



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RENATA DANIELA SALDANHA NANDI

**PADRONIZAÇÃO DE MULTIPLEX-PCR PARA DETECÇÃO  
DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA E ATIVIDADE  
ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS NATURAIS EM LEITE  
BOVINO**

RENATA DANIELA SALDANHA NANDI

**PADRONIZAÇÃO DE MULTIPLEX-PCR PARA DETECÇÃO  
DE *Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA E ATIVIDADE  
ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS NATURAIS EM LEITE  
BOVINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Daniela Saldanha Nandi, Renata

Padronização de *multiplex*-PCR para detecção de *Escherichia coli* diarreiogênica e atividade antibacteriana de compostos naturais em leite bovino / Renata Daniela Saldanha Nandi. – Londrina, 2017.

91f : il.

Orientador: Gerson Nakazato

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2016.

Inclui bibliografia.

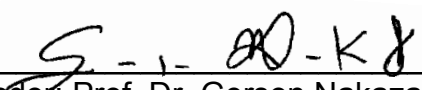
1. Leite – Teses. 2. *Escherichia coli* – Teses. 3. *Staphylococcus aureus* – Teses. 4. Bactérias Ácido Láticas - Teses. I. Nakazato, Gerson. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

RENATA DANIELA SALDANHA NANDI

**PADRONIZAÇÃO DE MULTIPLEX-PCR PARA DETECÇÃO DE  
*Escherichia coli* DIARREIOGÊNICA E ATIVIDADE  
ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS NATURAIS EM LEITE BOVINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

  
Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Renata Katsuko Takayama  
Kobayashi  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Angelita Sampaio Baptista  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 24 de fevereiro de 2017

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pela saúde e força concedidas para concluir meus objetivos e por guiar meu caminho.

Agradeço à minha família, por estar ao meu lado em todos os momentos, mesmo distante. Ao meu pai, Alceu Nandi, que sempre me apoiou na realização de meus sonhos e que permitiu que mais essa etapa fosse concluída. À minha mãe, Lourdes Maria Saldanha, que sempre me deu suporte emocional para que eu não desistisse. À minha irmã, Lethycia Nandi, pela força e compreensão sempre. Vocês foram essenciais para a realização deste sonho!

Ao meu amigo de infância, Luiz Fernando Vichoski, que mesmo distante acreditou em mim e me apoiou sempre.

Às minhas amigas de faculdade, Ana Claudia Valcanaia, Amanda Martins e Katia Wochner, que mesmo distantes, me estimularam a persistir.

Ao Juliano Castellane, por me compreender, me ouvir e estar ao meu lado em todos os momentos. Seu companheirismo e sua paciência foram importantes para a realização e conclusão deste trabalho.

Ao meu orientador Gerson Nakazato, por abrir as portas de seu laboratório, NIP3, no momento mais difícil dessa caminhada; pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de estudos; pela confiança depositada em mim; pelo aprendizado acadêmico e pessoal que me proporcionou; pela humildade e disposição em auxiliar a todo momento. Muito obrigada!

À professora Renata Katsuko Takayama Kobayashi pelo apoio e auxílio desde o início. Agradeço por sua calma e paciência, que muitas vezes ajudaram a dar andamento ao meu trabalho e concluí-lo.

À Anna Carolina Campos, por toda disposição em me auxiliar no desenvolvimento do trabalho e pela sua positividade, que muitas vezes me ajudaram a persistir.

À todos do NIP3, em especial, Maysa Chueiri Miranda, Carina Terumi Tsuruda, Laura Perez Abshana, Juan Josue Puño, Larissa Ciappina e Erick Nishio, por me acolherem e auxiliarem a todo momento; pelos questionamentos, debates e ensinamentos que foram essenciais para meu aprendizado e por tornarem o NIP3 um local tão aconchegante e inspirador.

À minha amiga Natália Hata, pela calma, paciência, estímulo e auxílio que foram essenciais para a realização e conclusão deste trabalho.

Meu agradecimento à Andrey Cordeiro, Ane Simionato, Ana Carolina Polano Vivan, Bárbara Gionco e João Augusto Nielsen Conter, pelos ensinamentos, apoio e estímulo desde o início.

Ao programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade de conhecer profissionais extremamente capacitados e que contribuíram para minha formação.

À Universidade Estadual de Londrina por fornecer o espaço para a realização deste trabalho e pela oportunidade de crescer profissionalmente e como pessoa.

E a todos, que direta ou indiretamente, me apoiaram e auxiliaram para a realização desse sonho! Muito obrigada!

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

NANDI, Renata Daniela Saldanha. **Padronização de *multiplex*-PCR para detecção de *Escherichia coli* diarreio gênica e atividade antibacteriana de compostos naturais em leite bovino**. 2017. 91 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

O leite bovino é um alimento rico em nutrientes consumido mundialmente, e é utilizado como matéria-prima para produção de diversos produtos lácteos com o envolvimento de microrganismos, dentre eles as bactérias ácido lácticas (LAB), que são as principais utilizadas. Esses alimentos são submetidos à diversas etapas de fabricação, onde sofrem a interferência de contaminantes biológicos, incluindo *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, afetando a qualidade do alimento. Esses microrganismos são importantes contaminantes, devido sua capacidade de causar infecções e intoxicações no homem. O objetivo deste estudo foi padronizar um sistema de Reação em Cadeia da Polimerase – *multiplex* (*multiplex*-PCR) para detecção de *Escherichia coli* diarreio gênica (DEC) em leite bovino, e avaliar a ação antibacteriana do óleo essencial de orégano (OEO) e de três tipos de méis (*Scaptotrigona postica* – SP, *Scaptotrigona bipunctata* - SB e *Apis mellifera* - Apis) contra LAB, *E. coli* e *S. aureus*. Para a padronização da *multiplex*-PCR foram utilizados os iniciadores *stx2* e *elt* para detecção de *E. coli* produtora de Shiga-toxina (STEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), respectivamente. As quantidades celulares testadas foram  $10^1$  a  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> de leite “Ultra-High-Temperature” (UHT) e leite pasteurizado, ambos desnatados. O sistema de *multiplex*-PCR utilizado demonstrou detecção de *E. coli* a  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>, tanto para o leite UHT quanto para o leite pasteurizado. Esses resultados indicam que a *multiplex*-PCR pode ser utilizada para detecção de *E. coli* diarreio gênica no leite, porém em uma concentração bacteriana acima de  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>. Para avaliar a ação antibacteriana do OEO e dos méis, foram determinadas a concentração inibitória mínima (MIC), a concentração bactericida mínima (MBC) e atividade antibacteriana das bacteriocinas produzidas por LAB. Os testes realizados para os compostos naturais demonstraram importante atividade antibacteriana do OEO e dos méis SP e SB. Foi possível notar que o OEO apresenta uma ação antibacteriana mais potente que os méis. No entanto, essa ação antibacteriana é similar para as LAB e para os microrganismos patogênicos, indicando que o uso desses compostos em produtos lácteos fermentados deve ser controlada. Não foi possível detectar a MIC do mel Apis. Não foi possível determinar a atividade antibacteriana das bacteriocinas. Dessa forma, o uso de OEO e méis de abelhas indígenas sem ferrão (SP e SB) são interessantes como antimicrobianos naturais para solucionar as contaminações microbianas no leite.

**Palavras-chave:** Leite. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. Bactérias Ácido Lácticas. Antibacteriano.

NANDI, Renata Daniela Saldanha. **Padronization of multiplex-PCR to detection of diarrheagenic *Escherichia coli* and antibacterial activity of natural compounds in bovine milk**. 2017. 91 p. Dissertation (Master Science in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

Bovine milk is a food rich in nutrients consumed worldwide, and is used as raw material for the production of various dairy products with the involvement of microorganisms, among them lactic acid bacteria (LAB), which are the main ones used. These foods are subjected to several stages of manufacture, where they suffer the interference of biological contaminants, including *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, affecting the quality of the food. These microorganisms are important contaminants due to their ability to cause infections and poisoning in humans. The objective of this study was to standardize a Polymerase Chain Reaction – *multiplex* (multiplex-PCR) system for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli* (DEC) in bovine milk and to evaluate the antibacterial action of oregano essential oil (OEO) and three types of honey (*Scaptotrigona postica* - SP, *Scaptotrigona bipunctata* - SB and *Apis mellifera* - Apis) against LAB, *E. coli* and *S. aureus*. For the standardization of the *multiplex*-PCR primers *stx2* and *elt* were used for the detection of *E. coli* producing Shiga-toxin (STEC) and *E. coli* enterotoxigenic (ETEC), respectively. The cellular amounts tested were  $10^1$  to  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> of *Ultra-High-Temperature* (UHT) milk and pasteurized milk, both skimmed. The *multiplex*-PCR system showed detection of *E. coli* at  $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup> for both UHT and pasteurized milk. These results indicate that the *multiplex*-PCR can be used for detection of DEC in milk, but at a bacterial concentration above  $10^9$  CFU mL<sup>-1</sup>. To evaluate the antibacterial action of OEO and honeys, the minimum inhibitory concentration (MIC), the minimum bactericidal concentration (MBC) and the antibacterial activity of the bacteriocins produced by LAB were determined. The tests performed for the natural compounds demonstrated important antibacterial activity of OEO and of the SP and SB honey. It was possible to note that OEO has a more potent antibacterial action than honey. However, this antibacterial action is similar for LAB and for pathogenic microorganisms, indicating that the use of these compounds in fermented dairy products should be controlled. It was not possible to detect the MIC of honey Apis. It was not possible to determine the antibacterial activity of bacteriocins. Thus, the use of OEO and bee honeys without sting (SP and SB) are interesting as natural antimicrobials to solve microbial contaminations in milk.

**Key words:** Milk. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*. Lactic Acid Bacteria. Antibacterial.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 –</b>	A- Metabolismo homofermentativo; B- Metabolismo heterofermentativo .....	18
<b>Figura 2 –</b>	Estrutura dos isômeros L(+) e D(-) do ácido láctico .....	20
<b>Figura 3 –</b>	Representação esquemática da nisina, variante A, produzida por <i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> .....	24
<b>Figura 4 –</b>	Perfil epidemiológico de microrganismos envolvidos em doenças transmitidas por alimentos no Brasil entre os anos de 2007 e 2016 .....	30
<b>Figura 5 –</b>	Interação de EPEC com a célula hospedeira .....	34
<b>Figura 6 –</b>	Mecanismo de patogenicidade de EHEC .....	36
<b>Figura 7 –</b>	Mecanismo de patogenicidade de ETEC .....	38
<b>Figura 8 –</b>	Mecanismo de patogenicidade de EAEC .....	40
<b>Figura 9 –</b>	Mecanismo de patogenicidade de EIEC .....	42
<b>Figura 10 –</b>	Mecanismo de patogenicidade de DAEC .....	43
<b>Figura 11 –</b>	Estrutura química do timol e carvacrol, constituintes do OEO .....	47
<b>Figura 12 –</b>	Estrutura química dos ácidos fenólicos e flavonoides presentes no mel .....	48
<b>Figura 13 –</b>	Imagem dos produtos amplificados através do <i>multiplex</i> -PCR em gel de agarose a 2,5% para o leite UHT .....	70
<b>Figura 14 –</b>	Imagem dos produtos amplificados através do <i>multiplex</i> -PCR em gel de agarose a 2,5% para o leite pasteurizado .....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Descrição dos iniciadores e das concentrações de reagentes utilizados no <i>multiplex</i> -PCR .....	69
<b>Tabela 2</b> – Descrição dos tratamentos testados na <i>multiplex</i> -PCR .....	70
<b>Tabela 3</b> – MIC das diferentes LAB para os compostos OEO, SP, SB e Apis. ND – não determinado .....	82
<b>Tabela 4</b> – Resultados da MIC das cepas de <i>E. coli</i> para os compostos OEO, SP, SB e Apis. ND – não determinado.....	83
<b>Tabela 5</b> – Resultados da MIC para cepas de <i>S. aureus</i> para os compostos OEO, SP, SB e Apis. ND – não determinado.....	83
<b>Tabela 6</b> – Diâmetros dos halos de inibição formados pelas culturas lácticas CHN22 e R704 no crescimento de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> .....	84

## SUMÁRIO

1.	<b><u>INTRODUÇÃO</u></b> .....	12
2.	<b><u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u></b> .....	13
2.1.	Leite Bovino .....	13
2.2.	Bactérias Ácido Láticas (LAB).....	14
2.2.1.	Características Gerais .....	14
2.2.2.	Metabolismo .....	16
2.2.3.	Ácido Lático .....	19
2.2.4.	Gênero <i>Lactococcus</i> .....	20
2.2.5.	Gênero <i>Leuconostoc</i> .....	22
2.2.6.	Bacteriocinas .....	23
2.2.7.	Aplicações das LAB .....	27
2.3.	Agentes Patogênicos .....	28
2.3.1.	<i>E. coli</i> .....	30
2.3.2.	<i>S. aureus</i> .....	43
2.4.	Compostos naturais .....	466
2.4.1.	Óleo essencial de orégano (OEO) .....	466
2.4.2.	Mel.....	488
3.	<b><u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b> .....	5050
4.	<b><u>OBJETIVOS</u></b> .....	644
4.1.	Objetivo .....	644
4.2.	Objetivos Específicos .....	644
5.	<b><u>ARTIGO 1</u></b> .....	655
6.	<b><u>ARTIGO 2</u></b> .....	744
7.	<b><u>CONCLUSÃO</u></b> .....	911

## 1. INTRODUÇÃO

O leite bovino é um alimento complexo, composto por diversos nutrientes incluindo gorduras, proteínas, açúcares, minerais e vitaminas. A composição do leite é variável e depende de diversos fatores, como por exemplo, a alimentação do animal. É utilizado como matéria-prima de diversos produtos, dentre eles, iogurtes, queijos e manteiga, através do processo de fermentação utilizando microrganismos como as bactérias ácido lácticas (LAB). Essas bactérias apresentam características diversas, no entanto, ganham destaque pela produção de ácido láctico e bacteriocinas (AWADALLAH et al., 2016; KASKONIENE et al., 2017; MUEHLHOFF; BENNETT; MCMAHON, 2013).

Diversos agentes patogênicos podem estar presentes no leite e nos produtos derivados devido ao contato direto com fontes contaminadas ou serem diretamente provenientes do animal contaminado. *Escherichia coli* é uma bactéria da microbiota intestinal de humanos e animais, no entanto, sua presença no leite e produtos lácteos gera preocupação devido à existência de cepas patogênicas capazes de gerar distúrbios gastrintestinais. Essa espécie é o principal indicador de contaminação fecal dos alimentos, além de ser um dos agentes patogênicos responsável pela mastite bovina. *Staphylococcus aureus* é uma bactéria da microbiota humana e sua presença no leite e produtos lácteos é associada com más condições higiênicas ou quando há infecção da glândula mamaria do animal por esse microrganismo. A contaminação desses alimentos por *S. aureus* ganha importância devido à produção de enterotoxinas por essa bactéria, ocasionando intoxicação alimentar (OLIVEIRA et al., 2011; ZEINHOM; ABDEL-LATEF, 2014).

Dentre as maneiras de controle dos agentes patogênicos, pode-se citar a utilização de compostos naturais, como os óleos essenciais (obtidos de plantas) e o mel. O óleo de orégano é um óleo essencial composto, em sua maioria, por carvacrol e timol, dois constituintes que apresentam ação antimicrobiana. O mel é utilizado pela população a anos devido às suas propriedades antimicrobianas. É capaz de agir contra microrganismos patogênicos por apresentar elevada quantidade de açúcares, peróxido de hidrogênio e compostos fenólicos (LEE; CHUREY; WOROBO, 2008; NAZZARO et al., 2013).

Neste estudo abordamos o leite bovino como um importante veículo de microrganismos contaminantes relacionados às intoxicações alimentares em humanos, além de ser um alimento utilizado como matéria-prima para fabricação de diversos produtos fermentados, a partir de adição de microrganismos fermentadores, como as LAB. Também foi abordada a capacidade antimicrobiana de diferentes compostos naturais contra os microrganismos contaminantes do leite e seus derivados. O manuscrito foi organizado na forma de revisão bibliográfica e dois artigos.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Leite Bovino**

O leite bovino é um alimento incluso na dieta de pessoas de todas as faixas etárias, fornecendo diversos nutrientes importantes para a saúde humana. Os maiores consumidores de leite são as crianças, uma vez que, é um dos principais alimentos durante os primeiros anos de vida. Ganha destaque entre os alimentos por apresentar proteínas de alta qualidade, compondo 3,5% dos nutrientes. A caseína é a proteína encontrada em maior quantidade, cerca de 80%, enquanto as proteínas do soro do leite são encontradas em quantidades inferiores, cerca de 20%. Apesar disso, a composição do leite é influenciada por diversos fatores, tanto ambientais quanto relacionados ao próprio animal. Fatores como dieta, raça, genética, fase de lactação e estação do ano, afetam a composição do leite (XU et al., 2015; FLORES-FLORES et al., 2015; SCHWENDER et al., 2015).

