridium*” das bactérias Gram positivas, por apresentarem um teor molar de Guanina (G) e Citosina (C) inferior a 50%, enquanto que o ramo “*Actinomycetes*” cujo teor em G e C é superior a 50%, inclui espécies do género *Bifidobacterium* e outros géneros também importantes nas indústrias dos alimentos e das bebidas (Coenye & Vandamme, 2003).

De modo geral, a maioria dos géneros das BAL forma grupos filogeneticamente distintos mas, para alguns, em particular *Lactobacillus* e *Pediococcus*, os *clusters* filogenéticos não se correlacionam com as classificações baseadas em caracteres fenotípicos (Axelsson, 2004).

No caso do género *Lactobacillus* e numa tentativa de conciliar os dados de caracterização fenotípica com os dados filogenéticos obtidos da sequenciação do rRNA, Hammes e Vogel (1995) propuseram a seguinte classificação: homofermentativos obrigatórios (grupo A), heterofermentativos facultativos (grupo B) e heterofermentativos obrigatórios (grupo C). Dentro de cada grupo fermentativo as espécies são organizadas de acordo com as suas relações filogenéticas pelos seguintes grupos: a) grupo *Lactobacillus delbrueckii*; b) grupo *Lactobacillus casei-Pediococcus*; c) grupo *Leuconostoc*, existindo as seguintes combinações Aa, Ab, Ba, Bb, Cb e Cc.

Para além destas discrepâncias filo-fenéticas, a maior dificuldade que surge ao sumarizar os grupos taxonómicos das BAL, actualmente reconhecidos, prende-se com a própria definição deste grupo funcional de bactérias. De facto, consoante as BAL são encaradas como um grupo de bactérias Gram positivas que produzem ácido láctico como único, principal ou importante produto da fermentação de açúcares obtendo energia (BAL *sensu lato*), ou como um sub-grupo destas que, para além de serem anaeróbias, microaerófilicas ou aerotolerantes, possuem um teor molar de G e C inferior a 50%, não produzem catalase e não formam endósporos (BAL *sensu strictu*), assim varia o número de géneros considerados e a correspondente diversidade filogenética (Inês *et al.*, 2008).

A Figura 1 apresenta a organização taxonómica deste grupo funcional de bactérias, no seu conceito mais amplo, recorrendo à informação disponível no TOBA (“*Taxonomic Outline of Bacteria and Archaea*” (Garrity *et al.*, 2007) e na LPNSN (“*List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*”, Euzéby, 1997), para a compilação dos géneros actualmente reconhecidos em termos de publicação válida e do número de espécies incluídas.

As BAL metabolizam, para além da glucose, outros açúcares nomeadamente: frutose, galactose, manose, sacarose, lactose, maltose e pentoses. A maior parte das hexoses são

transportadas por permeases (ATP- dependentes) e/ou pelo sistema da fosfotransferase (fosfoenolpiruvato- dependente) e são metabolizadas após isomerização e/ou fosforilação (Axelsson, 1993). No que diz respeito às pentoses, quase todas as estirpes heterofermentativas têm capacidade de as utilizar, embora existam algumas pentose-negativas. As pentoses são geralmente transportadas para o interior da célula bacteriana através de permeases, sendo fosforiladas e convertidas a D-xilulose-5-fosfato por epimerases e/ou isomerases. Este composto dá origem a quantidades equimolares de lactato e acetato pelas reações que ocorrem na parte final da via heterofermentativa (Inês *et al.*, 2008).

Figura 1: Organização taxonómica até às famílias das BAL de acordo com o “*Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea*” (TOBA, versão 05.12.09) e com a “*List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature*” (LPNSN, versão 05.12.09).

BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO					
DOMÍNIO BACTERIA					
CLASSE BACILLI					
ORDEM LACTOBACILLALES					
FAMÍLIA LACTOBACILLACEAE	FAMÍLIA AEROCOCCACEAE	FAMÍLIA CARNOBACTERIACEAE	FAMÍLIA ENTEROCOCCACEAE	FAMÍLIA LEUCONOSTOCACEAE	FAMÍLIA STREPTOCOCCACEAE
<p>ESPÉCIES <i>Lactobacillus</i> <i>Paralactobacillus</i> <i>Pediococcus</i></p>	<p>ESPÉCIES <i>Aerococcus</i> <i>Abiotrophia</i> <i>Doliscoccus</i> <i>Eremococcus</i> <i>Facklamis</i> <i>Globicatella</i> <i>Ignavigranum</i></p>	<p>ESPÉCIES <i>Carnobacterium</i> <i>Agitococcus</i> <i>Alkalibacterium</i> <i>Allofustis</i> <i>Alloiococcus</i> <i>Atopococcus</i> <i>Atopostipes</i> <i>Desemzia</i> <i>Dolisogranulum</i> <i>Granulicatella</i> <i>Isobacterium</i> <i>Lactosphaera</i> <i>Marinilactibacillus</i> <i>Trichococcus</i></p>	<p>ESPÉCIES <i>Enterococcus</i> <i>Atopobacter</i> <i>Catelliococcus</i> <i>Melissococcus</i> <i>Pilibacter</i> <i>Tetragenococcus</i> <i>Vagococcus</i></p>	<p>ESPÉCIES <i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weissella</i></p>	<p>ESPÉCIES <i>Streptococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Lactovum</i></p>

2.1.1. Importância e caracterização de *Lactobacilli*

Entre as várias espécies do grupo que constitui as BAL, as mais usadas em enchidos fermentados como culturas de arranque são das espécies *Lactobacillus curvatus*, *L. sakei*, *L. plantarum*, *Pediococcus acidilactici* e *P. pentosaceus* (Montel, Talon, Fournaud & Larpent, 1994; Hammes & Hertel, 1998; Hugas & Monfort, 1997). Outras espécies têm sido também testadas como probióticos em enchidos, designadamente *Lactobacillus acidophilus*, *L. alimentarius*, *L. casei* e *Bifidobacterium*, spp. (Patarata, 2002).

De acordo com os estudos publicados, as três espécies de *Lactobacillus* mais usadas como culturas de arranque em enchidos fermentados são *L. curvatus*, *L. sakei* e *L. plantarum*, (Montel, 1994).

A identificação de estirpes da mesma espécie é muitas vezes difícil, dada a sua proximidade morfológica e genética. Para diferenciar as várias estirpes de *Lactobacillus*, há que ter por base uma combinação entre características fenotípicas e genotípicas.

O género *Lactobacilli* tem sido classificado com base em características fenotípicas, incluindo morfológicas, modo de fermentação da glucose, capacidade de crescimento a diferentes temperaturas, configuração do ácido láctico produzido e tipos de carboidratos fermentados. No entanto, devido ao facto das espécies apresentarem requisitos nutricionais e de crescimento semelhantes, as técnicas de microbiologia clássica foram consideradas insuficientes. Acrescente-se que a avaliação das características fenotípicas são sempre demoradas e muito laboriosas. Neste contexto, as técnicas moleculares têm vindo a ser cada vez mais utilizadas pelo valor acrescentado na caracterização bacteriana (Kao, Liu & Shyu, 2007).

2.1.1.1. Características morfológicas

O género *Lactobacilli* engloba um conjunto diverso de 140 espécies (Euzéby, 1997), que apresentam algumas características comuns, designadamente serem Gram positivas, catalase negativas, não móveis, não esporuladas, anaeróbias facultativas e com capacidade de crescimento quer em ambientes de microaerofilia quer de anaerobiose estrita (Klein, Pack, Bonaparte & Reuter, 1998).

Morfologicamente, apresentam geralmente forma de bacilo ou bastonete estreito com aspecto linear, no entanto podem também ter aspecto cocobacilar ou espiralar; dimensões entre 0,6 e 1,2 µm por 2,0 e 8,0 µm; estes bacilos podem aparecer isolados, em pares ou cadeias curtas; não crescem a 45°C e algumas estirpes conseguem crescer a temperaturas entre 2 e 4°C; produzem ácido láctico a partir da fermentação de vários sacáridos (Kandler, & Weiss, 1986; Singh, Goswami, Singh & Heller, 2009). O teor molar de C e G varia entre 32% (*L. mali*) e 54% (*L. pontis* e *L. fermentum*); estes valores que ultrapassam os limites estabelecidos para o género, dando a impressão que *Lactobacilli* não é um género bem definido (Vandamme *et al.*, 1996).

A cultura e incubação destas bactérias são efectuadas em meio selectivo Man-Rogosa-Sharpe (MRS), ocorrendo o seu crescimento a temperaturas próximas de 30°C, durante 48 a 72 horas.

2.1.1.2. Taxonomia

O grande número de espécies dentro do género *Lactobacilli* e as suas similaridades fenotípicas e fisiológicas, em que se verificam transferências horizontais de características através de plasmídeos, condiciona grandemente a descrição taxonómica do género (Dalezios & Siebert, 2001; Hammes & Hertel, 2006; Hammes & Vogel, 1995). Com o objectivo de tornar mais fácil a identificação e caracterização das várias espécies foram

propostos vários esquemas baseados em características diferenciadoras, tais como fenotípicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas comparando a região 16S do rRNA (Hammes & Vogel, 1995; Kandler & Weiss, 1986; Orla-Jensen, 1919). Destes esquemas de identificação e caracterização resultou a deslocação de várias espécies para dentro e para fora do género. Algumas espécies foram reclassificadas, tais como *L. confuses*, *L. halotolerans*, *L. kandleri*, *L. minor*, *L. viridescens*, *L. minutus*, *L. rimae* e *L. uli*; outras constituíram um novo género, tais como *L. maltaromicus*, *L. carnis* e *L. divergens* que se inclui no género *Carnobacterium*. Esta situação criou também alguma ambiguidade em relação às espécies mais importantes do género, designadamente *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum* e *L. delbrueckii*, bem conhecidos pelas suas aplicabilidades em alimentos e com funções nutracêuticas (Collins, Farrow, Phillips, Feresu & Jones, 1987).

2.1.1.3. Características genéticas

A crescente importância das espécies de *Lactobacillus* nos processos industriais e na saúde humana e animal e o facto dos testes bioquímicos serem insuficientes para a caracterização e diferenciação das mesmas, levou ao desenvolvimento de métodos moleculares com elevado grau de sensibilidade direccionadas para este género (Chagnaud, Machinis, Coutte, Marecat & Mercenier, 2001; Singh *et al.*, 2009).

Contrariamente aos métodos de caracterização fenotípica, os de identificação e caracterização molecular são considerados consistentes, rápidos, fiáveis e reprodutíveis, tendo capacidade de discriminar diferenças entre espécies muito próximas. De facto, várias espécies de *Lactobacillus* foram reclassificadas com base em resultados obtidos recentemente por técnicas moleculares, alterando a classificação taxonómica de algumas, nomeadamente *L. cellobiosus*, *L. pastorianus*, *L. arizonensis* que passaram a ser designadas *L. fermentum*, *L. paracollinoides* e *L. plantarum*, respectivamente (Singh *et al.*, 2009).

As técnicas moleculares utilizadas mais frequentemente para identificação de *Lactobacillus* podem ser divididas em quatro grupos: i) técnicas não baseadas em PCR; ii) técnicas baseadas em PCR; iii) métodos baseados na combinação de ambas as técnicas referidas anteriormente; iv) técnicas baseadas na sequenciação (Singh *et al.*, 2009).

A identificação genética rápida de estirpes pertencentes a espécies geneticamente próximas é considerada difícil. As sondas de DNA que reconhecem principalmente regiões variáveis dos genes 16S ou 23S do rRNA têm sido usadas para identificar espécies e estirpes. Contudo, para espécies muito próximas estas sondas de rRNA não podem ser usadas devido à elevada similaridade das sequências de rRNA (Berthier & Ehrlich, 1998).

Os resultados obtidos relativos a sequências do gene 16S rRNA ou de regiões intergenéticas dos genes 16S- 23S rRNA têm levado à identificação de BAL usando oligonucleótidos específicos como sondas (fluorescentes ou não) ou em ensaios de PCR

(Berthier & Ehrlich, 1998; Tannock *et al.*, 2000). Chagnaud *et al.*, (2001) descreveram um método de PCR baseado na amplificação específica do fragmento 16S rRNA de 6 espécies de *Lactobacillus*. O programa de amplificação de DNA englobava várias etapas: (i) primeiro, ciclo-desnaturação; (ii) segundo, ciclo-desnaturação e *annealing*; (iii) terceiro, ciclo-extensão. Esta reacção exige a presença de DNA bacteriano em estudo, *primers*, tampão, MgCl₂ e enzima *taq*polimerase. Os produtos obtidos foram submetidos a electroforese em gel de agarose e visualizados por transiluminação com luz ultravioleta.

O PCR *multiplex* é uma evolução da técnica clássica de PCR, a qual permite detectar várias espécies ao mesmo tempo, usando vários *primers* simultaneamente, o que permite ganhar tempo e reduzir o período de resposta, tendo já sido testado em vários trabalhos para o género *Lactobacillus* (Song *et al.*, 2000; Tilsala-Timisjarvi & Alatosava, 1997; Kwon, Yang, Yeon, Kang, & Kim, 2004; citados por Singh *et al.*, 2009).

Outros métodos foram conseguidos a partir de evoluções do PCR, o que tem conferido maior especificidade e rapidez de detecção de estirpes e discriminação entre géneros e espécies.

As metodologias PCR- *fingerprinting* permitem obter uma impressão digital do genoma das estirpes através da amplificação de diferentes regiões do genoma do DNA extraído, obtendo um conjunto de fragmentos de DNA específico do microrganismo, e revelado através de electroforese em gel de agarose. Contrariamente às técnicas convencionais de PCR em que são usados dois *primers* que flanqueiam a região a amplificar, na PCR- *fingerprinting* utiliza-se um único *primer* que pode hibridar em várias regiões do genoma e originar vários fragmentos. A amplificação é garantida se o *primer* hibridar em cadeias opostas a pequena distância (4000 p.b.).

O número, reprodutibilidade e intensidade dos fragmentos de um perfil depende de vários factores tais como temperatura de hibridação do *primer*, concentração de DNA molde, concentração de sais (MgCl₂) e dimensão e sequência do *primer*. Portanto, para formular conclusões é importante conjugar os resultados de várias técnicas de PCR *Fingerprinting* e/ou relacionar os resultados com outros dados obtidos em testes paralelos (Welsh & McClelland, 1990; Williams, Kuubelik, Livak, Rafalksi & Tingey, 1990).

Tais são os casos das técnicas PCR- DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), usado recentemente para avaliar a população de *L. plantarum* em vinho tinto (Spano, Lonvaud-Funel, Claisse & Massa, 2007); PCR- TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*), que permite estudar a diversidade de uma comunidade bacteriana através da sequenciação dos fragmentos de DNA ribossomal durante a corrida de electroforese num determinado gradiente de temperaturas; RAPD (*Randomly Amplification of Polymorphic DNA*), muitas vezes usado para a diferenciação intra e inter- espécies no género *Lactobacillus* (Bjorkroth, Ridell & Korkeala, 1996; Du Plessis & Dicks, 1995; Elegado, Guerra, Macayan, Mendoza & Lizaran, 2004; Johansson, Quednau, Molin & Ahrne, 1995;

Khaled, Neilan, Henricsson & Conway, 1997; Oneca, Irigoyen, Ortigosa & Torre, 2003); REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic- PCR*), usado como método para diferenciar estirpes de *Lactobacillus* isoladas de enchidos e de queijo *Comte*, com elevada capacidade discriminatória e de baixo custo (Gevers, Huys, & Swings, 2001; Berthier, Beuvier, Dasen & Grappin, 2001); RT- PCR (*Real Time- PCR*), de elevada sensibilidade, tem sido usado com sucesso na identificação de espécies de *Lactobacillus* isoladas de produtos fermentados de salsicharia (Martin, Jofre, Garriga, Pla & Aymerich, 2006) e de amostras humanas (Haarman & Knol, 2006).

Segundo Bernardeau, Vernoux, Henri-Dubernet e Guéguen, (2008), o método mais discriminatório e reprodutível para diferenciar as várias estirpes de *Lactobacillus* é a técnica *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE). Esta técnica permite a comparação de fragmentos longos de DNA após a digestão com uma enzima de restrição; difere da electroforese em gel de agarose convencional uma vez que a orientação do campo eléctrico ao longo do gel se altera periodicamente, em vez de ser unidireccional e constante como na electroforese convencional.

Martín-Platero, Maqueda, Valdivia, Purswani & Martinez-Bueno (2009), num estudo direccionado para a avaliação da microflora de dois queijos de cabra espanhóis, “Quesaila Arochena” e “Torta Arochena”, aplicaram métodos de microbiologia convencional em conjugação com métodos moleculares: RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), TTGE (*Temporal-Temperature-Gradient Gel Electrophoresis*) e LH- PCR (*Length-Heterogeneity PCR*). Este trabalho permitiu concluir que apenas com a conjugação de vários métodos se conseguem resultados mais abrangentes e próximos da realidade.

Infelizmente, embora estas técnicas moleculares sejam ferramentas poderosas, algumas delas não são altamente reprodutíveis, uma vez que não existem bases de dados públicas que sirvam de termos de comparação para os resultados experimentais obtidos, e acima de tudo, exigem a utilização de microrganismos isolados em cultura pura. Considerando que apenas parte dos microrganismos existentes no alimento conseguem ser isolados em cultura pura, os estudos com base nestas técnicas poderão não refletir a composição real do ecossistema microbiano (Martin- Platero *et al.*, 2009).

2.2. Aplicações tecnológicas das bactérias do ácido láctico

Segundo Inês *et al.* (2008), as BAL constituem provavelmente o grupo mais numeroso de bactérias relacionadas com os seres humanos. Estas bactérias encontram-se naturalmente associadas às superfícies das mucosas, particularmente nos tractos gastrointestinal, respiratório e genital do homem e de outros animais (Axelsson, 1993; Makarova & Koonin, 2006), e são também indígenas em habitats muito diversos, desde produtos alimentares (leite e derivados, vegetais, frutos, cereais, carne, peixe, vinho) a solo, água, estrume e

águas residuais (Konings, Kok, Kuipers & Poolman, 2000; Hansen, 2002; Makarova & Koonin, 2006).

Numa perspectiva biotecnológica, as BAL têm um potencial de aplicação diversificado, desde o controlo do processo fermentativo na produção de alimentos fermentados até à sua utilização como probióticos na saúde humana e animal (Inês *et al.*, 2008).

Os alimentos fermentados, originários do Oriente, datam de tempos pré-históricos baseados em fermentações alcoólica, láctica e acética que eram efectuadas empiricamente para conservar os alimentos. Apesar de existirem actualmente outros métodos de conservação dos alimentos, tais como a refrigeração e a esterilização pelo calor, a fermentação continua a ter interesse industrial uma vez que a aplicação controlada desta metodologia garante a preservação e até melhoramento das características físico-químicas e organolépticas dos alimentos (Buckenhüskes, 1993). Estima-se que 25% da dieta dos europeus e 60% da dieta dos habitantes de muitos países em desenvolvimento seja constituída por alimentos fermentados (Holzapfel & Wood, 1995; Stiles, 1996; Leroy & DeVuyst, 2004).

Todas as classes de microrganismos podem ser, regra geral, usadas na fermentação de alimentos. Na Europa, as bactérias e as leveduras são mais utilizadas que os fungos filamentosos. Entre as bactérias, as BAL são as mais importantes (Buckenhüskes, 1993; Hansen, 2002), não só por serem indispensáveis na produção de certos alimentos e bebidas, dotando-os de uma grande variedade de atributos sensoriais únicos e desejáveis, mas também pela sua actividade antimicrobiana, inibindo microrganismos patogénicos e de deterioração que afectariam a segurança e qualidade dos mesmos (Daeschel, 1993).

De acordo com Klaenhammer *et al.* (2002), as aplicações das BAL na indústria alimentar recaem genericamente em seis géneros benéficos e não patogénicos: *Lactococcus* (leite), *Lactobacillus* (leite, carne, vegetais e cereais), *Leuconostoc* (vegetais, leite), *Pediococcus* (vegetais, carne), *Oenococcus oeni* (vinho) e *Streptococcus thermophilus* (leite). As BAL são maioritariamente consideradas organismos GRAS (“*Generally Recognized As Safe*”), embora já tenham sido observados casos pontuais em que algumas estirpes se comportaram como agentes patogénicos oportunistas em indivíduos com o sistema imunitário debilitado (Olano *et al.*, 2001; Zé-Zé *et al.*, 2004). Elas desempenham um papel fundamental na bioconservação de uma grande variedade de alimentos fermentados, permitindo o seu consumo com segurança. São ainda de referir os seus potenciais benefícios nutricionais resultantes da biodisponibilidade de minerais, produção de aminoácidos e vitaminas, aumento da digestibilidade da lactose e eliminação de toxinas endógenas e de compostos antinutricionais de alimentos de origem vegetal (Buckenhüskes, 2001).

Os produtos fermentados apresentam características de aroma, sabor, aparência visual, textura, consistência, durabilidade e segurança, diferentes das matérias-primas que lhes deram origem ou de outros alimentos semelhantes e que não sofreram fermentação. A

acidificação da carne migada ou picada durante a produção de enchidos fermentados secos/ fumados, pode ser atingida pela aplicação de aditivos químicos (Glucono- delta- lactona) ou por fermentação. Em ambos os casos, a durabilidade, a segurança e a textura do enchido serão alcançadas, porém, o sabor e o aroma característicos de um produto de qualidade só serão obtidos por fermentação (Buckenhüskes, 1993).

As BAL constituem um grupo importante de culturas iniciadoras ou *starter* a nível industrial em diversos produtos, designadamente queijos, iogurtes, enchidos, *sauerkraut* e *sourdough* (Messens & De Vuyst, 2002). As funções esperadas das culturas *starter* são a rápida acidificação das matérias-primas preparadas e o desenvolvimento de características sensoriais apreciáveis aos produtos finais (Leroy, Verluyten & De Vuyst, 2006).

A inoculação de culturas *starter* compostas por estirpes seleccionadas de BAL, tais como *Lactobacilli* homofermentativos, e/ ou *Pediococci* e cocos Gram-positivos, catalase-positivos, não patogénicos, coagulase-negativos, tais como *Staphylococci* e/ou *Kokuria*, permitem aumentar a segurança e a qualidade dos produtos finais, padronizar o processo de fabrico (Hugas & Monfort, 1997) e conservar os produtos durante períodos mais longos (Caplice & Fitzgerald, 1999).

As pequenas salsicharias continuam, no entanto, a usar o método de fermentação espontânea sem adição de culturas iniciadoras. Em último caso os microrganismos necessários à fermentação são provenientes da carne ou do ambiente e constituem a flora caseira (*house flora*) (Santos, González-Fernández, Jaime & Rovira, 1998). Pode ainda haver reinoculação de uma pequena quantidade de massa com características consideradas ideais e usada num fabrico prévio, servindo para reiniciar outro processo de fermentação (Alley *et al.*, 2002, citado por Leroy *et al.*, 2006). De modo geral, os produtos tradicionais de salsicharia são considerados de melhor qualidade quando comparados com os industriais, devido às propriedades da carne, ao modo de fabrico (Moretti *et al.*, 2004, citado por Leroy *et al.*, 2006) e à composição da flora caseira. Garcia- Varona *et al.* (2000), citado por Leroy *et al.* (2006) demonstraram que o sabor do chouriço artesanal pode variar com o local de produção.

Samelis, Metaxopoulos, Vlassi e Pappa (1998), citado por Leroy *et al.* (2006), sugeriram que as culturas *starter* comerciais usadas principalmente nos países do norte da Europa não conseguiam competir com a flora caseira que coloniza os produtos fabricados em salsicharias do sul da Europa, perdendo-se, com o seu uso, as características sensoriais desejáveis. As culturas devem ser seleccionadas de acordo com a sua aplicação específica, tendo em conta a receita e a tecnologia de fermentação, já que os factores ambientais interagem no sentido de seleccionar um número limitado de estirpes mais competitivas.

As estirpes *Pedicoccus acidilactici*, *Pedicoccus pentosaceus*, *Lactobacillus pentosus* e *Lactobacillus plantarum* surgem frequentemente nas culturas *starter* comerciais. No entanto, são raramente detectadas na flora isolada a partir de produtos fermentados de salsicharia

em que estas não tenham sido aplicadas, uma vez que a sua competitividade é reduzida relativamente a estirpes como *L. sakei* e *L. curvatus* (Dobmann *et al.*, 1998; Coppola *et al.*, 2000; citados por Leroy *et al.*, 2006). Apesar de conseguirem uma boa acidificação inicial da massa, as culturas supracitadas não conseguem evitar o desenvolvimento de outras BAL que provocam efeitos indesejáveis no produto final (Hugas & Monfort, 1997). O *L. plantarum* pode até levar a uma excessiva acidificação do produto, que o desvaloriza comercialmente (Garriga, Hugas, Aymerich & Monfort, 1996).

Apesar da rápida acidificação conseguir reduzir os perigos microbiológicos nos produtos fermentados, alguns microrganismos patogénicos podem surgir em produtos menos fermentados ou pouco maturados tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* (Leroy *et al.*, 2006). O *S. aureus* multiplica-se e produz enterotoxina na fase inicial de maturação da carne; a *E. coli* e a *Salmonella* têm maior importância em produtos pouco secos e pouco maturados (Lucke, 1998; Castaño *et al.*, 2002, citado por Leroy *et al.*, 2006); a *L. monocytogenes* tem sido detectada no produto final (Aymerich, Martin, Garriga & Hugas, 2003), possivelmente devido à sua presença na carne crua (Lucke, 1998; Samelis & Metaxopoulos, 1999).

A capacidade inibitória frente a estes agentes por parte das BAL usadas como culturas *starter* na produção de produtos fermentados está relacionada com a sua capacidade de produção de ácidos como o láctico e o acético, peróxido de hidrogénio, bacteriocinas, substâncias com actividade bacteriocinogénica e surfactantes (Fernandez *et al.*, 2003).

A produção de ácido é um processo considerado fundamental no fabrico de produtos fermentados; como tal, é frequente a adição de glúcidos fermentescíveis às massas, tendo sempre em atenção a flora que os irá utilizar e os produtos finais formados (Patarata, 2002). Geralmente quando se pretende uma rápida acidificação, junta-se glucose, por ser prontamente metabolizada (Olsen, 1985, citado por Patarata, 2002).

A maioria das BAL fermentam a glucose a ácido láctico, em condições normais de substrato e acesso limitado a oxigénio. Existem, no entanto, alguns factores que influenciam este padrão, designadamente: a disponibilidade ou tipo de glícido, o pH do meio e a presença de oxigénio (Patarata, 2002). Quando ocorre fermentação mista, verifica-se produção também, de ácido acético, ácido fórmico, etanol, dióxido de carbono e outros compostos (Garrigues, Loubière, Lindlay & Cocaing- Bousquet, 1997; London, 1976). A redução do pH está associada à modificação da capacidade de retenção de água das proteínas, favorecendo a desidratação e a ligação da massa, conferindo a textura firme e fatiável ao enchido (Lucke, 1985). A presença de ácidos interfere no sabor e aroma característicos do produto, no entanto, quando em quantidades excessivas originam *flavour* anormal.

A formação de diacetilo (2,3-butanodiona) interfere também no aroma dos produtos fermentados, tendo este composto um reduzido limiar de detecção a nível olfactivo e conferindo sabor a manteiga o que pode ser depreciativo quando excessivo. A presença de

diacetilo em enchidos foi relacionada com *L. plantarum* e com algumas espécies de *Staphylococcus* envolvidas na maturação de produtos cárneos, referindo-se que podem produzir quantidades consideráveis deste composto (Patarata, 2002).

Para além do seu uso em produtos fermentados, as BAL têm demonstrado características interessantes quando aplicadas em alimentos minimamente processados (*minimally processed products*), pré-cozinhados refrigerados ou congelados e em alimentos com baixo teor em sal, açúcar ou aditivos químicos. Estes alimentos são cada vez mais procurados pelos consumidores e muito susceptíveis de deterioração. Para a sua melhor conservação tem-se apostado em várias estratégias que garantam a frescura, os atributos sensoriais e as características nutricionais, designadamente: a refrigeração, a utilização de embalagens a vácuo e com atmosferas modificadas e o uso de culturas protectoras (estirpes produtoras de bacteriocinas pertencentes ao grupo das BAL, que não alteram as qualidades sensoriais dos alimentos onde são aplicadas) (Kelly, Asmundson & Huang, 1996). Os agentes patogénicos *Listeria monocytogenes* e o *Clostridium botulinum* são particularmente importantes no grupo de alimentos prontos a consumir refrigerados, pela possibilidade de sobrevivência das formas esporuladas com multiplicação das formas vegetativas a estas temperaturas e produção de toxinas, sendo pouco provável a sua destruição sob acção dos leves aquecimentos a que os alimentos são submetidos antes de serem consumidos (Okereke & Montville, 1991).

Os *Lactobacillus* constituem microflora frequente em produtos fermentados e apresentam uma larga variedade de tipos celulares, assim como comportamentos fisiológicos e bioquímicos diferentes interessantes nesta área.