O leite é utilizado como matéria-prima para produção de vários produtos lácteos, dentre eles iogurtes, manteiga, queijos e doces. Antes de chegar até o consumidor, o leite e os produtos lácteos passam por etapas como produção, processamento e estocagem, que apresentam fatores que podem interferir na qualidade do alimento, como a presença de contaminantes. Esses contaminantes podem ser químicos, como antibióticos, pesticidas e adulterantes, e biológicos, como os microrganismos *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* e *Yersinia* spp., devido seu alto valor nutritivo, pH neutro e alta atividade de água. O controle desses contaminantes é de extrema importância, uma vez que, a ingestão

de leite e produtos lácteos com esses contaminantes pode ocasionar sérios problemas à saúde humana (CERVA et al., 2014; XU et al., 2015; NAG, 2010).

Os contaminantes biológicos ganham importância devido a possibilidade de gerar surtos na população. Entre os países industrializados, como Estados Unidos e França, o leite e os produtos lácteos são responsáveis por até 5% do total de surtos bacterianos de origem alimentar, em que a maioria é proveniente do consumo de queijo. Dessa forma, a fim de garantir sua qualidade e prolongar sua vida útil, o leite é tratado termicamente. Dentre os processos térmicos, a pasteurização e esterilização estão entre os mais usados, e envolvem o aquecimento do leite a determinada temperatura por um período de tempo seguido de resfriamento. A pasteurização pode ser lenta (LTLT), com temperatura de 63°C por 30 minutos, ou rápida (HTST), com temperatura de 72°C por 15 segundos. Na esterilização (UHT – *ultra high temperature*) o leite é submetido a temperatura mais alta, 135°C, em um menor tempo, de 2 segundos (CLAEYS et al., 2013; PEARCE et al., 2012).

Com relação aos produtos lácteos, o processo de fabricação desses alimentos envolve a capacidade fermentativa de microrganismos, em que as LAB são as principais utilizadas. Essas bactérias são capazes de utilizar carboidratos gerando energia e diferentes compostos orgânicos, que agem como aceptores finais de elétrons. Além disso, os compostos gerados a partir da fermentação auxiliam no aroma e sabor característicos dos produtos lácteos fermentados (JAY, 2005).

## **2.2. Bactérias Ácido Lácticas (LAB)**

### **2.2.1. Características Gerais**

Os alimentos fermentados têm sido utilizados pelo homem a mais de 5000 anos, no entanto, as LAB passaram a ser vistas como um grupo de organismos somente no final do século XIX. As pesquisas de Pasteur a respeito da fermentação ácido láctica entre os anos de 1857 e 1863 contribuíram para que no ano de 1873, a primeira cultura pura de LAB fosse obtida por Lister, denominada *Bacterium lactis*. No ano de 1919, Orla-Jensen classificou essa bactéria como *Streptococcus lactis* e atualmente é classificada como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (KONING; FROHLICH, 2009; JOSEPHSEN; JESPERSEN, 2004).

No ano de 1890, Storch, Weigmann e Conn, de forma independente, adicionaram culturas puras ao leite e identificaram a bactéria *Lactococcus* como um componente essencial para produção de alimentos fermentados. A partir disso, essas culturas começaram a ser utilizadas para a produção de queijos e coalhadas permitindo o início do desenvolvimento da industrialização de alimentos fermentados (KONING; FROHLICH, 2009; VOS et al., 2009).

LAB foram assim definidas, pois a maioria das bactérias utilizadas na fermentação do leite foi capaz de utilizar a lactose, açúcar presente no leite, e produziam como produto principal o ácido láctico. São microrganismos pertencentes ao domínio Bacteria, que é dividido em vinte e quatro filos. O filo Firmicutes é composto por bactérias com características diversas de morfologia, fisiologia e coloração de Gram, dentre elas estão inclusos os mais importantes gêneros de LAB, que são os principais microrganismos utilizados na produção de alimentos fermentados. Além disso, por serem utilizadas para iniciar o processo de fermentação, elas receberam a denominação de culturas *starters* (HAAKENSEN et al, 2008; HUTKINS, 2006; JOSEPHSEN; JESPERSEN, 2004; SUN et. al., 2014).

Especificamente, o termo “bactérias ácido lácticas” não está relacionado a uma classe filogenética de microrganismos, mas sim à capacidade metabólica das espécies desse grupo. São definidas como um grupo de bactérias heterogêneas capazes de produzir ácido láctico, sendo microaerófilas e ácido-tolerantes, que normalmente não produzem a enzima catalase, e apresentam baixo conteúdo GC (guanina e citosina), que está relacionado com a estabilidade do DNA. São bactérias que não formam esporos, são imóveis e podem se apresentar na forma de bacilos e cocos Gram-positivos que compartilham propriedades bioquímicas, genéticas e fisiológicas (BURGAIN at. al., 2014; SUN et. al., 2014).

Em termos de necessidades energéticas, as bactérias podem ser classificadas nutricionalmente, como heterotróficas quimiorganotróficas, o que significa que exigem moléculas orgânicas complexas como fonte de energia, em que estão inclusos aminoácidos, peptídeos, vitaminas, minerais, ácidos graxos e carboidratos. São bactérias importantes devido as suas características fisiológicas, como utilização de substratos, capacidades metabólicas e propriedades probióticas (aditivos alimentares microbianos). Estão presentes em uma variedade de locais como plantas, produtos processados, carnes e produtos vegetais, além de

cavidades humanas, como trato respiratório e gastrointestinal (OZCELIK; KULEY; OZOGUL, 2016; SUN et al., 2014).

Atualmente, as LAB são representadas pelos seguintes gêneros: *Aerococcus*, *Alliococcus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. Os gêneros *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Weissella* incluem bactérias que são aplicadas em indústrias de alimentos com o objetivo de obter produtos lácteos, produtos cárneos, legumes, cereais e vinhos (BURGAIN et. al., 2014).

### **2.2.2. Metabolismo**

As propriedades mais importantes das LAB incluem as relacionadas com o metabolismo de carboidratos a partir da fermentação associada à fosforilação ao nível de substrato. Embora seja um grupo heterogêneo, as LAB apresentam a mesma característica: a capacidade de metabolizar carboidratos e produzir ácido láctico como produto final. Uma vez que, são microrganismos fermentadores, não apresentam o ciclo de Krebs e a obtenção de energia ocorre através da fosforilação de substratos. São bactérias capazes de se adaptar às condições que são impostas e dessa forma, modificar seu metabolismo e seus produtos finais (JAY, 2005; AXELSSON, 2004; GANZLE, 2015).

As LAB podem ser enquadradas em espécies que são exclusivamente homofermentativas, indicando que os carboidratos são fermentados apenas pela via glicolítica; espécies que são exclusivamente heterofermentativas, as quais realizam o processo de fermentação dos carboidratos apenas pela via fosfoacetolase; e espécies heterofermentativas facultativas, que se enquadram numa posição intermediária, que são capazes de realizar o processo homofermentativo para as hexoses, no entanto, assumem um metabolismo heterofermentativo na presença de pentoses (GANZLE; VERMEULEN; VOGEL, 2007; PAPAGIANNI, 2012; REDDY et al., 2008).

### 2.2.2.1. Metabolismo Homofermentativo

No metabolismo homofermentativo, a via utilizada para produção de ácido láctico é a via glicolítica ou Embden-Meyerhof (Figura 1A). Essa via envolve a ação de algumas enzimas, como a *glicoquinase*, capaz de fosforilar a glicose e gerar o composto frutose-1,6-difosfato (FDP). Consequentemente, esse composto, sofre ação de outra enzima, a *frutose-1,6-difosfato aldolase*, que converte o FDP em diidroxiacetona-fosfato (DHAP) e gliceraldeído-3-fosfato (GAP). O piruvato, composto importante do metabolismo, é formado a partir do GAP através de uma sequência de reações com fosforilação ao nível de substrato. Em condições normais, em que se tem quantidade adequada de substrato e acesso limitado ao oxigênio, o piruvato é reduzido a ácido láctico pela enzima *lactato desidrogenase dependente de NAD<sup>+</sup>* (nLDH), reoxidando o NADH formado durante as reações glicolíticas anteriores. Dessa forma, no metabolismo homofermentativo é possível obter duas moléculas de ácido láctico e um ganho energético de duas moléculas de ATP (GASPAR et al., 2013; MARTINEZ et al., 2013; REDDY et al., 2008).

Em situações críticas, como o aumento do pH, diminuição do crescimento microbiano ou quando a taxa glicolítica se torna baixa e tem a presença de outras fontes de carbono, as bactérias que realizam o metabolismo homofermentativo podem passar a produzir outros compostos além do ácido láctico, como formiato, acetato e etanol, em que o piruvato passa a ser utilizado por outra via metabólica (MARTINEZ et al., 2013; ZAUNMULLER et al., 2006).

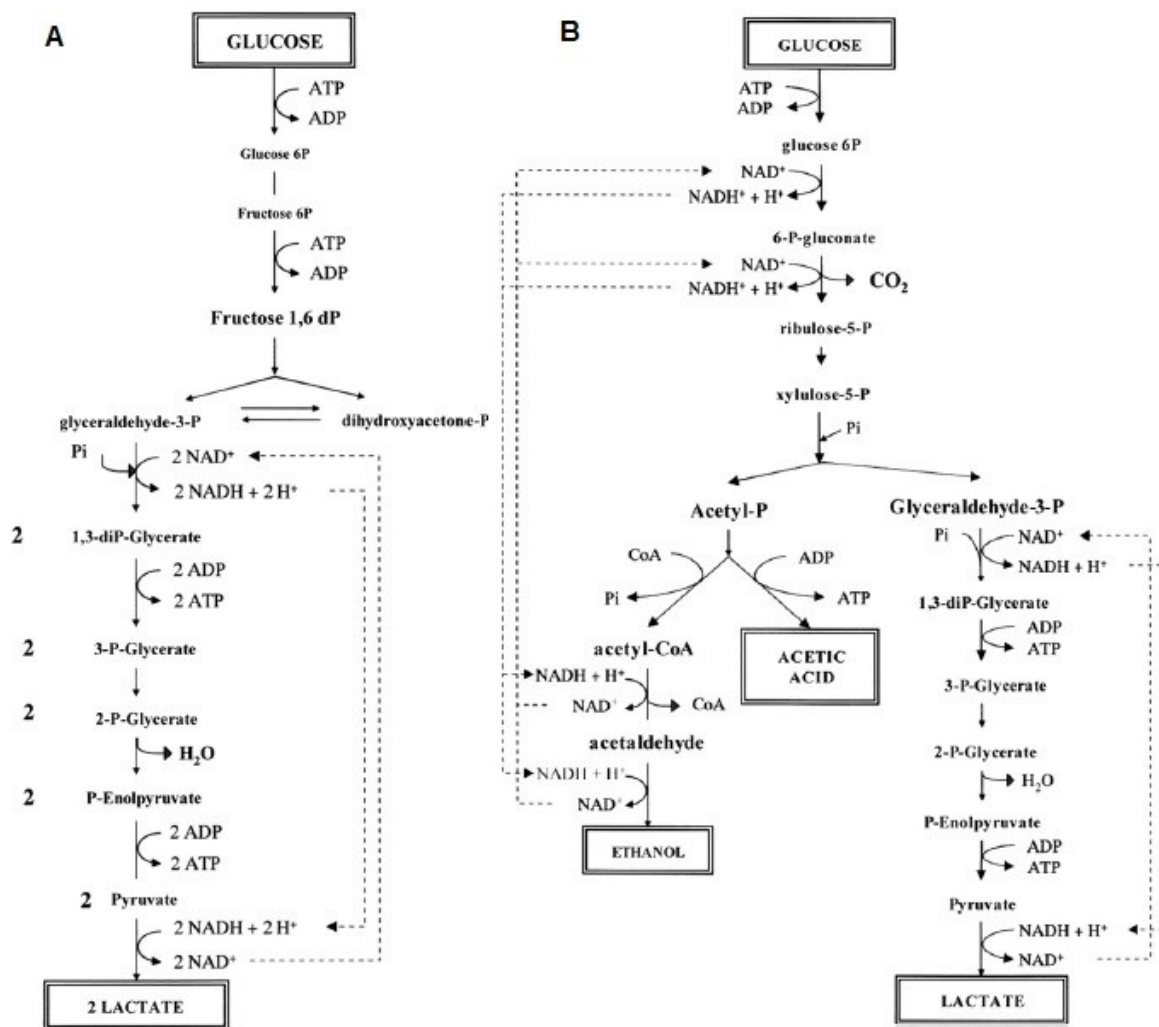
### 2.2.2.2. Metabolismo Heterofermentativo

No metabolismo heterofermentativo, a via utilizada para produção de ácido láctico é a 6-fosfogluconato ou fosfocetolase (Figura 1B). Essa via é caracterizada por reações de desidrogenação e descarboxilação. A glicose é convertida em 6-fosfogluconato pelo processo de desidrogenação, em seguida, há formação da ribulose-5-fosfato pelo processo de descarboxilação e posteriormente sua conversão a xilulose-5-fosfato. Essa pentose é convertida em GAP e acetil-fosfato pela enzima *fosfocetolase*. O composto GAP é metabolizado através da via glicolítica, resultando na formação de ácido láctico. Quando não há um aceptor de elétrons disponível, o composto acetil-fosfato pode ser convertido em etanol ou ácido acético. O produto final formado depende da capacidade do microrganismo em reoxidar o NADH

gerado em reações anteriores, além da sua necessidade energética (GASPAR et al., 2013; MARTINEZ et al., 2013; RODRIGUES, C. et al., 2017).

Dessa forma, em condições normais, o metabolismo heterofermentativo permite obter uma molécula de ácido láctico, etanol e  $\text{CO}_2$ , com ganho de uma molécula de ATP. Além disso, se o microrganismo for capaz de reoxidar o NADH, o ácido acético poderá ser formado permitindo a obtenção de duas moléculas de ATP e NADH (MARTINEZ et al., 2013; REDDY et al., 2008).

**Figura 1** – A- Metabolismo Homofermentativo; B- Metabolismo Heterofermentativo (MARTINEZ et al., 2013).



### **2.2.2.3. Metabolismo Heterofermentativo Facultativo**

No metabolismo heterofermentativo facultativo estão inclusas LAB capazes de realizar tanto o processo de fermentação das hexoses quanto de pentoses. Para a fermentação das hexoses, essas LAB utilizam a via glicolítica, como o metabolismo homofermentativo. No entanto, são bactérias capazes de utilizar as pentoses como fonte energética e assim utilizam a via fosfoctolase, conforme o metabolismo heterofermentativo (GAO; MA; XU, 2011).

De um modo geral, as LAB têm seu metabolismo relacionado com sua aplicação em alimentos devido a capacidade de melhorar suas características organolépticas, tecnológicas e de prateleira. A possibilidade de adicionar as LAB diretamente no leite permite que a indústria tenha mais controle sobre o processo de fermentação e sobre o produto final. As LAB têm a capacidade de iniciar o processo de fermentação de forma rápida e adequada produzindo ácidos, nos quais o ácido láctico é o mais abundante. Além disso, a produção de outros compostos, como os compostos aromáticos, CO<sub>2</sub> e bacteriocinas, permite direcionar o uso dessas bactérias de acordo com o seu metabolismo para o produto final que se deseja. Por exemplo, o diacetil produzido por algumas LAB confere um sabor semelhante ao iogurte. Outro exemplo é a capacidade de algumas LAB produzirem CO<sub>2</sub>, sendo interessante para produção de alguns tipos de queijo, como o queijo Minas Frescal (FLOROU-PANERI; CHRISTAKI; BONOS, 2013; LEDENBACH; MARSHALL, 2009).