O interesse particular revelado pela comunidade científica perante os *Lactobacillus* deve-se i) à associação destes microrganismos com propriedades promotoras da saúde humana, ii) à sua introdução em diversos produtos alimentares para obter um aumento da qualidade ou das características nutricionais e iii) a necessidade de serem estabelecidas legal e industrialmente requisitos de segurança, rotulagem, registo de patente e integridade das estirpes usadas (Holzapfel, Haberer, Geisen, Björkroth & Schillinger, 2001).

Entre as várias espécies de interesse tecnológico, *L. sakei* e *L. curvatus* foram isoladas de diferentes habitats, tais como produtos acabados embalados, vegetais fermentados, produtos cárneos fermentados, e relacionadas com o seu papel na conservação e nos processos fermentativos (Egan, 1983; Hammes, Bantleon & Min, 1990).

Segundo Leroy & De Vuyst (1999), as estirpes de *Pediococcus acidilactici* são as mais usadas como culturas iniciadoras na produção de enchidos fermentados nos EUA; na Europa, este tipo de produtos são fabricados usando *L. sakei*, *L. curvatus* e *L. plantarum* (Berthier & Ehrlich, 1999). A facilidade de identificação assim como a estabilidade ao longo do tempo são características fundamentais que as estirpes usadas como culturas iniciadoras devem apresentar (Berthier & Ehrlich, 1999).

2.2.1. Actividade lipolítica e actividade proteolítica

A presença de BAL em alimentos fermentados interfere com as características qualitativas dos mesmos. Apesar de existirem diversos estudos sobre estes microrganismos e existir vasta experiência na sua utilização como culturas *starter*, é importante avaliar as características e aptidão tecnológica, de modo a serem seleccionadas as estirpes mais interessantes para os fins pretendidos. Antes de serem realizados testes nos próprios alimentos, são desenvolvidos estudos laboratoriais com culturas puras, que permitem inferir sobre as propriedades das diferentes estirpes.

A capacidade de inibição de microrganismos patogénicos ou as modificações organolépticas, nomeadamente das fracções azotada e lipídica, são características desejadas nos microrganismos usados com fins tecnológicos (Lucke, 1985).

Relativamente às modificações das BAL sobre a fracção azotada, é actualmente aceite que a sua importância se situa ao nível da actividade aminopeptidásica, contribuindo para o aumento do teor de aminoácidos livres, que interferem directamente e indirectamente no sabor do produto, através da ocorrência de compostos aromáticos (Patarata, 2002).

O termo proteólise agrupa um conjunto de actividades enzimáticas relacionadas com a hidrólise das ligações peptídicas nas proteínas ou péptidos. As peptidases podem ser classificadas como endopeptidases, quando actuam no interior da cadeia polipeptídica, ou exopeptidases, quando actuam exclusivamente em regiões próximas da extremidade da cadeia polipeptídica. As exopeptidases podem ser subdivididas em aminopeptidases e carboxipeptidases (Patarata, 2002).

Na produção de enchidos, várias reacções ocorrem sequencialmente, designadamente: i) acção das endopeptidases com libertação de péptidos; ii) acção das exopeptidases, essencialmente aminopeptidases, sobre os péptidos, promovendo a libertação de aminoácidos livres. Existem estudos que demonstram a importância de *L. curvatus*, *L. sakei* e *L. plantarum* na hidrólise de proteínas musculares de suíno (Fadda, Vignolo, Holgado & Oliver, 1998; Fadda *et al.*, 1999). A presença de péptidos ou aminoácidos livres confere características organolépticas próprias ao produto, já que cada aminoácido tem sabor diferente, que difere também do sabor dos péptidos (Patarata, 2002).

Embora os efeitos benéficos das BAL sobre os produtos fermentados sejam diversos, estes microrganismos podem também ser responsáveis pela produção de compostos indesejáveis, como as aminas biogénicas (Roig- Sagués & Eerola, 1997).

O crescimento descontrolado da flora láctica pode ser, no entanto, responsável pela degradação dos produtos alimentares, designadamente carne e produtos cárneos (Hugas, 1998). *L. sakei* foi referido como responsável pela degradação de carne embalada a vácuo (Egan *et al.*, 1989 citado por Hugas, 1998). O desenvolvimento de BAL com metabolismo

heterofermentativo pode também causar odores desagradáveis e cavidades no interior dos produtos, devido à produção de CO₂ (Hugas, 1998).

A importância do estudo da fracção lipídica, prende-se com o facto de os lípidos serem o composto mais abundante nos enchidos secos crus.

As alterações sofridas pelos lípidos nos processos de maturação/ fermentação podem ser de dois tipos: i) hidrolítico, que promove a formação de ácidos gordos livres para o meio; ii) oxidativo, formando peróxidos, beta- cetoácidos, metilcetonas e álcoois secundários a partir dos ácidos gordos livres. Estas reacções estão relacionadas e têm uma importância determinante no *flavour* dos enchidos (Patarata, 2002).

2.3. Actividade antimicrobiana das bactérias do ácido láctico

A actividade antimicrobiana das BAL está relacionada com a produção de ácidos orgânicos, particularmente ácido láctico e ácido acético, dióxido de carbono, etanol, peróxido de hidrogénio e diacetilo (De Vuyst & Vandamme, 1994a). Esta capacidade foi já referida contra diversos agentes designadamente i) *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *S. aureus*, *E. fecalis* (Albano *et al.*, 2007), *E. coli* O157:H7 e *Salmonella typhimurium* (Kang & Fung, 1999).

Da fermentação dos carboidratos resulta a produção de vários ácidos, principalmente o ácido láctico e também o ácido acético. O efeito antimicrobiano dos ácidos pode estar relacionado com vários factores, designadamente: i) redução do pH do meio, ii) redução do pH intracelular por entrada de ácido através da membrana celular, o que resulta em aumento do consumo de ATP celular com o fim de bombear para fora da célula os protões em excesso, alteração da permeabilidade celular por interferência das proteínas membranárias responsáveis pelo transporte activo de nutrientes e redução da capacidade de produção de ATP; iii) toxicidade celular devido a acumulação de compostos alcalinos no interior da célula (Axelsson, 1993).

A produção de peróxido de hidrogénio por algumas BAL na presença de oxigénio tem também acção antimicrobiana devido à sua actividade oxidante (Davidson & Juneja, 1990).

O diacetilo (2,3- butanodiona) tem também demonstrado uma potencial acção no controlo de microrganismos indesejáveis (Lindgren & Dobrogosz, 1990), designadamente *E. coli* O157:H7 e *Salmonella typhimurium* (Kang & Fung, 1999).

Foram identificados outros compostos produzidos por *L. plantarum* com acção contra bactérias Gram negativas, designadamente a metil- hidantoína e a mevanolactona (Niku-Paavola, Laitila, Mattila- Sandholm & Haikara, 1999).

Para além destes compostos, também a produção de bacteriocinas, péptidos de baixo peso molecular ou proteínas, com efeito bactericida ou bacteriostático (De Vuyst & Vandamme, 1994b), influencia o desenvolvimento de várias espécies, entre as quais as relacionadas com o produtor, estirpes da mesma espécie (Jack, Tagg & Ray, 1995) e estirpes

patogénicas. As bacteriocinas são produzidas por microrganismos e possuem propriedades antibióticas, no entanto não são denominadas antibióticos para não serem confundidas com os antibióticos de uso terapêutico, que podem produzir potencialmente reacções alérgicas em humanos e possuem estrutura proteica (Jack *et al.*, 1995, Chen & Hoover, 2003). Estes péptidos ou proteínas sintetizados pelos ribossomas são rapidamente digeridos no tracto gastrointestinal dos humanos (Joerger *et al.*, 2000, citado por Chen & Hoover, 2003). São um grupo heterogénio mas apresentam em comum a capacidade de serem antagonistas específicos contra bactérias problemáticas (Jack *et al.*, 1995). Contudo, a sua utilização nos alimentos pode ser limitada por diversas razões, e os custos continuam a ser um factor impeditivo do uso de bacteriocinas como aditivos alimentares em maior escala. Têm sido realizados diversos estudos, não apenas no sentido de procurar bacteriocinas novas e mais eficazes, mas também para otimizar as já conhecidas, nas vertentes biológica e económica (Chen & Hoover, 2003).

2.4. Utilização de bacteriocinas em alimentos

Desde Louis Pasteur e Robert Koch que foi reconhecida cientificamente a necessidade de controlar a flora deteriorativa dos alimentos. A descoberta da penicilina em 1929 por Alexander Fleming, permitiu à medicina humana e veterinária o combate específico de microrganismos causadores de doenças. Embora o uso de antibióticos em alimentos seja proibido, a utilização de aditivos com propriedades conservantes e antimicrobianas, tornou-se importante para a segurança alimentar (Chen & Hoover, 2003).

Apesar de as bacteriocinas serem produzidas por microrganismos pertencentes a diversos géneros, são as produzidas por BAL que despertam maior interesse de estudo e aplicação prática no campo da conservação e segurança dos alimentos (Lucke, 1992).

A acção antimicrobiana das bacteriocinas depende de vários factores como a concentração e pureza das mesmas, o tipo de tampão ou meio usados, a sensibilidade da estirpe indicadora usada e a densidade da suspensão celular usada (Leroy & De Vuyst, 1999).

As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram negativas, como é o caso da colicina produzida por *E. coli*, apresentam 3 mecanismos de acção: i) formação de poros na membrana citoplasmática (efeito comum às bacteriocinas produzidas por microrganismos Gram positivos), ii) degradação do DNA celular e iii) inibição da síntese proteica (Chen & Hoover, 2003).

O alvo das bacteriocinas é principalmente a membrana plasmática, sendo geralmente activas contra bactérias Gram positivas, uma vez que os lipopolissacáridos da membrana exterior das bactérias Gram negativas impedem a sua acção (Gao, van Belkum & Stiles, 1999). O efeito inibidor decorre fundamentalmente da indução da formação de poros, da interferência com o potencial eléctrico formado ao longo da membrana e com os mecanismos de transporte activo (Abee, Krockel & Hill, 1995).

A presença de bacteriocinas pode ser inerente ao produto, tal como em queijos produzidos manualmente (Sulzer & Busse, 1991), salsicharia fermentada (Vogel, Lohmann, Nguyen, Weller & Hammes, 1993), ou intencional através da adição de culturas iniciadoras ou *starter*. Em produtos cárneos fermentados, têm sido desenvolvidos diversos estudos no sentido de detectar a presença de bacteriocinas naturalmente presentes nestes produtos ou introduzidas através de culturas *starter*. Procurou-se avaliar e otimizar as condições de síntese e a acção desses compostos, determinando a sua actuação contra estirpes patogénicas (*Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) ou contra estirpes com interesse para a saúde pública e conservação dos alimentos (*Clostridium sp.* e *Bacillus sp.*) em situação real (Patarata, 2002).

A bacteriocina nisina foi usada desde a década de 1950 como aditivo para conservação de alimentos; em 1988, a FDA (*Food and Drugs Administration*) aprovou o uso da mesma em queijo de leite pasteurizado, marcando o início legal da aplicação de bacteriocinas como aditivos alimentares (Chen & Hoover, 2003).

As bacteriocinas produzidas por BAL têm sido consumidas por várias gerações de indivíduos de diversas culturas, logo com diferentes padrões alimentares, sem detecção de efeitos adversos. Portanto, estas são as preferidas entre as bacteriocinas (Chen & Hoover, 2003).

Para além da nisina, são conhecidas outras bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus*, que têm vindo a ser usadas como conservantes naturais de produtos alimentares, entre as quais: sakacina A (Schillinger & Lucke, 1989), sakacina M (Sobrinho *et al.*, 1992), sakacina P (Tichaczek, Vogel & Hammes, 1994), sakacina 674 (Holck, Axelsson, Huhne & Krockel, 1994), sakacina B (Samelis, Maurogenakis & Metaxopoulos, 1994), sakacina K (Hugas, Garriga, Aymerich & Monfort, 1995), sakacina T (Aymerich *et al.*, 2000), sakacina G (Simon, Fremaux, Cenatiempo & Berjeaud, 2002), sakacina X (Vaughan, Eijsink & van Sinderen, 2003), sakacina Q (Mathiesen, Huehne, Kroeckol, Axelsson & Eijsink, 2005), curvaticina A (Tichaczek, Vogel & Hammes, 1993), curvaticina 13 (Sudirman, Mathier, Michel & Lefebvre, 1993), curvaticina FS47 (Garver & Muriana, 1994), lactocina A, lactocina B, lactocina F, brevicina 37, buchnericina LB, helveticina J, plantaricina A, gassericina A (Barefoot & Nettles, 1992; Klaenhammer, 1993; Muriana & Klaenhammer, 1991), lactocina S (Skaugen, Abildgaard & Nes, 1997), bavaricina MN (Kaiser & Montville, 1996). Foi demonstrado por alguns autores que existem bacteriocinas idênticas mas que têm origens diferentes (Axelsson & Holck, 1995; Aymerich *et al.*, 2000; Leroy & De Vuyst, 2005, Rodriguez *et al.*, 1995).

A maioria das bacteriocinas produzidas por BAL são moléculas catiónicas, amfifílicas e compostas por 20- 60 resíduos de aminoácidos (Nes & Holo, 2000).

2.4.1. Ecologia das bacteriocinas

A capacidade de produção de uma ou mais bacteriocinas significa para o microrganismo produtor uma vantagem de sobrevivência e proliferação no ambiente, eliminando a restante flora competidora. Estudos realizados por Riley (1998), demonstram que a vantagem competitiva é aumentada significativamente na presença de células produtoras de bacteriocinas contra estirpes sensíveis, designadamente *Lactobacillus plantarum* proveniente de processos fermentativos de azeitona verde, *E. coli* isolada na conjuntiva de porcos da Índia e *Streptococcus mutans* na cavidade oral dos humanos. No caso específico de *L. plantarum* produtor de bacteriocinas no processo fermentativo de azeitona verde, enquanto que esta estirpe foi detectada ao final de 12 semanas em níveis elevados, uma variante da mesma estirpe não produtora de bacteriocinas, estudada nas mesmas condições, não foi detectada no produto após 7 semanas de fermentação, o que significa uma menor resistência nestas circunstâncias (Ruiz- Barba, Cathcart, Warner & Jimenez-Diaz, 1994). Depois de trabalhos efectuados com o objectivo de averiguar as interacções entre estirpes produtoras de bacteriocinas e as propriedades de sensibilidade à sua acção, concluiu-se que a produção destas peptidases aumenta em situações de stress, tais como carência de nutrientes ou sobrecrecimento bacteriano (Riley & Gordon, 1999).

A natureza proteica das bacteriocinas é geralmente demonstrada pela sua sensibilidade à acção de enzimas proteolíticas tais como tripsina, α - quimiotripsina, pepsina e proteinase K. A resistência ao calor representa também uma importante característica das bacteriocinas usadas como aditivos alimentares, considerando o tratamento térmico a que são submetidos alguns alimentos (Garriga *et al.*, 1993).

As moléculas não purificadas com actividade antimicrobiana que apresentam características semelhantes às bacteriocinas designam-se substâncias inibitórias com capacidade bacteriocinogénica, BLIS (Tagg, 1991, citado por Garriga *et al.*, 1993).

Na aplicação de estirpes produtoras de bacteriocinas em alimentos têm sido considerados factores como o pH e a temperatura em condições laboratoriais e a sua interferência com compostos minerais dos produtos, tais como sal (NaCl) e nitritos, na produção de bacteriocinas (Leroy & De Vuyst, 1999). Está descrita a perda de actividade da bavaricina A, com NaCl a 3% a 4°C e a não interferência de nitrito acima de 0,01% no crescimento de *L. sakei* MI401 nem na produção de bavaricina A a 4°C e a 10°C (Larsen, Vogensen & Josephsen, 1993).

De modo geral, as bacteriocinas são resistentes ao calor (Messens & De Vuyst, 2002). A resistência das bacteriocinas ao calor e a sua estabilidade após fervura foi demonstrada para a bavaricina A e plantaricina ST31, em que mantiveram a actividade integral após aquecimento a 100°C durante 60 minutos (Larsen *et al.*, 1993) e 40 minutos à mesma temperatura (Todorov *et al.*, 1999); o mesmo acontece com a reuterociclina, que é estável após exposição a 60°C durante 30 minutos (Gänzle, Hertel, & Hammes, 1996). No entanto,

algumas bacteriocinas perdem mais facilmente a sua actividade por acção do calor, como acontece com a bavaricina MN, deixando de estar activa após ser submetida a 60°C durante 15 minutos ou a 100°C durante 10 minutos (Lewus & Montville, 1992).

2.4.2. Classificação das bacteriocinas

Segundo classificação de Klaenhammer (1993) e Nes *et al.* (1996), as bacteriocinas produzidas pelas BAL podem ser divididas em 3 classes, de acordo com as suas características bioquímicas e genéticas: i) classe I ou lantibióticos (tipos A e B), que são péptidos de pequena dimensão (<5 kDa) modificados pós-transcricionalmente, contêm aminoácidos derivados do tioéter como a lantionina e são termoestáveis. Os tipos A e B diferem na estrutura química e actividade antimicrobiana (Moll, Konings & Driessen, 1999; van Kraaij, de Vos, Siezen & Kuipers, 1999; Guder, Wiedemann & Sahl, 2000). Neste grupo estão incluídas a nisina, a lactocina S e a plantaricina C; ii) classe II (a, b, c), que inclui bacteriocinas não modificadas constituídas por péptidos de pequena dimensão (<10 kDa) que não contêm lantionina, termoestáveis, hidrofóbicos, com actividade anti- listéria, estando dividida em 3 subclasses- classe IIa (pediocina-*like* bacteriocinas) compostas por 1 cadeia polipeptídica, classe IIb (*bacteriocinas de dois péptidos*) compostas por 2 cadeias polipeptídicas, classe IIc (*bacteriocinas de um péptido*); iii) classe III, composta por proteínas de cadeias longas (>30 kDa), termolábeis e hidrofílicas, que incluem a pediocina, carnobactericina, sakacina, curvaticina e plantaricina. (Drider, Fimland, Hechard, McMuller & Prévost, 2006). Foi ainda proposta por Klaenhammer (1993) uma classe IV, que incluiria bacteriocinas de estrutura complexa, no entanto as moléculas não foram caracterizadas convenientemente a nível bioquímico.

2.4.3. Utilização de bacteriocinas ou bactérias do ácido láctico com actividade bacteriocinogénica como conservantes em alimentos

Para utilização de BAL com actividade bacteriocinogénica em produtos cárneos deve ter-se em consideração: i) a adequação do meio oferecido pelo alimento para a produção de bacteriocinas, ii) a possibilidade de perda de capacidade de produção de bacteriocinas e iii) o antagonismo produzido por outras bactérias existentes no meio. Neste sentido é interessante usar estirpes isoladas do meio onde irão ser aplicadas, naturalmente mais adaptadas e mais competitivas. Contudo, nem sempre é possível aliar a maior acção antimicrobiana à melhor cultura *starter*, e adicionalmente é imperativo garantir que a cultura usada como conservante não vai originar aspectos organolépticos desagradáveis, mesmo quando adicionada em quantidades tão elevadas que permitam a produção de bacteriocinas.

As técnicas modernas de recombinação genética permitem transferir genes de produção de bacteriocinas para estirpes com boa capacidade de conservação do alimento ou que

apresentem características que permitam serem usadas como cultura iniciadora ou ainda criar estirpes recombinantes de diferentes bacteriocinas de modo a aumentar o seu espectro de acção (Aymerich, Hugas & Monfort, 1998). Das diversas experiências realizadas neste campo surgiram a pediocina PA-1 clonada em *E. coli* (Marugg *et al.*, 1992), acidocina B em *L. plantarum* 80 (Pouwels & Leer, 1993), pediocina PA-1 em *L. lactis* LI108 (Chikindas *et al.*, 1995, citado por Aymerich *et al.*, 1998), lactacina F em *Carnobacterium piscicola* LV17 (Allison *et al.*, 1995, citado por Aymerich *et al.*, 1998), entre outras.

O uso industrial de bacteriocinas purificadas ou parcialmente purificadas em produtos cárneos deve considerar o desenvolvimento de microflora resistente à bacteriocina, a sua inactivação por enzimas ou a ligação a gorduras ou a proteínas. Para serem utilizadas como aditivo alimentar, existe legislação comunitária e nacional que regulamenta a aplicação de microrganismos geneticamente modificados em alimentos, que prevê o pedido prévio à sua utilização, sendo o processo acompanhado por informação exhaustiva relativa a propriedades fisiológicas e químicas da bacteriocina, possíveis aplicações, descrição do processo de produção, metodologia analítica, eficácia, quantidade de bacteriocina a usar, testes de segurança e de toxicidade (Aymerich *et al.*, 1998).

Em 1969, o uso da bacteriocina nisina foi aprovado pela FAO/ WHO (*Food and Agriculture Organisation/ World Health Organization*), sendo posteriormente aprovado, em 1983, pela Comunidade Europeia e, em 1987, pela FDA (*Food and Drug Administration*). A sua utilização é permitida em 52 países e em diferentes alimentos, entre os quais queijo, pescado fresco, produtos de padaria, leite pasteurizado, cerveja e conservas. A sua eficácia está provada contra microrganismos Gram positivos formadores de esporos, tais como *Clostridium* e *Bacillus* (Aymerich, Hugas & Monfort, 1998).

As bacteriocinas podem ser usadas para reduzir a intensidade dos tratamentos térmicos nos alimentos sem comprometer a inactivação microbiana (Gálvez, Abriouel, López & Omar, 2007). A nisina e o calor agem sinergicamente contra *L. monocytogenes* (Mahadeo & Tatini, 1994; Ueckert *et al.*, 1998, citados por Aymerich *et al.*, 1998) reduzindo a resistência à temperatura por parte deste agente patogénico no leite (Maisnier- Patin *et al.*, 1995, citado por Aymerich *et al.*, 1998).

As bacteriocinas podem fornecer protecção adicional durante o período de conservação dos alimentos contra a formação de endosporos bacterianos resistentes ao calor. Além disso, foi demonstrada a redução da intensidade dos tratamentos térmicos contra endosporos bacterianos na presença de nisina ou de enterocina AS-48 permitindo a redução de custos relativos a tratamentos térmicos bem como o seu impacto negativo nos alimentos (Gálvez *et al.*, 2007).

Perante o exposto, concluiu-se que as bacteriocinas e as BAL com actividade bacteriocinogénica são substâncias bio-conservantes promissoras na indústria da carne e produtos cárneos. A implementação de boas práticas de higiene e a aplicação das novas

tecnologias de embalagem, conjuntamente com a adição de bacteriocinas e BAL com actividade bacteriocinogénica pode contribuir para minimização da contaminação dos produtos e prevenção de toxinfecções alimentares (Leistner & Hechelmann, 1993, citado por Aymerich *et al.*, 1998). A melhoria das características de qualidade dos produtos onde são aplicadas, com aumento no consumo de produtos mais naturais, sem resíduos tóxicos de aditivos químicos, contribui positivamente para os benefícios financeiros no sector das carnes (Aymerich *et al.*, 1998).

2.5. Aplicações terapêuticas das bactérias do ácido láctico

No tracto gastrointestinal dos humanos desenvolve-se um vasto e complexo ecossistema microbiano a partir do nascimento, que forma uma flora diversa mas estável quando se atinge a idade adulta. Estes microrganismos autóctones interagem com a dieta e com o hospedeiro, contribuindo para a protecção contra os microrganismos patogénicos a nível intestinal, através da resistência à colonização e promovendo benefícios para a saúde devido às suas actividades metabólicas (Crittenden *et al.*, 2005). Foi demonstrado que estes também interagem com a imunidade do hospedeiro e são essenciais para a maturação e homeostase do sistema imunitário (Gibson & Robberfoid, 1995).

O termo “probiótico” foi introduzido pela primeira vez em 1965 por Lilly e Stillwell, definindo-se como o factor de origem microbiológico que estimula o crescimento de outros organismos. Em 1989, Roy Fuller introduziu a ideia de que têm um efeito benéfico para o hospedeiro.

Os principais objectivos do uso de probióticos têm sido: i) aumentar as resistências do hospedeiro contra agentes intestinais patogénicos exógenos; ii) controlar doenças cuja etiologia esteja relacionada com agentes intestinais; iii) reduzir o metabolismo da flora putrefactiva/ toxinogénica no intestino; iv) modular o sistema imunitário do hospedeiro (Dhillon, Ghosh & Ganguli, 2007).

As bactérias mais comumente associadas com a actividade probiótica são do género *Lactobacilli* e *Bifidobacteria*, embora outras estirpes não patogénicas como *Escherichia coli*, isolada em 1917 por Nissle, e *Saccharomyces boulardii* tenham sido usadas (Ouwehand, Isolauri, Kirjavainen & Salminen, 1999).

In vitro, foi demonstrado que as BAL inibem o crescimento de flora entérica patogénica e têm sido usadas para tratar diversas patologias gastrointestinais em humanos e animais (Ouwehand *et al.*, 1999).

Dentro do género *Lactobacilli*, as estirpes mais estudadas e aceites como probióticos são *L. acidophilus* LA1, *L. acidophilus* NCFB 1748, *L. rhamosus* GG, *L. casei shirota*, *L. gasseri* ADH e *L. reuteri*. Os benefícios do seu consumo tais como fortalecimento do sistema imunitário, redução da actividade enzimática fecal, prevenção de doenças intestinais e de diarreias virais, sugerem que podem ser usados como agentes de tratamento de infecções e

inflamações gastrointestinais (Macfarlane & Cummings, 2002; Madsen, 2001; citados por Dhillon *et al.*, 2007). Algumas preparações de probióticos foram utilizadas para evitar a diarreia causada por antibióticos ou como parte do tratamento para a disbiose relacionada com antibióticos (WGO, 2008).

Os efeitos benéficos dos *Lactobacillus* ao nível do sistema imunitário e o controlo de agentes patogénicos por exclusão competitiva no intestino, são de grande importância mas salienta-se também a sua actividade anticarcinogénica e o seu papel na redução do nível do colesterol (Fernandes, Shahani & Amer, 1987; Gilliland, 1990; Brink & Veld, 1992; Hammes & Tichaczek, 1994; Klaenhammer *et al.*, 2002; Leroy & DeVuyst, 2004).

Pereira e Gibson (2002) demonstraram em estudos *in vitro* a acção benéfica das BAL e de *Bifidobacterium* isoladas do intestino humano sobre os níveis de colesterol, concluindo-se que *L. fermentum* KC5b se mantinha viável, após 2 horas, num meio com pH 2 e com uma concentração de 4,0 mg/l de ácidos biliares, conseguindo remover até 14,8 mg/g de colesterol das células do meio de cultura.

Existem estudos que documentam os efeitos probióticos numa série de transtornos gastrointestinais e extra-intestinais, incluindo as doenças inflamatórias do intestino, o síndrome do intestino irritável, o cancro do cólon, a afecção por *Helicobacter pylori*, as infecções vaginais e as alterações da imunidade. A acção de alguns probióticos também foi pesquisada no tratamento de eczema atópico, artrite reumatóide, cirrose hepática e encefalopatia hepática (WGO, 2008).

A capacidade de adesão das estirpes probióticas às células gastrointestinais é uma característica muito apreciada, facilitando a sua permanência no organismo e prolongando as suas acções benéficas, tal é o caso de *L. plantarum* 299V (Cebeci & Gurakan, 2003).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos no sentido de esclarecer a relação entre o uso de probióticos e a melhoria dos sintomas em crianças que sofrem de autismo. É facto, contudo, que se manifesta redução dos sintomas de patologia gastrointestinal e neurológicos após introdução na dieta de alimentos que veiculam agentes probióticos, possivelmente pela competição directa com bactérias de género *Clostridia* que existem em número elevado no intestino destes pacientes (Murphy, 2004).

Os probióticos surgem no mercado introduzidos nos alimentos ou sob a forma liofilizada em medicamentos (comprimidos, cápsulas ou saquetas). A dose necessária para obter efeitos benéficos para a saúde variam com: i) o tipo de microrganismo com efeito probiótico; ii) a quantidade de células viáveis até ao final da vida útil do produto; iii) a dose ingerida; iv) as características do produto onde foram inoculados os microrganismos; v) as características do hospedeiro (WGO, 2008). Segundo Tannock *et al.* (2000), a concentração mínima de BAL no intestino para promoverem efeito protector é na ordem de 10^9 UFC, sendo fundamental uma ingestão regular destes agentes para se conseguir este teor.

Algumas espécies probióticas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são residentes habituais ou transitam usualmente pelo aparelho digestivo humano e como tal não apresentam infecciosidade ou toxicidade para a população saudável e nos níveis tradicionalmente usados.

O potencial das BAL como produtoras de proteínas com aplicação em cuidados de saúde ou para o desenvolvimento de novas vacinas tem sido também referido (Sybesma, Hugenholtz, de Vos & Smith, 2006).