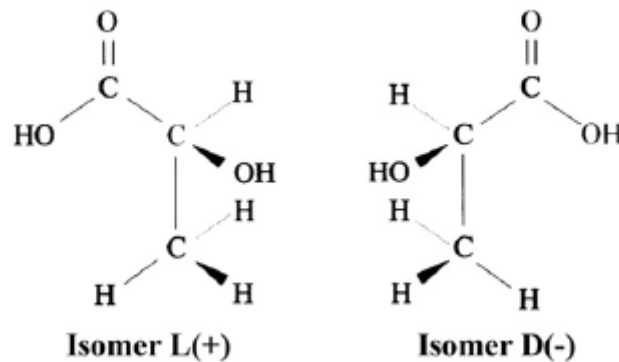
### **2.2.3. Ácido Láctico**

O ácido láctico foi descoberto no ano de 1780 pelo químico sueco Karl Wilhelm Scheele a partir do leite azedo, mas somente no ano de 1789 o composto foi nomeado como ácido láctico por Lavoisier. No ano de 1808, o químico sueco Jons Jakob Berzelius descreveu a presença do ácido láctico em fluidos extraídos de carne e posteriormente, o químico alemão Justus von Liebig provou a presença de ácido láctico em tecidos musculares de organismos mortos. No ano de 1857, Pasteur descobriu que o ácido láctico era um produto do processo de fermentação de microrganismos (KOMPANJE et al., 2007; RODRIGUES, C. et al., 2017).

O ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanóico) é um ácido orgânico com a fórmula molecular C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>. É uma molécula quiral, ou seja, se apresenta na forma de dois

enantiômeros, L(+)-ácido láctico e D(-)-ácido láctico (Figura 2). Pode ser obtido quimicamente a partir de matérias-primas petroquímicas, no entanto, o composto obtido é sempre uma mistura racêmica dos enantiômeros: DL-ácido láctico. A obtenção do ácido láctico opticamente puro, L(+)-ácido láctico ou D(-)-ácido láctico, ocorre através da fermentação microbiana, o que é importante para as utilizações comerciais. Dessa forma, atualmente cerca de 90% do ácido láctico comercial é obtido através de fermentação microbiana de açúcares (WEE; KIM; RYU, 2006; SUBRAMANIAN; TALLURI; CHRISTOPHER, 2014; RODRIGUES, C. et al., 2017).

**Figura 2** – Estrutura dos isômeros L(+) e D(-) do ácido láctico (MARTINEZ et al., 2013).



#### 2.2.4. Gênero *Lactococcus*

O gênero *Lactococcus* foi proposto por Schleifer e colaboradores no ano de 1985 para reclassificar algumas espécies de *Streptococcus* (grupo N de Lancefield) e *Lactobacillus*, o que foi confirmado a partir de estudos de quimiotaxonomia incluindo o sequenciamento de RNAr 16S. Está descrito como membro da família Streptococcaceae e ordem Lactobacillales (CASALTA; MONTEL, 2008; TEUBER; GEIS, 2006)

De acordo com a base de dados *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* (LPSN), atualmente o gênero *Lactococcus* inclui doze espécies distintas: *L. lactis*, *L. chungangensis*, *L. formosensis*, *L. fujiensis*, *L. hircilactis*, *L. laudensis*, *L. nasutitermitis*, *L. taiwanensis*, *L. garviae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, e *L. raffinolactis*. Entre as espécies, *L. lactis* apresenta quatro subespécies descritas: *L.*

*lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *hordniae* e *L. lactis* subsp. *tractae* (LIU et al., 2014; PARTE, 2014).

São bactérias que se apresentam na forma de cocos Gram positivos em pares ou cadeias curtas, imóveis, anaeróbios facultativos e com um metabolismo homofermentativo. São capazes de utilizar a lactose como fonte energética, principalmente a espécie *L. lactis*, e realizar o metabolismo do citrato. São  $\alpha$ -hemolíticas, possuem um crescimento ótimo em temperatura próxima a 30°C e produzem exclusivamente L(+)-ácido láctico. São encontradas em plantas, como milho e alface, e geralmente está presente no leite cru por ser um microrganismo comum da microbiota do animal (CASALTA; MONTEL, 2008; HUTKINS, 2006; SAMARZIJA; ANTUNAC; HAVRANEK, 2001).

Atualmente, dentro do gênero *Lactococcus*, apenas as subespécies *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* são significantes para fermentação de produtos lácteos e utilizadas como cultura *starter*, ou seja, a sua presença em grande quantidade na matéria-prima auxilia na fermentação, acelerando o processo. A presença dessas bactérias no leite cru está associada à rápida produção de ácido láctico, tornando o pH do leite baixo, o que contribui para o processo de maturação. Além disso, de acordo com as condições em que são submetidas, essas bactérias são capazes de produzir outros compostos como ácido acético, etanol, bacteriocinas e compostos aromáticos que contribuem na textura, vida útil e sabor dos produtos lácteos (LEROY; VUYST, 2004; RUGGIRELLO; COCOLIN; DOLCI, 2016).

A presença de *L. lactis* no leite cru está relacionada com características codificadas por plasmídeos, como a capacidade de metabolizar lactose, proteínas do leite e outros nutrientes complexos; a capacidade de resistir a tensões ambientais, como bacteriófagos e variações de temperatura; e vantagens de colonização seletiva pela produção de bacteriocinas e exopolissacarídeos. Por serem elementos móveis, os plasmídeos presentes nessas bactérias são trocados entre diferentes cepas através do processo de conjugação, e em outros casos, o DNA plasmidial pode integrar-se dentro do cromossomo, resultando em cepas derivadas estáveis e altamente adaptadas. No entanto, os plasmídeos são comuns no gênero *Lactococcus*, mesmo em cepas isoladas de fontes não lácteas, variando em tamanho de 2 a 80 kb (FALLICO et al., 2011; SIEZEN et al, 2005).

As subespécies *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* podem ser diferenciadas de acordo com alguns aspectos fisiológicos, que são significativos durante as fermentações do leite. A maioria das cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* são capazes de crescer até a temperatura de 40°C, enquanto que a maioria das cepas de *L. lactis* subsp. *cremoris* não crescem acima de 38°C; *L. lactis* subsp. *lactis* tem maior tolerância ao sal (até 4%) do que *L. lactis* subsp. *cremoris*, além de ser capaz de hidrolizar o aminoácido arginina (HUTKINS, 2006; LIU et al., 2014).

Apesar disso, observou-se recentemente que existem cepas de *L. lactis* subsp. *lactis* que têm um genótipo "lactis", mas um fenótipo tipo "cremoris". Do mesmo modo, existem estirpes de *L. lactis* subsp. *cremoris* que têm um genótipo "cremoris", mas um fenótipo tipo "lactis". Além disso, a subespécie *L. lactis* subsp. *lactis* apresenta uma variante, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* que é capaz de utilizar citrato e produzir diacetil, composto que confere sabor aos produtos lácteos (HUTKINS, 2006; SAMARZIJA; ANTUNAC; HAVRANEK, 2001).

### 2.2.5. Gênero *Leuconostoc*

As bactérias do gênero *Leuconostoc* pertencem a família *Leuconostocaceae*, que também inclui gêneros como *Weissella* e *Oenococcus*. No ano de 2008, Endo e Okada propuseram reclassificar várias espécies de *Leuconostoc* no gênero *Fructobacillus*, no entanto, no ano de 2009, Schleifer realizou análise das sequências de RNA<sub>r</sub> 16S, o que permitiu a classificação atual (KOT et al., 2014).

Atualmente, o gênero *Leuconostoc* inclui vinte e quatro espécies, de acordo com a base de dados *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* (LPSN): *Ln. amelibiosum*, *Ln. argentinum*, *Ln. carnosum*, *Ln. citreum*, *Ln. cremoris*, *Ln. dextranicum*, *Ln. durionis*, *Ln. fallax*, *Ln. ficulneum*, *Ln. fructosum*, *Ln. gasicomitatum*, *Ln. gelidum*, *Ln. holzapfelii*, *Ln. inhae*, *Ln. kimchii*, *Ln. lactis*, *Ln. mesenteroides*, *Ln. miyukkimchii*, *Ln. oeni*, *Ln. palmae*, *Ln. paramesenteroides*, *Ln. pseudoficulneum*, *Ln. pseudomesenteroides* e *Ln. rapi* (PARTE, 2014).

Entre as espécies, *Ln. gelidum* apresenta três subespécies: *Ln. gelidum* subsp. *gelidum*, *Ln. gelidum* subsp. *gasicomitatum* e *Ln. gelidum* subsp. *aenigmaticum*, e *Ln. mesenteroides* apresenta quatro subespécies: *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Ln. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Ln.*

*mesenteroides* subsp. *mesenteroides* e *Ln. mesenteroides* subsp. *suionicum* (PARTE, 2014).

Esse gênero inclui bactérias que se apresentam na forma de cocos Gram positivos em pares ou cadeias, anaeróbios facultativos e catalase negativa. Realizam o metabolismo heterofermentativo, com produção de CO<sub>2</sub> juntamente com D(-)-ácido lático, etanol ou acetato. São bactérias mesofílicas, ou seja, são capazes de se multiplicar entre 10 e 45°C. Estão presentes em vegetais e raízes, e por esse motivo, se propagam facilmente para outros nichos. Além disso, pode estar presente no leite cru, uma vez que, esse gênero bacteriano é componente da microbiota do animal (HEMME; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, 2004; OGIER et al., 2008).

As principais espécies do gênero utilizadas como cultura *starter* são *Ln. mesenteroides* e *Ln. pseudomesenteroides*. Por realizarem o metabolismo heterofermentativo, são capazes de produzir ácido lático, ácido acético e etanol, e, além disso, são utilizados para a fabricação de alguns tipos de queijo devido sua capacidade de produzir CO<sub>2</sub>. Têm importante papel na formação do aroma e textura dos produtos fermentados. *Ln. mesenteroides* e *Ln. lactis* são capazes de metabolizar o citrato e produzem compostos aromáticos importantes, como o diacetil e a acetoina (LI et al., 2012; OGIER et al., 2008; POGACIC et al., 2014).

De um modo geral, as LAB tem a capacidade de produzir diversos compostos a partir de seu metabolismo e dentre esses compostos, as bacteriocinas ganham destaque por atuarem contra microrganismos. Constituem um grupo heterogêneo de peptídeos com diferentes tamanhos, estrutura e modo de ação, e são produzidos por diferentes espécies bacterianas (DOBSON et al., 2012).

### **2.2.6. Bacteriocinas**

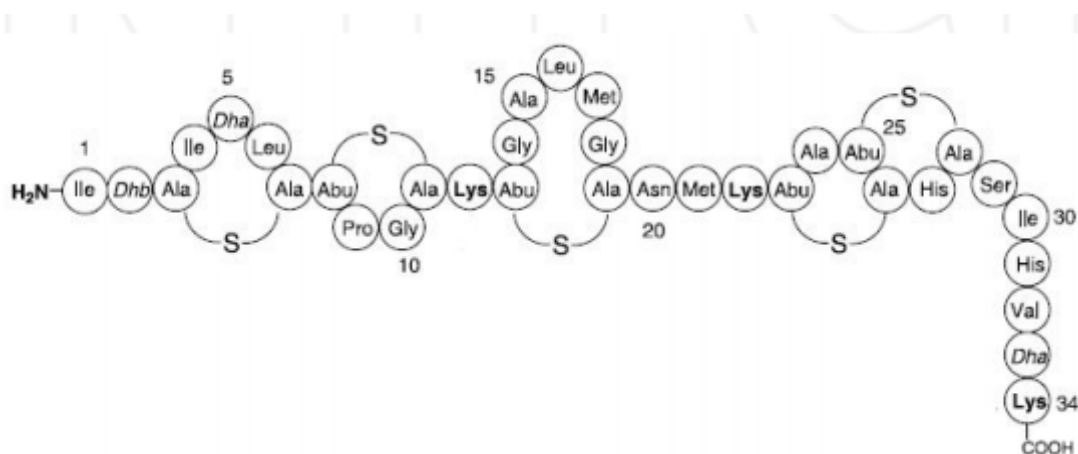
As bacteriocinas podem ser definidas como peptídeos que são liberados para o meio extracelular e apresentam propriedades antimicrobianas contra determinadas espécies de microrganismos (WORAPRAYOTE et al., 2016). Várias bactérias têm a capacidade de produzir essas substâncias, embora as Gram positivas ganhem destaque por produzirem bacteriocinas com maior capacidade de inibição. Atualmente, as bacteriocinas produzidas por LAB são as mais estudadas, pois a maioria dessas bactérias está presente em alimentos e são consideradas como

bactérias GRAS (Generally Recognized as Safe) e QPS (Qualified Presumption of Safety), permitido pelo FDA (Food and Drug Administration – Estados Unidos) e EFSA (European Food Safety Authority), respectivamente (FRAQUEZA, 2015; WORAPRAYOTE et al., 2016).

Apesar de possuírem atividade antimicrobiana, as bacteriocinas não são consideradas antibióticos. Normalmente, elas apresentam uma ação antimicrobiana contra cepas bacterianas estritamente relacionadas e que estão presentes no mesmo ambiente das bactérias produtoras, enquanto os antibióticos possuem um espectro de ação mais amplo. Além disso, as bacteriocinas são produzidas a nível ribossomal durante a fase inicial de crescimento bacteriano, enquanto os antibióticos são metabólitos secundários (CAVERA et al., 2015; WORAPRAYOTE et al., 2016).

Normalmente, as bacteriocinas são sintetizadas na forma de um pré-peptídeo inativo formado por um peptídeo-líder N-terminal e um pró-peptídeo C-terminal. A ligação da porção N-terminal mantém as bacteriocinas inativas antes de serem secretadas pela bactéria e por isso, a clivagem e remoção dessa porção é importante para a ativação das bacteriocinas. Somente após essa clivagem, ocorre sua liberação para o exterior da célula. A figura 3 representa a estrutura da bacteriocina nisina produzida por *L. lactis* subsp. *lactis* e algumas espécies do gênero *Streptococcus* (NISHIE; NAGAO; SONOMOTO, 2012; SHIN et al., 2015).

**Figura 3** - Representação esquemática da nisina, variante A, produzida por *L. lactis* subsp. *lactis* (JOZALA; NOVAES; JUNIOR, 2015).



A nisina é uma bacteriocina composta por 34 aminoácidos, pertencente à classe dos lantibióticos. É um composto importante por apresentar amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Sua produção ocorre na fase exponencial de crescimento das bactérias *L. lactis* subsp. *lactis* e *Streptococcus* sp., e sua produção diminui quando as bactérias entram na fase estacionária. Por ser da classe dos lantibióticos, a nisina é composta por alguns aminoácidos incomuns, como lantionina,  $\beta$ -metil-lantionina e dehidro-alanina, que conferem algumas propriedades importantes à esse peptídeo, como tolerância a baixo pH, termoestabilidade e modo de ação bactericida específica (SHIN et al., 2015; SOBRINO-LÓPEZ, MARTÍN-BELLOSO, 2008).

A ação da nisina ocorre na membrana citoplasmática da bactéria alvo, em que interfere na biossíntese da parede celular, levando à formação de poros que causam o extravasamento de íons e hidrólise de ATP. Atualmente, oito variantes de nisina já foram identificadas, em que as variantes A, Z, Q, e F são produzidas por *L. lactis* subsp. *lactis* e as variantes H, U, U2 e P são produzidas por *Streptococcus* sp. Essas variantes são diferenciadas umas das outras pelas alterações dos aminoácidos que as compõe, o que interfere na sua atividade antimicrobiana (ALEGRÍA et al., 2010; ARAUZ et al., 2009).

Atualmente são conhecidas diversas aplicações da nisina, sendo a mais conhecida como conservante alimentício. A nisina é a única bacteriocina permitida em alimentos e avaliada como segura para o uso pela FAO/OMS (Joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization). Tem como característica não alterar as características naturais dos alimentos e ser sensível a digestão por proteases presentes no sistema digestório humano. A adição de nisina em queijos é permitida pela FAO/OMS a uma concentração de 12,5 mg/kg de alimento, no entanto, alguns países, como a Espanha, Brasil e Argentina, apresentam legislação própria com relação ao uso desse conservante. Além disso, tem se demonstrada a possibilidade do uso dessa bacteriocina no tratamento de dermatites, cárie dental, úlceras estomacais e no controle de infecções respiratórias causadas por *S. aureus* devido sua atividade antibacteriana (ARAUZ et al., 2009; BALCIUNAS et al., 2013; TONG; NI; LING, 2014).