As BAL também têm sido usadas na produção industrial de produtos biológicos e químicos, incluindo biopolímeros (*Leuconostoc* spp.), enzimas (*Lactobacillus brevis*), etanol e ácido láctico (*Lactobacillus casei*, *Lb. lactis*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. brevis*) (Gold, Meager, Hutkins & Conway, 1992; Hofvendahl & Hahn- Hagerdal, 2000 citados por Klaenhammer *et al.*, 2002) e compostos aromáticos (Sybesma *et al.*, 2006).

2.6. Resistência das bactérias do ácido láctico aos antibióticos

A resistência a antibióticos é uma das mais sérias preocupações médicas deste século. A relação estabelecida entre o uso de antibióticos em animais e o aparecimento de agentes patogénicos resistentes em humanos tem vindo a merecer grande estudo. Foi evidenciado que as resistências de agentes patogénicos do tracto gastrointestinal surgiram a partir da transferência de bactérias resistentes ou de genes de resistência dos animais para os humanos através da cadeia alimentar (Barton, 2001). Os genes de resistência podem ser transferidos horizontalmente a partir de agentes patogénicos ou comensais dos animais para os microrganismos patogénicos do homem (van den Bogaard & Stobberingh, 2000, citado por Barton, 2001).

O uso de antibióticos na produção animal é muito importante economicamente e pode ser efectuado de várias formas: i) tratamento, em que se administram doses altas do produto a um grupo restrito de animais; ii) profilaxia, em que são administradas doses moderadas a um número elevado de animais, permitindo aumentar a produção, particularmente quando a higiene e o controlo de doenças não são os mais correctos; iii) promoção de crescimento, que envolve doses subterapêuticas de antibióticos ou compostos com características antimicrobianas, por longos períodos em muitos animais. A resistência por parte dos agentes patogénicos aos antibióticos surge como resposta à exposição; é facto que os genes de resistência a antibióticos são mais comuns nas estirpes actuais. O desenvolvimento e a persistência de resistências variam consoante as classes de antibióticos e as espécies bacterianas (Barton, 2001).

No tracto digestivo podem ser detectadas diversas BAL, contudo, a sua prevalência e distribuição variam com a espécie animal. De modo geral, estes microrganismos são dos primeiros a colonizar o aparelho digestivo dos animais, no entanto o seu número diminui ao

longo da idade, principalmente devido à redução da capacidade para aderirem à mucosa intestinal (Ouwehand *et al.*, 1999).

O estudo de resistência das BAL aos antibióticos é muito importante devido à ingestão destes microrganismos associados a alimentos e à possibilidade de serem usadas como probióticos em situações de reconstituição da flora intestinal durante terapêuticas antimicrobianas com colites associadas (Biourge *et al.*, 1998).

A possibilidade de transmissão dos genes de resistência de BAL tolerantes a determinados antibióticos e usadas na reconstituição da flora intestinal para estirpes patogénicas ou potencialmente patogénicas é uma preocupação na selecção e segurança das estirpes com acção probiótica e quando utilizadas como *starter* (Danielsen & Wind, 2003).

De acordo com Bernardeau *et al.* (2008), os *Lactobacillus* têm uma elevada resistência natural a vários antibióticos, especialmente à vancomicina, cuja resistência não pode ser transferida para outros agentes potencialmente patogénicos. No entanto, há que seguir certos requisitos de segurança no que toca ao uso destas estirpes para fins tecnológicos, efectuando estudos prévios do perfil de resistência a antibióticos. Este pressuposto vai de encontro ao reconhecimento do QPS (*Qualified Presumption of Safety*) status atribuído pela EFSA a 32 espécies do género *Lactobacilli*.

Tal como Bernardeau *et al.* (2008) referem, o género *Lactobacilli* apresenta, de modo geral, resistência natural aos seguintes antibióticos: bacitracina, cefoxitina, ciprofloxacina, ácido fusídrico, kanamicina, gentamicina, metronidazol, nitrofurantoína, norfloxacina, estreptomina, sulfadiazina, teicoplanina, trimetoprim/ sulfametoxazol e vancomicina. Embora os *Lactobacillus* homofermentativos estritos sejam sensíveis à vancomicina, várias estirpes de *L. plantarum*, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. leishmannii*, *L. acidophilus* apresentam resistência intrínseca a esta substância devido à presença de enzimas relacionadas com D-alanina ligase.

Em estudos realizados por Salminen *et al.* (2006), *Lactobacillus* isolados de sangue humano demonstraram reduzidos valores de Concentrações Mínimas Inibitórias (MICs) para imipenem, piperaciclina- tazobactam, eritromicina e clindamicina, no entanto, apresentavam susceptibilidade variável para penicilina e cefalosporinas, o que prova variabilidade inter-específica no que toca à resistência aos antibióticos.

Está descrita a resistência de estirpes de *Lactobacillus* isoladas a partir de produtos alimentares, designadamente: *L. plantarum* isolado em queijos de pasta mole fabricados com leite cru resistente a tetraciclina (Dasen, Zurich, artigo não publicado, citado por Salminen *et al.* (2006); 63 estirpes de *L. ramosus* isoladas a partir de queijo Parmigiano Reggiano apresentaram resistência a cefixima, vancomicina, neomicina, enoxacina, pefloxacina e sulfametoxazol-trimetoprim (Coppola *et al.*, 2005); na Suíça, 74 estirpes probióticas isoladas de diferentes produtos demonstraram resistência a tetraciclina e a lincosamida (Kastner *et al.*, 2006); uma das 189 estirpes estudadas após isolamento em

produtos fermentados noruegueses, tais como iogurte, *sour cream*, leite fermentado e queijo, apresentou elevada resistência a estreptomicina (Katla, Kruse, Johnsen & Herikstad, 2001); *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. acidophilus* e *L. casei* isolados a partir de queijos espanhóis (Serena, Gamonedo e Cabrales) demonstraram resistência a penicilina G, cloxacilina, estreptomicina, gentamicina, tetraciclina, eritromicina e cloranfenicol (Herrero, Mayo, Ganzales & Suarez, 1996).

Existem também dados que demonstram a resistência de *Lactobacillus*, particularmente dos usados como probióticos, a vários antibióticos como penicilina G, ampicilina, vancomicina, cloranfenicol e ciprofloxacina (Halami, Chandra, Chekar & Nand, 2000; Coppola *et al.*, 2005).

Dados de vários estudos demonstram a existência de diferenças dentro do género e dentro das espécies de *Lactobacillus* na resposta aos antibióticos. Contudo os resultados variam com o método usado (Danielsen & Wind, 2003).

2.7. Resistência das bactérias do ácido láctico às condições adversas do meio

2.7.1. Resistência a pH baixo

A capacidade das estirpes usadas como culturas iniciadoras ou como probióticos sobreviverem e produzirem substâncias com actividade bacteriocinogénica em meios com pH baixo reveste-se de grande importância.

Os alimentos em que podem ser aplicadas BAL são fermentados e tipicamente com pH baixo. Na Europa do Norte e Alemanha, os enchidos fermentados apresentam, de modo geral, pH inicial de 5,8 e um valor final próximo de pH 4,8 (Leroy & De Vuyst, 1999).

No seu uso como probióticos, a primeira barreira que os microrganismos encontram no estômago humano é o ácido gástrico que pode apresentar valores próximos de pH 0,9, aumentando para pH 3,0 na presença de alimentos (Erkkila & Petaja, 2000).

De acordo com estudos realizados por Mourad & Nour- Eddine (2006), concluiu-se que as estirpes de *L. plantarum* isoladas de azeitonas fermentadas sobreviveram a períodos de 2 a 6 horas em meios com pH 2,0 e pH 3,0; a sobrevivência da estirpe *L. fermentum* AD1, a pH 3,0 durante 3 horas foi de 80% (Stompfová, Marcináková, Simonová, Bogovic- Matijasic & Lauková, 2005).

Por outro lado, a estabilidade das bacteriocinas ao pH tem sido também alvo de estudos. Está descrita a actividade da bavaricina A entre pH 1,3 e 9,7 (Larsen, Vogensen & Josephsen, 1993) e da plantaricina ST31 entre pH 3,0 e 8,0 (Todorov *et al.*, 1999), contudo, a actividade destas duas bacteriocinas foi significativamente reduzida a pH alcalino, perdendo-se a pH 12,5 e pH 9,0, respectivamente.

Os trabalhos desenvolvidos por Mortvedt-Abildgaard *et al.* (1995) demonstram que a produção de lactocina S por *L. sakei* L45 varia quando o pH do meio de cultura é alterado entre 5,0, 5,6 e 6,0, sendo que a maior produção se verificava para pH 5,0.

Leroy & De Vuyst (1999) demonstraram que o pH óptimo para crescimento de culturas de *L. sakei* CTC494 era pH 6,0 enquanto que a produção da bacteriocina sakacina K era máxima a pH 5,0, concluindo que a adsorção às células do meio de cultura da estirpe sensível podia reduzir a actividade desta substância.

Considerando o pH da maioria dos alimentos, a estabilidade das BAL e das bacteriocinas é mantida (Larsen *et al.*, 1993; Todorov *et al.*, 1999).

2.7.2. Resistência aos sais biliares

A maior concentração de sais biliares atingida no intestino humano e dos animais durante a primeira hora de digestão é 2% w/v, passando posteriormente a um valor médio de 0,3% w/v (Gilliland, Staley & Bush, 1984; Gotcheva, Hristozova, Hristozova, Guo, Roshkova & Angelov, 2002). Mourad e Nour- Eddine (2006), referiram que a resistência aos sais biliares pode variar entre as espécies de BAL e entre as estirpes da mesma espécie. A resistência de algumas estirpes está relacionada com a presença e a acção da enzima hidrolase de sais biliares (*bile salt hidrolase*- BSH), que permite a hidrólise da bÍlis conjugada, reduzindo o seu efeito tóxico (Du Toit, Franz, Schillinger, Warles & Holzappfel, 1998). A ausência deste mecanismo pode explicar a sensibilidade de algumas estirpes estudadas (Mourad & Nour- Eddine, 2006).

2.7.3. Resistência a enzimas

A natureza proteica das bacteriocinas torna-as sensÍveis à acção de certas proteases. A sensibilidade às proteases é um dos critérios chave na caracterização de uma substância inibitória como as bacteriocinas (Okereke & Montville, 1991). A bavaricina A é inibida pela tripsina, pronase E, proteinase K, pepsina e quimiotripsina A4 (Larsen *et al.*, 1993); a plantaricina ST31 é inibida pela tripsina, pronase E, protease IV e protease VIII (Todorov *et al.*, 1999). No entanto, a reuter ciclina não é destruída na presença da proteinase K e da tripsina (Gänzle, Hertel & Hammes, 2000).

2.7.4. Resistência a diferentes temperaturas

O crescimento das culturas de BAL e a produção de bacteriocinas estão também directamente ligados à temperatura do meio. Os maiores valores de crescimento e de produção foram detectados a temperaturas de 20 a 25°C. Curiosamente, o processo de fermentação da maioria dos enchidos produzidos na Europa ocorre neste intervalo de temperaturas (Ricke & Keeton, 1997). No trabalho desenvolvido por Leroy & De Vuyst (1999) a bacteriocina sakacina K reduziu significativamente a sua actividade a temperaturas de cultivo superiores a 25°C.

3. Materiais e Métodos

3.1. Identificação genotípica de bactérias do ácido láctico isoladas de produtos cárneos fermentados

3.1.1. Origem das estirpes em estudo

O trabalho experimental foi realizado a partir de uma colecção de estirpes de Bactérias do Ácido Láctico (n= 55) isoladas a partir de amostras de chouriço e do ambiente fabril provenientes de duas unidades (A e B) de fabrico de produtos de salsicharia tradicional situadas no Alentejo (Talon *et al.*, 2007)

3.1.1.1. Colheita das amostras e identificação das espécies

A colheita das amostras e a implementação dos métodos analíticos para controlo microbiológico tiveram por base os requisitos normativos internacionais ISO (*International Organization for Standardisation*).

Nas duas unidades foram colhidas amostras de seis superfícies de trabalho, de acordo com os requisitos da Norma ISO 18593:2004: (i) picadora; (ii) misturadora; (iii) enchedora; (iv) mesa de corte; (v) parede da câmara de maturação; (vi) faca de desossa.

As colheitas foram efectuadas após realização dos procedimentos de limpeza e desinfeção das superfícies, seguidas habitualmente por cada fabricante. Foram amostrados 500 cm² de superfície em cada local de colheita, usando compressas estéreis humedecidas com uma solução neutralizante (*Humeau, La Chapelle-sur-Erdre, França*), posteriormente transferidas para 25 ml de solução de água peptonada tamponada (*BPW, AES Laboratory*) e homogeneizadas no *stomacher*.

Foram também efectuadas colheitas de amostras de chouriço em três fases diferentes de fabrico: i) massa após 48h de repouso; ii) massa de produto após enchimento; iii) produto acabado; colheram-se ainda amostras de ingredientes secundários: i) massa de pimentão; ii) alho; iii) tripa.

A Tabela 1 relaciona a codificação das estirpes isoladas em cada unidade industrial com os tipos de amostras colhidos. Foram estudadas 55 estirpes, 48 da unidade A (PO5) e 7 da unidade B (PO6). Relativamente ao local de colheita, podem agrupar-se da seguinte forma: mesa (6 estirpes); enchedora (1 estirpe); faca (2 estirpes); tripa (3 estirpes); alho (1 estirpe); pimentão (5 estirpes); massa produto 48h (7 estirpes); massa após enchimento (7 estirpes); produto acabado (23 estirpes).

Tabela 1: Codificação das estirpes e sua relação com as unidades de produção e locais de colheita.

UNIDADE DE PRODUÇÃO	CODIFICAÇÃO	ORIGEM
A	PO5-3	Mesa
	PO5-4	Mesa
	PO5-5	Mesa
	PO5-8	Mesa
	PO5-15	Enchedora
	PO5-18	Faca
	PO5-20	Pimentão
	PO5-21	Pimentão
	PO5-22	Pimentão
	PO5-27	Produto acabado
	PO5-28	Produto acabado
	PO5-29	Produto acabado
	PO5-31	Alho
	PO5-34	Massa produto após enchimento
	PO5-35	Massa produto após enchimento
	PO5-37	Massa produto após enchimento
	PO5-38	Produto acabado
	PO5-39	Massa produto após enchimento
	PO5-40	Massa produto após enchimento
	PO5-42	Massa produto após enchimento
	PO5-45	Produto acabado
	PO5-46	Produto acabado
	PO5-49	Massa produto após 48h
	PO5-50	Massa produto após 48h
	PO5-51	Produto acabado
	PO5-52	Massa produto após 48h
	PO5-53	Massa produto após 48h
	PO5-54	Produto acabado
	PO5-56	Produto acabado
	PO5-57	Produto acabado
	PO5-60	Produto acabado
PO5-62	Produto acabado	
PO5-67	Produto acabado	
PO5-71	Produto acabado	
PO5-77	Faca	
PO5-82	Tripa	
PO5-84	Massa produto após enchimento	
PO5-85	Tripa	
PO5-87	Tripa	
PO5-89	Mesa	
PO5-95	Massa produto acabado	
PO5-98	Pimentão	
PO5-99	Pimentão	
PO5-102	Massa produto acabado	
PO2-103	Massa produto após 48h	
PO5-107	Massa produto acabado	
PO5-108	Massa produto acabado	
PO5-119	Mesa	
B	PO6-12	Massa produto após 48h
	PO6-13	Massa produto acabado
	PO6-14	Massa produto acabado
	PO6-23	Massa produto acabado
	PO6-44	Massa produto acabado
	PO6-67	Massa produto 48h
PO6-100	Massa produto acabado	

3.1.1.2. Cultura, isolamento e identificação fenotípica

O cultivo de Bactérias do Ácido Láctico (BAL) foi conseguido a partir de amostras preparadas para análise microbiológica de acordo com a Norma ISO 15214:1998, seguindo-se a preparação de diluições seriadas em água peptonada tamponada (BPW, AES Laboratory) e posterior sementeira em placas de meio *Man Rogosa Sharpe* (MRS, Merck, Darmstad, Alemanha). A incubação foi realizada a 30°C durante 48 a 72 horas em anaerobiose (ISO 15214: 1998; Talon *et al.*, 2007). As estirpes em estudo foram isoladas do

meio MRS, procedendo-se à sua posterior identificação fenotípica por API 50CHL (bioMérieux S.A., França).

A Tabela 2 apresenta a identificação fenotípica das estirpes efectuada por API 50CHL (bioMérieux S.A., França) e o grau de certeza da sua identificação, em percentagem.

Tabela 2: Identificação fenotípica por API 50CHL (bioMérieux S.A., França) e grau de certeza da identificação (%) das estirpes isoladas nas unidades de produção A e B.

UNIDADE DE PRODUÇÃO	CODIFICAÇÃO DA AMOSTRA	IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA	%
A	PO5- 3	Não identificado	-
	PO5-4	<i>L. curvatus</i>	88,5
	PO5- 5	Não identificado	-
	PO5- 8	<i>L. curvatus</i>	42,7
	PO5- 15	<i>L. plantarum</i>	97,9
	PO5- 18	<i>L. curvatus</i>	87,1
	PO5- 20	Não identificado	-
	PO5- 21	Não identificado	-
	PO5- 22	Não identificado	-
	PO5- 27	<i>L. plantarum</i>	98,9
	PO5- 28	<i>L. plantarum</i>	99,9
	PO5- 29	<i>L. plantarum</i>	99,9
	PO5- 31	Não identificado	-
	PO5- 34	Não identificado	-
	PO5- 35	Não identificado	-
	PO5- 37	Não identificado	-
	PO5- 38	<i>L. plantarum</i>	97,9
	PO5- 39	Não identificado	-
	PO5- 40	<i>L. curvatus</i>	64,1
	PO5- 42	Não identificado	-
	PO5- 45	<i>L. plantarum</i>	98,9
	PO5- 46	<i>L. plantarum</i>	93,1
	PO5- 49	Não identificado	-
	PO5- 50	Não identificado	-
	PO5- 51	<i>L. plantarum</i>	98,9
	PO5- 52	Não identificado	-
	PO5- 53	Não identificado	-
	PO5- 54	Não identificado	-
	PO5- 56	Não identificado	-
	PO5- 57	<i>L. plantarum</i>	99,9
	PO5- 60	Não identificado	-
	PO5- 62	Não identificado	-
	PO5- 67	<i>L. plantarum</i>	99,9
PO5- 71	Não identificado	-	
PO5- 77	<i>L. curvatus</i>	88,5	
PO5- 82	Não identificado	-	
PO5- 84	Não identificado	-	
PO5- 85	Não identificado	-	
PO5- 87	Não identificado	-	
PO5- 89	Não identificado	-	
PO5- 95	Não identificado	-	
PO5- 98	Não identificado	-	
PO5- 99	Não identificado	-	
PO5- 102	Não identificado	-	
PO5- 103	Não identificado	-	
PO5- 107	<i>L. curvatus</i>	42,7	
PO5- 108	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2</i>	59,7	
PO5- 119	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2</i>	96,3	
B	PO6- 12	<i>Pediococcus pentosaceus 2</i>	99,9
	PO6- 13	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides</i>	95,1
	PO6- 14	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	58,1
	PO6- 23	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides</i>	95,1
	PO6- 44	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides</i>	95,1
	PO6- 67	<i>Carnobacterium piscicola</i>	97,7
	PO6- 100	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides</i>	95,1

3.1.2. Isolados de *Lactobacilli*

3.1.2.1. Estirpes em estudo: conservação e cultivo para revivificação

As estirpes estudadas encontravam-se conservadas em criotubos com BHI e 15% de glicerol a - 80°C.

A sua revivificação foi conseguida através do duplo cultivo em caldo BHI (BHI Broth, Scharlau Chemie S.A., Espanha) a 30°C durante 24 horas, em aerobiose. Após este período efectuou-se sementeira das mesmas em placas MRS 1,5% agar (MRS Agar, Scharlau Chemie S.A., Espanha) durante 48 a 72 horas em aerobiose.

3.1.3. Identificação genética das espécies de *Lactobacillus spp.* por PCR

3.1.3.1. Extração de DNA

A extracção do ácido desoxiribonucleico (DNA) celular das estirpes em estudo foi realizada com base na metodologia descrita pela Qiagen (França), no kit QIAamp- DNA Minikit (250).

Foi usada cultura pura das várias estirpes em estudo resultante de sementeira em placas de MRS 1,5% agar (MRS Agar, Scharlau Chemie S.A., Espanha) a 30°C durante 48- 72h. As células resultantes da amostra recolhidas com uma ansa de 1µl (ROLL, S.A.S.) foram ressuspendidas em 180µl do tampão ATL (Qiagen, França). Posteriormente, foram adicionados a cada preparação 20 µl de Proteinase K (Qiagen, França) e procedeu-se a incubação em banho-maria a 56°C, durante 2 horas, com a finalidade de lisar as células bacterianas. Em seguida adicionaram-se 200 µl de Tampão AL (Qiagen, France) a cada amostra e efectuou-se incubação em banho-maria a 70°C durante 10 minutos. Após a adição de 200 µl de etanol 96%, todas as amostras foram transferidas para uma coluna QIAamp Spin Column (Qiagen, França), centrifugadas a 6000xg (8000 rpm) (Centrifuge 5415R, eppendorf AG, Alemanha) durante 1 minuto, rejeitando o filtrado.

Ao concentrado juntaram-se 500 µl de tampão AW1 (Qiagen, França), centrifugaram-se a 6000xg (8000 rpm) (Centrifuge 5415R, eppendorf AG, Alemanha) durante 1 minuto e rejeitou-se o filtrado. Repetiu-se este procedimento para o tampão AW2, centrifugando a 20000x g (14000 rpm) (Centrifuge 5415R, eppendorf AG, Alemanha) durante 4 minutos, rejeitando-se seguidamente o filtrado. Foram adicionados 200 µl de tampão AE (Qiagen, França) a cada amostra concentrada, seguindo-se uma incubação à temperatura ambiente durante 5 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 6000xg (8000 rpm) (Centrifuge 5415R, eppendorf AG, Alemanha) durante 1 minuto, sendo descartada a coluna QIAamp Spin (Qiagen, França) e obtendo assim o DNA das células bacterianas em estudo, que foi conservado na solução final a -22°C.

3.1.3.2. Estirpes de referência: conservação e cultivo

Foram usadas as seguintes estirpes de referência: *L. plantarum* CCM 4000, *L. curvatus* DSM 20019, *L. sakei* ATCC 15323, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus*

aureus ATCC 29213, *Listeria monocytogenes* 4A CECT 934, *Staphylococcus xylosus* CIP 81.66 (Institute Pasteur, França; gentilmente cedido pela Dra. Celcidina Pires do LNIV), *Escherichia coli* CCUG 42744, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Enterococcus faecium* EK13 (produtor de Enterocina A, isolado no LAM- IAP SAS, Kosice, Eslováquia) e *Enterococcus avium* EA5 (estirpe sensível a bacteriocinas isolada no LAM- IAP SAS, Kosice, Eslováquia), gentilmente cedidos pela Dra. Andrea Lauková.

Estas estirpes foram conservadas a -80°C e a sua revivificação foi conseguida através do duplo cultivo em caldo BHI (BHI Broth, Scharlau Chemie S.A., Espanha) a 30°C durante 24 horas, em aerobiose. Após este período efectuou-se sementeira em placas MRS 1,5% agar (MRS Agar, Scharlau Chemie S.A., Espanha) ou BHI 1,5% agar (BHI Agar, Scharlau Chemie S.A., Espanha), durante 48- 72 horas em aerobiose.

Para a extração do DNA destas estirpes foi seguido o protocolo referido em 3.1.3.1.

3.1.3.3. Metodologia PCR para identificação das espécies

As reacções polimerase em cadeia (PCR) foram realizadas no termociclador (MyCycler, BIO-RAD, Inglaterra) do CIISA- FMV.

Após as reacções de PCR, os produtos foram revelados por electroforese em gel de agarose 1,5% (tampão TBE 1x, pH 8; agarose em pó, GE Healthcare, Suécia) com brometo de etídio (0,5mg/ml). Cada amostra colocada nos pocilhos do gel continha 5 µl de DNA e 3 µl de Bromofenol (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol). As corridas de electroforese em gel, a uma voltagem de 50V, duraram 45 minutos. As bandas dos produtos de PCR foram visualizadas por transiluminação em luz ultravioleta (UV).

3.1.3.3.1. *Lactobacillus plantarum*

As condições e os *primers* usados na reacção de PCR para identificação genética de *L. plantarum* estão descritos na Tabela 3, tendo sido realizadas de acordo com Berthier e Ehrlich, (1998). Para além da temperatura de *annealing* sugerida (51,0°C), na montagem da técnica foram testadas também as seguintes: 40,0°C, 42,0°C, 44,0°C e 46,6°C.

Tabela 3: Condições de PCR para identificação genética de *L. plantarum*.

ESPÉCIE	FRAGMENTO AMPLIFICADO	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS	CONDIÇÕES DOS CICLOS DE PCR
<i>L. plantarum</i>	265 pb	LpI R: (ATGAGGTATTCAACTTATG) 16S F: (GCTGGATCACCTCCTTTC)	Pré-incubação: 95°C/ 5 min Desnaturação: 30 ciclos de 95°C/ 1 min <i>Annealing</i> : 51°C/ 1 min Extensão: 72°C/ 1 min Incubação final: 72°C/ 7 min

3.1.3.3.2. *Lactobacillus curvatus*

As condições e os *primers* usados na reacção de PCR para identificação genética de *L. curvatus* seguiram a metodologia descrita por Berthier e Ehrlich, (1998) e estão

apresentados na Tabela 4. Para além da temperatura de *annealing* sugerida (50,0°C), na montagem da técnica foram testadas também as seguintes: 40,0°C, 43,6°C, 46,0°C e 50,0°C.

Tabela 4: Condições de PCR para identificação genética de *L. curvatus*.

ESPÉCIE	FRAGMENTO AMPLIFICADO	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS	CONDIÇÕES DOS CICLOS DE PCR
<i>L. curvatus</i>	220 pb	Ls R: (ATGAAACTATTAATTGGTAC) 16s F: (GCTGGATCACCTCCTTTC)	Pré-incubação: 95°C/ 5 min Desnaturação: 20 ciclos de 95°C/ 1 min <i>Annealing</i> : 50°C/ 1 min Extensão: 72°C/ 1 min Incubação final: 72°C/ 7 min

3.1.3.3.3. *Lactobacillus sakei*

As condições e os *primers* usados na reacção de PCR para identificação genética de *L. sakei* estão descritos na Tabela 5 de acordo com Berthier e Ehrlich (1998). Para além da temperatura de *annealing* sugerida (45,0°C), na montagem da técnica foram testadas também as seguintes: 40,5°C, 44,1°C e 46,9°C.

Tabela 5: Condições de PCR para identificação genética de *L. sakei*.

ESPÉCIE	FRAGMENTO AMPLIFICADO	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS	CONDIÇÕES DOS CICLOS DE PCR
<i>L. sakei</i>	205 pb	LsR: (ATGAAACTATTAATTGGTAC) 16s F: (GCTGGATCACCTCCTTTC)	Pré-incubação: 95°C/ 5 min Desnaturação: 30 ciclos de 95°C/ 1 min <i>Annealing</i> : 45°C/ 1 min Extensão: 72°C/ 1 min Incubação final: 72°C/ 7 min

3.1.3.4. Metodologia PCR *Fingerprinting*

Para a reacção de PCR *Fingerprinting* realizada no termociclador (My Cyclor, BIO-RAD, Inglaterra) do CIISA- FMV foram usados os *primers* e as condições indicadas na Tabela 6, de acordo com o protocolo descrito por Welsh e McClelland (1990), para todas as estirpes em estudo e 3 réplicas seleccionadas aleatoriamente (n= 39).

Os produtos resultantes da reacção PCR foram revelados por electroforese em gel de agarose 1,5% (tampão TBE 1x, pH 8; agarose em pó, GE Healthcare), após adição de Bromofenol (2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol), sendo a duração da corrida de 2,5 horas. Após este procedimento o gel foi submerso em tampão TBE1x com brometo de etídio (0,5µl/ml) durante 30 minutos para visualização dos fragmentos obtidos por luz ultravioleta (UV).

Posteriormente, foi efectuado um estudo no programa *Bionumerics Applied Maths* 1998-2005 (versão 4.61, Bélgica), no Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, com base nos dados obtidos, de modo a obter um dendrograma que permitiu visualizar a proximidade genética entre as estirpes.

Tabela 6: Condições de PCR *Fingerprinting* para diferenciação de espécies e subespécies de *Lactobacillus* em estudo.

ESPÉCIES	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS	CONDIÇÕES DOS CICLOS DE PCR
<i>L. plantarum</i> <i>L. curvatus</i> <i>L. sakei</i>	M13 (00088481_1 DNA) 5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3'	Pré-incubação: 95°C/ 5 min Desnaturação: 40 ciclos de 95°C/ 1 min Annealing: 40°C/ 2 min; Extensão: 72°C/ 2 min Incubação final: 72°C/ 10 min

3.2. Caracterização fenotípica das estirpes em estudo

3.2.1. Testes de sensibilidade a antibióticos

As estirpes em estudo (n= 36) foram testadas segundo o método de difusão em disco em placas de MRS simples 1,5% agar (MRS Agar, Scharlau Chemie S.A., Espanha), usando 9 antibióticos diferentes: ampicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), estreptomicina (10 µg), vancomicina (30 µg), kanamicina (30 µg), rifampicina (30 µg), clindamicina (10 µg), gentamicina (10 µg) e eritromicina (15 µg) (Liofilchem Bacteriology Products, Itália). Foram medidas as dimensões das zonas de inibição formadas, desde o centro do disco até à periferia do halo transparente, apresentando-se estes valores em milímetros (média de duas leituras por estirpe e antibiótico).