As bacteriocinas produzidas por LAB são pequenas (< 10 kDa), catiônicas, termoestáveis e anfifílicas. Normalmente, atuam na membrana citoplasmática da

bactéria alvo em duas fases distintas. A primeira fase consiste na adsorção da bacteriocina em receptores presentes na membrana celular da bactéria o que é facilitada quando os valores de pH são baixos (menores que 5). A segunda fase ocorre com a inserção da bacteriocina na membrana ocasionando modificações no seu potencial e no gradiente das concentrações de hidrogênio. Como consequência, há formação de poros na membrana e alterações na produção de ATP, comprometendo a viabilidade da célula bacteriana (GHRAIRI; CHAFTAR; HANI, 2012; NES; YOON; DIEP, 2007).

A produção de bacteriocinas por LAB é influenciada por alguns fatores, como pH, fonte de nutrientes e temperatura. Normalmente, um pH em torno de 6, fontes de carbono e nitrogênio suficientes e temperatura próxima a 30°C são condições ideais. Outro fator importante é a presença de cloreto de sódio, que em grandes quantidades diminui os níveis de produção desses compostos. Além disso, a produção está relacionada diretamente ao crescimento celular, uma vez que, a produção ocorre durante a fase exponencial até o início da fase estacionária da bactéria (CHEIGH et al., 2002; VUYST; LEROY, 2007; YUSUF; HAMID, 2012).

De um modo geral, as bacteriocinas podem ser classificadas em quatro classes principais e subclasses de acordo com o organismo produtor, tamanho molecular, propriedades físicas, estruturas químicas, modo de ação, entre outros (ZACHAROF; LOVITT, 2012).

A classe I, também chamada de lantibióticos, inclui peptídeos que apresentam tamanho inferior a 5 kDa, são ativos a nível de membrana, podem sofrer modificações pós-traducionais e contém alguns aminoácidos incomuns, como a lantionina,  $\beta$ -metil-lantionina e dehidro-alanina. Essa classe é subdividida em duas subclasses de acordo com a atividade antimicrobiana e estrutura química da bacteriocina. A classe II, também chamada de não-lantibióticos, inclui peptídeos que apresentam tamanho inferior a 10 kDa, não sofrem modificações pós-traducionais e têm como característica serem termoestáveis. Essa classe é subdividida em quatro subclasses (LAFUENTE-RINCÓN; CHÁVEZ; FUENTE-SALCIDO, 2016; ZACHAROF; LOVITT, 2012).

A classe III inclui bacteriocinas de peso molecular acima de 30 kDa, produzidas principalmente por bactérias Gram-positivas e que têm como

característica serem termolábeis. A classe IV inclui bacteriocinas circulares, que necessitam de uma porção lipídica ou uma porção de carboidrato ligada à porção proteica para terem uma atividade completa (MORACANIN; DUKIC; MEMISI, 2014; NES; YOON; DIEP, 2007).

No gênero *Lactococcus*, a espécie *L. lactis* (incluindo as subespécies *L. lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) é responsável pela produção de diferentes bacteriocinas, dentre elas a nisina, atualmente a mais estudada e aplicada. É capaz de inibir bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos, como *S. aureus* e *L. monocytogenes*. Outras bacteriocinas da classe I produzidas pela espécie incluem a lacticina 481 e lacticina 3147. Bacteriocinas da classe II também são produzidas por essa espécie e inclui a lactococina MMFII (classe IIa), lactococina G e M (classe IIb), lactococina B (classe IIc) e lactococina A (classe IId) (OPPEGARD et al., 2007; PISANO et al., 2015; ZACHAROF; LOVITT, 2012).

No gênero *Leuconostoc* muitas cepas produzem as bacteriocinas, sendo que a leucocina A e leucocina C, ambas da classe IIa, estão entre as mais estudadas. A espécie *Ln. mesenteroides* é capaz de produzir bacteriocinas como as leucocinas A e C (classe IIa), leucocina B (classe IId) e mesenterocina (classe IIa). A espécie *Ln. pseudomesenteroides* produz a leucocina A (classe IIa) e as leucocinas Q e N (classe IId). Bacteriocinas produzidas por esse gênero ganham destaque por serem biopreservativos em alimentos contra o crescimento da bactéria *L. monocytogenes* (OSMANAGAOGLU; KIRAN, 2011; WAN; SARIS; TAKALA, 2015).

### **2.2.7. Aplicações das LAB**

Atualmente, as LAB estão sendo utilizadas em vários processos biotecnológicos. Podem ser utilizadas como culturas *starters*, que participam do processo de fermentação, ou como culturas não-*starters*, que participam do processo de maturação. Também podem ser utilizadas culturas probióticas, tanto para alimento humano quanto como aditivo para a alimentação animal. Para isso, as bactérias são selecionadas de acordo com sua taxa de acidificação, produção de aroma e de acordo com seu efeito na saúde do homem/animal. Assim, a produção dessas culturas normalmente é otimizada com o objetivo de obter contagens

celulares viáveis elevadas, melhor sobrevivência ao estresse e vida útil prolongada (SETTANNI; MOSCHETTI, 2010; TEUSINK; SMID, 2006).

O ácido láctico é o principal produto da fermentação das LAB, podendo ser utilizado como substrato para produção de vários compostos, como ácido propiônico, ácido acético, propilenoglicol, etanol e acetaldeído. Esses compostos podem ser utilizados em processos biotecnológicos, como na fabricação de polímeros biodegradáveis, na formulação de cosméticos, entre outros. No entanto, o principal uso do ácido láctico está relacionado com alimentos, em que é usado como acidulante, aromatizante, agente tamponante e inibidor bacteriano (DATTA; HENRY, 2006; TEUSINK; SMID, 2006).

Os compostos que conferem aroma podem ser derivados da utilização da glicose pelas LAB, incluindo diacetil, acetoína e ácido acético, ou derivados da utilização de proteínas, gerando peptídeos e aminoácidos, que confere aroma característico associado a álcoois, aldeídos, ácidos e ésteres. A utilização de lipídeos contribui pouco para o aroma, no entanto, seus derivados são importantes em alguns queijos, como o Roquefort. Muitos desses compostos, além de conferirem aroma, são importantes para inibição de agentes deteriorantes dos alimentos, como as bacteriocinas (LEROY; VUYST, 2004; SMIT; SMIT; ENGELS, 2005).

As LAB também são capazes de produzir os exopolissacarídeos (EPS) que conferem características envolvendo a textura dos alimentos, sendo utilizados como agentes viscosificantes, estabilizantes e emulsionantes. Além disso, algumas espécies, como *Lactococcus lactis*, tem a capacidade de produzir vitaminas, dentre elas a riboflavina (B2) e folato (B11) que permitem fortalecer alimentos como soja, leite, carnes e vegetais (CAGGIANIELLO; KLEEREBEZEM; SPANO, 2016; SMIT; SMIT; ENGELS, 2005).

### **2.3. Agentes Patogênicos**

Muitas doenças são transmitidas por alimentos por uma diversidade de agentes patogênicos, como bactérias, fungos, vírus e parasitas. Em todo o mundo, as pessoas sofrem de doenças como diarreia, disenteria e intoxicações alimentares causadas diretamente por diversos patógenos presentes em alimentos. Além disso, existem os microrganismos capazes de causar deterioração nos alimentos, gerando

perdas econômicas. Atualmente, as bactérias constituem os maiores agentes etiológicos de doenças relacionadas com o consumo de produtos lácteos, correspondendo cerca de 90% dos casos (HAGHI et al., 2015; OLIVER; JAYARAO; ALMEIDA, 2005; PINU, 2016).

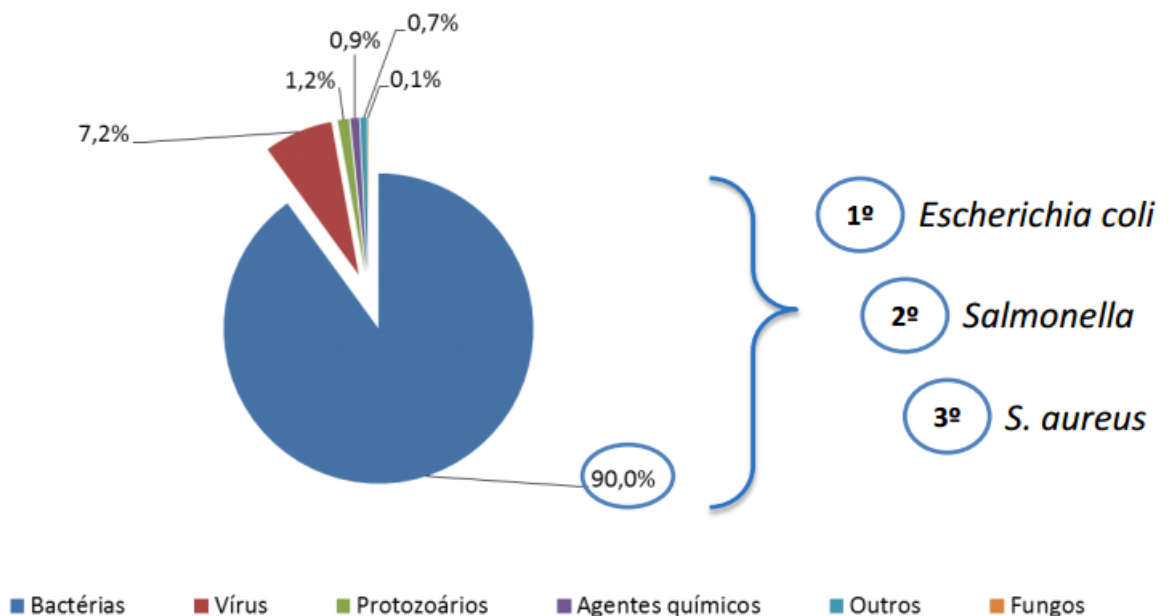
*E. coli* é uma bactéria que está presente na microbiota do trato gastrintestinal de humanos e outros animais, e sua presença em alimentos está associada principalmente com a contaminação fecal de forma direta ou indireta. Com relação ao leite e produtos lácteos, a sua presença nesses alimentos pode ser relacionada com a capacidade de cepas de *E. coli* causarem mastite em bovinos, ocasionando contaminação direta do animal durante a ordenha. Algumas cepas de *E. coli* podem ser patogênicas para o homem por adquirirem genes de virulência, causando diarreia, sendo referidas como *E. coli* diarreiogênica (DEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Atualmente, de acordo com o SINAN-MS (Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Ministério da Saúde), *E. coli* é a principal espécie bacteriana relacionada com doenças transmitidas por alimentos no Brasil (Figura 4). Pode estar presente em alguns produtos lácteos e os valores limites são determinados pela legislação. Quando esses valores são ultrapassados indicam más condições sanitárias durante a produção, armazenamento, transporte e comercialização do produto (FUJIOKA; OTOMO; AHSAN, 2012; GUILLÉN; MILLÁN; ARAQUE, 2014).

*S. aureus* é uma bactéria presente na microbiota humana e de animais, no entanto, é um patógeno importante de origem alimentar. Normalmente, está relacionada a infecções hospitalares, nosocomiais e de acordo com o SINAN-MS (Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Ministério da Saúde), atualmente *S. aureus* está em terceiro lugar no ranking de bactérias causadoras de doenças transmitidas por alimentos no Brasil (Figura 4). Ocorre pela ingestão de enterotoxinas produzidas pela bactéria presente nos alimentos. O isolamento de *S. aureus* em leite e produtos lácteos tem sido muito frequente, sendo um risco potencial para a saúde humana, uma vez que, a eliminação da bactéria por tratamentos térmicos como a pasteurização, não indica a eliminação das toxinas formadas antes do processo. A presença dessa bactéria nos alimentos indica práticas inadequadas de manipulação, transporte e armazenamento do alimento (DALLAL et al., 2016; NECIDOVA et al., 2016).

A mastite é uma infecção das glândulas mamárias de animais, como os bovinos, causada por uma variedade de bactérias, incluindo *E. coli* e *S. aureus*, citados anteriormente. É uma infecção que gera grande impacto na saúde animal e na produção de leite. Normalmente a idade do animal, seu estágio de lactação e condições higiênico-sanitárias dos equipamentos de ordenha, são fatores de risco para a mastite influenciando na invasão bacteriana e no sistema imunológico dos bovinos. É um problema mundial, sendo necessário o tratamento com antibióticos quando ocorre. No entanto, a prevenção é importante a fim de evitar o aumento da resistência bacteriana (EISENBERG et al., 2016; MCMILLAN et al., 2016).

**Figura 4** – Perfil epidemiológico de microrganismos envolvidos em doenças transmitidas por alimentos no Brasil entre os anos de 2007 e 2016 (SINAN-MS).

### Brasil, 2007 a 2016



#### 2.3.1. *E. coli*

*E. coli* foi descoberta em 1885, pelo pesquisador Theodor Escherich, em que encontrou a bactéria presente no trato gastrointestinal humano. É um membro da família Enterobacteriaceae, com metabolismo anaeróbico facultativo, podendo crescer na presença ou ausência de oxigênio. Morfologicamente se apresenta como bacilo Gram-negativo, pode ser móvel ou imóvel e tem a capacidade de crescer

entre temperaturas de 15-48°C, e sua temperatura ótima de crescimento está entre 37 a 42°C. É capaz de crescer entre pH de 5.5 a 8.0, no entanto, cresce melhor em pH neutro. É uma espécie que está presente no trato gastrointestinal humano e de animais, e quando encontrada em locais como solo e água, é associada a contaminação fecal do ambiente (SHULMAN; FRIEDMANN; SIMS, 2007).

Algumas cepas bacterianas não oferecem risco ao homem por fazerem parte da microbiota, enquanto outras cepas são patogênicas podendo causar principalmente, doenças no trato gastrointestinal e também doenças extraintestinais (HAYHURST, 2004; WELCH, 2006).

Alguns fatores estão envolvidos na capacidade da *E. coli* ser patogênica. A capacidade de adaptação nos diferentes meios, assim como a competição por nutrientes com outras espécies, estão relacionadas com expressão ou inibição de genes, envolvendo processos de mutações, alterações de bases nitrogenadas, perdas, duplicação e rearranjo de genes. A diversidade patogênica dessa bactéria está associada à aquisição de genes de virulência através da transferência horizontal de genes. Elementos genéticos móveis, como plasmídeos e ilhas de patogenicidade, são adquiridos e dão características importantes para as cepas bacterianas. Com isso, as cepas são classificadas em patotipos, de acordo com suas características únicas de virulência (HAYHURST, 2004; WILLIAMS; TORRES; LLOYD, 2010).

Embora a espécie *E. coli* seja classificada de acordo com a sorologia dos antígenos somático (O e K) e flagelar (H), a classificação em patotipos tem sido utilizada para referir-se a um grupo de cepas que causam determinadas doenças utilizando fatores de virulência em comum. Oito categorias distintas de patotipos de *E. coli* patogênicas ao homem podem ser descritas e estão classificadas dentro de dois tipos: *E. coli* extraintestinal (ExPEC) e *E. coli* diarreiogênica (DEC). Apenas dois patotipos são classificadas como ExPEC e inclui *E. coli* uropatogênica (UPEC) e *E. coli* associada à meningite neonatal (NMEC). Com relação à DEC, seis patotipos estão inclusos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de Shiga-toxina (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

*E. coli* é frequentemente relacionada com contaminação em alimentos, sendo que o leite cru apresenta características e condições ideais para seu crescimento. A principal forma de contaminação por *E. coli* em leite e produtos lácteos ocorre durante a ordenha do leite, devido às más condições higiênico-sanitárias durante o processo. Dentre os patótipos, STEC é atualmente a mais relacionada com contaminação de leite e produtos lácteos, uma vez que, está frequentemente presente no trato gastrintestinal de bovinos, podendo ou não causar doença nesses animais. ETEC é um patótipo importante que causa diarreia aquosa e doença de origem alimentar semelhante a cólera, atingindo todas as faixas etárias. É transmitida por água e alimentos contaminados, como leite e produtos lácteos, sendo um dos patótipos mais comuns em países em desenvolvimento (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014; KUMAR; PRASAD, 2010; OMBARAK et al., 2016; NOBILI et al., 2016; QADRI et al., 2005).

Ntuli, Njage e Buys (2016) analisaram 258 amostras de leite cru (154) e pasteurizado (104) coletados de oito províncias da África do Sul. Foram verificados os fatores de virulência, resistência a antimicrobianos e sorotipos para caracterização dos isolados encontrados. Como resultado, foi detectada *E. coli* em 93 amostras de leite, 54 de leite cru e 37 de leite pasteurizado. Além disso, 31 isolados apresentaram os genes de virulência *stx1/stx2*, característico de STEC. Além disso, foi verificada a resistência a antimicrobianos em 65 dos isolados de *E. coli*, sendo que 12 dos isolados positivos para *stx1/stx2* mostraram multirresistência para cefalotina, amoxicilina, neomicina, ampicilina, entre outros.

Msolo, Igbinosa e Okoh (2016) analisaram amostras de leite cru e suabes coletadas de máquinas de ordenha, do úbere bovino e das mãos dos manipuladores de junho a novembro de 2014 na África do Sul. Durante esse período isolaram 252 cepas de *E. coli* e 27 dos isolados foram positivos para *E. coli* O157:H7. Foi verificada a susceptibilidade desses isolados a 17 antimicrobianos, e como resultado observaram resistência à penicilina (23), tetraciclina (22), eritromicina (19), estreptomicina (14) e cloranfenicol (12). Com esse estudo foi possível verificar que as fazendas produtoras podem ser potenciais reservatórios de *E. coli* O157:H7 e que podem ser resistentes a antibióticos.

Stella (2009) verificou a presença de STEC e ETEC em amostras de fezes bovinas, leite e água de propriedades leiteiras de São Paulo, Brasil. Das amostras

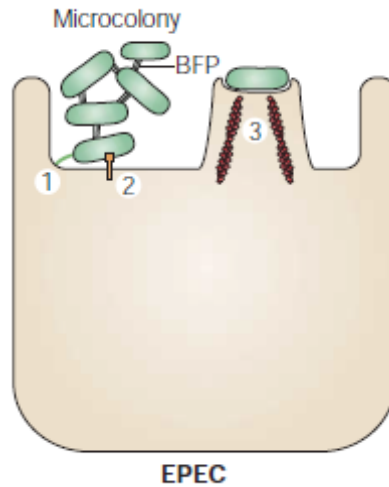
de água foram obtidos 19 isolados, do leite foram obtidos 7 isolados e das fezes bovinas foram obtidos 466 isolados de *E.coli*, totalizando 473 isolados. Como resultado verificaram que 96 amostras de fezes bovinas foram positivas para STEC, em que 53 isolados apresentaram o gene *stx1*, 33 isolados apresentaram o gene *stx2* e 10 isolados apresentaram ambos os genes. Além disso, 30 amostras de fezes bovinas apresentaram *E. coli*, patotipo ETEC. Nenhuma amostra de água foi positiva para STEC e ETEC. No entanto, 3 amostras de leite apresentaram o gene *stx1* e 1 amostra foi positiva para *stx2*. Com relação a ETEC, 1 amostra de leite apresentou esse patotipo de *E. coli*. Esses estudos demonstram a importância da detecção e controle de DEC, descritas a seguir.

#### **2.3.1.1. *E. coli* enteropatogênica (EPEC)**

EPEC inclui cepas responsáveis por diarreia infantil em muitos países desenvolvidos. As cepas estão inclusas dentro de sorotipos O:H específicos e dentro de doze sorogrupos O diferentes: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142, e O158. São caracterizadas por produzirem um padrão de adesão em células teciduais chamada aderência localizada (LA), em que a bactéria se liga na superfície celular formando agregados bacterianos. Essa ligação ocorre através de fimbrias do tipo IV presentes na superfície bacteriana e são denominadas *bundle forming pili* (BFP) (Figura 5). Essa capacidade de adesão está relacionada com a presença de um plasmídeo denominado EPEC-*adherence fator* (EAF), que contém genes que codificam para BFP, dentre eles *bfpA*, *bfpD*, *bfpF* e *bfpP* (MELLIES; BARRON; CARMONA, 2007; SCALETSKY; FAGUNDES-NETO, 2016; ZAHAVI et al., 2011).

O principal mecanismo de patogenicidade das EPEC é uma lesão chamada *attaching and effacing* (A/E) que é caracterizada pela destruição das microvilosidades intestinais em que há um rearranjo epitelial com acúmulo de actina no local da célula (enterócito) onde a bactéria está aderida, formando um pedestal. Os genes responsáveis pela lesão A/E são codificados por uma ilha de patogenicidade específica denominada *locus of enterocyte effacement* (LEE) que está presente no cromossomo bacteriano e é organizada em cinco operons (LEE1 a LEE5) (MELLIES; BARRON; CARMONA, 2007; WELCH, 2006).

**Figura 5** – Interação de EPEC com a célula hospedeira (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).



Os operons LEE1, LEE2 e LEE3 codificam componentes de um sistema de secreção do tipo III (genes *esc* e *sep*) e o gene *ler*, que regula os genes localizados em LEE. O operon LEE5 codifica as proteínas intimina e Tir (receptor), enquanto LEE4 codifica proteínas secretadas Esp (EspA, EspB, EspD e EspF), que inclui proteínas efetoras e estruturais. O sistema de secreção do tipo III é composto por cerca de vinte proteínas diferentes, incluindo proteínas efetoras, regulatórias e estruturais. Algumas proteínas, como a EscC, EscV, codificadas *escC* e *escV*, e as proteínas Esp, codificadas por *esp*, são importantes na formação de uma estrutura que se estende da membrana interna da bactéria até o meio extracelular formando um canal onde proteínas efetoras são secretadas. Essas proteínas efetoras têm a capacidade de modular funções bioquímicas na célula hospedeira, como a morte celular programada. A intimina é uma proteína, codificada pelo gene *eae*, que é responsável pela aderência da bactéria na célula hospedeira. Essa proteína se liga a célula hospedeira através do receptor Tir, produzido pela própria bactéria e translocado, fosforilado e inserido na membrana celular do hospedeiro (GAUTHIER; PUENTE; FINLAY, 2003; HARTLAND; LEONG, 2013).

As EPEC típicas (tEPEC) são cepas de *E. coli* diarreiogênica capazes de formar a lesão A/E, possuem o gene *eae*, não expressam a toxina de Shiga (Stx), e possuem o plasmídeo EAF. As EPEC atípicas (aEPEC) apresentam como diferença a ausência do plasmídeo EAF e a presença de fatores de virulência adicionais como toxinas e enterohemolisinas, dentre elas EAST1 e HlyA, respectivamente. tEPEC normalmente são consideradas as principais causadoras de diarreia infantil em

países em desenvolvimento, enquanto, em países desenvolvidos as aEPEC são mais incidentes. No entanto, atualmente têm se verificado o aumento de aEPEC em países da América do Sul, incluindo o Brasil, associada com a diminuição de tEPEC. Souza e colaboradores (2016) realizaram um levantamento bibliográfico a nível mundial a respeito da ocorrência de tEPEC e aEPEC e demonstraram que a ocorrência de tEPEC é rara e está presente em animais silvestres, como macacos, enquanto aEPEC está relacionada com água e animais domésticos. Além disso, enfatizaram o aumento da ocorrência de aEPEC e diminuição de tEPEC em fezes humanas em todo o mundo (HERNANDES et al., 2009; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002; WILLIAMS; TORRES; LLOYD, 2010).

#### **2.3.1.2. *E. coli* produtora de Shiga-toxina (STEC)**

Algumas cepas estão relacionadas apenas com a produção de toxinas, não causando a lesão A/E devido à ausência do gene *eae*. Por esse motivo, essas cepas são denominadas STEC ou *E. coli* produtoras de toxinas Vero (VTEC), por serem capazes de atingir células Vero *in vitro* (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

As toxinas Shiga são formadas por uma estrutura conservada, AB<sub>5</sub>, composta por uma subunidade ativa (A) ligada a uma subunidade pentamérica (B), responsável pela ligação da toxina a célula hospedeira por receptores específicos. Essas toxinas são compostas pela toxina Stx1, que é semelhante a toxina produzida pela espécie *Shigella dysenteriae* diferindo apenas em um aminoácido, e pela toxina Stx2, que apresenta menos que 60% de homologia com os aminoácidos de Stx1. São codificadas pelo gene *stx* (*stx1* e *stx2*), presente no genoma de um bacteriófago lambda lisogênico, que tem a capacidade de se integrar ao cromossomo de STEC. Isso permite a disseminação do gene entre diferentes cepas, permitindo que uma mesma bactéria possa produzir as duas toxinas (BERNEDO-NAVARRO; ALVIN; YANO, 2016; JAFARI; ASLANI; BOUZARI, 2012).

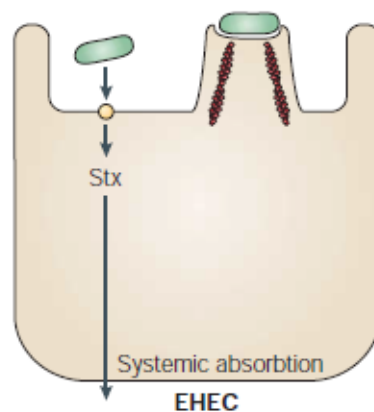
Essas toxinas tem a capacidade de inibir a síntese proteica celular pela remoção de um resíduo de adenina do RNAr. Além disso, são capazes de atuar na transdução de sinais celulares e na modulação imunológica causando respostas inflamatórias e apoptóticas. Sabe-se que existe pouca variação na sequência de aminoácidos da toxina Stx1, sendo composta por Stx1a, Stx1c e Stx1d. No entanto, a Stx2 apresenta variações que implicam na diferença de atividade biológica e resposta imunológica. Entre as variantes estão Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e,

Stx2f e Stx2g. As toxinas Stx2a, Stx2c e Stx2d são normalmente relacionada com a síndrome urêmica hemolítica (HUS), enquanto que Stx2e e Stx2f foram isoladas de suínos e aves, e raramente em humanos (GOMES et al., 2016; MAINIL; DAUBE, 2005).

*E. coli* enterohemorrágica (EHEC), um subtipo importante de STEC, inclui cepas capazes de causar diarreia em humanos ao colonizar o cólon, podendo evoluir para colite hemorrágica (HC). Cerca de 10% dos pacientes apresentam complicações extraintestinais, como a HUS. Diversos sorotipos estão relacionados com EHEC, no entanto, o sorotipo O157:H7 é o mais frequente (IN et al., 2016).

A patogenicidade de EHEC está relacionada com a sua capacidade de desenvolver a lesão A/E, em que a aderência da bactéria ao enterócito e a destruição das microvilosidades do intestino causam a diarreia. Além disso, são capazes de produzir toxinas Shiga (Stx), que apresentam ação importante no sistema circulatório e renal (Figura 6) (GOUALI; WEILL, 2013; IN et al., 2016).

**Figura 6** – Mecanismo de patogenicidade de EHEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).



Atualmente, as cepas de EHEC incluem todas as *E. coli* que atingem humanos e animais que são capazes de causar a lesão A/E e produzir as toxinas Shiga. Apesar disso, casos esporádicos de HC e HUS têm sido associados com STEC, indicando que apesar da importância da lesão A/E para a bactéria, ela não é

essencial para a patogênese da doença (JAFARI; ASLANI; BOUZARI, 2012; MAINIL; DAUBE, 2005).

A produção de uma hemolisina (Ehx) é outro fator de virulência de cepas de EHEC. Em muitos casos de HC e HUS existe a produção concomitante de Stx e Ehx. Essa hemolisina é codificada a partir de genes *ehx* inseridos em um operon, *ehxCABD*, presente em um plasmídeo (pO157), encontrado na maioria das cepas de EHEC isoladas de humanos. Outra hemolisina (HylA) é amplamente encontrada em bactérias Gram negativas e é produzida por cepas de EHEC. O operon *hylCABD* é necessário para a produção e secreção dessa hemolisina, e está presente em ilhas de patogenicidade (BIELASZEWSKA et al., 2014; MURASE et al., 2012).

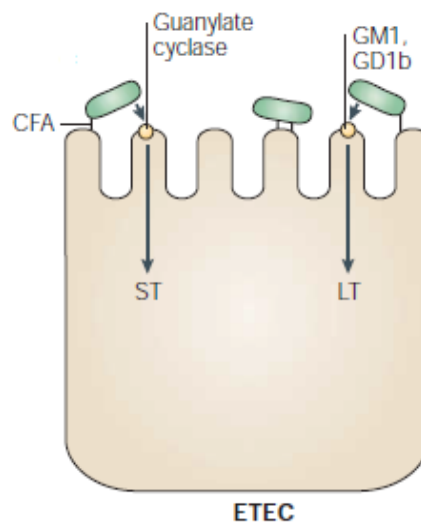
### **2.3.1.3. *E. coli* enterotoxigênica (ETEC)**

ETEC inclui cepas capazes de causar diarreia tanto em crianças quanto em adultos e geralmente estão relacionadas com a contaminação fecal de alimentos e água. A diarreia causada por ETEC é conhecida como “diarreia do viajante”, associada a pessoas que se deslocam de um país a outro. Além disso, está correlacionada com a desnutrição, sendo endêmica em países em desenvolvimento. As cepas de ETEC não são invasivas e por isso, não causam inflamação, no entanto, o principal problema da diarreia é a desidratação, que leva a um desequilíbrio eletrolítico. Dentre os principais sorotipos pertencentes a esse patotipo estão O36:H5, O152:H8, O109:H51 e O8:H21 (DUBREUIL, 2014; JOHURA et al., 2017).

As cepas de ETEC têm a capacidade de produzir enterotoxinas, que são divididas em duas classes, toxina termolábil (LT) e toxina termoestável (ST) (Figura 7). A LT é uma toxina de alto peso molecular, com estrutura AB<sub>5</sub> e se assemelha em estrutura, função e mecanismo de ação com a toxina colérica (CT). Pode ser dividida em dois tipos: LT-I e LT-II, que apresentam a mesma ação, mas diferem antigenicamente. Normalmente, apenas a LT-I é associada com cepas que atingem o ser humano, enquanto LT-II é relacionada com cepas que atingem especificamente animais. Sabe-se que ao ser liberada, a toxina LT liga-se pela subunidade B em receptores presentes nos enterócitos (GM1), enquanto a subunidade A ativa a enzima adenilato ciclase, gerando um aumento de AMP cíclico e desequilíbrio osmótico, ocasionando diarreia aquosa. A ST é dividida em três grupos de toxinas de baixo peso molecular: STa, STb e EAST1, em que STa e

EAST1 tem mecanismo de ação semelhantes. Ambas as toxinas tem a capacidade de se ligar à guanilato ciclase presente nos enterócitos, levando a um aumento de GMP cíclico e AMP cíclico e desequilíbrio osmótico, ocasionando diarreia. A STb tem um mecanismo diferenciado não ativando as enzimas adenilato ciclase ou guanilato ciclase, mas se ligando a um glicosfingolípido presente nos enterócitos. Essa ligação permite a internalização da toxina para a célula por endocitose. No interior celular, a toxina estimula uma proteína regulatória (G), ocasionando o aumento de íons cálcio intracelular e eliminação de íons cloro. O aumento de cálcio estimula enzimas fosfolipases que secretam 5-hidroxitriptamina (5-HT), que age no sistema nervoso entérico ocasionando a contração muscular do intestino, contribuindo para a diarreia (DUBREUIL, 2014; JOFFRÉ; SJOLING, 2016).

**Figura 7** – Mecanismo de patogenicidade de ETEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).



As cepas de ETEC também são capazes de produzir fatores de colonização (CF), que são fimbrias ou proteínas fimbriares que diferem entre si em morfologia, sorotipo, sequência de aminoácidos e ligação ao receptor específico. Sabe-se que sua função está relacionada com aderência e colonização da bactéria na célula hospedeira. *In vitro* verificou-se a ligação de CFs em glicoproteínas e glicosfingolípídeos, no entanto, os receptores específicos ainda não são conhecidos. Podem ser divididas em quatro tipos morfológicos: fimbrias, estruturas

fibrilares, helicoidal e afimbrilares. Mais de vinte e dois fatores de colonização foram reconhecidos em cepas de ETEC que atingem humanos. Os CFs mais frequentemente encontrados incluem CFA/1, CS1, CS2, CS3, CS4, CS5, CS6, CS7, CS14, CS17 e CS21 (QADRI et al., 2005; MADHAVAN; SAKELLARIS, 2015).