Staphylococcus aureus ATCC 29213 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foram usadas como estirpes controlo.

As estirpes em estudo foram cultivadas em caldo BHI (BHI Broth, Scharlau Chemie S.A., Espanha) a 30°C durante 24h; 100µl de cada cultura, (Densidade Óptica (DO_{600nm}) entre 0,7 e 0,9) foram uniformemente espalhados à superfície de placas MRS 1,5% agar (MRS Agar, Scharlau Chemie S.A., Espanha), sobre a qual foram colocados discos comerciais de antibióticos com concentrações conhecidas, em duplicado. As placas foram incubadas a 30°C durante 48 a 72h (Ocaña, Silva & Nader- Macías, 2006).

Os resultados foram expressos como estirpes resistentes (R), de sensibilidade intermédia (I) ou sensíveis (S), com base nos valores de referência indicados pelo fornecedor (Liofilchem Bacteriology Products, Itália).

3.2.2. Actividade Lipolítica

A actividade lipolítica dos isolados em estudo (n= 36) foi avaliada através da inoculação, em duplicado, de uma gota de 10 µl da cultura (DO_{600nm} entre 0,7 e 0,9) de cada estirpe, cultivadas previamente, em placas de meio *Spirit Blue Agar* (Becton Dickinson, França) enriquecido com uma solução de amido e banha de suíno, na proporção de 3,0%. Após 24 h de incubação a 30°C, foram consideradas lipolíticas as estirpes que produziram halo transparente na zona de inoculação da gota, resultante da metabolização dos lípidos do meio de cultura.

A estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi usada como controlo positivo.

3.2.3. Actividade Proteolítica

As estirpes em estudo (n= 36) foram previamente cultivadas em meio BHI (BHI broth, Scharlau Chemie S.A., Espanha), a 30°C durante 24h ($DO_{600\text{ nm}}$ entre 0,7 e 0,9). Foi inoculada uma gota de 10 µl de cada estirpe, em duplicado, em placas de meio sólido específico para avaliação da actividade proteolítica (TGA, Gelatina, *Skim Milk*, Água Destilada), procedendo-se posteriormente a incubação a 30°C durante 24h. A estirpe *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi usada como controlo positivo.

Os resultados foram obtidos por medição do halo transparente formado à periferia da gota inoculada, após inundar a placa com 1 ml de Bicloreto de Mercúrio a 15% ($HgCl_2$, HCl, Água Destilada), considerando que as estirpes formadoras de halo apresentavam actividade proteolítica.

3.2.4. Produção de substâncias com actividade bacteriocinogénica

3.2.4.1. Método qualitativo para avaliação da actividade bacteriocinogénica das estirpes

Para avaliar a capacidade de inibição de estirpes patogénicas ou flora competidora existente em produtos cárneos fermentados pelas estirpes em estudo (n= 36) foi aplicado o método de Skalka modificado (Skalka, Pillich & Pospisil, 1983).

Foi usada como controlo positivo a estirpe *Enterococcus faecium* EK13 (produtor de Enterocina A, isolado no LAM- IAP SAS, Kosice, Eslováquia, por Lauková, A.)

As estirpes foram cultivadas em caldo BHI (BHI broth, Scharlau Chemie S.A., Espanha) a 30°C durante 24h. Após medição da densidade óptica $DO_{600\text{ nm}}$ e determinação de valores entre 0,7 e 0,9, o que equivale aproximadamente a 10^7 - 10^8 UFC/ml, as culturas foram semeadas em placas MRS 1,5% agar (MRS agar, Scharlau Chemie S.A., Espanha) e incubadas a 30°C durante 48h. Após este período, foram recolhidas assepticamente várias colónias com uma ansa e inoculadas em linha, em duplicado, em placas MRS 1,5% agar (MRS agar, Scharlau Chemie S.A., Espanha) e incubadas a 30°C durante 24h, em aerobiose. Posteriormente foi adicionada e distribuída homogeneamente sobre as linhas a mistura de 200 µl da estirpe *Enterococcus avium* EA5 (LAM- IAP SAS, Kosice, Eslováquia) usada como sensível (previamente cultivada a 30°C durante 18h, $DO_{600\text{ nm}}$ com valores entre 0,7 e 0,9), com 4 ml de meio MRS 0,7% agar (MRS agar, Scharlau Chemie S.A., Espanha), liquefeito a cerca de 40°C. As placas foram novamente incubadas a 30°C durante 24h. Os resultados exprimem as dimensões em milímetros das zonas de inibição formadas pelas estirpes de *Lactobacillus* contra a estirpe sensível EA 5 (LAM- IAP SAS, Kosice, Eslováquia).

O mesmo procedimento foi repetido contra microrganismos patogénicos como *Staphylococcus aureus* ATCC29213 e *Listeria monocytogenes* 4A CECT934 e contra

microrganismos coabitantes com *Lactobacillus*, em enchidos secos fermentados, designadamente *Staphylococcus xylosus* CIP 81.66 e *E. coli* CCUG42744. Para estes microrganismos em vez de meio MRS 0,7% agar (MRS agar, Scharlau Chemie S.A., Espanha) foi usado meio BHI agar 0,7% (BHI agar, Scharlau Chemie S.A., Espanha).

3.2.4.2. Determinação da produção de substâncias com actividade bacteriocinogénica

Para quantificar a capacidade de produção de substâncias com actividade bacteriocinogénica pelas estirpes identificadas em estudo (n= 13) seguiu-se a metodologia do *Agar Spot Test* (De Vuyst, Callewaert & Pot, 1996).

A estirpe *Enterococcus faecium* EK13, isolada no LAM- IAP SAS, Kosice, Eslováquia, foi usada como controlo positivo, estando descrita como produtora de bacteriocina (Mareková, Lauková, De Vuyst, Skaugen & Nes, 2003). Para este estudo foram seleccionadas as estirpes que produziram zonas de inibição contra EA5 igual ou superior a 15,0 mm.

As estirpes em estudo (n= 13) e a estirpe controlo (EK13) foram cultivadas em 5 ml de caldo BHI (BHI broth, Scharlau Chemie S.A., Espanha) a 30°C durante 18h, em aerobiose. Após medição e ajuste da $DO_{600\text{ nm}}$ a valores entre 0,7 e 0,9, as culturas foram submetidas a centrifugação (10 000xg, 7°C, 30 minutos) (Rotina 35R, Hettich, Alemanha). Os sobrenadantes foram concentrados por liofilização (-60°C, 24h), ressuspensando as amostras liofilizadas em 200 µl de Tampão Fosfato (pH 7; 50 mM), de modo a ajustar o pH e descartar o efeito inibitório dos ácidos formados. A liofilização garante a sublimação do peróxido de hidrogénio das amostras, de forma a não interferir com a sua capacidade inibitória (*The Merck Index*, 1983).

Foram aplicadas em duplicado gotas de 10 µl de cada amostra sobre placas de MRS 1,5% agar (MRS agar, Scharlau Chemie S.A., Espanha) previamente cobertas com 200 µl de cultura EA5 ($DO_{600\text{ nm}}$ 0,45) adicionados a 4 ml de meio MRS 0,7% agar fundido (MRS agar, Scharlau Chemie S.A., Espanha). As placas foram incubadas a 30°C durante 24h.

As estirpes produtoras de substâncias com capacidade bacteriocinogénica impedem o crescimento da estirpe indicadora EA5, formando uma zona de inibição transparente no local de inoculação das gotas.

3.2.4.2.1. Quantificação da produção de substâncias com actividade bacteriocinogénica

Para quantificar as substância com actividade bacteriocinogénica seguiu-se a metodologia *Critical dilution method* preconizada por De Vuyst, Callewaert & Pot, 1996.

As unidades de medida usadas para quantificar esta produção de substâncias com capacidade bacteriocinogénica são UA/ ml (Unidades Arbitrárias/ ml), que representam a maior diluição da substância com capacidade de inibir o crescimento da estirpe com que está a competir.

Foram seleccionadas as estirpes que produziram zonas de inibição contra *Enterococcus avium* EA5 iguais ou superiores a 15,0 mm, no método de Skalka modificado. *Enterococcus faecium* EK13 foi usado como controlo positivo e *Enterococcus avium* EA5 como estirpe indicadora (isoladas no LAM- IAP SAS, Kosice, Eslováquia).

Os sobrenadantes liofilizados, preparados de acordo com o método anteriormente descrito, foram submetidos a diluições em Tampão Fosfato (pH 7,0, 50 mM), 1:2, 1:4 e 1:8. Foram aplicadas em duplicado gotas de 10 µl de cada amostra e diluição sobre placas de MRS 1,5% agar (MRS agar, Scharlau Chemie S.A., Espanha) previamente cobertas com 200 µl de cultura EA 5 (DO_{600 nm} de 0,45) adicionados a 4 ml de meio MRS 0,7% agar liquefeito e mantido a aproximadamente 40°C (MRS agar, Scharlau Chemie S.A., Espanha). Após deposição das gotas as placas foram incubadas a 30°C durante 24h.

As estirpes produtoras de substâncias com capacidade bacteriocinogénica impedem o crescimento da estirpe indicadora EA5, formando uma zona de inibição transparente no local de inoculação das gotas. Quanto maior for a quantidade de substância bacteriocinogénica no sobrenadante, maior a capacidade inibitória até diluições mais elevadas.

As zonas de inibição produzidas foram expressas em Unidades Arbitrárias por mililitro (AU/ml), como apresentado na Tabela 7 (De Vuyst, Callewaert & Pot, 1996).

Tabela 7: Relação entre as diluições dos sobrenadantes e a actividade bacteriocinogénica manifestada em Unidades Arbitrárias por mililitro (UA/ml).

DILUIÇÃO	UNIDADES ARBITRÁRIAS/ ml
Puro	100 UA/ ml
1: 2	200 UA/ ml
1: 4	400 UA/ ml
1: 8	800 UA/ ml

3.2.5. Capacidade de acidificação do meio envolvente

Foram seleccionadas as estirpes de *Lactobacillus* que produziram maiores zonas de inibição no Método de Skalka modificado contra a estirpe indicadora *Enterococcus avium* EA5 (3 *L. plantarum*, 1 *L. curvatus* e 1 *L. sakei*).

As estirpes (n=5) foram inoculadas em duplicado em caldo BHI, com pH 7,0 (BHI Broth, Scharlau Chemie S.A., Espanha), seguindo-se a sua incubação a 30°C durante 24 horas.

Após este período foi medido o pH das culturas com o auxílio de um eléctrodo (HI9025, Hanna Instruments, Portugal), acoplado a um potenciómetro.

3.2.6. Determinação da tolerância a pH baixo das estirpes com actividade bacteriocinogénica

A tolerância a pH baixo das estirpes com actividade bacteriocinogénica foi determinada de acordo com a metodologia apresentada por Jin, Ho, Abdullah, Ali e Jalaludi (1998).

Para esta avaliação foram seleccionadas as estirpes de cada espécie (n= 5) que apresentavam maiores zonas de inibição no Método de Skalka modificado contra a estirpe indicadora *Enterococcus avium* EA5. As estirpes (100 ml de cultura de 24h a 30°C, em caldo BHI, com DO_{600nm} entre 0,7 e 0,9) foram inoculadas em duplicado em 5 ml de caldo BHI (BHI Broth, Scharlau Chemie S.A., Espanha) e cultivadas em aerobiose, a 30°C durante 24h. Após a incubação as culturas foram centrifugadas a 2000xg durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 5 ml de Tampão Fosfato 0,05M a pH 3 ajustado com 1 NHCl. As suspensões foram diluídas em Triptona Sal (6,5%) e incubadas a 30°C durante 3h. Efectuou-se a sementeira de um mililitro da mesma cultura em placas de meio MRS 1,5% agar (MRS Agar, Scharlau Chemie S.A., Espanha) seguindo-se a incubação a 30°C durante 48h para contagem do número de colónias (UFC/ ml) após 0h, 1h, 2h e 3h. A centrifugação, ressuspensão, diluição e sementeira de placas foram repetidas em todos os momentos referidos.

3.2.7. Determinação da tolerância aos sais biliares das estirpes com actividade bacteriocinogénica

A tolerância das estirpes com actividade bacteriocinogénica à presença de sais biliares foi avaliada de acordo com a metodologia preconizada por Gilliland e Walker (1990).

As estirpes (100 ml de cultura de 24h a 30°C, em caldo BHI, com DO_{600nm} entre 0,7 e 0,9) foram cultivadas em caldo MRS (MRS broth, Scharlau Chemie S.A., Espanha), a 30°C durante 24h, e inoculadas em duplicado, na proporção de 0,1%, no meio MRS com 1% (w/v) de Oxgall (Difco TM, Oxgall, Becton Dickinson, França). Paralelamente, as mesmas estirpes foram cultivadas em meio MRS sem Oxgall, como controlo. Após 0h, 18h e 24h de incubação a 30°C em aerobiose, avaliou-se o crescimento das estirpes por medição da densidade óptica (DO) da cultura em espectrofotómetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Inglaterra), com um comprimento de onda de 600 nm. Em simultâneo, efectuou-se a sementeira de um mililitro da mesma cultura em placas de meio MRS 1,5% agar (MRS Agar, Scharlau Chemie S.A., Espanha) seguindo-se a incubação a 30°C durante 48h para contagem do número de colónias (UFC/ ml).

Para esta avaliação foram seleccionadas as estirpes de cada espécie (n= 5) que apresentavam maiores zonas de inibição contra a estirpe indicadora *Enterococcus avium* EA5 no Método de Skalka modificado.

3.2.8. Determinação do crescimento a diferentes temperaturas das estirpes com actividade bacteriocinogénica

As estirpes que produziram zonas de inibição contra a estirpe indicadora *Enterococcus avium* EA5 iguais ou superiores a 15,0 mm, no Método de Skalka modificado, (n= 13) foram avaliadas na capacidade de crescimento a temperaturas diferentes. Efectuou-se inoculação

de uma ansa de 1µl (ROLL, S.A.S.) de colónias de cultura fresca (24h a 30°C) de cada estirpe em 4 ml de caldo BHI (BHI Broth, Scharlau Chemie S.A., Espanha). A incubação foi efectuada a 10°C, 25°C, 30°C e 44,5°C. As temperaturas seleccionadas permitem avaliar a capacidade de utilização das estirpes como culturas *starter*. 10°C é uma temperatura próxima à das salas de desmancha e de preparação de carnes frescas e à das câmaras de maturação da massa; 25°C é uma temperatura próxima à de fumagem dos enchidos tradicionais portugueses; 30°C é a temperatura óptima de crescimento do género *Lactobacilli*, servindo de controlo; 44,5°C é uma temperatura extrema, que permite testar a termotolerância das estirpes.

Foi efectuada medição das DO_{600 nm} das culturas às 24h de cultivo às várias temperaturas em espectrofotómetro (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Inglaterra).

3.3. Análise estatística dos resultados

Na análise descritiva dos resultados obtidos, utilizou-se o programa *Microsoft Office Excel* (versão 2007), para determinação das percentagens de sensibilidade, resistência intermédia e resistência das estirpes aos nove antibióticos testados; para determinação das médias dos valores de inibição relativos à actividade bacteriocinogénica das estirpes contra agentes coabitantes e patogénicos. A apresentação gráfica dos resultados foi efectuada com o auxílio do mesmo programa.

A análise dos perfis genéticos das estirpes resultantes da metodologia PCR *Fingerprinting* foi efectuada com recurso ao programa *Bionumerics Applied Maths 1998-2005* (versão 4.61, Bélgica), disponibilizado pelo Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, permitindo estabelecer *clusters* (grupos homogéneos em função das suas características genéticas) e determinar a percentagem de semelhança entre as estirpes estudadas, de acordo com o coeficiente de *Pearson*, sendo o índice de reprodutibilidade da técnica de 90%, com base na semelhança entre as estirpes e as réplicas.

4. Resultados

4.1. Caracterização genética das estirpes

4.1.1. Identificação genética das espécies de *Lactobacillus* por PCR

Às várias estirpes isoladas (n= 55) foram aplicados os protocolos de PCR referidos para *L. plantarum*, *L. curvatus* e *L. sakei*, de modo a obter a sua identificação genética. Nem todas as estirpes foram testadas para as 3 metodologias, no entanto várias foram testadas para mais que uma metodologia. A Tabela 8 apresenta a identificação genética obtida para as estirpes analisadas.

Tabela 8: Identificação genética por PCR convencional, obtida por aplicação das condições definidas para *L. plantarum*, *L. curvatus* e *L. sakei* às várias estirpes previamente isoladas.

UNIDADE DE PRODUÇÃO	CODIFICAÇÃO	ANÁLISE DAS ESTIRPES POR METODOLOGIA PCR			IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA
		<i>L. plantarum</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. sakei</i>	
A	PO5-3	X	X	X	Não identificado
	PO5-4	X	X		<i>L. plantarum</i>
	PO5-5	X	X		<i>L. plantarum</i>
	PO5-8		X		<i>L. curvatus</i>
	PO5-15	X			<i>L. plantarum</i>
	PO5-18		X		Não identificado
	PO5-20	X	X	X	Não identificado
	PO5-21	X	X		Não identificado
	PO5-22	X	X	X	Não identificado
	PO5-27	X			<i>L. plantarum</i>
	PO5-28	X			<i>L. plantarum</i>
	PO5-29	X			<i>L. plantarum</i>
	PO5-31	X	X	X	Não identificado
	PO5-34	X			<i>L. plantarum</i>
	PO5-35	X			<i>L. plantarum</i>
	PO5-37	X	X	X	Não identificado
	PO5-38	X			<i>L. plantarum</i>
	PO5-39	X			<i>L. plantarum</i>
	PO5-40			X	<i>L. curvatus</i>
	PO5-42	X		X	<i>L. plantarum</i>
	PO5-45	X			<i>L. plantarum</i>
	PO5-46	X			<i>L. plantarum</i>
	PO5-49			X	Não identificado
	PO5-50	X		X	<i>L. plantarum</i>
	PO5-51	X			<i>L. plantarum</i>
	PO5-52	X		X	Não identificado
	PO5-53	X			Não identificado
	PO5-54	X			<i>L. plantarum</i>
	PO5-56	X			<i>L. plantarum</i>
	PO5-57	X			<i>L. plantarum</i>
	PO5-60	X			<i>L. plantarum</i>
PO5-62	X			<i>L. plantarum</i>	
PO5-67	X			<i>L. plantarum</i>	
PO5-71			X	Não identificado	
PO5-77			X	<i>L. curvatus</i>	
PO5-82	X		X	Não identificado	
PO5-84			X	Não identificado	
PO5-85			X	<i>L. sakei</i>	
PO5-87	X		X	Não identificado	
PO5-89	X		X	<i>L. plantarum</i>	
PO5-95			X	<i>L. sakei</i>	
PO5-98	X		X	Não identificado	
PO5-99	X		X	Não identificado	
PO5-102	X			<i>L. plantarum</i>	
PO5-103			X	Não identificado	
PO5-107			X	<i>L. curvatus</i>	
PO5-108			X	<i>L. curvatus</i>	
PO5-119			X	<i>L. curvatus</i>	
B	PO6-12			X	Não identificado
	PO6-13			X	<i>L. sakei</i>
	PO6-14			X	<i>L. sakei</i>
	PO6-23			X	<i>L. sakei</i>
	PO6-44			X	<i>L. sakei</i>
	PO6-67			X	Não identificado
	PO6-100			X	<i>L. sakei</i>

A Tabela 9 apresenta as identificações fenotípica e genética das estirpes, determinadas por API 50CHL (BioMérieux, França) e reacções de PCR, respectivamente. Das 36 estirpes identificadas geneticamente, 22 tinham já sido identificadas fenotipicamente (61,11%), sendo que 14 coincidiram com as identificações genotípicas (63,64%). Dos 23 *L. plantarum* identificados geneticamente, 10 coincidiam com a identificação fenotípica; dos 6 *L. curvatus* identificados geneticamente, 66,67% coincidiam com a identificação fenotípica; nenhuma das estirpes foi identificada fenotipicamente como *L. sakei*, apesar de terem sido identificadas geneticamente 7 estirpes.

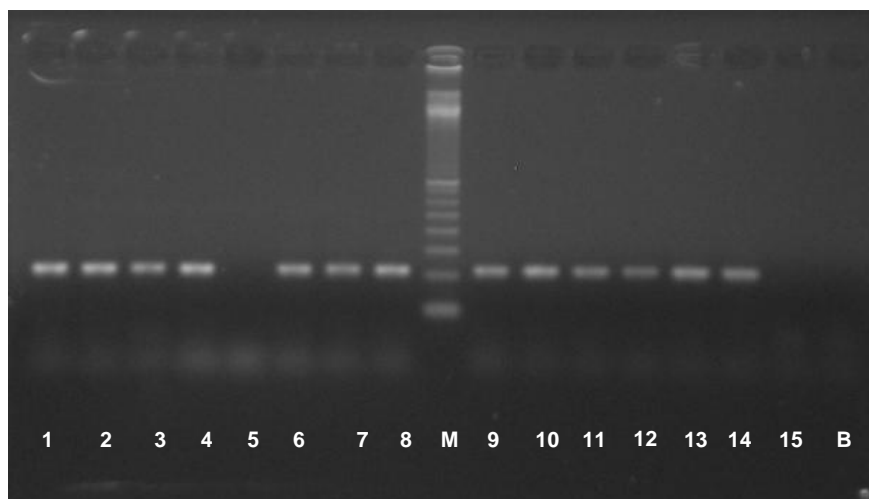
Tabela 9: Identificação fenotípica por API 50CHL (Bio Mérieux, França) e genética por PCR das estirpes isoladas em duas unidades de produção.

UNIDADE DE PRODUÇÃO	CODIFICAÇÃO	IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA	IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA
A	PO5- 4	<i>L. curvatus</i>	<i>L. plantarum</i>
	PO5- 5	Não identificado	<i>L. plantarum</i>
	PO5- 8	<i>L. curvatus</i>	<i>L. curvatus</i>
	PO5- 15	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
	PO5- 27	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
	PO5- 28	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
	PO5- 29	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
	PO5- 34	Não identificado	<i>L. plantarum</i>
	PO5- 35	Não identificado	<i>L. plantarum</i>
	PO5- 38	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
	PO5- 39	Não identificado	<i>L. plantarum</i>
	PO5- 40	<i>L. curvatus</i>	<i>L. curvatus</i>
	PO5- 42	Não identificado	<i>L. plantarum</i>
	PO5- 45	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
	PO5- 46	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
	PO5- 50	Não identificado	<i>L. plantarum</i>
	PO5- 51	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
	PO5- 54	Não identificado	<i>L. plantarum</i>
	PO5- 56	Não identificado	<i>L. plantarum</i>
	PO5- 57	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
	PO5- 60	Não identificado	<i>L. plantarum</i>
PO5- 62	Não identificado	<i>L. plantarum</i>	
PO5- 67	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	
PO5- 77	<i>L. curvatus</i>	<i>L. curvatus</i>	
PO5- 85	Não identificado	<i>L. sakei</i>	
PO5- 89	Não identificado	<i>L. plantarum</i>	
PO5- 95	Não identificado	<i>L. sakei</i>	
PO5- 102	Não identificado	<i>L. plantarum</i>	
PO5- 107	<i>L. curvatus</i>	<i>L. curvatus</i>	
PO5- 108	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2</i>	<i>L. curvatus</i>	
PO5- 119	<i>Lactococcus lactis ssp lactis 2</i>	<i>L. curvatus</i>	
B	PO6- 13	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides</i>	<i>L. sakei</i>
	PO6- 14	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>	<i>L. sakei</i>
	PO6- 23	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides</i>	<i>L. sakei</i>
	PO6- 44	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides</i>	<i>L. sakei</i>
	PO6- 100	<i>Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides</i>	<i>L. sakei</i>

As Figuras 2 e 3 apresentam os resultados obtidos por PCR seguindo a metodologia descrita para *L. plantarum*, podendo observar-se para as estirpes em estudo e identificadas como *L. plantarum* um fragmento amplificado de 265 p.b. (pares de bases), enquanto que para o controlo *L. curvatus* tal não acontece, por não haver hibridação, confirmando-se deste modo, a especificidade dos *primers* utilizados.

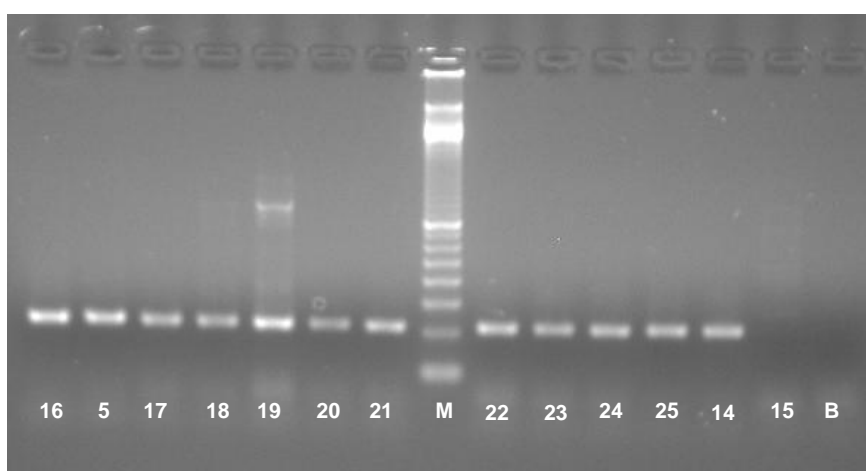
A estirpe PO5- 38, correspondente ao número 5 das Figuras 2 e 3, não aparece na Figura 2, pelo que foi repetida na Figura 3. A estirpe PO5- 4 identificada bioquimicamente como *L. curvatus*, foi identificada geneticamente como *L. plantarum*, correspondendo ao número 16 da Figura 3.

Figura 2: Identificação genética de 12 estirpes de *L. plantarum* por metodologia PCR.



Legenda: (M) Marcador 100 p.b.; (B) Branco; (1) PO5- 15; (2) PO5- 27; (3) PO5- 28; (4) PO5- 29; (5) PO5- 38; (6) PO5- 45; (7) PO5- 46; (8) PO5- 51; (9) PO5- 57; (10) PO5- 67; (11) PO5- 5; (12) PO5- 34; (13) PO5- 35; (14) *L. plantarum* CCM 4000; (15) *L. curvatus* DSM 20019.

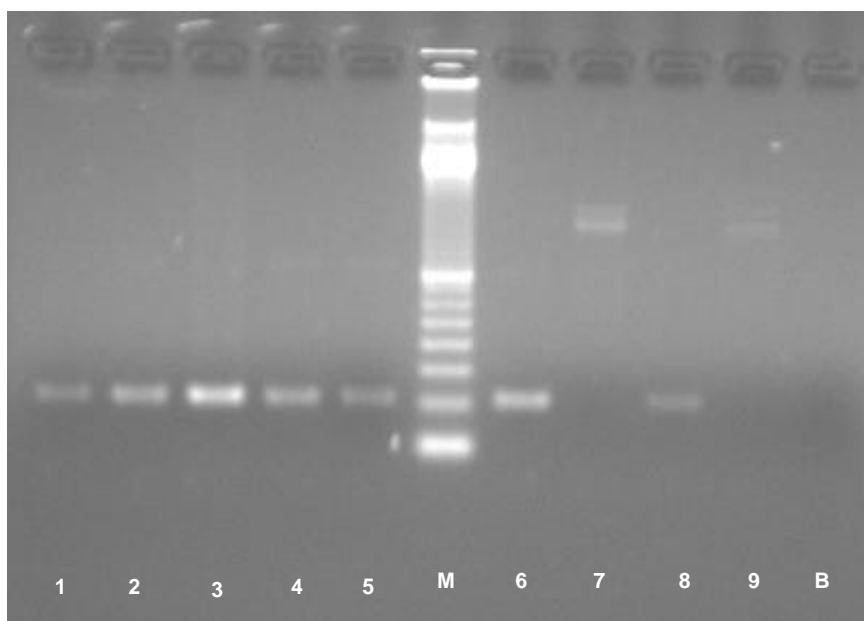
Figura 3: Identificação genética de 11 estirpes de *L. plantarum* por metodologia PCR.



Legenda: (M) Marcador 100 p.b.; (B) Branco; (16) PO5- 4; (5) PO5- 38; (17) PO5- 39; (18) PO5- 42; (19) PO5- 50; (20) PO5- 54; (21) PO5- 56; (22) PO5- 60; (23) PO5- 62; (24) PO5- 89; (25) PO5- 102; (14) *L. plantarum* CCM 4000; (15) *L. curvatus* DSM 20019.

A Figura 4 representa os produtos resultados obtidos por PCR de acordo com a metodologia descrita para *L. curvatus*, apresentando um fragmento com 220 p.b.. As estirpes (1) PO5- 40, (2) PO5- 119, (3) PO5- 8, (4) PO5- 77, (5) PO5- 108 e (6) PO5- 107 apresentam todas um fragmento de 220 p.b.. A estirpe PO5- 4, identificada com o número 7, apesar de ter sido identificada fenotipicamente como *L. curvatus*, não aparece na corrida de electroforese apresentada na Figura 4.

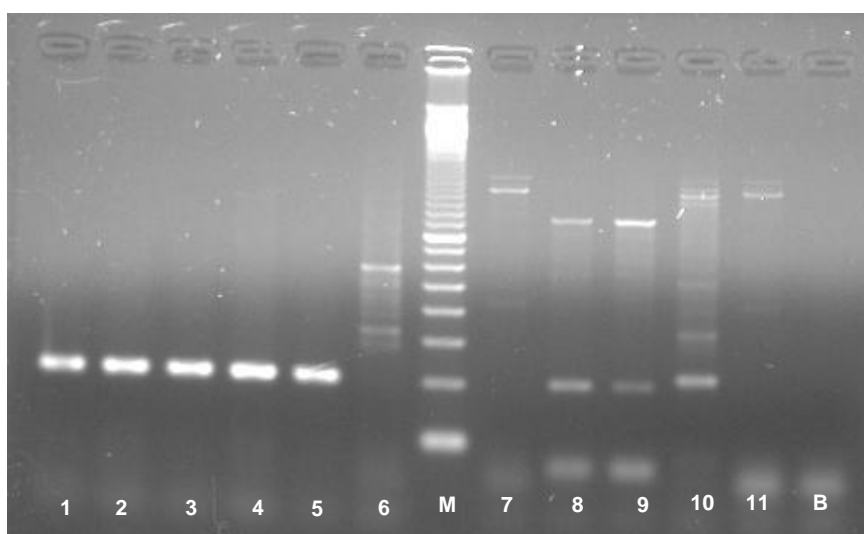
Figura 4: Identificação genética de 6 estirpes de *L. curvatus* por metodologia PCR.



M) Marcador 100 p.b.; (B) Branco; (1) PO5- 40; (2) PO5- 119; (3) PO5- 8; (4) PO5- 77; (5) PO5- 108; (6) PO5- 107; (7) PO5- 4; (8) *L. curvatus* DSM 20019; (9) *L. plantarum* CCM 4000.

Na Figura 5 pode visionar-se a reação de PCR efectuada de acordo com a metodologia descrita para *L. sakei*. As estirpes (6) PO6- 67 e (7) PO6- 12 não foram identificadas como *L. sakei*, uma vez que não aparece uma banda de 205 p.b. nas linhas 6 e 7, respectivamente. As restantes amostras foram identificadas, no entanto, as linhas 8 (PO5- 85) e 9 (PO5- 95) aparecem ligeiramente abaixo da zona de hibridação correspondente a 205 p.b., relativamente à estirpe de referência identificada com o número 10.

Figura 5: Identificação genética de 7 estirpes de *L. sakei* por metodologia PCR.



Legenda: (M) Marcador 100 p.b.; (B) Branco; (1) PO6- 44; (2) PO6- 14; (3) PO6- 100; (4) PO6- 23; (5) PO6- 13; (6) PO6- 67; (7) PO6- 12; (8) PO5- 85; (9) PO5- 95; (10) *L. sakei* ATCC 15323; (11) *L. curvatus* DCM20019.

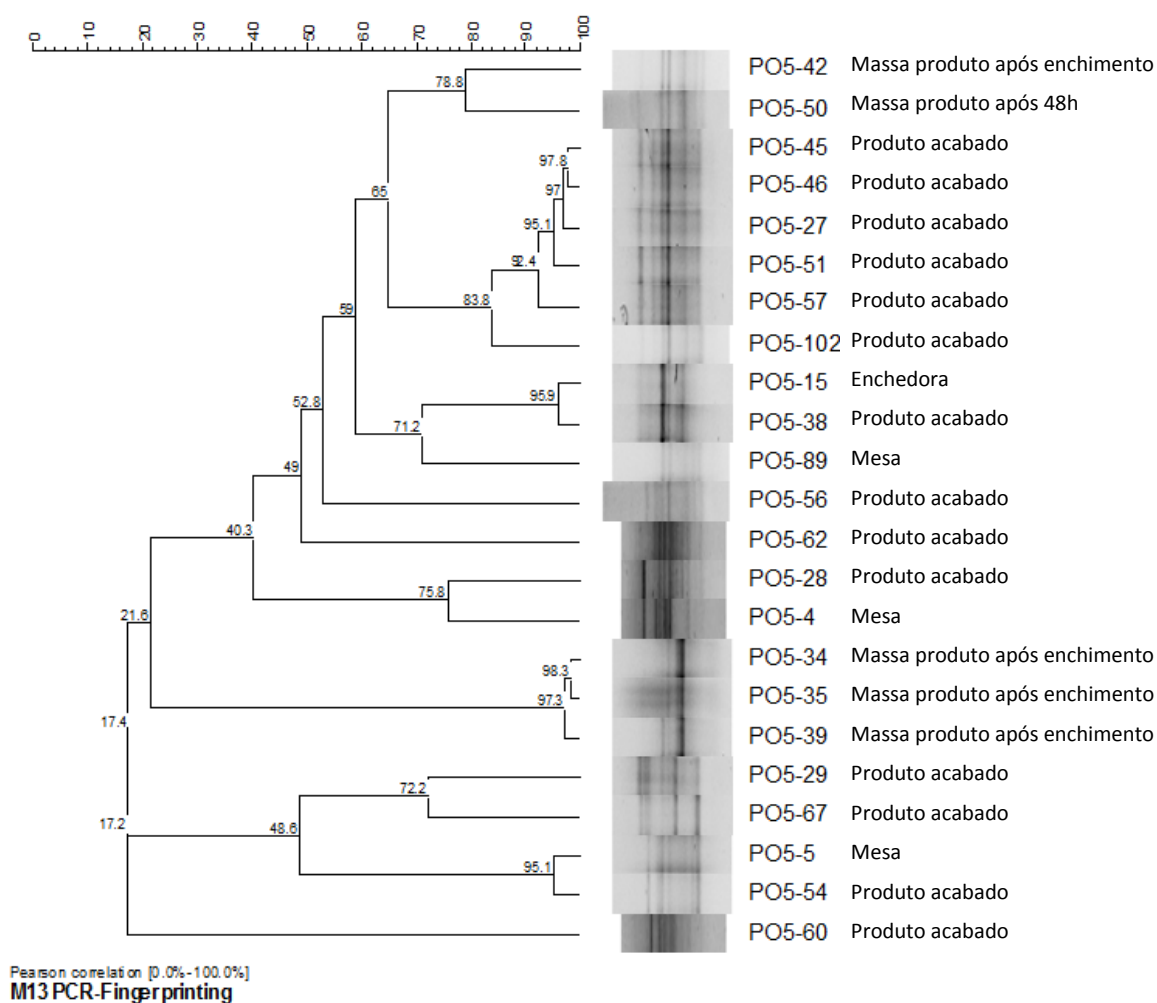
4.1.2. PCR *Fingerprinting*

As Figuras 6, 7 e 8 representam os dendrogramas que foram originados a partir dos géis de agarose onde foram aplicadas todas as estirpes em estudo (n=36) e 3 réplicas seleccionadas aleatoriamente de modo a verificar o grau de reprodutibilidade do teste, após avaliação matemática no programa *Bionumerics Applied Maths*.

Da análise do perfil genético das estirpes de *L. plantarum* estudadas (Figura 6) estabeleceram-se três grandes grupos cujas semelhanças eram de 17,2%: i) PO5- 42, PO5- 50, PO5- 45, PO5- 46, PO5- 27, PO5- 51, PO5- 57, PO5- 102, PO5- 15, PO5- 38, PO5- 89, PO5- 56, PO5- 62, PO5- 28 e PO5- 4; ii) PO5- 34, PO5- 35 e PO5- 39; iii) PO5- 29, PO5- 67, PO5- 5, PO5- 54 e PO5- 60.

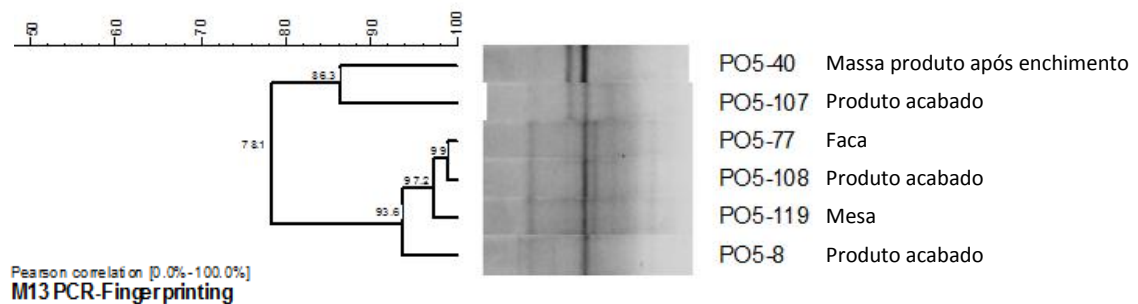
Dentro de cada grupo, as estirpes que apresentaram um grau de semelhança superior a 90%, podem ser consideradas a mesma estirpe, caso os restantes testes efectuados sejam semelhantes. Na Figura 6 é possível distinguir 15 perfis genéticos diferentes entre as várias estirpes de *L. plantarum* analisadas, pois apresentam semelhanças inferiores a 84%.

Figura 6: Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes *L. plantarum* obtido por PCR *Fingerprinting*. A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança dado pela análise de *clusters*.



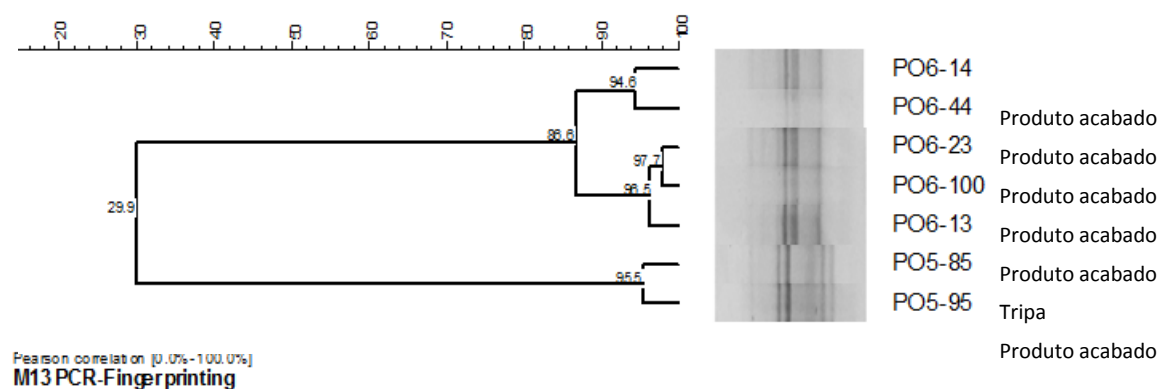
Na Figura 7 estão representados os dois grupos (*clusters*) formados a partir da análise do perfil genético obtido por PCR *Fingerprinting* a estirpes identificadas como *L. curvatus*: i) PO5- 40 e PO5- 107; ii) PO5- 77, PO5- 108; PO5- 119 e PO5- 8. Estes dois grupos apresentam um grau de semelhança de 78,1% entre si, sugerindo uma correcta identificação da espécie, mas permitindo diferenciar três perfis genéticos diferentes para as estirpes analisadas (semelhança de 86,3%).

Figura 7: Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes *L. curvatus* obtido por PCR *Fingerprinting*. A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança dado pela análise de *clusters*.



Na Figura 8 apresentam-se os perfis genéticos de dois grupos de estirpes identificadas previamente como *L. sakei*, com 29,9% de semelhança. As estirpes incluídas nos dois grupos (*clusters*) são: i) PO6- 14, PO6- 44, PO6- 23, PO6- 100 e PO6- 13; ii) PO5- 85 e PO5- 95.

Figura 8: Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes identificadas como *L. sakei* obtido por PCR *Fingerprinting*. A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança dado pela análise de *clusters*.



4.2. Caracterização fenotípica das estirpes

4.2.1. Sensibilidade a Antibióticos

A Tabela 10 apresenta os resultados relativos aos testes de sensibilidade a antibióticos (cloranfenicol (30 µg), estreptomicina (10 µg), vancomicina (30 µg), kanamicina (30 µg), rifampicina (30 µg), clindamicina (10 µg), ampicilina (10 µg), gentamicina (10 µg) e eritromicina (15 µg)) das estirpes em estudo. De acordo com as referências do fornecedor *Liofilchem Bacteriology Products*, as estirpes foram classificadas como resistentes (R), com sensibilidade intermédia (I) ou sensíveis (S) à acção dos vários antibióticos.

Das estirpes estudadas, 78,40% apresentaram resistência aos antibióticos, 15,43% sensibilidade intermédia e 6,17% foram sensíveis.

Entre as estirpes de *L. plantarum*, 78,26% eram resistentes, 16,91% apresentaram sensibilidade intermédia e 4,83% eram sensíveis aos antibióticos testados; para o caso das estirpes de *L. curvatus*, 70,37% eram resistentes, 22,22% manifestaram sensibilidade intermédia e 7,41% eram sensíveis; entre as estirpes de *L. sakei*, 85,71% eram resistentes, 4,76% apresentaram sensibilidade intermédia e 9,52% demonstraram sensibilidade.

Tabela 10: Resistência (R), sensibilidade intermédia (I) ou sensibilidade (S) apresentada pelas estirpes de *Lactobacillus* à presença de antibióticos (cloranfenicol (30 µg), estreptomicina (10 µg), vancomicina (30 µg), kanamicina (30 µg), rifampicina (30 µg), clindamicina (10 µg), ampicilina (10 µg), gentamicina (10 µg) e eritromicina (15 µg)).

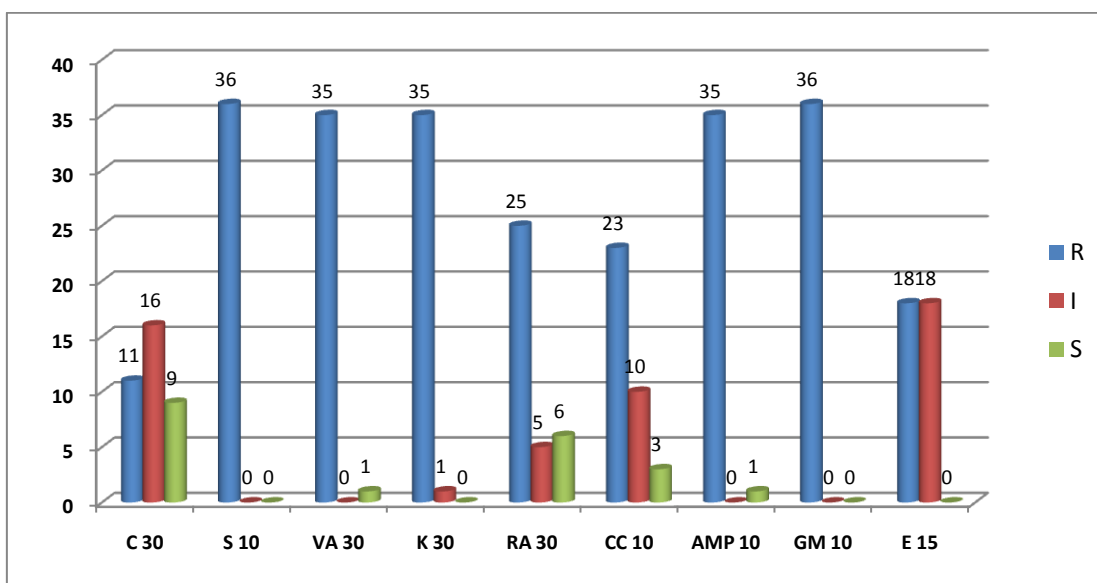
ESPÉCIES	ESTIRPES	ANTIBIÓTICOS USADOS E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES EM MICROGRAMAS								
		C 30	S 10	VA 30	K 30	RA 30	CC 10	AMP 10	GM 10	E 15
<i>L. plantarum</i>	PO5- 4	I	R	R	R	R	R	R	R	R
	PO5- 5	I	R	S	I	S	S	S	R	I
	PO5- 15	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	PO5- 27	I	R	R	R	R	R	R	R	I
	PO5- 28	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	PO5- 29	R	R	R	R	R	I	R	R	R
	PO5- 34	I	R	R	R	R	R	R	R	I
	PO5- 35	S	R	R	R	R	R	R	R	R
	PO5- 38	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	PO5- 39	S	R	R	R	R	R	R	R	I
	PO5- 42	I	R	R	R	S	I	R	R	I
	PO5- 45	I	R	R	R	R	R	R	R	I
	PO5- 46	I	R	R	R	R	R	R	R	R
	PO5- 50	I	R	R	R	R	R	R	R	I
	PO5- 51	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	PO5- 54	I	R	R	R	I	R	R	R	I
	PO5- 56	I	R	R	R	R	R	R	R	I
	PO5- 57	S	R	R	R	R	R	R	R	R
	PO5- 60	S	R	R	R	I	R	R	R	I
	PO5- 62	I	R	R	R	R	I	R	R	I
PO5- 67	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
PO5- 89	S	R	R	R	I	I	R	R	I	
PO5- 102	I	R	R	R	I	I	R	R	I	
<i>L. curvatus</i>	PO5- 8	S	R	R	R	S	I	R	R	I
	PO5- 40	I	R	R	R	R	I	R	R	R
	PO5- 77	I	R	R	R	S	I	R	R	I
	PO5- 107	R	R	R	R	R	I	R	R	R
	PO5- 108	S	R	R	R	R	R	R	R	R
	PO5- 119	I	R	R	R	I	I	R	R	I

Tabela 10 (continuação): Resistência (R), sensibilidade intermédia (I) ou sensibilidade (S) apresentada pelas estirpes de *Lactobacillus* à presença de antibióticos (cloranfenicol (30 µg), estreptomicina (10 µg), vancomicina (30 µg), kanamicina (30 µg), rifampicina (30 µg), clindamicina (10 µg), ampicilina (10 µg), gentamicina (10 µg) e eritromicina (15 µg)).

ESPÉCIES	ESTIRPES	ANTIBIÓTICOS USADOS E RESPECTIVAS CONCENTRAÇÕES EM MICROGRAMAS								
		C 30	S 10	VA 30	K 30	RA 30	CC 10	AMP 10	GM 10	E 15
<i>L. sakei</i>	PO5- 85	I	R	R	R	S	S	R	R	I
	PO5- 95	S	R	R	R	S	S	R	R	I
	PO6- 13	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	PO6- 14	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	PO6- 23	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	PO6- 44	S	R	R	R	R	R	R	R	R
	PO6- 100	R	R	R	R	R	R	R	R	R

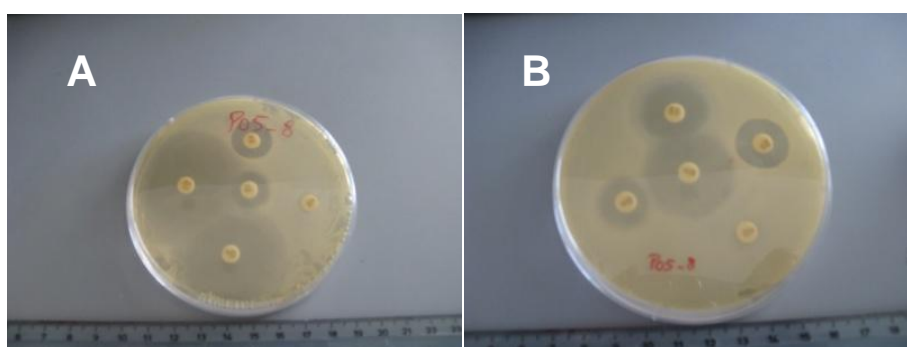
No Gráfico 1 representa-se o número de estirpes, independentemente da espécie, que demonstraram resistência (R), sensibilidade intermédia (I) ou sensibilidade (S) a cada um dos antibióticos estudados. Pode verificar-se que todas as estirpes estudadas apresentaram resistência a estreptomicina (10 µg) e a gentamicina (10 µg); 35 das estirpes foram resistentes a vancomicina (30 µg), kanamicina (30 µg) e ampicilina (30 µg); 25 estirpes apresentaram resistência a rifampicina (30 µg); 23 estirpes foram resistentes a clindamicina (10 µg); 18 estirpes apresentaram resistência a eritromicina (15 µg); 11 estirpes demonstraram resistência a cloranfenicol (30 µg). Apenas 9 estirpes, independentemente da espécie, mostraram sensibilidade a cloranfenicol (30 µg) e 6 estirpes eram sensíveis a rifampicina (30 µg).

Gráfico 1: Resultados dos testes de sensibilidade aos nove antibióticos apresentados pelas 36 estirpes de *Lactobacillus* em estudo. O eixo vertical representa o número de estirpes resistentes aos vários antibióticos e o eixo horizontal as designações dos antibióticos usados. R- resistência, I- sensibilidade intermédia, S- sensibilidade.



As Figuras 9 A e B ilustram os testes de sensibilidade a antibióticos da estirpe PO5- 8 (*L. curvatus*), mostrando as zonas de inibição formadas na presença de cloranfenicol (30 µg), estreptomicina (10 µg), vancomicina (30 µg), kanamicina (30 µg), rifampicina (30 µg), clindamicina (10 µg), ampicilina (10 µg), gentamicina (10 µg) e eritromicina (15 µg). Os maiores halos formados foram para rifampicina (20 mm), cloranfenicol (18mm), eritromicina (17 mm) e clindamicina (16 mm), seguidos de ampicilina (12 mm) e kanamicina (5 mm). Para a estreptomicina, vancomicina e gentamicina não houve formação de halo, o que significa total resistência da estirpe a estes antibióticos.

Figuras 9 A e B: Zonas de inibição formadas na presença de discos de antibióticos, da estirpe PO5-8 (*L. curvatus*) em placas MRS 1,5% agar.



4.2.2. Actividade lipolítica e proteolítica das estirpes em estudo

A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos na determinação das actividades lipolítica e proteolítica das estirpes em estudo. Foram classificadas como positivas (+) as estirpes com capacidade de lipólise ou de proteólise ou negativas (-) quando se verificou a ausência destas capacidades. Pode observar-se que todas as estirpes analisadas apresentaram ausência de capacidades lipolítica e proteolítica.

Tabela 11: Actividade lipolítica e proteolítica demonstrada pelas estirpes de *Lactobacillus*.

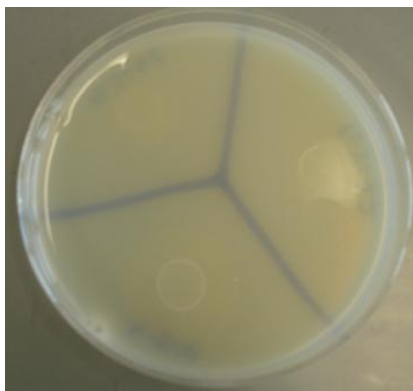
UNIDADE DE PRODUÇÃO	CODIFICAÇÃO	IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA	ACTIVIDADE LIPOLÍTICA		ACTIVIDADE PROTEOLÍTICA	
			Presença (+)	Ausência (-)	Presença (+)	Ausência (-)
A	PO5- 4	<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-
	PO5- 5	<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-
	PO5- 8	<i>L. curvatus</i>	-	-	-	-
	PO5- 15	<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-
	PO5- 27	<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-
	PO5- 28	<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-
	PO5- 29	<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-
	PO5- 34	<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-
	PO5- 35	<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-
	PO5- 38	<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-
	PO5- 39	<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-
	PO5- 40	<i>L. curvatus</i>	-	-	-	-
	PO5- 42	<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-
	PO5- 45	<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-
	PO5- 46	<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-
	PO5- 50	<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-

Tabela 11 (continuação): Actividade lipolítica e proteolítica demonstrada pelas estirpes de *Lactobacillus*.

UNIDADE DE PRODUÇÃO	CODIFICAÇÃO	IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA	ACTIVIDADE LIPOLÍTICA Presença (+) Ausência (-)	ACTIVIDADE PROTEOLÍTICA Presença (+) Ausência (-)
	PO5- 51	<i>L. plantarum</i>	-	-
	PO5- 54	<i>L. plantarum</i>	-	-
	PO5- 56	<i>L. plantarum</i>	-	-
	PO5- 57	<i>L. plantarum</i>	-	-
	PO5- 60	<i>L. plantarum</i>	-	-
	PO5- 62	<i>L. plantarum</i>	-	-
	PO5- 67	<i>L. plantarum</i>	-	-
	PO5- 77	<i>L. curvatus</i>	-	-
	PO5- 85	<i>L. sakei</i>	-	-
	PO5- 89	<i>L. plantarum</i>	-	-
	PO5- 95	<i>L. sakei</i>	-	-
	PO5- 102	<i>L. plantarum</i>	-	-
	PO5- 107	<i>L. curvatus</i>	-	-
	PO5- 108	<i>L. curvatus</i>	-	-
	PO5- 119	<i>L. curvatus</i>	-	-
B	PO6- 13	<i>L. sakei</i>	-	-
	PO6- 14	<i>L. sakei</i>	-	-
	PO6- 23	<i>L. sakei</i>	-	-
	PO6- 44	<i>L. sakei</i>	-	-
	PO6- 100	<i>L. sakei</i>	-	-

A Figura 10 ilustra os resultados negativos dos testes de avaliação da capacidade proteolítica de estirpes de *Lactobacillus* em estudo. A não formação de halo transparente na zona de inoculação de uma gota de cultura pura de cada estirpe após inundar a placa com de Bicloreto de Mercúrio a 15% significa que não apresentaram capacidade proteolítica.

Figura 10: Ausência de formação de halos transparentes na avaliação da actividade proteolítica em estirpes de *Lactobacilli* (estirpe não proteolítica).



4.2.3. Actividade bacteriocinogénica das estirpes

A Tabela 12 apresenta os resultados dos testes qualitativos de competição entre as estirpes de *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. curvatus* e *L. sakei*) em estudo e uma estirpe indicadora referenciada como sensível (EA5- *Enterococcus avium* isolado no IAP SAS, Kosice, Eslováquia), estirpes patogénicas (*L. monocytogenes* 4A CECT 934 e *S. aureus* ATCC 29213) e estirpes coabitantes nos produtos cárneos fermentados (*S. xilosus* CIP 81.66 e *E. coli* CCUG 42744).

Os valores apresentados em milímetros são a média aritmética de resultados obtidos em duplicado para cada estirpe.

Os resultados demonstram que: i) a capacidade inibitória não apresenta qualquer padrão dentro da espécie; ii) a ausência de capacidade de inibição da estirpe sensível não significa ausência de inibição de agentes patogênicos ou coabitantes, tal como acontece com PO5-5 e PO5-62 que não inibem EA5 mas inibem *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. xylosum* e *E. coli*; iii) nas condições do estudo, todas as estirpes estudadas apresentam capacidade inibitória contra *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *S. xylosum*; iv) 2 das 35 estirpes não inibem o crescimento de *E. coli*, designadamente PO5- 8 (*L. curvatus*) e PO5- 77 (*L. curvatus*); v) 13 estirpes (36,11%), apresentam halos com dimensões $\geq 15,0$ mm contra EA5, 10 estirpes (27,78%) contra *L. monocytogenes*, 16 estirpes (44,44%) contra *S. aureus*, 12 estirpes (34,29 %) contra *S. xylosum* e 8 estirpes (22,9%) contra *E. coli*; vi) a estirpe PO5- 67 (*L. plantarum*) é a única que apresenta zonas de inibição $\geq 15,0$ mm contra todos os agentes patogênicos e coabitantes.

Tabela 12: Dimensão das zonas de inibição formadas pelas estirpes de *Lactobacillus* quando cultivadas na presença de outros agentes: EA5 (estirpe indicadora), *L. monocytogenes* 4A CECT 934, *S. aureus* ATCC 29213, *S. xylosum* CIP 81.66 e *E. coli* CCUG 42744.