Os genes que codificam as toxinas LT, SF e também os CFs em ETEC estão inclusos em plasmídeos e bacteriófagos, indicando que são genes que podem ser adquiridos. A toxina LT-I é codificada pelos genes *eltA* e *eltB* presente em plasmídeos, enquanto a LT-II é codificada por genes presentes no cromossomo de bacteriófagos lambda. A toxina STa é codificada pelos genes *estA* e *st1*, enquanto a STb é codificada pelo gene *estB*, ambos presentes em plasmídeos. Com relação as CFs, os genes que os codificam normalmente estão presentes em plasmídeos, como pCS1 e pCoo, que codificam respectivamente, CFA/1 e CS1 (BRUSSOW, 2014a; MADHAVAN; SAKELLARIS, 2015).

#### **2.3.1.4. *E. coli* enteroagregativa (EAEC)**

EAEC engloba um conjunto de cepas capazes de causar diarreia aquosa e mucoide, associada a febre baixa e náuseas. Inicialmente, essas cepas foram consideradas patógenos oportunistas de pacientes com HIV e crianças desnutridas em países em desenvolvimento, no entanto, atualmente existem estudos demonstrando sua ligação com a diarreia do viajante, diarreia em países desenvolvidos e também surtos na Europa e Ásia. Alimentos contaminados têm sido considerados a principal fonte de infecção por esse patotipo. Os sorotipos mais comuns pertencentes a EAEC são O126:H27 e O44:H18 (BOISEN et al., 2008; JENSEN et al., 2014; OKHUYSEN; DUPONT, 2010).

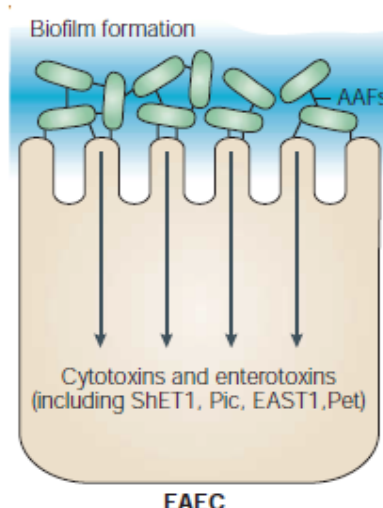
A patogenia de cepas de EAEC está relacionada com a capacidade da bactéria de se aderir às células, produzir enterotoxinas e citotoxinas e induzir o processo inflamatório (Figura 8). *In vitro*, essas cepas produzem um padrão de aderência agregativa (AA) em células humanas do tipo HEp-2 e HeLa, em que as células bacterianas se agregam umas às outras formando um arranjo “empilhado”. (BOISEN et al., 2008; OKHUYSEN; DUPONT, 2010).

O processo de AA é mediado por fimbrias de aderência agregativa (AAF) codificada por genes presentes em um plasmídeo (pAA), que incluem *aggA* (AAF/I), *aafA* (AAF/II) e *agg3A* (AAF/III). Essas AAFs são reguladas pelo gene *aggR*, um

ativador transcricional também presente no plasmídeo pAA. Esse plasmídeo também apresenta o gene *aap*, que codifica a proteína antigregação (Aap), chamada dispersina, que tem envolvimento no processo de desagregação e dispersão bacteriana na mucosa intestinal. Além disso, também apresenta o gene *aatA*, que codifica uma proteína de membrana externa que faz parte de um complexo transportador de proteínas (BRUSSOW, 2014b; CARBONARI et al., 2014; PEREIRA et al., 2008).

Enterotoxinas são produzidas por EAEC e são codificadas tanto por genes presentes no plasmídeo pAA quanto por genes presentes no cromossomo bacteriano. Pet é uma protease da família das *serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae* (SPATEs) que causa desequilíbrio e perda celular. O gene que a codifica está presente no plasmídeo pAA, denominado *pet*. *Enteroaggregative heat-stable toxin 1* (EAST1) é uma toxina produzida por EAEC que pode ser comparada com a STa produzida por ETEC por ocasionar desequilíbrio osmótico. É codificada pelo gene *astA*, localizado próximo ao gene *pet* no plasmídeo pAA (BOISEN et al., 2009; HARRINGTON et al., 2009; LIMA et al., 2013).

**Figura 8** – Mecanismo de patogenicidade de EAEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).



Outras toxinas podem ser citadas, como a *protease involved in colonization* (Pic), uma protease que tem atividade de mucinase, codificada pelo gene cromossomal *pic*, e a *Shigella enterotoxin 1* (ShET1) que causa acumulação de fluido intestinal, codificada pelos genes cromossomais *set1A* e *set1B*. O sistema de

secreção do tipo VI (T4SS) apresenta-se como um importante fator de virulência da bactéria, em que é capaz de transportar substratos, incluindo toxinas, para o meio extracelular. É codificado pelo operon *aai* (*aggR-activated island*) presente na ilha de patogenicidade *pheU* no cromossomo bacteriano, e que é composto por vinte e cinco genes (*aaiA* até *aaiY*) (DUDLEY et al., 2006; HARRINGTON et al., 2009).

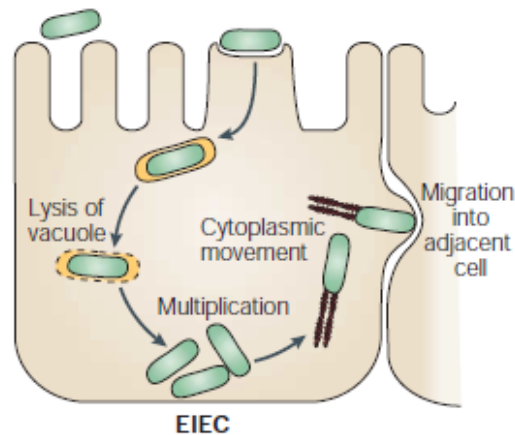
### 2.3.1.5. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

EIEC engloba um conjunto de cepas bacterianas capazes de causar desintéria bacilar, a mesma doença causada por bactérias do gênero *Shigella*. EIEC têm a capacidade de invadir a mucosa intestinal, penetrar nas células epiteliais por endocitose e se multiplicar no interior das células, ocasionando cólicas abdominais, náuseas, febre e diarreia com muco e sangue. Dentre os sorogrupos pertencentes a EIEC, pode-se citar O121, O124, O135, O136, O143, O144, O152, O159 e O164 (LAN et al., 2004; MICHELACCI et al., 2016).

A patogenia das cepas de EIEC envolve genes presentes em um plasmídeo de virulência (pINV) e é determinada por três operons: *mxi* (*membrane excretion of ipa*) e *spa* (*surface presentation of invasion plasmid antigens*), que codificam um sistema de secreção do tipo III (T3SS), e *ipa* (*invasion plasmid antigens*) que codifica proteínas de invasão celular que são secretadas pelo T3SS (Figura 9) (LAN et al., 2004; PENG; YANG; JIN, 2009).

O T3SS inclui proteínas como as lipoproteínas MxiJ e MxiM, proteínas transmembrana como MxiA e outras proteínas que são codificadas pelo operon *mxi*. Além disso, proteínas adicionais são codificadas pelo operon *spa*, como a Spa32, uma proteína importante que controla a especificidade do substrato com o T3SS. Após o contato com as células intestinais, esse sistema tem como função transportar e internalizar proteínas bacterianas na célula, facilitando a invasão bacteriana. O operon *ipa* compreende quatro genes, *ipaABCD*, que codificam proteínas que são detectadas no soro de pacientes infectados. Esse operon também codifica uma proteína, a IpgC, que faz ligação entre as proteínas IpaB e IpaC no citosol bacteriano, impedindo sua degradação. O complexo Ipa se insere na membrana celular dos enterócitos provocando acúmulo de actina no local da ligação bacteriana (COBURN; SEKIROV; FINLAY, 2007; MAURELLI, 2013).

**Figura 9** – Mecanismo de patogenicidade de EIEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).



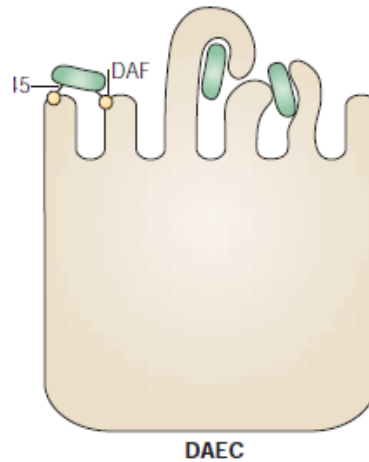
Outras proteínas são secretadas por cepas de EIEC, e dentre elas estão as proteínas da família IpaH, como a IpaH 7.8 e a IpaH 9.8. Os membros da família IpaH são codificados por genes *ipaH* presentes tanto no cromossomo bacteriano, quanto nos plasmídeos de virulência. Por estar presente em múltiplas cópias em EIEC, normalmente os genes que as codificam são utilizados para detectar esse patotipo. A proteína IpaH 7.8 está envolvida na virulência enquanto IpaH 9.8 está relacionada com a diminuição da resposta inflamatória do hospedeiro (COBURN; SEKIROV; FINLAY, 2007; MAURELLI, 2013).

#### **2.3.1.6. *E. coli* difusamente aderente (DAEC)**

DAEC inclui cepas bacterianas potencialmente diarreio gênicas, no entanto, inicialmente esse termo era utilizado para caracterizar cepas de *E. coli* capazes de se aderir à células Hep-2 de forma diferenciada das EPEC. Com a descoberta de EAEC, as DAEC passaram a ser reconhecidas como um patotipo de DEC (SARKAR, 2008).

Cepas de DAEC estão associadas com diarreia aquosa que pode se tornar persistente em crianças. O processo fisiológico de infecção por essas cepas ainda não está bem estabelecido, no entanto, sabe-se que apresentam como característica a aderência difusa (DA) em células epiteliais, que ocorre devido a produção de adesinas codificadas por genes presentes nos operons *afa/draa/daa*, importantes para a patogênese e detecção dessas cepas (Figura 11) (BOUGUÉNEC; SERVIN, 2006; MANSAN-ALMEIDA; PEREIRA; GIUGLIANO, 2013; SARKAR, 2008).

**Figura 10** – Mecanismo de patogenicidade de DAEC (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).



### 2.3.2. *S. aureus*

*S. aureus* é a espécie mais comumente relacionada a infecções hospitalares e é reconhecida como um dos principais agentes patogênicos relacionados com doenças transmitidas por alimentos. A bactéria se apresenta na forma de cocos Gram-positivos, com formato de “cachos de uva”, mas também pode ser encontrada isolada, aos pares ou cadeias curtas. Não apresenta motilidade e não forma esporo. Tem um metabolismo aeróbico e anaeróbico facultativo, com capacidade de crescimento em temperatura entre 12-44°C, e temperatura ótima de 37°C. É capaz de fermentar açúcares produzindo ácido, mas não produz gás. A capacidade de fermentar manitol é uma das características da espécie, sendo a única do gênero a utilizar esse açúcar. *S. aureus* é capaz de produzir a enzima catalase e quando cresce na presença de gema de ovo, forma-se um halo opaco à sua volta devido à sua capacidade lipolítica. Também é capaz de produzir diversas enzimas, como a coagulase, DNase, gelatinase e urease (KUMAR, 2016; SHAHDORDIZADEH et al., 2016).

*S. aureus* é capaz de causar diversas doenças, incluindo infecções de menor grau, como abscessos e a síndrome da pele escaldada, e infecções mais graves, como endocardite, pneumonia e septicemia. Normalmente, a patogenicidade da espécie envolve diversos fatores, com exceção das doenças que são mediadas por toxinas, como as enterotoxinas estafilocócicas (SE) ou superantígenos (SAGs), que são responsáveis pelos casos de intoxicação alimentar envolvendo *S. aureus*. Essas

SE são também denominadas SAGs por ativarem uma grande quantidade de células T do sistema imunológico do hospedeiro, enquanto toxinas típicas ativam pequenas quantidades. Além disso, ganham destaque por não serem eliminadas através do processo térmico, aumentando as chances de gerar intoxicações (CHEUNG, 2001; LEVINSON, 2016; SHAHDORDIZADEH et al., 2016).

A intoxicação alimentar por *S. aureus* ocorre devido o consumo de alimentos que apresentam uma ou mais SE em quantidade suficientes, menores que 1.000 ng, que é atingida quando *S. aureus* excede 100.000 UFC/g de alimento. Os sintomas da intoxicação tem início rápido e incluem náuseas, vômitos, cólicas abdominais, podendo ocorrer diarreia. A principal fonte de contaminação de alimentos por *S. aureus* é através dos manipuladores, devido o manuseio impróprio de alimentos seguida de armazenamento em condições que permita o crescimento da bactéria e produção de enterotoxinas. Dentre os alimentos frequentemente envolvidos na intoxicação alimentar por *S. aureus* estão as carnes, ovos, produtos de panificação, como bolos recheados, leite e produtos lácteos (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010; NUNES; CALDAS, 2017; OLIVER; JAYARAO; ALMEIDA, 2005).

SE pertencem a uma família de toxinas pirogênicas (PT) que são sintetizadas por *S. aureus* na fase logarítmica de crescimento. Têm como característica serem resistentes a tratamentos térmicos e baixo pH, condições que normalmente destroem a bactéria que as produzem, além de serem resistentes à ação de enzimas proteolíticas do trato digestivo. Atualmente, as SE incluem SEA, SEB, SEC (SEC1, SEC2 e SEC3), SED e SEE, que são as de maior ocorrência e apresentam atividade emética no hospedeiro. Além dessas, outras SE já foram identificadas, como SEG, SEH, SEI, SER, SES e SET que também apresentam atividade emética. Novas proteínas tem sido descobertas e são denominadas *staphylococcal-like proteins* (SEI) que não apresentam atividade emética, mas apresentam sequências de aminoácidos em sua estrutura semelhantes às SE, e incluem SEI/J, SEI/K, SEI/L, SEI/M, SEI/N, SEI/O, SEI/P, SEI/Q, SEI/U, SEI/U2 e SEI/V. TSST-1, inicialmente denominada SEF, é uma toxina também produzida por *S. aureus*, e está relacionada com o choque toxico, não apresentando atividade emética (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010; OMOE et al., 2013).

Os genes que codificam SE e SEI estão presentes em plasmídeos, profagos, ilhas de patogenicidade (SaPIs) e ilhas genômicas. Com relação aos plasmídeos,

dois são conhecidos, pIB485 e pF5, que apresentam genes como *sed*, *selj*, *ser*, *ses* e *set*. Dentre os profagos,  $\Phi$ Sa252B,  $\Phi$ Mu3A,  $\Phi$ Mu50A,  $\Phi$ NM3 e  $\Phi$ SaTW20 possuem o gene *sea*,  $\Phi$ Sa3ms e  $\Phi$ Sa3mw possuem os genes *sea*, *selk* e *selq* e  $\Phi$ Sa3n e  $\Phi$ 04-02981 carregam o gene *selp*. Genes como *seb*, *sell*, *sec* e *tst* estão presentes nas ilhas de patogenicidade do cromossomo, e podem ser transferidos de uma cepa a outra devido a capacidade de replicação em profagos. Ilhas genômicas como vSa $\alpha$  e vSa $\beta$ , apresentam genes que não são carregados e estão exclusivamente presentes em *S. aureus*. vSa $\alpha$  apresentam genes codificadores de lipoproteínas (*lpl*) e genes de exotoxinas (*ssl*). vSa $\beta$  possui genes de SE/SEI como *seg*, *sei*, *selm*, *seln*, *selo* e *selu* formando *enterotoxin gene cluster (egc)* e que estão agrupados em um operon (GRUMANN; NUBEL; BROKER, 2013; SCHELIN et al., 2011).

O modo de ação das SE ainda está sendo elucidado devido a descoberta de novas proteínas que não apresentam ação emética. De um modo geral, as SE estimulam receptores neurais locais das vísceras abdominais, gerando a transmissão de impulsos através do nervo vago e dos nervos simpáticos, resultando no estímulo do centro emético medular. SE induzem o processo de liberação de mediadores inflamatórios, como histaminas e leucotrienos, por serem capazes de atingir a mucosa intestinal, levando ao estímulo do centro emético medular. Alterações inflamatórias importantes aparecem principalmente no estômago e no intestino delgado. A diarreia pode ocorrer devido à inibição da reabsorção de água e eletrólitos no intestino delgado (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010; AUSTIN, 2017).