ESPÉCIES	ESTIRPES	EA5	<i>L. monocytogenes</i> 4A CEC T934	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. xylosum</i> CIP 81.66	<i>E. coli</i> CCUG 42744
<i>L. plantarum</i>	PO5- 4	20,5	15,5	18,0	10,0	12,0
	PO5- 5	0,0	9,5	9,5	7,5	16,5
	PO5- 15	15,0	13,5	20,0	15,0	14,5
	PO5- 27	17,0	16,0	30,0	15,5	14,0
	PO5- 28	15,0	13,5	24,0	19,5	12,5
	PO5- 29	16,5	14,5	30,0	19,0	12,0
	PO5- 34	12,0	15,0	9,5	17,5	12,5
	PO5- 35	11,0	13,5	8,0	11,5	15,0
	PO5- 38	14,5	13,5	26,0	15,5	14,0
	PO5- 39	10,5	11,0	11,5	14,5	10,5
	PO5- 42	10,5	9,5	9,0	9,0	10,5
	PO5- 45	11,0	15,5	30,0	14,5	12,5
	PO5- 46	16,0	12,5	30,0	14,5	10,5
	PO5- 50	19,0	16,0	17,0	14,5	20,0
	PO5- 51	16,5	13,5	27,0	18,0	10,5
	PO5- 54	12,5	17,5	13,0	14,0	22,0
	PO5- 56	0,0	10,5	10,5	15,5	11,5
	PO5- 57	9,5	15,5	30,0	15,5	12,5
	PO5- 60	8,5	18,0	16,5	16,5	22,0
	PO5- 62	0,0	10,5	13,0	14,5	17,5
PO5- 67	18,0	16,5	25,0	19,0	15,0	
PO5- 89	9,0	8,0	12,5	9,5	13,5	
PO5- 102	6,0	10,5	7,0	12,5	12,5	
<i>L. curvatus</i>	PO5- 8	9,0	13,5	19,0	8,5	0,0
	PO5- 40	13,0	10,5	9,5	10,5	5,0
	PO5- 77	13,0	13,5	10,5	11,5	0,0
	PO5- 107	7,0	7,0	5,0	4,5	6,5
	PO5- 108	22,0	17,0	17,0	13,0	11,5
	PO5- 119	16,5	14,5	15,5	15,0	19,5
<i>L. sakei</i>	PO5- 85	7,5	6,5	8,5	6,5	7,5
	PO5- 95	10,5	8,5	10,0	14,4	12,5
	PO6- 13	15,0	11,5	9,5	9,0	11,0
	PO6- 14	13,5	7,5	6,0	11,0	6,0
	PO6- 23	15,5	9,5	11,5	14,5	8,5
	PO6- 44	11,0	10,5	6,5	11,5	5,0
	PO6- 100	13,0	9,5	9,5	12,5	6,0

4.2.4. Quantificação da actividade bacteriocinogénica das estirpes

A Tabela 13 apresenta a capacidade inibitória demonstrada pelas estirpes em estudo que formaram zonas de inibição $\geq 15,0$ mm, no Método de Skalka modificado. Esta capacidade foi demonstrada por formação de zona de inibição transparente no local de inoculação em placa MRS 1,5% agar de uma gota de 10 μ l de sobrenadante concentrado e neutralizado, impedindo o crescimento da estirpe indicadora EA5. Das 13 estirpes, 2 pertencentes às espécies *L. plantarum*, apresentaram capacidade formação de zona de inibição nas condições do estudo.

Os resultados apresentados na Tabela 13 decorrentes da aplicação do *Agar Spot Test* e do *Critical Dilution Method* às estirpes seleccionadas (*L. plantarum* (9); *L. curvatus* (2); *L. sakei* (2)), que formaram zonas de inibição $\geq 15,0$ mm, no Método de Skalka modificado, permitem quantificar as substâncias bacteriocinogénicas produzidas. De todas as estirpes apenas PO5-15 (*L. plantarum*) e PO5-51 (*L. plantarum*) produziram substâncias bacteriocinogénicas com capacidade inibitória de, respectivamente, 100 UA/ml e 200 UA/ml.

Tabela 13: Actividade bacteriocinogénica de diferentes estirpes de *L. plantarum*, *L. curvatus* e *L. sakei* (em Unidades Arbitrárias por mililitro).

ESPÉCIE	ESTIRPES COM ZONAS DE INIBIÇÃO $\geq 15,0$ mm	ACTIVIDADE BACTERIOCINOGÉNICA			
		100 UA/ml	200 UA/ml	400 UA/ml	800 UA/ml
<i>L. plantarum</i>	PO5- 4	-	-	-	-
	PO5- 15	+	-	-	-
	PO5- 27	-	-	-	-
	PO5- 28	-	-	-	-
	PO5- 29	-	-	-	-
	PO5- 46	-	-	-	-
	PO5- 50	-	-	-	-
	PO5- 51	+	+	-	-
	PO5- 67	-	-	-	-
<i>L. curvatus</i>	PO5- 108	-	-	-	-
	PO5- 119	-	-	-	-
<i>L. sakei</i>	PO6- 13	-	-	-	-
	PO6- 23	-	-	-	-

4.2.5. Capacidade de acidificação do meio envolvente

De todas as espécies de *Lactobacillus* foram seleccionadas as estirpes (3 *L. plantarum*, 1 *L. curvatus* e 1 *L. sakei*) com as maiores zonas de inibição contra a estirpe indicadora EA5, tendo-se determinado a média do pH das suspensões após 24h de crescimento da cultura a 30°C. Na Tabela 14, os resultados demonstram que a estirpe PO5-108 que originou o maior halo de inibição (22,0 mm) apresenta um pH final mais elevado do que as estirpes PO5-4, PO5-50 e PO5-67, sugerindo que a sua capacidade inibitória não está apenas relacionada com a produção de ácidos mas também com a presença de outros compostos com actividade bacteriocinogénica.

Tabela 14: Valor de pH do meio de cultura apresentado por estirpes que apresentaram maiores zonas de inibição contra EA5, após 24h de cultivo a 30°C.

ESPÉCIES	ESTIRPES	DIMENSÃO DA ZONA DE INIBIÇÃO CONTRA EA5	pH (24h, 30°C)
<i>L. plantarum</i>	PO5- 4	20,5	5,96
	PO5- 50	19,0	5,95
	PO5- 67	18,8	5,88
<i>L. curvatus</i>	PO5- 108	22,0	6,01
<i>L. sakei</i>	PO6- 23	15,5	6,05

4.2.6. Tolerância a pH baixo das estirpes com actividade bacteriocinogénica

A Tabela 15 resume os resultados das contagens de colónias obtidas das diferentes estirpes *L. plantarum*, *L. curvatus* e *L. sakei*, quando submetidas a um meio de pH 3,0, durante 3 horas. Observou-se uma redução das contagens ao longo do tempo para todas as estirpes, contudo estas ainda demonstraram capacidade de crescimento após 3 horas no meio ácido. Assim sendo, e após análise de outros factores envolvidos na digestão dos alimentos, estas estirpes poderão ser candidatas a probióticos, uma vez que demonstraram neste teste preliminar tolerância a um meio com pH 3. Este facto é também sugestivo da sua boa capacidade de sobrevivência aos processos fermentativos envolvidos na produção de alimentos, nomeadamente produtos cárneos tradicionais portugueses cujo pH é sempre superior a 3,0.

Tabela 15: Contagem das colónias (UFC/ ml) das estirpes que apresentaram maiores zonas de inibição contra EA5, que resistiram em meio com pH 3 durante 3 horas.

ESPÉCIE	ESTIRPES	CONTAGEM DAS COLÓNIAS (UFC/ ml) AO LONGO DO TEMPO			
		0h	1h	2h	3h
<i>L. plantarum</i>	PO5- 4	$3,9 \times 10^{10}$	$4,0 \times 10^7$	$1,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$
	PO5- 50	$1,6 \times 10^9$	$1,3 \times 10^6$	$2,7 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$
	PO5- 67	$7,7 \times 10^9$	$2,3 \times 10^7$	$3,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$
<i>L. curvatus</i>	PO5- 108	$7,3 \times 10^{11}$	$2,3 \times 10^7$	$1,7 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$
<i>L. sakei</i>	PO6- 23	$9,9 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^6$	$3,1 \times 10^4$	$2,5 \times 10^2$

4.2.7. Tolerância aos sais biliares das estirpes com actividade bacteriocinogénica

Os resultados da tolerância à presença de sais biliares na proporção de 1% (w/v) para as estirpes seleccionadas (3 *L. plantarum*, 1 *L. curvatus* e 1 *L. sakei*), avaliada às 0h, 18h e 24h, podem ser observados na Tabela 16.

O crescimento em meio MRS sem Oxgall foi acentuado para todas as estirpes, observando-se DO_{600nm} do meio que variaram entre 1,568 e 2,702. Quando o meio foi adicionado de Oxgall, estas estirpes demonstraram uma boa capacidade de resistência à presença deste composto mesmo após 24h ($0,195 \leq DO_{600nm} \leq 2,628$). As estirpes PO5- 4, PO5- 50 e PO5- 67 (*L. plantarum*) e PO5- 108 (*L. curvatus*) apresentaram um aumento de população ao longo do tempo. A estirpe PO6- 23, nestas condições, apresentou uma ligeira quebra no crescimento às 18h de incubação, tendo atingido, às 24h uma contagem de $1,4 \times 10^6$ UFC/ml.

A estirpe PO5- 4 (*L. plantarum*) foi aquela que apresentou valores de DO_{600 nm} mais elevados em todos os momentos, demonstrando ser a que melhor se adaptou à presença de sais biliares (Oxgall) no meio.

Com base nestes resultados, estas estirpes podem ser consideradas candidatas a agentes probióticos, visto crescerem na presença de sais biliares.

Tabela 16: Resistência das estirpes seleccionadas à presença de Oxgall (resultados expressos em DO_{600 nm} e em UFC/ ml às 0h, 18h e 24h de cultivo.

ESPÉCIES	ESTIRPES	0h			18h			24h		
		DO Oxgall	DO MRS	UFC/ml Oxgall	DO Oxgall	DO MRS	UFC/ml Oxgall	DO Oxgall	DO MRS	UFC/ml Oxgall
<i>L. plantarum</i>	PO5- 4	0,109	0,104	1,6 x 10 ⁸	2,335	2,572	9,5 x 10 ⁹	2,628	2,702	1,5 x 10 ¹⁰
	PO5- 50	0,099	0,090	1,9 x 10 ⁸	2,163	2,515	1,4 x 10 ¹⁰	2,592	2,662	2,8 x 10 ¹⁰
	PO5- 67	0,113	0,114	3,3 x 10 ⁷	1,990	2,455	1,6 x 10 ⁹	2,444	2,604	1,8 x 10 ⁹
<i>L. curvatus</i>	PO5- 108	0,112	0,090	5,3 x 10 ⁸	1,970	2,481	8,8 x 10 ⁹	2,007	2,660	8,4 x 10 ¹⁰
<i>L. sakei</i>	PO6- 23	0,046	0,045	2,2 x 10 ⁶	0,041	1,545	3,2 x 10 ⁵	0,195	1,679	1,4 x 10 ⁶

4.2.8. Crescimento a diferentes temperaturas das estirpes com actividade bacteriocinogénica

Na Tabela 17 pode observar-se que todas as estirpes estudadas, nestas condições de ensaio, apresentam um melhor crescimento quando incubadas a 30°C, com excepção da estirpe PO5- 28.

Todas as estirpes se desenvolveram a 10°C e toleraram uma temperatura de 44,5°C, embora com valores de DO_{600nm} inferiores aos apresentados a 25°C e a 30°C.

Estes resultados sugerem que as estirpes estudadas poderiam ser utilizadas no fabrico de produtos alimentares sujeitos a temperaturas entre 10°C e 44,5°C, sem que a temperatura seja um factor limitante da sua actividade.

Tabela 17: Densidade óptica (600 nm) dos meios de cultura das estirpes de *Lactobacillus* que formaram zonas de inibição ≥15 mm no Método de Skalka modificado, após 24h a diferentes temperaturas (10°C, 25°C, 30°C e 44,5°C).

ESPÉCIES	ESTIRPES	DO _{600nm} DOS MEIOS DE CULTURA APÓS 24H A DIFERENTES TEMPERATURAS			
		10°C	25°C	30°C	44,5°C
<i>L. plantarum</i>	PO5- 4	0,340	0,446	2,012	0,369
	PO5- 15	0,294	0,908	1,755	0,310
	PO5- 27	0,388	1,849	2,308	0,386
	PO5- 28	0,293	0,294	0,204	0,238
	PO5- 29	0,498	0,460	2,298	0,555
	PO5- 46	0,434	0,629	2,022	0,268
	PO5- 50	0,265	0,310	1,975	0,189
	PO5- 51	0,451	1,250	1,798	0,327
	PO5- 67	0,280	0,532	1,915	0,354
<i>L. curvatus</i>	PO5- 108	0,385	0,302	1,878	0,336
	PO5- 119	0,354	0,982	1,935	0,401
<i>L. sakei</i>	PO6- 13	0,000	0,003	0,109	0,015
	PO6- 23	0,290	0,253	0,411	0,184

4.2.9. Diferenciação de estirpes pelas suas características fenotípicas e genotípicas

A diferenciação das estirpes que apresentaram grau de semelhança superior a 90% pela análise de *clusters* do perfil genético obtido pela metodologia PCR *Fingerprinting*, tornou-se possível quando se caracterizaram: i) a origem das estirpes; ii) as suas sensibilidades a antibióticos; e iii) as respectivas capacidades bacteriocinogénicas.

No conjunto das estirpes *L. plantarum* estudadas, verificou-se que existiam 4 subgrupos com grau de semelhança superior a 90%, tal como ilustrado na Tabela 18.

No subgrupo I, a estirpe PO5- 51 apresentou resistência a cloranfenicol (30 mg) e PO5- 57 teve sensibilidade ao mesmo antibiótico; por outro lado, as outras estirpes deste subgrupo demonstraram sensibilidade intermédia. As estirpes PO5- 45 e PO5- 57, quando avaliadas na sua actividade bacteriocinogénica contra EA5, apresentaram halos de inibição inferiores a 15 mm, verificando-se que para as restantes este valor foi ≥ 15 mm. As estirpes PO5- 46 e PO5- 51, avaliadas contra *L. monocytogenes* 4A CECT 934 formaram halos de inibição inferiores a 15 mm. Apesar da semelhança genética detectada entre estas estirpes ser de 92,4%, as características referidas sugerem que pode tratar-se de estirpes diferentes.

No subgrupo II, as estirpes *L. plantarum* PO5- 15 e PO5- 38 que tinham grau de semelhança de 95,9%, apesar de provirem de origens diferentes (superfície de uma enchedora e produto acabado- chouriço, respectivamente), apresentaram todos os resultados semelhantes, logo é possível que seja a mesma estirpe que se encontre disseminada no ambiente fabril e contamine a massa do produto ou vice-versa.

Quando observamos o subgrupo III, a estirpe PO5- 39 apresentou sensibilidade a cloranfenicol (30 mg) e sensibilidade intermédia a eritromicina (15 mg), distinguindo-se das restantes estirpes; a PO5- 35 foi sensível a cloranfenicol (30 mg) e teve capacidade bacteriocinogénica contra *E. coli* CCUG 42744, produzindo um halo ≥ 15 mm; a estirpe PO5- 34 apresentou sensibilidade intermédia a cloranfenicol (30 mg) e a eritromicina (15 mg) e demonstrou capacidade de formação de zonas de inibição ≥ 15 mm contra *L. monocytogenes* 4A CECT 934 e *S. xylosus* CIP 81.66. Os resultados sugerem que são estirpes diferentes, apesar da origem comum e de um grau de semelhança genética de 97,3%.

As estirpes PO5- 5 e PO5- 54, do subgrupo IV, tinham origens diferentes (mesa e produto acabado) e demonstraram semelhança genética de 95,1%. A estirpe PO5- 5 apresentou sensibilidade a vancomicina (30 mg), rifampicina (30 mg), clindamicina (10 mg) e gentamicina (10 mg), enquanto que a estirpe PO5- 54 apresentou resistência ou sensibilidade intermédia a estes antibióticos. O *L. plantarum* PO5- 5 não formou zona de inibição contra a estirpe sensível EA5, contrariamente a PO5- 54, cujo halo de inibição formado foi de 12,5mm. Assim, estes resultados sugerem que as estirpes em causa são distintas.

Tabela 18: Subgrupos de estirpes *L. plantarum* com grau de semelhança superior a 90%, pela análise de *clusters*, origens e caracterização fenotípica.

SUBGRUPO	ESTIRPE	ORIGEM	TESTES DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS										MÉTODO DE SKALKA MODIFICADO				
			C 30	S 10	VA 30	K 30	RA 30	CC 10	AMP 10	GM 10	E 15	EA5	<i>L. monocytogenes</i> 4A CECT 934	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. xyloso</i> CIP 81.66	<i>E. coli</i> CCUG 42744	
I	PO5- 45	Produto acabado	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	11	15,5	30	14,5	12,5
	PO5- 46	Produto acabado	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	16	12,5	30	14,5	10,5
	PO5- 27	Produto acabado	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	17	16	30	15,5	14
	PO5- 51	Produto acabado	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	16,5	13,5	27	18	10,5
	PO5- 57	Produto acabado	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	9,5	15,5	30,0	15,5	12,5
II	PO5- 15	Enchedora	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	15	13,5	20	15	14,5
	PO5- 38	Produto acabado	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	14,5	13,5	26	15,5	14
III	PO5- 34	Massa após enchimento	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	12	15	9,5	17,5	12,5
	PO5- 35	Massa após enchimento	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	11	13,5	8	11,5	15
	PO5- 39	Massa após enchimento	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	10,5	11	11,5	14,5	10,5
IV	PO5- 5	Mesa	I	R	S	I	S	S	S	R	I	0	9,5	9,5	7,5	16,5	
	PO5- 54	Produto acabado	I	R	R	R	I	R	R	R	R	I	12,5	17,5	13	14	22

A Tabela 19 representa as estirpes de *L. curvatus* pertencentes ao subgrupo I, com grau de semelhança genética de 93,6%. A estirpe PO5- 77, isolada de uma faca, demonstrou sensibilidade a rifampicina (30 mg) e sensibilidade intermédia a cloranfenicol (30 mg), clindamicina (10 mg) e eritromicina (15 mg); esta estirpe não formou halo de inibição contra *E. coli* CCUG 42744, no entanto demonstrou ser capaz de inibir *S. aureus* ATCC29213 (halo ≥ 15 mm). A estirpe PO5- 8 apresentou sensibilidade a cloranfenicol (30 mg) e rifampicina (30 mg) e sensibilidade intermédia a clindamicina (10 mg) e eritromicina (15 mg); não formou halo de inibição contra *E. coli* CCUG 42744, mas inibiu o crescimento de *S. aureus* ATCC 29213 (halo ≥ 15 mm); PO5- 108, isolada a partir de produto acabado (chouriço) apresentou sensibilidade a cloranfenicol (30 mg) e resistência em relação a todos os outros antibióticos; a capacidade inibitória demonstrada contra as estirpes EA5, *L. monocytogenes* 4A CECT 934 e *S. aureus* foi superior relativamente aos outros elementos do subgrupo; a estirpe PO5- 119, apesar de ter a mesma origem de PO5- 8 (mesa), apresentou resistência a estreptomicina (10 mg), vancomicina (30 mg), kanamicina (30 mg), ampicilina (10 mg) e gentamicina (10 mg); esta estirpe *L. curvatus* registou o maior halo de inibição contra *E. coli* CCUG 42744. Os dados sugerem que todas as estirpes são diferentes entre si.

Tabela 19: Subgrupos de estirpes *L. curvatus* com grau de semelhança superior a 90%, pela análise de *clusters*, origens e caracterização fenotípica.

SUBGRUPO	ESTIRPE	ORIGEM	TESTES SENSIBILIDADE ANTIBIÓTICOS										MÉTODO DE SKALKA MODIFICADO				
			C 30	S 10	VA 30	K 30	RA 30	CC 10	AMP 10	GM 10	E 15	EA5	<i>L. monocytogenes</i> 4A CECT 934	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. xyloso</i> CIP 81.66	<i>E. coli</i> CCUG 42744	
I	PO5- 77	Faca	I	R	R	R	S	I	R	R	R	I	13,0	13,5	10,5	11,5	0,0
	PO5- 108	Produto acabado	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	22,0	17,0	17,0	13,0	11,5
	PO5- 119	Mesa	I	R	R	R	I	I	R	R	R	I	16,5	14,5	15,5	15,0	19,5
	PO5- 8	Mesa	S	R	R	R	S	I	R	R	R	I	9,0	13,5	19,0	8,5	0,0

As características das estirpes de *L. sakei*, formando dois subgrupos com um grau de semelhança superior a 90% encontram-se resumidas na Tabela 20.

No subgrupo I, todas as estirpes tinham a mesma origem (produto acabado- chouriço) e um grau de semelhança genética de 96,5%. A totalidade das estirpes apresentou resistência a todos os antibióticos testados; PO6- 23 apresentou contra EA5 um halo de inibição ≥ 15 mm, contrariamente às restantes. Sendo todas as características analisadas semelhantes, considera-se que pode tratar-se da mesma estirpe.

As estirpes PO6- 14 e PO6- 44, ambas com origem em produto acabado (chouriço), compõem o subgrupo II, tendo um grau de semelhança genética de 94,6%. PO6- 44 demonstrou sensibilidade a cloranfenicol (30 mg), enquanto que PO6- 14 apresentou resistência a todos os antibióticos. Apesar desta diferença, todas as outras características são semelhantes, sugerindo que podem ser a mesma estirpe.

No subgrupo III, a origem das estirpes era diferente. A estirpe *L. sakei* PO5- 95 demonstrou sensibilidade a cloranfenicol (30 mg), enquanto que PO5- 85 apresentou uma sensibilidade intermédia a este antibiótico. Considerando que o grau de semelhança genética era 95,5% e as restantes características eram semelhantes, estas estirpes PO5- 85 e PO5- 95 podem ser a mesma, aceitando que houve contaminação do produto acabado a partir da tripa.

Tabela 20: Subgrupos de estirpes *L. sakei* com grau de semelhança superior a 90%, pela análise de *clusters*, origens e caracterização fenotípica.

SUBGRUPO	ESTIRPE	ORIGEM	TESTES SENSIBILIDADE ANTIBIÓTICOS										MÉTODO DE SKALKA MODIFICADO				
			C 30	S 10	VA 30	K 30	RA 30	CC 10	AMP 10	GM 10	E 15	EA5	<i>L. monocytogenes</i> 4A CECT 934	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. xyloosus</i> CIP 81.66	<i>E. coli</i> CCUG 42744	
I	PO6- 23	Produto acabado	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	15,5	9,5	11,5	14,5	8,5
	PO6- 100	Produto acabado	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	13,0	9,5	9,5	12,5	6,0
	PO6- 13	Produto acabado	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	13,0	9,5	9,5	12,5	6,0
II	PO6- 14	Produto acabado	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	13,5	7,5	6,0	11,0	6,0
	PO6- 44	Produto acabado	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	11,0	10,5	6,5	11,5	5,0
III	PO5- 85	Tripa	I	R	R	R	S	S	R	R	I	7,5	6,5	8,5	6,5	7,5	
	PO5- 95	Produto acabado	S	R	R	R	S	S	R	R	I	10,5	8,5	10,0	14,4	12,5	

5. Discussão

As estirpes estudadas, isoladas a partir de amostras (superfícies de trabalho e produto cárneo fermentado- chouriço) colhidas em duas unidades de fabrico de produtos de salsicharia tradicional situadas no Alentejo (A e B), pertenciam ao género *Lactobacilli* e às espécies *L. plantarum*, *L. curvatus* e *L. sakei*. Foi efectuada uma prévia identificação bioquímica das estirpes por API 50CHL (bioMérieux S.A., França) no entanto as metodologias genéticas PCR e PCR *Fingerprinting* foram fundamentais para a identificação definitiva das mesmas e serviram de base para os posteriores testes de caracterização fenotípica realizados. A fiabilidade nos métodos bioquímicos deixa algumas reticências, uma vez que se constatou que os resultados nem sempre coincidiam com os genéticos. A mesma conclusão foi reportada por Pennacchia *et al.* (2004) num trabalho realizado com 28

estirpes de *Lactobacillus*, em que os resultados fenotípicos e moleculares coincidiram na identificação de *L. brevis*, mas discordaram na identificação de *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. paracasei*, *L. fermentum* e *L. curvatus*; nesse estudo, a identificação genética permitiu em algumas situações ligar a estirpe à espécie mas não facultou a identificação até à subespécie.

No trabalho desenvolvido por Chagnaud *et al.* (2001), os autores concluíram que a metodologia PCR usando 2 *primers* apresentou maior capacidade de discriminação entre 6 espécies de *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*, *L. paracasei* e *L. casei*) que o teste API 50CHL, tendo sido recomendada a sua aplicação na análise de microflora complexa, com baixa probabilidade de surgirem resultados falsos positivos.

Tal como defendem Pennachia *et al.* (2004) as dificuldades na identificação correcta das estirpes de *Lactobacillus* por métodos bioquímicos e a crescente importância da sua aplicação devido às suas propriedades benéficas, exigem a utilização de metodologias genéticas simples e céleres, de modo a evitar a selecção errónea de estirpes indesejadas para fins tecnológicos e probióticos.

No presente trabalho foram efectuados testes de identificação bioquímicos e genéticos a 55 estirpes de *Lactobacillus*, tendo sido detectada a presença de 23 estirpes *L. plantarum*, 7 estirpes *L. sakei* e 6 estirpes *L. curvatus*. O estudo foi direccionado para estas espécies pelo facto de serem as mais usadas nos países mediterrâneos como culturas *starter* de enchidos fermentados e os microrganismos mais importantes nos processos caseiros de fermentação, onde a sua presença é indígena (Hugas, 1998).

A origem destes microrganismos pertencentes ao grupo das BAL pode ser: i) intencional, através da utilização de culturas *starter* nas massas, com os objectivos de facultar características organolépticas desejáveis e de aumentar a vida útil do produto final, graças às já referidas capacidades de conservação; ii) não intencional, provindo da sua presença na carne fresca ou de contaminações cruzadas.

As BAL fazem parte da microflora inicial da carne fresca e têm capacidade de desenvolvimento após a preparação de produtos cárneos, sejam produtos fermentados, refrigerados, embalados a vácuo ou em atmosfera modificada. De modo geral, as alterações provocadas pela fermentação não são prejudiciais para os produtos, dada a capacidade tampão da carne e a baixa percentagem de hidratos de carbono que contém. As estirpes consideradas naturais na carne e nos produtos cárneos são: *Carnobacterium piscicola*, *C. divergens*, *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. gelidum* e *L. carnosum* (Hugas, 1998).

A presença de *Lactobacillus* nos produtos cárneos, quando não intencional, pode ocorrer ainda por contaminação fecal. *L. plantarum* e *L. paracasei* são as espécies do género *Lactobacilli* mais frequentemente isoladas em amostras de mucosa oral e rectal de humanos

saudáveis, sendo as mesmas consideradas probióticas (Ahrné *et al.*, 1998; Ouwehand *et al.*, 2002; citados por Pennacchia *et al.*, 2004).

Quer a presença natural nas carnes frescas, quer a contaminação fecal podem explicar o grande número de isolados de *L. plantarum* detectados no presente estudo (63,89% de *L. plantarum* em 36 estirpes identificadas).

Nos Testes de Sensibilidade a Antibióticos (TSA), as estirpes estudadas apresentaram resistência perante a maioria dos antibióticos testados, independentemente da espécie. A totalidade das estirpes (100%) demonstrou ser resistente a estreptomicina (10 mg) e gentamicina (10 mg); 97,22% apresentaram resistência a vancomicina (30 mg), kanamicina (30 mg) e ampicilina (10 mg); 69,44% eram resistentes a rifampicina (30 mg); e 63,89% eram resistentes a clindamicina. A maior sensibilidade verificou-se para cloranfenicol (30 mg) com 25,00%, seguida de rifampicina (30 mg) com 16,67%. Entre as estirpes de *L. plantarum*, 78,26% eram resistentes aos antibióticos testados, 16,91% apresentaram sensibilidade intermédia e 4,83% sensibilidade; para o caso das estirpes de *L. curvatus*, 70,37% manifestaram resistência, 22,22% sensibilidade intermédia e 7,41% sensibilidade; entre as estirpes de *L. sakei*, 85,71% apresentaram resistência, 4,76% sensibilidade intermédia e 9,52% sensibilidade aos antibióticos testados.

Salminen *et al.* (2006) chegaram a conclusões divergentes dos resultados obtidos neste trabalho, num estudo com 86 estirpes de *Lactobacillus* de 11 espécies diferentes, isolados a partir de sangue humano, de pacientes do Hospital Universitário Central de Helsinquia (Helsinki, Finlândia). Estes autores referiram que a sensibilidade a antibióticos manifestada pelo género *Lactobacilli* parecia depender da espécie e que as cefalosporinas não constituíam um tratamento adequado para bacteriémia causada por *Lactobacillus*, uma vez que as resistências a este grupo de antibióticos eram elevadas.

Dhillon *et al.* (2007), verificaram que a estirpe *L. plantarum* Ch1 isolada em Molhos Indianos (*Indian Green Sauces*) apresentou susceptibilidade a amicacina, eritromicina, cefotaxime e ceftriaxome e resistência a penicilina G, ampicilina, vancomicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, tetraciclina e gentamicina.

Outros estudos indicam que as BAL são resistentes aos principais antibióticos, designadamente penicilina G, ampicilina, vancomicina, cloranfenicol e ciprofloxacina (Halami *et al.*, 2000; Coppola *et al.*, 2005).

Strompfová e Lauková (2004), concluíram que 47 estirpes de *Lactobacillus* isoladas de fezes de cães saudáveis apresentaram resistências a 6 dos 8 antibióticos testados, isto é, penicilina G, lincomicina, novobiocina, eritromicina, tetraciclina e vancomicina; ampicilina e cloranfenicol demonstraram total capacidade inibitória do seu desenvolvimento; contrariamente, no presente trabalho, apenas 68,57% das estirpes demonstraram sensibilidade a cloranfenicol e 2,90% a ampicilina. Segundo Strompfová e Lauková (2004), apenas 6,4% das estirpes de *Lactobacillus* apresentaram resistência à vancomicina (*L.*

rhamosus, *L. casei* e *L. paracasei*) e a resistência ao grupo das penicilinas era de 54,6%, possivelmente pela larga utilização destes produtos nas terapêuticas instituídas na medicina veterinária. No presente trabalho, a resistência a vancomicina atingiu 97,14% das estirpes. Este valor contraria os resultados de Stropfová e Lauková (2004). Contudo, Salminen *et al.* (2006), reportaram que a resistência à vancomicina é uma propriedade intrínseca do género *Lactobacilli*, o que é corroborado pelos resultados obtidos neste trabalho, em que a maioria das estirpes foi resistente à vancomicina, existindo apenas 2,78% (n=1) com sensibilidade a este antibiótico.

O uso de antibióticos é considerado o factor determinante no aparecimento, selecção e disseminação de microrganismos resistentes, tanto em animais como em humanos. No entanto, outros factores podem estar implicados, designadamente stress ambiental, idade, sobrepovoamento e manejo dos animais (Sorum & Sunde, 2001).

A endocardite é uma das mais sérias infecções provocadas por *Enterococcus* em humanos. A elevada resistência à gentamicina apresentada por estes microrganismos, fez com que a vancomicina passasse a ser o antibiótico de eleição no combate a esta doença. No entanto, foram reportados casos de pacientes hospitalizados com resistência a vancomicina, com origens em produtos cárneos e no ambiente (Ribeiro, Abrantes, Lopes & Crespo, 2007). O número elevado de resistências a vancomicina obtido no presente estudo permite levantar a questão da actual eficácia da vancomicina no tratamento de doenças graves, tais como a endocardite causada por *Enterococcus* e da possibilidade de transferência dessa resistência a partir de microrganismos resistentes, tais como os *Lactobacillus*.

Com base nos resultados obtidos nos TSA para as estirpes de *Lactobacilli* em estudo, podemos concluir que a maioria são bons candidatos a agentes probióticos, a utilizar em situações de reconstituição da flora intestinal, dada a ausência de susceptibilidade à generalidade dos antibióticos usados. Contudo, o perigo de transferência dos genes de resistência a antibióticos para agentes patogénicos, no sistema gastrointestinal, coloca grandes limitações ao uso de microrganismos resistentes (Barton & Hart, 2001), sendo obrigatória a realização de estudos adicionais.

É efectiva a necessidade de redução da resistência a antibióticos para os microrganismos em geral. A estratégia dos 3 Rs poderia ser aplicada com êxito para obter este objectivo: redução (*Reduction*), restrição (*Refinement*) e substituição (*Replacement*). Reduzir o uso de antibióticos através do diagnóstico laboratorial da causa de doença antes da administração de medicamentos, da monitorização da resistência dos agentes implicados a antibióticos, da restrição dos tratamentos ao tempo estritamente necessário e da administração de doses ajustadas; restringir a administração de antibióticos exclusivamente aos animais e pessoas afectados; reduzir a utilização de antibióticos na produção animal através da melhoria das condições de higiene e de manejo, do uso de vacinas, da manipulação das dietas e da

exclusão competitiva dos agentes patogénicos através do uso de organismos probióticos (Barton & Hart, 2001).

Os resultados obtidos no Método de Skalka modificado, avaliando a capacidade inibitória das estirpes em estudo, sugerem que determinadas estirpes produzem substâncias que inibem o crescimento de EA5 e/ou *Staphylococcus xylosus* e/ou *E. coli* e/ou *Staphylococcus aureus* e/ou *Listeria monocytogenes*, que podem ser substâncias inibitórias, tais como ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono, etanol, peróxido de hidrogénio, diacetilo ou bacteriocinas (Patarata, 2002).

Entre as estirpes produtoras de maiores zonas de inibição contra a estirpe sensível, 2 estirpes de *L. plantarum* (PO5-15, PO5-51) demonstraram capacidade inibitória contra EA5 no *Agar Spot Test*, após retirada das células por centrifugação, concentração por liofilização e neutralização a pH 7. A aplicação de um método de determinação quantitativa da produção de substâncias com actividade bacteriocinogénica, permitiu observar que a estirpe PO5-15 produz substâncias bacteriocinogénicas com actividade inibitória de 100 UA/ ml e a estirpe PO5- 51 de 200 UA/ ml, nas referidas condições de estudo. Este resultado torna estas estirpes fortes candidatas a produtoras de bacteriocinas, tendo que ser realizados outro tipo de testes específicos para identificação e caracterização dessas substâncias com capacidades inibitórias, designadamente: i) determinação do peso molecular; ii) aquecimento para avaliação da estabilidade ao calor, o que indica que sua estrutura proteica não é complexa; iii) ajuste do pH para eliminação da actividade dos ácidos e adição de catalase para eliminação do efeito do peróxido de hirogénio, mantendo assim mesmo a actividade inibitória (Mataragas, Metaxopoulos & Drosinos, 2002); iv) adição de enzimas proteolíticas de modo a verificar a sua estabilidade (Schillinger & Lucke, 1989), avaliação da sua acção contra estirpes patogénicas e, finalmente, identificação da bacteriocina por metodologia PCR (Mareková, Lauková, De Vuyst, Skaugen & Nes, 2003).

Em 2007, foi avaliada por Albano *et al.*, a actividade inibitória de 226 estirpes de BAL isoladas de Alheiras contra os seguintes agentes: *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. coli* O:157 (VT-ve), *E. fecalis*, *S. typhimurium* e *S. enteritidis*. Deste estudo concluiu-se que entre elas, 14 estirpes demonstraram actividade contra *L. innocua* e *L. monocytogenes*; destas, 2 eram também activas contra *S. aureus* e *E. fecalis* e outras 2 apenas contra *S. aureus*.

A contaminação por *Listeria monocytogenes* é considerada o maior problema a nível microbiológico para a indústria de salsicharia, e, embora alguns aditivos como NaNO₂ sejam eficazes contra este agente ou contra outros microrganismos patogénicos, podem representar perigo químico, não sendo bem aceites pelos consumidores, o que leva a uma constante pesquisa de novos agentes para a conservação dos produtos (Cleveland, Montville, Nes & Chikindas, 2001, citado por Albano *et al.*, 2007). Segundo estes autores, os melhores candidatos a serem usados como agentes promotores da segurança dos enchidos

são as BAL isoladas nestes produtos e com capacidade antimicrobiana, uma vez que se encontram bem adaptadas ao ambiente, conseguindo ser mais competitivos que os provenientes de outras origens.

Embora os resultados da inibição efectiva de *L. monocytogenes* sejam promissores nos trabalhos desenvolvidos por Hugas, Garriga, Aymerich & Monfort (1993), a actividade bacteriocinogénica na carne pode ser mais reduzida do que em meio líquido, provavelmente devido a inactivação parcial por proteases, difusão limitada na matriz alimentar e a ligações inespecíficas a ingredientes, tais como a gordura. A selecção das estirpes a usar deve ser criteriosa, escolhendo-se as estirpes bem adaptadas ao meio e às condições de processamento do produto, tais como a temperatura e o pH (Leroy & De Vuyst, 1998).

Tal como defendido pelos autores acima referenciados, no presente trabalho foram estudadas as capacidades bacteriocinogénicas contra agentes patogénicos de estirpes isoladas directamente de enchidos e do ambiente fabril de produção destes produtos. As estirpes de *Lactobacillus* que demonstraram capacidade inibitória teriam de antemão vantagem competitiva, se usadas no fabrico de enchidos.

A inexistência de actividade bacteriocinogénica na maioria das estirpes estudadas e produtoras de zonas de inibição significativas (≥ 15 mm) pode dever-se à neutralização do sobrenadante da sua cultura a pH 7,0. Para além do efeito directo sobre os microrganismos, o pH pode ter relação também na síntese e acção das bacteriocinas, sendo mais favorável um pH baixo (meio ácido), por interferir na adsorção da bacteriocina à parede celular dos microrganismos sensíveis e na difusão deste composto no meio (Patarata, 2002). Por outro lado, a adsorção das bacteriocinas à parede celular através de interações iónicas ou hidrofóbicas, verificada a pH próximo da neutralidade, e a desadsorção a valores de pH baixos podem também explicar a ausência de comportamento inibitório apresentado na utilização do sobrenadante isento de células para testar a actividade bacteriocinogénica (De Vuyst, Callewaert & Crabbé, 1996).

Alguns autores sugerem que a produção de bacteriocinas é estimulada por condições desfavoráveis do meio ou por situações de stress, tais como baixas temperaturas, presença de flora competitiva, elevada pressão osmótica e presença de compostos químicos indesejados, tais como cloreto de sódio, etanol, oxigénio ou Tween 80. Este último composto desencadeou grande produção de amilovorina L471 quando presente no meio de cultura num trabalho realizado por De Vuyst *et al.* (1996). A explicação para este facto prende-se com a incapacidade de determinados microrganismos terem sucesso nas situações de competição apenas através da produção de ácidos (Parente & Ricciardi, 1994). Segundo De Vuyst e Vandamme (1992), os aspectos ambientais e nutricionais interferem significativamente na produção de bacteriocinas pelas BAL. Quando são adicionadas BAL aos alimentos, as características do produto podem também interferir com a síntese de bacteriocinas e/ ou com a sua actividade inibitória. A produção e a acção de bacteriocinas *in*

vitro não garantem a sua eficácia nos alimentos. Os produtos alimentares, e especificamente os produtos cárneos, são sistemas complexos, com vários factores que influenciam o crescimento microbiano e a produção de metabolitos. Do mesmo modo, a receita e as condições de fermentação e maturação devem ser tidas em consideração (Hugas, 1998). Por isso, os seus efeitos inibitórios deverão ser testados nos produtos e de acordo com as suas condições de processamento.

Existem diversos métodos de *screening* de bacteriocinas, no entanto são laboriosos, morosos e requerem a utilização de equipamentos caros. Além disso, em muitos casos, não se consegue concluir se a origem da actividade antimicrobiana é uma bacteriocina, a acção dos ácidos ou de outros compostos inibitórios ou o conjunto dos vários factores (Vesterlund, Paltta, Lauková, Karp & Ouwehand, 2004).

A maior parte das técnicas usadas para determinação da produção de bacteriocinas baseiam-se na quantificação da capacidade de inibição do crescimento de microrganismos sensíveis. Embora tenham sido descritas técnicas baseadas na emissão de ATP (Waites & Ogden, 1987, citado por Cabo, Murado, González & Pastoriza, 1999), e na aplicação do método ELISA (Falahee *et al.*, 1990; Suarez *et al.*, 1996; citados por Cabo *et al.*, 1999) as técnicas de inibição de crescimento são as mais usadas por várias razões, designadamente as económicas.

Quer a técnica de medição da turvação do meio de crescimento (Berridge & Barret, 1952; Reeves, 1965; Mortvedt & Nes, 1990; citados por Cabo *et al.*, 1999), quer a de medição das zonas de inibição em placas (Mocquot & Lefevre, 1956; Tramer & Fowler, 1964; citados por Cabo *et al.*, 1999; Skalka *et al.*, 1983), podem ser usadas para este fim. Contudo, foi descrito por Wolf e Gibbons (1996) que a medição das zonas de inibição em placa contra agentes sensíveis apresenta alguns inconvenientes, designadamente: i) a dificuldade de difusão das bacteriocinas no agar; ii) os factores a que o método está sujeito e que não são tidos em consideração, tais como o tempo de difusão específico do extracto e a densidade do agar usado. A redução da percentagem de agar nas placas de 1,50% para 0,75% provocou o aumento da sensibilidade em 21,00%, para as mesmas condições de incubação, segundo estes autores; iii) a subjectividade de interpretação dos métodos semi-quantitativos frequentemente usados, uma vez que as unidades de bacteriocina produzida são definidas como a menor concentração do péptido que produz uma zona de inibição “perceptível”. Após avaliação de diferentes critérios de quantificação das zonas de inibição em placa, consideraram que esta estratégia é inadequada para o fim pretendido devido à baixa capacidade de discriminação de médias e ao elevado grau de subjectividade, dado o alto grau de erro e baixa repetibilidade da mesma.

O estudo da curva de crescimento da estirpe produtora em meio de cultura líquido foi proposto por Cabo *et al.* (1999) como uma alternativa mais fiável, pelo facto de eliminar as

limitações relacionadas com a difusão em agar e permitir a medição mais objectiva dos resultados.

Segundo Vesterlund *et al.* (2003), o pH do meio, a concentração das substâncias inibitórias e a concentração da estirpe produtora, são, entre outros, factores que influenciam a sensibilidade dos métodos de avaliação da zona de inibição formada à volta da estirpe produtora. As metodologias baseadas na medição da turvação, citometria de fluxo, medição do ATP e a determinação da bioluminescência, são apresentados como métodos mais sensíveis e rápidos.

Schillinger e Lucke (1989), avaliaram a actividade inibitória de 221 estirpes de isolados de carne fresca, produtos fermentados de salsicharia e outros produtos cárneos. 19 de 142 estirpes de *L. sakei*, 3 de 4 estirpes de *L. plantarum* e 1 de 75 estirpes de *L. curvatus* apresentaram efeito inibitório em meio de agar sólido, sob condições em que se reduziram os efeitos dos ácidos orgânicos e do peróxido de hidrogénio. Apenas 6 das estirpes de *L. sakei* demonstraram actividade inibitória em meio líquido nas mesmas condições de teste. Estes resultados não coincidem com a teoria de Cabo *et al.* (1999), que defende maior capacidade inibitória das bacteriocinas em meio líquido.

A sakacina A produzida por *L. sakei* Lb706 apresentou características próprias de uma bacteriocina: estrutura proteica, termoestável, não activa contra outras bactérias Gram-negativas, mas com capacidade de inibição de espécies relacionadas com o produtor. Com excepção da inibição de *L. monocytogenes*, a actividade inibitória restringia-se a outras BAL. Isto pode ser explicado pela proximidade taxonómica da *L. monocytogenes* em relação ao género *Lactobacilli* (Wilkinson & Jones, 1977; Ruhland & Fiedler, 1987; Ludwig, Schleifer & Stackebrandt, 1984; citados por Schillinger & Lucke, 1989).

Quando se mantêm constantes os outros factores, a acção do pH pode influenciar o crescimento celular e a produção de bacteriocinas. A uma temperatura constante de 30°C, Leroy e De Vuyst (1999), verificaram que o maior crescimento celular de *L. sakei* CTC494 ocorria a pH entre 5,5 e 6,5 e o pH óptimo para produção de sakacina K era 5,0; a pH 5,5 a quantidade desta bacteriocina era baixa e a pH 4,5 não era detectável. A adsorção da bacteriocina às células é dependente do pH e não específica. Contudo, o estreito intervalo em que se verificou produção da bacteriocina sakacina K corresponde aos valores dos produtos fermentados de salsicharia, geralmente entre um valor inicial de pH 5,8 e um valor final de 4,8 (Leroy & De Vuyst, 1999).

A hipótese de que a quantidade de bacteriocina depende do crescimento celular foi confirmada experimentalmente por Leroy e De Vuyst (1999). A actividade bacteriocinogénica aumenta à medida que as células crescem exponencialmente e diminui quando a massa celular começa a reduzir. Esta redução ocorre quando o crescimento celular é inibido devido à acumulação de ácido láctico e escassez de açúcares e de aminoácidos essenciais (Loubière, Cocaing- Bousquet, Matos, Goma & Lindley, 1997).

Opostamente a estes resultados, a sakacina B, produtora de 256 UA/ml, manteve a sua estabilidade após exposição a pH entre 2,0 e 9,0, não apresentando qualquer redução da sua actividade (Samelis, Roller & Metaxopoulos, 1994).

As estirpes estudadas neste trabalho, demonstraram resistência a pH 3 e à presença de sais biliares a 1% (w/v), sobrevivendo a totalidade das estirpes a estas condições, embora verificando-se redução da sua actividade ao longo do tempo. A tolerância demonstrada pelas estirpes estudadas num meio com pH baixo também foi referenciada por Pennachia *et al.* (2004), num trabalho efectuado com 150 estirpes de *Lactobacillus*, em que 28 demonstraram crescimento em placa MRS após cultivo em meio PBS (tampão fosfato salino) a pH 2,5 durante 3 horas. Estes autores concluíram ainda que 19 das estirpes expostas previamente a pH 2,5 durante 3 horas conseguiam sobreviver em caldo MRS com sais biliares a 4% (w/v) e 8 estirpes demonstraram crescimento após 28 horas de cultivo em caldo MRS com sais biliares a 0,3%. Dhillon *et al.* (2007) referiram a viabilidade de *L. plantarum* Ch1 após 2h de incubação a pH 2,5, assim como após 24h em caldo MRS suplementado com 2% de *Oxgall*.

No estômago, o pH dos sucos gástricos é próximo de 0,9, aumentando para pH 3 na presença de alimentos (Erkkila & Petaja, 2000); a quantidade de sais biliares no intestino delgado é referida como sendo 0,3% (w/v) (Gilliland *et al.*, 1984). A conjugação das capacidades de tolerância a pH baixo e à presença de sais biliares são características chave para posteriores estudos das estirpes que as demonstrem, dado que são fundamentais para garantir a sobrevivência no processo de digestão quando procuramos estirpes probióticas.

Quando usadas como culturas *starter* em produtos fermentados, o pH do meio também deve ser tido em consideração, uma vez que vai interferir directamente com a sobrevivência e actividade das estirpes usadas com fins tecnológicos.

Os *Lactobacillus* gozam de grande importância na fermentação de produtos cárneos devido à sua capacidade de rápida acidificação, na presença de açúcares fermentescíveis, preservando os produtos e evitando o desenvolvimento de flora deteriorativa e patogénica, sem alterar as características intrínsecas do produto. Por este facto, são usados como culturas iniciadoras em produtos de salsicharia seca fermentada. A conjugação do potencial probiótico e da aptidão tecnológica tornam as estirpes de *Lactobacillus* possíveis culturas *starter* probióticas a usar em novos produtos fermentados secos (Pennachia *et al.*, 2004).

A temperatura é um factor a ter também em conta, quer no crescimento bacteriano, quer na produção e acção das substâncias bacteriocinogénicas.

No presente estudo, a DO₆₀₀ das estirpes foi avaliada ao fim de 24h de cultivo a pH constante e a diferentes temperaturas: 10°C, 25°C, 30°C e 44,5°C. Pode constatar-se que todas as estirpes demonstraram capacidade de crescimento às várias temperaturas, apesar de os valores de DO₆₀₀ das culturas incubadas a 30°C serem os mais elevados, seguidos das incubadas a 25°C. O interesse desta avaliação prende-se com o facto de estas estirpes

serem potenciais candidatas a culturas *starter* ou a agentes probióticos, com vantagem competitiva caso consigam estar activas às temperaturas pelas quais passam os alimentos onde são aplicadas, ao longo do processo tecnológico e de conservação. Para além do crescimento celular teria interesse a avaliação da actividade bacteriocinogénica destas estirpes após serem cultivadas às diferentes temperaturas.

Leroy e De Vuyst (1999), demonstraram que a pH 6,5, o crescimento de *L. sakei* CTC494 e a produção de sakacina K eram óptimos, num intervalo de temperaturas entre 20°C e 25°C. A 35°C não se verificava produção da bacteriocina e a massa celular era apenas 61% relativamente aos valores apresentados a 20- 25°C, temperatura à qual se realiza a fermentação dos enchidos na Europa. A redução da quantidade de bacteriocina com o aumento da temperatura foi associada à maior acção de proteases ou interação entre bacteriocina/ células ou bacteriocina/ bacteriocina, sendo desaconselhada a sua aplicação em processos fermentativos cuja temperatura excedesse 30°C.

Schillinger, Geisen e Holzapfel (1996), obtiveram resultados semelhantes em estudos realizados para *L. sakei* Lb706, constatando que o maior crescimento celular e a maior produção de sakacina A ocorria a temperaturas entre 20°C e 30°C, decaindo a produção quando a temperatura excedia 25°C.

Para testar o efeito da temperatura, Schillinger e Lucke (1989), colocaram inóculo de *L. sakei* Lb706 em caldo MRS a cultivar a 7°C, 15°C e 25°C e testaram a actividade inibitória ao longo do tempo. Não foi detectada actividade durante as primeiras 8h de crescimento; contudo, foi detectada actividade significativa às 23h a 25°C e às 23h e às 47h para a cultura a 15°C (fase logaritmica tardia); às 47h a 25°C não se verificou actividade bacteriocinogénica.

A bacteriocina plantaricina ST31 é, segundo Messen e De Vuyst (2002), a mais termoresistente, conseguindo manter-se activa alguns minutos a 97-101°C.

No futuro, mais do que estudar a ecologia do alimento partindo da avaliação de cada população individualmente, a investigação deve estar focada na complexidade das interações entre os microrganismos e o alimento e entre populações de microrganismos. Os estudos de investigação da diversidade das estirpes selvagens que surgem na produção tradicional de produtos artesanais, entre os quais comparações genómica, transcricional, proteica e metabólica, podem ser as bases de origem para novas culturas *starter* de uso industrial, com maior diversidade, estabilidade e performance. Isto permitirá uma rápida selecção de estirpes selvagens com propriedades funcionais interessantes e sem características negativas, bem como a construção de culturas *starter* geneticamente modificadas ajustadas às acções funcionais pretendidas (Leroy, Verluyten & De Vuyst, 2006). A engenharia genética das culturas *starter* pode ter como alvo vários fins; uma cultura *starter* adequada pode não ser encontrada na natureza. Contudo, é difícil prever em

que direcção os requisitos legislativos influenciarão a inovação ligada à biotecnologia, especificamente as alterações genéticas (Hansen, 2002).

Seria interessante realizar estudos no sentido de desenvolver estirpes resistentes ao cloreto de sódio do meio, à limitada difusão no meio sólido, à baixa actividade da água na massa e aos agentes de cura e com capacidade competitiva.

No entanto, por detrás das características funcionais das potenciais novas culturas *starter*, podem existir também aspectos negativos que não são previstos, tais como: resistências a antibióticos, aparecimento de genes virulentos ou formação de metabolitos indesejáveis. O controlo das resistências antibióticas é um tópico importante tendo em conta que a inoculação de culturas *starter* da carne crua que contém elevada carga microbiana, pode originar transferência de resistências (Cocconcelli *et al.*, 2003; Gevers *et al.*, 2003; citados por Leroy & De Vuyst, 2006).

Deve também ser sublinhado que a eficácia de uma cultura *starter* seleccionada deve ser avaliada tendo em conta o contexto de aplicação, sendo relevantes determinados factores, como o tipo de produto em que será aplicada, as técnicas de fabrico, o tempo de maturação e as matérias-primas usadas (Leroy & De Vuyst, 1999; Hugas *et al.*, 2002; Mataragas *et al.*, 2003).

6. Conclusões

As 36 estirpes de *Lactobacillus* analisadas neste trabalho foram identificadas geneticamente como *L. plantarum*, *L. curvatus* e *L. sakei*, usando as metodologias PCR convencional e PCR *Fingerprinting*.

Estas estirpes possuem determinadas características favoráveis ao seu potencial uso como culturas *starter* e/ ou probióticos. A actividade inibitória evidenciada face a agentes coabitantes (*S. xylosus* e *E. coli*) e patogénicos (*L. monocytogenes* e *S. aureus*) sugere a capacidade de produção de substâncias bacteriocinogénicas. A conservação dessa capacidade após concentração do sobrenadante por liofilização e controlo de factores como o pH permitem ponderar sobre a capacidade de produção de bacteriocinas por parte de duas das estirpes de *L. plantarum* (PO5-15 e PO5-51).

A elevada resistência demonstrada aos antibióticos testados, levanta questões relativamente à causa de tais valores. Pode ser uma limitação se pensarmos na possibilidade de transferência dessa capacidade a outros microrganismos, nomeadamente os patogénicos, no entanto, pode ser uma vantagem destas estirpes quando utilizadas como probióticos na regulação gastrointestinal durante terapêuticas com antibióticos.

A tolerância a pH baixo e a resistência à presença de sais biliares são pré-requisitos fundamentais para estirpes que venham a ser aplicadas como agentes probióticos. As estirpes avaliadas para estes parâmetros demonstraram capacidade de sobrevivência a estas condições.

O crescimento das estirpes seleccionadas a diferentes temperaturas (10°C, 25°C, 30°C e 44,5°C) é indicativo da sua facilidade de adaptação ao meio e possibilidade de serem usadas em processos fermentativos de alimentos que impliquem variações térmicas, nomeadamente em produtos cárneos, por estarem predispostamente adaptadas ao ambiente de onde foram isoladas.

De modo geral, os resultados foram promissores, aliciando a realização de mais estudos que permitam aprofundar os assuntos tratados e desvendar efectivas aplicações práticas destas estirpes portuguesas de *Lactobacillus*.

7. Bibliografia

Abee, T., Krockel, L. & Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal Food Microbiology*, 28, 169-185.

Ahrnè, S., Nobaek, S., Jeppsson, B., Adlerberth, I., Wold, A. & Molin, G. (1998). The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *Journal of Applied Microbiology* 85, 85-94.

Albano H., Oliveira, M., Aroso, R., Cubero, N., Hogg, T. & Teixeira, P. (2007). Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from “Alheiras” (traditional Portuguese fermented sausages): In situ assays. *Meat Science* 76, 796–800.

Axelsson, L.T. (1993). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Salminen, S. & von Wright, A. (Ed.), *Lactic Acid Bacteria*. (pp. 1-63). New York: Marcel Dekker.

Axelsson, L.T. & Holck, A. (1995). The genes involved in production of and immunity of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *Journal Bacteriology*, 177, 2125-2137.

Axelsson L.T., (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Salminen, S. & von Wright, A. (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects (3rd ed.)*. (pp. 1-66). New York: Marcel Dekker.

Aymerich, M.T., Garriga, M., Ylla, J., Vallier J., Monfort, J. M. & Hugas, M. (2000). Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *Journal of Food Protection*, 63, 721-726.

Aymerich M.T., Hugas, M. & Monfort, J. M. (1998). Review: Bacteriocinogenic lactic acid bacteria associated with meat products. *Food Science and Technology International*, 4, 141-158.

Aymerich, M.T., Martín, B., Garriga, M. & Hugas, M. (2003). Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic *Staphylococci* from artisanal low-acid sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4583–4594.

Barefoot, S.F. & Nettles, C.G. (1992). Antibiosis revisited: bacteriocins produced by dairy starter cultures. *Journal of Dairy Science*, 76, 2366–2379.

Barton, M.D. & Hart, W.S. (2001). Public health risks: antibiotic resistance- review. *Asian-Aust. J. Animal Science*, 14, 414-422.

Bernardeau M., Vernoux, J.P., Henri-Dubernet, S. & Guéguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 278–285.

Berthier, F., Beuvier, E., Dasen, A., Grappin, R. (2001). Origin and diversity of mesophilic *Lactobacilli* in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. *Internationa. Dairy Journal*, 11, 293-305.

Berthier, F. & Ehrlich, S.D. (1998). Rapid species identification within two groups of closely related *Lactobacilli* using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiology Letters*, 161, 97-106.

Berthier, F. & Ehrlich, S. D. (1999). Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA. *Int J Syst Bacteriol*, 49, 997–1007.

Biourge, V., Vallet, C., Levesque, A., Sergheraert, R., Chevalier, S. & Roberton, J.L. (1998). The use of probiotics in the diet of dogs, 128, 2730- 2732.

Björkroth, J., Ridell, J. & Korkeala, H. (1996). Characterization of *Lactobacillus sake* strains associating with production of rropy slime by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns. *International Journal of Food Microbiology*, 31, 59-68.

Brink, T.B., Huis In't Veld, J.H.J. (1992). Application of metabolic properties of lactic acid bacteria. In: Novel, G., Le Querler, J-F. (Eds.), *Les bactéries lactiques*, (pp. 58-66). Caen: Ardie Normandie.

Buckenhüskes, H.J. (1993). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 253-272.

Buckenhüskes, H.J. (2001). Fermented Vegetables. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Ed.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. (2nd Ed.). (pp. 665-679). Washington: ASM Press.

Cabo, M. L., Murado, M.A., González, M.P. & Pastoriza, L. (1999). A method for bacteriocin quantification. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 907- 914.

Caplice, E., Fitzgerald, G.F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 15, 131-149.

Cebeci, A. & Gurakan, C. (2003). Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiology*, 20, 511-518.

Chagnaud, P., Machinis, K., Coutte, L., Marecat, A. & Mercenier, A. (2001). Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. *Journal of Microbiological Methods*, 44, 139-148.

Chen, H. & Hoover, D.G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Review in Food Science and Food Safety*, 2, 81-100.