O leite bovino é um veículo de transmissão importante de *S. aureus*, uma vez que essa bactéria é a principal causadora de mastite em bovinos. Assim, a contaminação do leite pode ocorrer diretamente do animal. Uma vez que, é capaz de produzir SEs, a presença de *S. aureus* no leite pode ocasionar intoxicação alimentar. Além disso, a presença de cepas que apresentam resistência a antimicrobianos têm sido cada vez mais frequentes. Thaker (2015) analisou 160 amostras, incluindo leite e produtos lácteos, e isolou cepas de *S. aureus* de 10 amostras, que apresentaram resistência antimicrobiana a penicilina G. Herrera, García-López e Santos (2016) isolaram e caracterizaram oito cepas de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA) de queijos frescos produzidos com leite cru obtidos de fazendas da Colombia. Riva e

colaboradores (2015) analisaram 383 amostras de leite cru, e encontraram *S. aureus* em 35 delas, sendo que 5 amostras apresentavam MRSA (TEREKGNE et al., 2015).

## 2.4. Compostos naturais

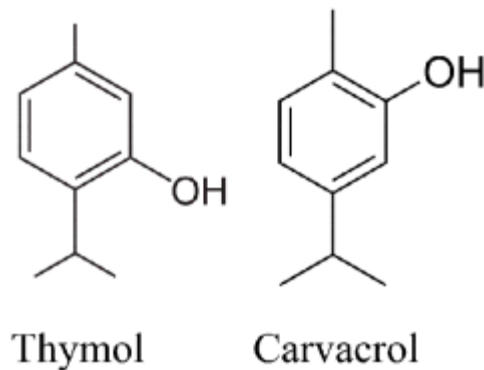
### 2.4.1. Óleo essencial de orégano (OEO)

A planta *Origanum vulgare* L. (família *Lamiaceae*) é uma planta herbácea que apresenta aroma e sabor característicos, e está presente na Europa, norte da África e Ásia sendo utilizada mundialmente como matéria-prima para medicamentos e produtos alimentícios. O OEO é um óleo essencial extraído da planta *O. vulgare* L., com mais de 50% da sua composição consistindo em compostos fenólicos, como timol e carvacrol. Outros compostos, como terpenos e sesquiterpenos, também estão presentes. Devido sua composição, o OEO apresenta propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas, emolientes e digestivas (HAN et al., 2017; RAO et al., 2011; SCANDORIEIRO et al., 2016).

Timol e carvacrol (Figura 11) são monotepenos fenólicos, similares em estrutura, diferenciando apenas na posição de ligação do grupo hidroxila no anel fenólico. Têm importante ação antimicrobiana, interagindo com proteínas presentes na membrana celular dos microrganismos e alterando sua permeabilidade. Essa interação gera uma perda do potencial de membrana e extravasamento de íons, como potássio, e também de ATP, gerando a lise celular. Apresentam ação contra microrganismos Gram-negativos, como *E. coli*, Gram-positivos, como *S. aureus*, contra fungos, como *Candida* sp. e vírus, como os norovírus (GILLING et al., 2014; HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012; NOSTRO et al., 2007; XU et al., 2008).

Rodrigues e colaboradores (2017) mostraram a capacidade do OEO de inibir cepas de *S. aureus* e impedir a formação de biofilmes por essa bactéria em superfície de poliestireno. Pesavento e colaboradores (2015) comprovaram a ação do OEO associado ao óleo de alecrim e óleo de tomilho, contra cepas de *S. aureus* presentes em almôndegas, em que uma concentração de 2% inibiu a bactéria. Marques e colaboradores (2015) demonstraram a inibição de cepas de *S. aureus* presentes em produtos cárneos derivados de aves por OEO, indicando que esse óleo essencial pode ser uma alternativa à preservação de alimentos.

**Figura 11** – Estrutura química do timol e carvacrol, constituintes do OEO (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012).



Moraes-Lovison e colaboradores (2016) comprovaram a ação do OEO contra cepas de *E. coli* presentes em patês de frango, indicando sua ação inibitória e bactericida. Barbosa e colaboradores (2016) verificaram a ação inibitória do OEO e de sua associação com o óleo de alecrim no controle de *E. coli* em vegetais, em que ambos os casos foram eficazes. Govaris e colaboradores (2011) mostraram a capacidade do OEO de inibir cepas de *E. coli* O157:H7 em queijos feta, comprovando o efeito inibitório desse óleo essencial contra microrganismos patogênicos.

Recentemente, com avanço da nanotecnologia, Scandorieiro e colaboradores (2016) demonstraram a ação antibacteriana do OEO contra *E. coli* e *S. aureus*. O OEO apresentou alta atividade bactericida contra cepas de *E. coli* (0,06% - 0,12%) e *S. aureus* (0,06%), além de demonstrar efeito sinérgico na atividade antibacteriana quando combinado com nanopartículas de prata biogênica (produzidas por enzimas do fungo *Fusarium oxysporum*).

Dessa forma, o OEO e seus componentes bioativos têm sido estudados para avaliar a atividade antimicrobiana desses compostos e verificar a aplicabilidade na indústria alimentícia, com o objetivo de aumentar a vida útil dos alimentos e impedir o crescimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes. Um dos obstáculos para a utilização do OEO em alimentos é a mudança sensorial que esse óleo essencial pode ocasionar. Por esse motivo, atualmente, formas de aplicabilidade desse composto em alimentos tem sido pesquisadas, dentre elas as nanoemulsões,

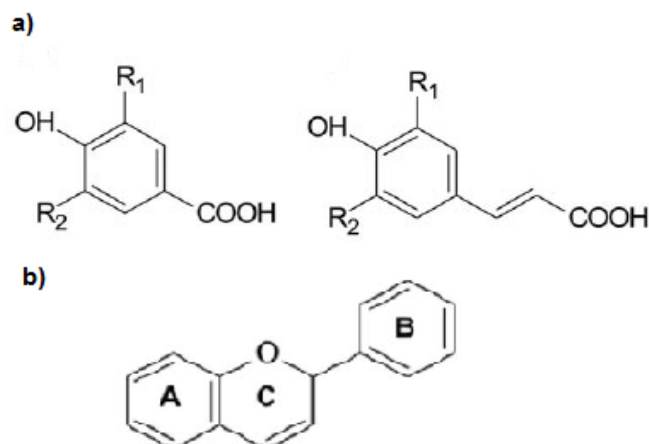
com o objetivo de manter sua capacidade antimicrobiana e diminuir seu efeito sensorial no alimento (MORAES-LOVISON et al., 2016; SIROLI et al., 2014).

#### 2.4.2. Mel

Na tradição humana, o mel tem sido utilizado como nutriente e como agente terapêutico. É constituído por monossacarídeos, como frutose e glicose, que são os principais componentes. Apresenta proteínas, vitaminas, ácidos orgânicos e minerais, além de compostos polifenólicos, como os ácidos fenólicos e flavonoides (Figura 12), responsáveis pela ação “promotora da saúde” do mel. Apresenta uma atividade antioxidante importante devido à presença desses compostos fenólicos, que reduz as reações oxidativas, tanto nos alimentos, quanto no homem (HABIB et al., 2014; SOUSA et al., 2016).

O uso do mel na medicina tradicional para tratamento de infecções tem sido praticado desde a origem da humanidade. Atualmente, pesquisas têm demonstrado a ação antimicrobiana do mel, que tem capacidade de inibir microrganismos patogênicos e microrganismos deteriorantes de alimentos. A apiterapia é um ramo da medicina tradicional desenvolvida com o intuito de utilizar produtos derivados das abelhas, como o mel, para fins terapêuticos, incluindo infecções bacterianas (MANDAL; MANDAL, 2011).

**Figura 12** – Estrutura química dos ácidos fenólicos e flavonoides presentes no mel (ANGELO; JORGE, 2007).



Inicialmente, acreditava-se que a atividade antimicrobiana do mel era devido a presença de altas concentrações de açúcar e de peróxido de hidrogênio. No entanto, atualmente sabe-se que os compostos fenólicos também estão relacionados com as propriedades antimicrobianas do mel. O perfil fenólico do mel é variável, dependendo da sua origem floral e entomológica. Dessa forma, os méis que são produzidos por espécies de abelhas distintas e recolhidos em locais diferentes, apresentam diferenças nas suas propriedades biológicas (AHMED; OTHMAN, 2013; SOUSA et al., 2016).

As abelhas sem ferrão (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) formam o grupo com maior diversidade de abelhas tropicais eussociais. Estão presentes na América Central, América do Sul, África, Ásia e Austrália. São consideradas polinizadores potenciais, alcançando plantas em ambientes selvagens e pomares. O mel produzido pela abelhas sem ferrão é muito valorizado como fonte alimentícia. Além disso, tem sido muito utilizado na América Central, América do Sul e África por suas propriedades terapêuticas (BOORN et al., 2010; BROSI, 2009; POIANI et al., 2015).

Atualmente, são conhecidas mais de quinhentas espécies de abelhas incluídas na subfamília Meliponinae. O gênero *Scaptotrigona* inclui espécies de abelhas indígenas que podem ser encontradas na Bolívia, no Brasil, no Paraguai e no Peru, que têm como característica serem importantes polinizadores e formarem ninhos populosos com grande capacidade para produção de mel (DORNELES, 2015; FERREIRA et al., 2013; RAMÓN-SIERRA; RUIZ-RUIZ; ORTIZ-VÁZQUEZ, 2015).

As abelhas com ferrão (Hymenoptera: Apidae), como a espécie *Apis mellifera*, são importantes produtoras de mel. *A. mellifera* é uma abelha europeia que foi inserida no Brasil com o objetivo de melhorar a atividade apícola. A subespécie *A. mellifera scutellata* (Lepeletier, 1836) é uma abelha africana considerada uma das mais produtivas. Possuem alta capacidade de defesa, de adaptação a ambientes inóspitos, alta produção de mel, rápida capacidade de reprodução e enxameação, proporcionando um rápido povoamento das regiões e apiários (NUNES et al., 2012; RANGEL et al., 2016).

Dessa forma, verificar a presença de patógenos em leite e produtos lácteos é importante para evitar o consumo de alimentos contaminados e o surgimento de

doenças de origem alimentar. Por isso, o desenvolvimento de técnicas para detecção desses microrganismos é essencial e atualmente, as técnicas moleculares têm ganhado destaque. Além disso, a utilização de compostos naturais que possuem ação antimicrobiana, como o OEO e os méis, podem ser interessantes na prevenção de contaminações por patógenos em leite e seus derivados, desde que não ocorra interferência no crescimento das LAB, utilizadas na fabricação dos produtos lácteos fermentados.

### **3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AHMED, S; OTHMAN, N. H. Review of the medicinal effects of tualang honey and a comparison with manuka honey. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, Malásia, v. 20, n. 3, p. 6-13, maio-jul. 2013.
- ALEGRÍA, A. et al. Bacteriocins produced by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from traditional, starter-free cheeses made of raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, Espanha, v. 143, p. 61-66, jul. 2010.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 1-9, jul. 2007.
- ARAUZ, L. J. et al. Nisin biotechnological production and application: a review. **Trends in Food Science & Technology**, São Paulo, v. 20, p. 146-154. 2009.
- ARGUDIN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins**, Espanha, v. 2, p. 1751-1773, jul. 2010.
- AUSTIN, J. W. Bacterial Toxins – Structure, Properties and Mode of Action. In: TAMIME, A. Y. **Microbial Toxins in Dairy Products**. Ucrânia: John Wiley & Sons, 2017. p. 71-93.
- AWADALLAH, M. A. et al. Occurrence, genotyping, shiga toxin genes and associated risk factors of *E. coli* isolated from dairy farms, handlers and milk consumers. **The Veterinary Journal**, Egito, v. 217, p. 83-88, set. 2016.
- AXELSSON, L. T. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A. V.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. 3. ed. Nova York: Marcel Dekker, 2004, p. 1-66.
- BALCIUNAS, E. M. et al. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, São Paulo, v. 32, p. 134-142, nov. 2012.
- BARBOSA, M. I. et al. Efficacy of the combined application of oregano and rosemary essential oils for the control of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis in leafy vegetables. **Food Control**, Paraíba, v. 59, p. 468-477, jan. 2016.

- BERNEDO-NAVARRO, A. R.; YANO, T. Phage display and Shiga toxin neutralizers. **Toxicon**, São Paulo, v. 113, p. 60-69, fev. 2016.
- BIELASZEWSKA, M. et al. Hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: Structure, transport, biological activity and putative role in virulence Mini-Review. **International Journal of Medical Microbiology**, Alemanha, v. 304, p. 1-31, maio. 2014.
- BOISEN, N. et al. High prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Estados Unidos, v. 80, n. 2, p. 294-301, fev. 2009.
- BOISEN, N. et al. New adhesin of Enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family. **Infection and Immunity**, Estados Unidos, v. 76, n. 7, p. 3281-3292, abr. 2008.
- BOORN, K. L. et al. Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *Trigona carbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. **Journal of Applied Microbiology**, Australia, v. 108, p. 1534-1543, ago. 2009.
- BOUGUÉNEC, C. B.; SERVIN, A. L. Difusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. **FEMS Microbiology Letters**, França, v. 256, p. 185-194, jan. 2006.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas dos Alimentos no Brasil**. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN, 2016.
- BROSI, B.J. The complex responses of social stingless bees (Apidae: Meliponini) to tropical deforestation. **Forest Ecology and Management**, Estados Unidos, v. 258, p.1830-1837, fev. 2009.
- BRUSSOW, H. Detection of Enterotoxins of *E. coli*. **Encyclopedia of Food Microbiology**, Suíça, v. 1, p. 702-705. 2014 (a).
- BRUSSOW, H. Enteroaggregative *E. coli*. **Encyclopedia of Food Microbiology**, Suíça, v. 1, p. 706-712. 2014 (b).
- BURGAIN, J. et al. Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. **Advances in Colloid and Interface Science**, França, v. 213, p. 21-35, nov. 2014.
- CAGGIANIELLO, G.; KLEEREBEZEM, M.; SPANO, G. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. **Applied Microbiology Biotechnology**, Itália, v. 100, p. 3877-3886, mar. 2016.
- CARBONARI, C. C. et al. First isolation of Enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 from a diarrhea case in Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, Argentina, v. 46, n. 4, p. 302-306, set. 2014.
- CASALTA, E.; MONTEL, M. C. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, França, v. 126, p. 271-273. 2008.

- CAVERA, V. L. et al. Bacteriocins and their position in the next wave of conventional antibiotics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Estados Unidos, v. 46, n. 5, p. 494-501, nov. 2015.
- CERVA, C. et al. Food safety in raw milk production: risk factors associated to bacterial DNA contamination. **Tropical Animal Health Production**, Rio Grande do Sul, v. 46, p. 877-882, mar. 2014.
- CHEIGH, C. I. et al. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. **Journal of Biotechnology**, Coréia do Sul, v. 95, p. 225-235, jan. 2002.
- CHEUNG, A. L. Global regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*. In: HONEYMAN, A. L.; FRIEDMAN, H.; BENDINELLI, M. **Staphylococcus aureus: infection and disease**. Estados Unidos: Kluwer Academic Publishers, 2001. p. 295-322.
- CLAEYS, W. L. et al. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. **Food Control**, Bélgica, v. 31, p. 251-262, set. 2013.
- COBURN, B.; SEKIROV, I.; FINLAY, B. B. Type III Secretion Systems and Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, Canadá, v. 20, n. 4, p. 535-549, out. 2007.
- COURA, F. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, São Paulo, v. 34, n. 9, p. 811-81, set. 2014.
- DALLAL, M. M. S. et al. Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolates: A study on dairy food products and other foods in Tehran, Iran. **Food Science and Human Wellness**, Irã, v. 5, p. 186-190, out. 2016.
- DATTA, R.; HENRY, M. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies – a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Estados Unidos, v. 81, p. 1119-1129, maio. 2006.
- DOBSON, A. et al. Bacteriocin Production: a Probiotic Trait?. **Applied and Environmental Microbiology**, Estados Unidos, v. 78, n. 1, p. 1-6. 2012.
- DORNELES, A. L. **Toxicidade de inseticidas organofosforados para as abelhas sem ferrão *Scaptotrigona bipunctata* e *Tetragonisca fiebrigi***. 2015. 60p. Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- DUBREUIL, J. D. Enterotoxigenic *E. coli*. **Encyclopedia of Food Microbiology**, Canadá, v. 1, p. 728-734. 2014.
- DUDLEY, E. G. et al. Proteomic and microarray characterization of the AggR regulon identifies a *pheU* pathogenicity island in Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, Estados Unidos, v. 61, n. 5, p. 1267-1282, ago. 2006.
- EISENBERG, S. W. F. et al. Diurnal differences in milk composition and its influence on in vitro growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in bovine quarter milk. **Journal of Dairy Science**, Holanda, v. 99, p. 1-11, 2016.