Coenye T. & Vandamme P. (2003). Extracting phylogenetic information from whole-genome sequencing projects: the lactic acid bacteria as a test case. *Microbiology*, 149, 3507-3517.

Collins, J. K., Thornton, G. & Sullivan, G. O. (1998). Selection of probiotic strains for human applications. *International Dairy Journal*, 8, 6487-490.

Collins, M.D., Farrow, J. A. E., Phillips, B. A., Fergus, S., & Jones, D. (1987). Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and Some Catalase-Negative, Asporogenous, Rod-Shaped Bacteria from Poultry in a New Genus, *Carnobacterium*. *Int J Syst Bacteriol*, 37, 310-316.

Coppola, R., Succi, M, Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G. & Sorrentino E. (2005). Antibiotic susceptibility of *L. rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano Cheese. *Lait*, 85, 193-204.

Crittenden, R., Bird, A.R., Gopal, P., Henriksson, A., Lee, Y.K. & Playne, M.J. (2005). Probiotic research in Australia, New Zealand and the Asia-Pacific region. *Current Pharmaceutical Design*, 11, 37-53.

Curk, M. C., Peladan, F., & Hubert, J. C. (1994). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identifying *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 123, 241–248.

Daeschel, M.A. (1993). Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. In: Hoover, D. G. & Steenson, L. R. (Eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. (pp. 63-91) San Diego: Academic Press, Inc..

Dalezios, I. & Siebert, K. J. (2001). Comparison of three pattern recognition techniques for classification and identification of lactic acid bacteria. *Journal Applied Microbiology*, 91, 225-236.

Danielsen, M. & Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol*, 82, 1 –11.

Davidson, P.M. & Juneja, V.K. (1990). Antimicrobial agents. In: Branen, A. L., Davidson, P. M. & Salminen, S. (Eds). *Food Additives*. (pp. 83-137). New York: Marcel Dekker Inc..

Dellaglio, F., de Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. C. & Janssens, D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: de Roissart, H. & Luquet, F. M. (Eds.) *Bacteries Lactiques, vol. I*, (pp. 25–116). Uriage: Lorica.

De Vuyst, L., Callewaert, R. & Krabé, K. (1996). Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology*, 142, 817-827.

De Vuyst, L., Callewaert, R. & Pot, B. (1996). Characterization and antagonistic activity of *Lactobacillus amylovorus* DCE471 and large scale isolation of its bacteriocin amylovorin L471. *Systematic and Applied Microbiology*, 19, 9-20.

De Vuyst, L. & Vandamme, E.J. (1992). Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *Journal genetic microbiology*, 138, 571-578.

De Vuyst, L. & Vandamme, E.J. (1994a). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: microbiology, genetics and applications*. London: Blackie Academy and Professional.

De Vuyst, L. & Vandamme, E.J. (1994b). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: De Vuyst, L. & Vandamme, E.J. (Eds.). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: microbiology, genetics and applications*, (pp. 91-142). London: Blackie Academy and Professional.

Dhillon, S., Ghosh, M. & Ganguli, A. (2007). Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* Ch1 isolates from Indian green sausage. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 2, 105-110.

Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L.M. & Prévost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 70, 564-582.

Dunne, C., Murphy, L., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E.M.M., O'Sullivan, G.C.,

Shanahan, F. & Kevin, J. (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 279-292.

Dunne, C., O'Halloran L., Murphy, L., Morrissey, D., Feeney, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G., Shanahan, F. & Collins, J.K. (2001). In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 386-392.

Du Plessis, E. M. & Dicks, L. M. (1995). Evaluation of random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR as a method to differentiate *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus johnsonii*. *Current Microbiology*, 31, 114-118.

Du Toit, M., Franz, C., Schillinger, U., Warles, B. & Holzappfel, W. (1998). Characterization and selection of probiotic *Lactobacilli* for preliminary minipig- feeding trial and their effect on serum cholesterol level, faeces moisture content. *International Journal of Food Microbiology*, 40, 93-104.

Egan, A. F. (1983). Lactic acid bacteria of meat and meat products. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49, 327-336

Elegado, F. B., Guerra, M. A. R. V., Macayan, R. A., Mendoza, H. A. & Lizaran, M. B. (2004). Spectrum of bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* BS and fingerprinting by RAPD-PCR. *International Journal Food Microbiology*, 95, 11–18.

Erkkila, S. & Petaja, E. (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*, 55, 297- 300.

Euzéby, J. P. (1997), List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Acedido em Dez 12, 2009, publicado em: <http://www.bacterio.cict.fr/>.

Fadda, S., Vignolo, G. M., Holgado, A.P. & Oliver, G. (1998). Proteolytic activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry-fermented sausages on muscle sarcoplasmic proteins. *Meat Science*, 49, 11-18.

Fadda, S., Sanz, Y., Vignolo, G., Aristoy, M., Oliver, G. & Toldra, F. (1999). Characterization of muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysis caused by *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3540-3546.

Fernandes, C.F., Shahani, K.M. & Amer M.A. (1987). Therapeutic role of dietary *Lactobacilli* and lactobacillic fermented dairy products. *FEMS Microbiol. Rev.*, 46, 343-356.

Fernández, M., Ordóñez, J.A., Bruna, J.M., Herranz, B. & de la Hoz, L. (2000). Accelerated ripening of dry fermented sausages. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 201–209.

Gálvez A., Abriouel, H., López, R.L. & Omar, N.B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation, *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51–70.

Ganzle, M., Hertel, C. & Hammes, W.P. (1996). Antimicrobial activity of bacteriocin-producing cultures in meat products. Modelling of the effect of pH, NaCl, and nitrite concentrations on the antimicrobial activity of sakacin P against *Listeria ivanovii* DSM20750. *Fleischwirtschaft*, 76, 409-412.

Gao, Y., van Belkum, M. J. & Stiles, M. E. (1999). The Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria Inhibits Antibacterial Activity of Brochocin-C. *Applied Environmental Microbiology*, 65, 4329-4333.

Gálvez, A., Abriouel, H., López, R., L.; Ben, O.N. (2007) Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51-70.

Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, T. & Monfort, J.M. (1993). Bacteriocinogenic activity of *Lactobacilli* from fermented sausages. *Journal Applied Bacteriology*, 75, 142-148.

Garrigues, C., Loubière, P., Lindley, N.D. & Cocaigh-Bousquet, M. (1997). Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio. *Journal of Bacteriology*, 179, 5282-5287.

Garrity, G.M., Lilburn, T. G., Cole, J. R., Harrison, S. H., Euzéby, J. & Tindall, B.J. (2007). Taxonomic Outline of the bacteria and Archaea: Part 9- The bacteria: Phylum "Firmicutes", Class "Bacilli". Acedido em Ago 6, 2009, disponível em: <http://www.taxonomicoutline.org/>.

Garver, K.I. & Muriana, P.M. (1994). Purification and partial amino acid sequence of curvaticin FS47, a heat-stable bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* FS47. *Applied Environmental Microbiology*, 60, 2191-2195.

Garver, K. I. & Muriana, P. M. (1995). Purification and partial amino acid sequence of curvaticin FS47, a heat-stable bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* FS47. *Applied Environmental Microbiology*, 60, 2191-2195.

Gevers, D., Huys, G. & Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS mmicrobiology Letters*, 205, 31-6.

Gibson, G. R. & Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbionota: introducing the concept of prebiotics. *J of Nutr*, 125, 1401-1412

Gilliland, S.E., Staley, T.E. & Bush, L.J. (1984). Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Journal of Dairy Science*, 67, 3045-3051.

Gilliland S.E. (1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology. Rev.*, 7, 175-188

Gilliland, S.E. & Walker, D.K. (1990). Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *Journal of Dairy Science*, 73, 905-911.

Gold, R. S., Meager, M. M., Hutkins, R. & Conway, T. (1992). Ethanol tolerance and carbohydrate-metabolism in *Lactobacilli*. *J Ind Microbiol*, 10, 45-54

Gotcheva, V., Hristozova, E., Hristozova, T., Guo, M., Roshkova, Z. & Angelov, A. (2002). Assessment of potencial probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast stains. *Food Biotechnology*, 16, 211-225.

Gottschalk, G. (Ed.) (1986). *Bacterial metabolism*. (2nd ed.). (380). New York: Springer Verlag.

Guder, A., Wiedemann, I., Sahl, H.G. (2000). Posttranslationally modified bacteriocins--the lantibiotics. Review. *Biopolymers*, 55(1), 62-73.

Haarman, M. & Knol, J. (2006) Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Applied and environmental microbiology*, 72, 2359-2365.

Halami, P.M., Chandrashekar, A. & Nand, K. (2000). *Lactobacillus farciminis* MD, a newer strain with potential for bacteriocin and antibiotic assay. *Letters Applied Microbiology*, 30, 197-202.

Hammes, W.P., Bantleon, A. & Min, S. (1990). Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.*, 87, 165-174.

Hammes, W. P. & Hertel, C. (1998). New developments in meat starter cultures. *Meat science*. 49, 125-138.

Hammes W. P. & Hertel C. (2006) The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. & Stackebrandt, E., (Eds.), *The prokaryotes*, (3rd ed.) (pp. 320–403) New York: Springer Science and Business Media.

Hammes, W.P. & Tichaczek, P.S. (1994). The potential of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food. *Z Lebensm Unters Forsch*, 198 (3), 193-201

Hammes, W.P. & Vogel R.F. (1995). The genus *Lactobacillus*, pp. 19-54. In, B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel (eds). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. London: Chapman & Hall.

Hansen, E.B., (2002). Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal Food Microbiology*, 78 (1-2), 119-131.

Herrero, M., Mayo, B., Ganzales, B. & Suarez, J.E. (1996). Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, 81, 565–570.

Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. & Schillinger U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal Clinical Nutrition*, 73(2), 365-373.

Holzapfel, W.H. & Wood B.J.B. (1995). Lactic acid bacteria in contemporary perspective. In: Wood B.J.B., Holzapfel W.H. (Eds.), *The genera of Lactic acid bacteria*. 1-7. London: Chapman & Hall.

Holck, A. L., Axelsson, L., Huhne, K. & Krockel, L. (1994). Purification and cloning of sakacin 674, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb 674. *FEMS Microbiology Letters*, 115, 143-150.

Hugas, M. (1998), Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Meat Science*, 49, 139-150.

Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T. & Monfort, J.M. (1993). Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *Journal Applied Bacteriology*, 79, 322-330.

Hugas, M., Garriga, M., Aymerick, M. T. & Monfort, J. M. (1995). Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC 494. *J. Appl.*, 79, 322-330.

- Hugas, M., Garriga, M., Pascual, M., Aymerich, M.T. & Monfort, J.M. (2002). Controlling measurements of food spoilage. *Food Microbiology*, 19, 519-532.
- Hugas, M. & Monfort, J.M. (1997). Bacterial starter cultures for food fermentation. *Food Chemistry*, 54, 547-554.
- Inês, A., Tenreiro, T., Tenreiro, R., Mendes-Faia, A. (2008), Revisão: As bactérias do ácido láctico do vinho – Parte I, *Ciência Técnica Vitivinícola* 23, 81-96.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. & Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram- positive bacteria. *Microbiological Reviews*, 59, 171- 200.
- Jin, L. Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., Ali, M.A. & Jalaludin, S. (1998). Effects of adherent *Lactobacillus* cultures on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. *Animal Feed Science*, 70, 197-209.
- Johansson, M.-L., Quednau, M., Ahrné, S. & Molin, G. (1995). Classification of *Lactobacillus plantarum* by restriction endonuclease analysis of total chromosomal DNA using conventional agarose gel electrophoresis. *International Journal Systematic Bacteriology*, 45, 670-675.
- Kaiser, A. L., & Montville, T.J. (1996). Purification of the bacteriocin MN and characterization of its Mode of Action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipids Vesicles. *Applied Environmental Microbiology*, 62, 4529-4535.
- Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 49, 209-224.
- Kandler, O. & Weiss, N. (1986). Regular, nonsporing gram-positive rods, section 14. In: John G. Holt (Ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, volume 2, Baltimore: Williams & Wilkins.
- Kang, D.H., Fung, D.Y. (1999). Effect of diacetyl on controlling *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in the presence of starter culture in a laboratory medium and during meat fermentation. *Journal of food Protection*, 62, 975-979.
- Kao, Y-T., Liu, Y-S., Shyu, Y-T. (2007). Identification of *Lactobacillus* spp. in probiotic products by real-time PCR and melting curve analysis. *Food Research International*, 40, 71-79.
- Kastner, S., Perreten, V., Bleuler, H., Hugenschmidt, G., Lacroix & C., Meile, L. (2006). Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 145–155.
- Katla, A.K., Kruse, H., Johnsen, G. & Herikstad, H. (2001). Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 67, 147–152.
- Kelly, W. J., Asmundson, R. V. & Huang, C. M. (1996). Characterization of plantaricin KW30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 81 (6) 657 – 662.
- Khaled, A. K., Neilan, B. A., Henriksson, A., Conway, P. L. (1997). Identification and phylogenetic analysis of *Lactobacillus* using multiplex RAPD-PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 153(1), 191-7.

- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Rev.*, 12, 39-86.
- Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., van de Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Hols, P., Hutkins, R., Kleerebezem, M., Kok, J., Kuipers, O., Lubbers, M., Maguin, E., McKay, L., Mills, D., Nauta, A., Overbeek, R., Pel, H., Pridmore, D., Saier, M., van Sinderen, D., Sorokin, A., Steele, J., O'Sullivan, D., de Vos, W., Weimer, B., Zagorec, M. & Siezen, R. (2002). Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 82, 29-58.
- Klein, G., Pack, A. Bonaparte, C. & Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2), 103-125.
- Konings, W.N., Kok, J., Kuipers, O.P., Poolman, B. (2000). Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Current Opinion Microbiology*, 3(3), 276-282.
- Larsen, A.G., Vogensen, F.K. & Josephsen, J. (1993). Antimicrobial activity of acid lactic bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* M1401. *Journal Appl. Bacteriol.*, 75, 113-122.
- Lauková, A., Mareková, M. & Javorsky, P. (1993). Detection and antimicrobial Spectrum of a bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* CCM4231, *Letters in Applied Microbiology*, 16, 257-260.
- Leroy, F. & De Vuyst, L. (1999). Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin Sakacin K, *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 974-981.
- Leroy, F. & De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15 (2), 67-78.
- Leroy, F. & De Vuyst, L. (2005) Simulation of the effect of sausage ingredients and technology on the functionality of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CTC 494 strain. *International Journal Food Microbiology*, 100, 141-52.
- Leroy, F., Verluyten, J. & De Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation, *International Journal of Food Microbiology*, 106, 270-285.
- Lewus, C. B., & Montville T. J. (1992). Further characterization of bacteriocins Plantaricin BN, Bavaricin MN and Pediocin A. *Food Biotechnol.*, 6, 153-174.
- Lindgren, S. E. & Dobrogosz, W. J., (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Review*, 7, 149-163.
- London, J. (1976) The ecology and taxonomic status of the *lactobacilli*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 279-301.
- Loubière, P., Coccagn- Bousquet, M., Matos, J., Goma, G. & Lindey, N.D. (1997). Influence of end- products inhibition and nutrient limitation on the growth of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Journal Applied Microbiology*, 82, 95-100.
- Lucke, F. K. (1985). Fermented sausages. In: Wood, B.J. B. (Ed.), *Microbiology of fermented food*, Vol. 2, (pp. 41- 83). Essex: Elsevier Applied Science Publishers Lda.

Lucke, F. K. (1992). Prospects for the use of bacteriocins against meat-borne pathogens. In: Smulders, F.J., Toldra, F., Flores, J. & Prieto, M. (Eds.), *New Technologies for meat and meat products. Fermentation and starter cultures; Muscle enzymology and meat ageing; Quality control systems*. (pp. 37-52). Utrecht: ECCEAMST, AUDET Tijdschriften.

Lucke, F.K. (1998). Fermented sausages. In: Wood, B.J.B. (Ed.). *Microbiology of Food Fermentation, Vol.2*. (pp.441-483). London: Applied Science Publishers.

Makarova, K.S. & Koonin, E.V. (2006). Evolutionary genomics of lactic acid bacteria, *Journal of Bacteriology*, 189(4),1199-11208.

Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Díaz-Muñiz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D. (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings National Academy Sciences USA*,103(42), 15611-15616.

Mareková, M., Lauková, A., De Vuyst, L., Skaugen, M. & Nes, I.F. (2003). Partial characterization of bacteriocins produced by environmental strain *Enterococcus faecium* EK13, *Journal of Applied Microbiology*, 523- 530.

Martín, B., Jofré, A., Garriga, M., Pla M. & Aymerich, T. (2006). Rapid quantitative detection of *Lactobacillus sakei* in meat and fermented sausages by real-time PCR. *Applied and environmental microbiology*, 72(9), 6040-6048.

Martin-Platero, A. M., Maqueda, M., Valdivia, E., Purswani, J. & Martinez-Bueno, M. (2009). Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats' milk cheeses from Sierra de Aracena. *Food Microbiology*, 26, 294–304.

Marugg, D., Gonzalez, C. F., Kunka, B. S., Ledebøer, A. M., Pucci, M. J., Toonen, M. Y., Walker, S.A., Zoetmulder, M. 1. & Vandenberg, P. A. (1992). Cloning, expression, and nucleotide sequence of genes involved in production of pediocin PA-1, a bacteriocin produced from *Pediococcus acidilactici* PAC1 . *Applied Environmental Microbiology*, 58, 2360-2367.

Mataragas, M., Metaxopoulos, J. & Drosinos, E.H. (2002) Characterization of two bacteriocins produced by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442, isolated from dry fermented sausages. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18, 847-856.

Mathiesen, G., Huehne, K., Kroeckel, L., Axelsson, L. & Eijsink, V. G. H. (2005). Characterization of a new bacteriocin operon in sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*, showing strong translational coupling between the bacteriocin and immunity genes. *Applied Environmental Microbiology*, 71(7), 3565–3574.

Messens, W. & De Vuyst, L. (2002). Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs- a review, *International Journal Food Microbiology*, 72, 75- 85.

Moll, G.N., Konings, W.N., Driessen, A.J. (1999). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. Review. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76, 185-98.

Montel, M.C., Talon, R., Fournaud, J. & Larpent, J.P. (1994) Transformation des produits animaux. Chap. IV-7: Fonctions des bactéries lactiques dans les produits carnés. In: Roissart, H. & Luquet, F.M. (Eds.), *Bactéries Lactiques*. (pp.183-191). Uriage: Lorica.

Mortvedt-Abildgaard, C.I., Nissen-Meyer, J., Jelle, B., Grenov, B., Skaugen, M. & Ness, I. (1995). Production and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45, *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 175-179.

Mourad, K. & Nour- Eddine, K. (2006). *In vitro* preselection criteria for probiotic *Lactobacillus plantarum* strains of fermented olives origin, *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 1, 27-32.

Muriana, P.M., & Klaenhammer, T.R. (1991). Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus* spp. *Journal of Bacteriology*, 173, 1779-1788.

Murphy. M. (2004). Bacteria could treat symptoms of autism. *Chemistry and Industry*. Acedido em Nov. 20, 2009, disponível em http://findarticles.com/p/articles/mi_hb5255/is_10/ai_n29095818/.

Nes, I.F. & Holo, H. (2000) Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Review. Biopolymers*, 55, 50-61.

Niku-Paavola, M. L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T. & Haikara, A. (1999). New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 29-35.

Norma ISO 15214: 1998. *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30°C*. International Organization for Standardization. Genève.

Ocaña, V., Silva, C. & Nader-Macías, M.E. (2006). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic vaginal Lactobacilli. *Infectious Diseases in Obstetrics Gynecology*. Acedido em Set. 9, 2009, disponível em <http://ukpmc.ac.uk/articlerender.cgi?artid=883523>.

Okereke A. & Montville, T.J. (1991). Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*, 54(5), 349- 353.

Olano, A., Chua, J., Schroeder, S., Minari, A., La Salvia, M. & Hall, G. (2001). *Weissella confusa* (Basonym: *Lactobacillus confusus*) Bacteremia, *Journal Clinical Microbiology*, 39, 1604-1607.

Oneca, M., Irigoyen, A., Ortigosa, M., & Torre, P. (2003). PCR and RAPD identification of *L. plantarum* strains isolated from ovine milk and cheese. Geographical distribution of strains. *FEMS Microbiological Letters*, 227, 271–277.

Ouwehand, A.C., Isolauri, E., Kirjavainen, P.V., Salminen, S.J. (1999) Adhesion of four *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups. *FEMS Microbiological Letters*, 172, 61-64.

Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Gronlund, M.M., Isolauri E. & Salminen, S.J. (1999). Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. *International Journal of Fodd Microbiology*, 64, 119-126.

Parente, E. & Ricciardi, A. (1994). Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. *Letters Applied Microbiology*, 19, 12-15.

Patarata, L. A. S. C. (2002). Caracterização e avaliação da aptidão tecnológica de bactérias do ácido láctico e *Micrococcaceae* em produtos de salchicharia. Tese de Doutorado. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Pennachia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G. & Villani, F. (2004). Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Science*, 67, 309- 317.

Pereira, D.I. & Gibson, G.R. (2002). Cholesterol reduction. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 4689-4693.

Pouwels, P.H. & Leer, R.J. (1993). Genetics of *Lactobacilli*: plasmids and gene expression. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64, 85- 107.

Ribeiro, T., Abrantes, M., Lopes, M.F.S., Crespo, M.T.B. (2002). Vancomycin-susceptible dairy and clinical enterococcal isolates carry vanA and vanB genes. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 289–295.

Ricke, S.C. & Keeton, T. (1997). Fermented meat, poultry and fish products. In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., and Montville, T.J. (Ed.) *Food Microbiology: fundamentals and frontiers*, (pp 610-628). Washinton, D.C.: ASM Press.

Riley, M. A. (1998). Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annual Review of Genetic*, 32, 255-278.

Riley, M.A., Gordon, D.M. (1999) The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. Review. *Trends Microbiology*, 7(3), 129-33.

Rodriguez, J. M., Cintas, L. M., Casaus, P., Horn, N., Dodd, H. M., Hernández, P. E. & Gasson, J. (1995). Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 78 (2), 109 – 115.

Roig- Sagués, A. & Eerola, S. (1997). S. Biogenic amines in meat inoculated with *Lactobacillus sakei* starter strains and an amine positive lactic acid bacterium. *Food Research and Technology*, 205 (3), 227-231.

Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Warner, P.J. & Jiménez-Díaz, R. (1994). Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in spanish-style green olive fermentations. *Applied Environmental Microbiology*, 60(6), 2059-2064.

Salminen, S., von Wright, A. & Ouwehand, A. (Eds.). (2004). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects* (3rd ed.). New York: Marcel Dekker.

Salminen, S., Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fondenn, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S-E. & Matilla-Sandholm, T. (1998). Demonstration of safety of probiotics, a review. *International Journal of Food Microbiology*, 44, 93-106.

Samelis, J., Maurogenakis, F. & Metaxopoulos, J. (1994) Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *Internatiotal Journal of Food Microbiology*, 23, 179–176.

Samelis, J. & Metaxopoulos, J. (1999). Incidence and principal sources of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and a meat processing plant. *Food Microbiology*, 16, 465–477.

Santos, E.M., Gonzalez-Fernandez, C., Jaime, I. & Rovira, J. (1998). Comparative study of lactic acid bacteria house flora isolated in different varieties of chorizo. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 123-128.

Schillinger, U., Geisen, R., Holzappel, W.H. (1996). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of food. *Trends in Food Science and Technology*, 7, 158- 164.

Schillinger, U. & Lucke, F-K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied Environmental Microbiology*, 55(8) 1901-1906.

Simon, L., Fremaux, C., Cenatiempo, Y. & Berjeaud, J.M. (2002). Sakacin G, a new type of antilisterial bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (12), 6416-6420.

Singh, S., Goswami, P., Singh, P. & Heller, K.J. (2009). Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 42, 448–457.

Skalka, B., Pillich, J. & Pospisil, L. (1983). Further observations on *Corynebacterium renale* as an indicator organism in the detection of exfoliationpositive strains of *Staphylococcus aureus*. *Zbl. Bakt. Hyg.*, 256 (a), 168-174.

Skaugen, M., Abildgaard, C.I.M. & Nes, I.F. (1997). Organization and expression of a gene cluster involved in the biosynthesis of the lantibiotic lactocin S. *Molecular General Genetics*, 253, 674-686.

Sobrino, O. J., Rodriguez, J. M., Moreira, W. L., Cintas, L. M., Fernandez, M. F., Sanz, B. & Hernandez, P.E. (1992). Sakacin M, a bacteriocin-like substance from *Lactobacillus sake* 148. *Internacional Journal Food Microbiology*, 16, 215-225.

Sorum H. & Sunde M. (2001) Resistance to antibiotics in the normal flora of animals. *Veterinary Research*, 32,228-241.

Stiles, M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70, 331-345.

Strompfová, V. & Lauková, A. (2004). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria from canine faeces. *Bull Vet Pulawy*, 48, 215-218.

Stompfová, V., Marcináková, M., Simonová, M., Bogovic- Matijasic, B. & Lauková, A. (2005). Application of potential probiotic *Lactobacillus fermentum* AD1 strain in healthy dogs. *Elsevier, Anaerobe*, 1-5.

Sudirman, I., Mathier, F., Michel, M. & Lefebvre G. (1993). Detection and properties of curvaticin 13, a bacteriocin like substance produced by *Lactobacillus curvatus* SB13. *Current Microbiology*, 27, 35-40.

Sulzer, G. & Busse, M. (1991) Growth of *Listeria* spp. on Camembert cheese by bacteria producing inhibitory substances. *International Journal of Food Microbiology*, 14, 287-296.

Sybesma, W., Hugenholtz, J., de Vos, W.M. & Smid, E.J. (2006). Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food. Bridging the gap between consumers, green groups and industry. *Elect. J. Biotechnol.*, 9 (4), 424-448.

Talon, R., Lebert, I., Lebert, A., Leroy, L., Garriga, M., Aymerich, T., Drosinos, E.H., Zanardi, E., Ianieri, A., Fraqueza, M.J., Patarata, L. & Lauková, A. (2007). Traditional dry

fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1: Microbial ecosystems of processing environments. *Meat Science*, 77, 570-579

Tannock, G., Fuller, R. & Pedersen, K. (1990). *Lactobacillus* succession in the piglet digestive tract demonstrated by plasmid profiling. *Applied Environmental Microbiology*, 56, 1310-1316.

Tannock G., Munro K., Harmsen H.J.M., Welling GM, Smart J. & Gopal P.K. (2000). Analysis of fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamosus* DR20. *Applied Environmental Microbiology*, 66, 2578-2588.

The Merck Index (10th ed.). (1983). USA: Merck, & Co., acedido em Dez. 11, 2009, disponível em http://www.peroxygen-chemicals.com/content/h2o2_stability.htm.

Tichaczek, P. S., Vogel, R. F., Hammes, W. P. (1993). Cloning and sequencing of *curA* encoding curvacin A, the bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174. *Archives of microbiology*, 160(4), 279-83.

Tichaczek, P.S., Vogel, R.F. & Hammes, W.P. (1994). Cloning and sequencing of *sakP* encoding sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH 673. *Microbiology*, 140 (2), 361-367.

Todorov, S., Onno, B., Sorokin, O., Chobert, J.M., Ivanova, I. & Dousset, X. (1999). Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST31 isolated from sourdough. *International Journal Food Microbiology*, 48, 167-177.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. *Microbiology Reviews*, 60, 407-438.

van Kraaij, C., de Vos, W.M., Siezen, R.J., Kuipers, O.P. (1999). Lantibiotics: biosynthesis, mode of action and applications. *Natural Product Reports*, 16(5), 575-587.

Vaughan, A., Eijsink, V.G.H. & van Sinderen, D. (2003). Functional characterization of a composite bacteriocin locus from malt isolate *Lactobacillus sakei* 5. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7194-7203.

Vesterlund, S., Paltta, J., Lauková, A., Karp, M. & Ouwehand, A.C. (2004). Rapid screening method for the detection of antimicrobial substances. *Journal of microbiological methods*, 57(1), 23-31.

Vogel, R. F., Lohmann, M., Nguyen, M., Weller, A.N. & Hammes, W.P. (1993). Molecular characterization of *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sake* isolated from sauerkraut and their application in sausage fermentations. *The Journal of Applied Bacteriology*, 74 (3), 295-300.

Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18, 7213- 7218.

Williams, J., Kuubelik, A., Livak, K., Rafalski, J. & Tingey, S. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531- 6535.

Wolf, C.E. & Gibbons, W.R. (1996). Improved method for quantification of the bacteriocin nisin. *Journal of Applied Bacteriology*, 80, 453-457.

World Gastroenterology Organisation (2008). *Guias Práticas de OMGE, Probiótico e Prebióticos*. Munich: WGO.

Zé-Zé, L., Tenreiro, R., Duarte, A., Salgado, M.J., Melo-Cristino, J., Lito, L., Carmo, M. M., Felisberto, S. & Carmo, G. (2004). Case of aortic endocarditis caused by *Lactobacillus casei*. *Journal Medical Microbiology*, 53, 451-453.