- FALLICO, V. et al. Plasmids of raw milk cheese isolate *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis DPC3901 suggest a plant-based origin for the strain. **Applied and Environmental Microbiology**, Irlanda, v. 77, n. 18, p. 6451-6462, set. 2011.
- FERREIRA, R. A. C. et al. Cellular responses in the Malpighian tubules of *Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) exposed to low doses of fipronil and boric acid. **Micron**, Brasil, v. 46, p. 57-65, mar. 2013.
- FLORES-FLORES, M. E. et al. Presence of mycotoxins in animal milk: A review. **Food Control**, Espanha, v. 53, p. 163-176, jan. 2015.
- FLOROU-PANERI, P; CHRISTAKI, E; BONOS, E. Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients. In: KONGO, M. **Lactic Acid Bacteria: R & D for Food, Health and Livestock Purposes**. Grécia: INTECH, 2013. p. 589-614.
- FRAQUEZA M. J. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from dry-fermented sausages. **International Journal of Food Microbiology**, Portugal, v. 212, p. 76-88, nov. 2015.
- FUJIOKA, M.; OTOMO, Y.; AHSAN, C. R. A novel single-step multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological Methods**, Japão, v. 92, p. 289-292, mar. 2012.
- GANZLE, M. G. Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Food Science**, Canadá, v. 2, p. 106-117, mar. 2015.
- GANZLE, M. G.; VERMEULEN, N.; VOGEL, R. F. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. **Food Microbiology**, Alemanha, v. 24, p. 128-138, set. 2007.
- GAO, C.; MA, C; XU, P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. **Biotechnology Advances**, China, v. 29, p. 930-939, ago. 2011.
- GASPAR, P. et al. From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. **Biotechnology Advances**, Portugal, v. 31, p. 764-788, abr. 2013.
- GAUTHIER, A.; PUENTE, J. L.; FINLAY, B. B. Secretin of the Enteropathogenic *Escherichia coli* Type III Secretion System requires components of the Type III Apparatus for assembly and localization. **Infection and Immunity**, Canadá, v. 71, n. 6, p. 3310-3319, jun. 2003.
- GHRAIRI, T; CHAFTAR, N.; HANI, K. Bacteriocins: recent advances and opportunities. In: BHAT, R.; ALIAS, A. K.; PALIYATH, G. **Progress in Food Preservation**. Ucrânia: John Wiley & Sons, 2012. p. 485-511.
- GILLING, D. H. et al. Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. **Journal of Applied Microbiology**, Estados Unidos, v. 116, p. 1149-1163, jan. 2014.
- GOMES, T. A. T. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brasilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 47, p. 3-30, dez. 2016.

- GOUALI, M.; WEILL, F. X. Les *Escherichia coli* entérohemorrágicas: des entérobactéries d'actualité. **La Presse Médicale**, França, v. 42, p. 68-75, jan. 2013.
- GOVARIS, A. et al. Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in feta cheese packaged under modified atmosphere. **LWT - Food Science and Technology**, Grécia, v. 44, p. 1240-1244, set. 2011.
- GRUMANN, D.; NUBEL, U.; BROKER, B. M. *Staphylococcus aureus* toxins – Their functions and genetics. **Infection, Genetics and Evolution**, Alemanha, v. 21, p.583-592, jan. 2013.
- GUILLEN, L.; MILLAN, B.; ARAQUE, M. Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. **Infectio - Asociación Colombiana de Infectología**, Venezuela, v. 18, n. 3, p. 100-108, jul. 2014.
- HAAKENSEN, M. et al. Real-time PCR detection of bacteria belonging to the *Firmicutes* Phylum. **International Journal of Food Microbiology**, Canadá, v. 125, p. 236-241, abr. 2008.
- HABIB, H. M. et al. Physicochemical and biochemical properties of honeys from arid regions. **Food Chemistry**, Emirados Árabes Unidos, v. 153, p. 35-43, dez. 2014.
- HAGHI, F. et al. Detection of major food-borne pathogens in raw milk samples from dairy bovine and ovine herds in Iran. **Small Ruminant Research**, Irã, v. 131, p. 136-140, ago. 2015.
- HAN, F. et al. Chemical composition and antioxidant activities of essential oil from different parts of the oregano. **Journal of Zhejiang University**, China, v. 18, n. 1, p. 79-84. 2017.
- HARRINGTON, S. M. et al. The Pic protease of Enteroaggregative *Escherichia coli* promotes intestinal colonization and growth in the presence of mucin. **Infection and Immunity**, Estados Unidos, v. 77, n. 6, p. 2465-2473, jun. 2009.
- HARTLAND, E. L.; LEONG, J. M. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *E. coli*: ecology, pathogenesis, and evolution. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, Australia, v. 3, n. 15, p. 1-3, abr. 2013.
- HAYHURST, C. ***E. coli*: Epidemics Deadly Diseases Throughout History**. Nova York: The Rosen Publishing Group, 2004. 64p.
- HEMME, D.; FOUCAUD-SCHEUNEMANN, C. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. **International Dairy Journal**, França, v. 14, p. 467-494, out. 2004.
- HERNANDES, R. T. et al. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, São Paulo, v. 297, p. 137-149, maio. 2009.
- HERRERA, F. C.; GARCÍA-LÓPE, M. L.; SANTOS, J. A. Short communication: Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from

raw milk fresh cheese in Colombia. **Journal of Dairy Science**, Espanha, v. 99, n. 10, p. 7872-7876, out. 2016.

- HUTKINS, R. **Microbiology and technology of fermented foods**. Estados Unidos: Blackwell Publishing, 2006. 473p.
- HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, Dinamarca, v. 3, n. 12, p. 1-24, jan. 2012.
- IN, J. et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* reduces mucus and intermicrovillar bridges in human stem cell-derived colonoids. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, Estados Unidos, v. 2, p. 48-62, jan. 2016.
- JAFARI, A.; ASLANI, M. M.; BOUZARI, S. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 102-117, set. 2012.
- JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.
- JENSEN, B. H. et al. Epidemiology and Clinical Manifestations of Enteroaggregative *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Dinamarca, v. 27, n. 3, p. 614-630, jul. 2014.
- JOFRÉ, E.; SJOLING, A. The LT1 and LT2 variants of the enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) heat-labile toxin (LT) are associated with major ETEC lineages. **Gut Microbes**, Suécia, v. 7, n. 1, p. 75-81, nov. 2016.
- JOHURA, F. T. et al. Occurrence of hybrid *Escherichia coli* strains carrying Shiga toxin and heat-stable toxin in Livestock of Bangladesh. **Frontiers in Public Health**, Bangladesh, v. 4, n. 287, p. 1-9, jan. 2017.
- JOSEPHSEN, J.; JESPERSEN, L. Starters cultures and fermented products. In: HUI, Y. H. et al. **Handbook of food and beverage fermentation technology**. Nova York: Marcel Dekker, 2004. p. 23-50.
- JOZALA, A. F.; NOVAES, L. C. L.; JUNIOR, A. P. Nisin. In: BOBBARALA, V. **Concepts, compounds and the alternatives of antibacterials**. Índia: Intech, 2015. 208p.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Echerichia coli*. **Nature**, Estados Unidos, v. 2, p. 123-140, fev. 2004.
- KASKONIENE V. et al. Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Lituânia, p. 1-13, jan. 2017.
- KOMPANJE, E. J. O. et al. The first demonstration of lactic acid in human blood in shock by Johann Joseph Scherer (1814–1869) in January 1843. **Intensive Care Medicine**, Holanda, v. 33, p. 1967-1971, jul. 2007.
- KONING, H.; FROHLICH, J. Lactic Acid Bacteria. In: KONING, H.; UNDEN, G.; FROHLICH, J. **Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine**. Alemanha: Springer, 2009. p. 3-29.

- KOT, W. et al. Bacteriophages of *Leuconostoc*, *Oenococcus*, and *Weissella*. **Frontiers in Microbiology**, Dinamarca, v. 5, n. 186, p. 1-9, abr. 2014.
- KUMAR, R; PRASAD, A. Detection of *E.coli* and *Staphylococcus* in Milk and Milk Products in and around Pantnagar. **Veterinary World**, Índia, v. 3, n. 11, p. 495-496. 2010.
- KUMAR, S. **Essentials of Microbiology**. India: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2016. 615p.
- LAFUENTE-RINCÓN, D. F.; CHÁVEZ, T. E. V.; FUENTE-SALCIDO, N. M. D. Bacteriocins of Gram-positive bacteria: Features and biotherapeutic approach. **African Journal of Microbiology Research**, México, v. 10, n. 45, p. 1873-1879, dez. 2016.
- LAN, R. et al. Molecular Evolutionary Relationships of Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Infection and Immunity**, São Paulo, v. 72, n. 9, p. 5080-5088, set. 2004.
- LEDENBACH, L. H.; MARSHALL, R. T. Microbiological Spoilage of Dairy Products. In: SPERBER, W. H.; DOYLE, M. P. **Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages**. Estados Unidos: Springer, 2009. p. 41-67.
- LEE, H.; CHUREY, J. J.; WOROBO, R. W. Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. **International Journal of Food Microbiology**, Nova York, v. 126, p. 240-244, abr. 2008.
- LEROY, F.; VUYST, L. D. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, Bélgica, v. 15, p. 67-78. 2004.
- LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 13. ed. Nova York: AMGH Editora, 2016. 741p.
- LI, L. et al. Characterization of the major dehydrogenase related to d-lactic acid synthesis in *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293. **Enzyme and Microbial Technology**, Coréia do Sul, v. 51, p. 274-279, jul. 2012.
- LIMA, I. F. N. et al. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* and its virulence-related genes in a case-control study among children from north-eastern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, Ceará, v. 62, p. 683-693, fev. 2013.
- LIU, W. et al. Biodiversity of Lactic Acid Bacteria. In: ZHANG, H.; CAI, Y. **Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice**. Springer, 2014. p. 103-203.
- MADHAVAN, T. P. V.; SAKELLARIS, H. Colonization Factors of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. In: SARIASLANI, S; GADD, G. M. **Advances in Applied Microbiology**. Califórnia: Academic Press, 2015. p. 155-197.
- MAINIL, J. G.; DAUBE, G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who?. **Journal of Applied Microbiology**, Bélgica, v. 98, n. 6, p.1332-1344, fev. 2005.

- MANDAL, M. D.; MANDAL, S. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Índia, v. 1, n. 2, p. 154-160, mar. 2011.
- MANSAN-ALMEIDA, R.; PEREIRA, A. L.; GIUGLIANO, L. G. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. **BMC Microbiology**, Brasília, v. 13, n. 22, p. 1-14, fev. 2013.
- MARQUES, J. L. et al. Antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. against *Staphylococcus aureus* isolated from poultry meat. **Industrial Crops and Products**, Rio Grande do Sul, v. 77, p. 444-450, set. 2015.
- MARTINEZ, F. A. C. et al. Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in Food Science & Technology**, São Paulo, v. 30, p. 70-83. 2013.
- MAURELLI, A. T. *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*: Paradigms for pathogen evolution and host– parasite interactions. In: DONNENBERG, M. S. **Escherichia coli**: Pathotypes and Principles of Pathogenesis. 2. ed. Estados Unidos: Academic Press, 2013. p. 215-245.
- MCMILLAN, K. et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk sources in Victoria, Australia. **BMC Microbiology**, Austrália, v. 16, n. 169, p. 1-12, jul. 2016.
- MELLIES, J. L.; BARRON, A. M. S.; CARMONA, A. M. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Virulence Gene Regulation. **Infection and Immunity**, Califórnia, v. 75, n. 9, p. 4199-4210, set. 2007.
- MICHELACCI, V. et al. Characterization of an emergent clone of enteroinvasive *Escherichia coli* circulating in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, Reino Unido, v. 22, n. 3, mar. 2016.
- MORACANIN, S. M. V.; DUKIC, D. A.; MEMISI, N. R. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria – A review. **Acta Periodica Technologica**, Sérvia, v. 45, p.271-283. 2014.
- MORAES-LOVISON, M. et al. Nanoemulsions encapsulating oregano essential oil: Production, stability, antibacterial activity and incorporation in chicken pâté. **LWT - Food Science and Technology**, São Paulo, v. 77, p. 233-240, nov. 2016.
- MSOLO, L.; IGBINOSA, E. O.; OKOH, A. I. Prevalence and antibiogram profiles of *Escherichia coli* O157:H7 isolates recovered from three selected dairy farms in the Eastern Cape Province, South Africa. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, África do Sul, v. 6, n. 12, p. 990-995, nov. 2016.
- MUEHLHOFF, E.; BENNETT, A.; MCMAHON, D. **Milk and Dairy Products in human nutrition**. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013. 377p.

- MURASE, K. et al. Haemolysin E- and enterohaemolysin-derived haemolytic activity of O55/O157 strains and other *Escherichia coli* lineages. **Microbiology**, Japão, v. 158, p. 746-758, dez. 2012.
- NAG, S. K. Pesticides, veterinary residues and other contaminants in milk. In: GRIFFITHS, M. W. **Improving the safety and quality of milk: Milk production and processing**. Índia: Woodhead Publishing Limited, 2010. p. 113-145.
- NAZZARO, F. et al. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, Itália, v. 6, p. 1451-1474, nov. 2013.
- NECIDOVA, L. et al. Short communication: Pasteurization as a means of inactivating staphylococcal enterotoxin A, B, and C in milk. **Journal of Dairy Science**, República Checa, v. 99, p. 1-6, ago. 2016.
- NES, I. F.; YOON, S.; DIEP, D. B. Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria: A Review. **Food Science and Biotechnology**, Coreia do Norte, v. 16, n. 5, p. 675-690, set. 2007.
- NISHIE, M.; NAGAO, J.; SONOMOTO, K. Antibacterial Peptides “Bacteriocins”: An Overview of Their Diverse Characteristics and Applications. **Biocontrol Science**, v. 17, n. 1, p. 1-16, out. 2012.
- NOBILI, G. et al. Short communication: Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw milk and mozzarella cheese in southern Italy. **Journal of Dairy Science**, Itália, v. 99, p. 7877-7880, jul. 2016.
- NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, Itália, v. 56, p. 519-523, dez. 2007.
- NTULI, V.; NJAGE, P. M. K.; BUYS, E. M. Characterization of *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae* in producer-distributor bulk milk. **Journal of Dairy Science**, África do Sul, v. 99, p. 1-16, ago. 2016.
- NUNES, L. A. et al. Variation morphogeometrics of Africanized honey bees (*Apis mellifera*) in Brazil. **Iheringia - Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 102, n. 3, p. 321-326, set. 2012.
- NUNES, M. M.; CALDAS, E. D. Preliminary Quantitative Microbial Risk Assessment for Staphylococcus enterotoxins in fresh Minas cheese, a popular food in Brazil. **Food Control**, Brasília, v. 73, p. 524-531, jan. 2017.
- OGIER, J. C. et al. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. **International Journal of Food Microbiology**, França, v. 126, p. 286-290. 2008.
- OKHUYSEN, P. C.; DUPONT, H. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): A Cause of Acute and Persistent Diarrhea of Worldwide Importance. **The Journal of Infectious Diseases**, Estados Unidos, v. 202, n. 4, p. 503-505, ago. 2010.
- OLIVEIRA, L. P. et al. Study of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk consumed in the Reconcavo area of the State of Bahia, Brazil. **Food Processing & Technology**, Bahia, v. 2, n. 6, p.1-5, nov. 2011.

- OLIVER, S. P.; JAYARAO, B. M.; ALMEIDA, R. A. Foodborne Pathogens in Milk and the Dairy Farm Environment: Food Safety and Public Health Implications. **Foodborne Pathogens and Disease**, Estados Unidos, v. 2, n. 2, p. 115-129. 2005.
- OMBARAK, R. A. et al. Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. **International Journal of Food Microbiology**, Japão, v. 221, p. 69-76, jan. 2016.
- OMOE, K. et al. Emetic Potentials of Newly Identified Staphylococcal Enterotoxin-Like Toxins. **Infection and Immunity**, Japão, v. 81, n. 10, p. 3627-3631, out. 2013.
- OPPEGARD, C. et al. The Two-Peptide Class II Bacteriocins: Structure, Production, and Mode of Action. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, Noruega, v. 13, p. 210-219. 2007.
- OSMANAGAOGU, O.; KIRAN, F. Evidence for a chromosomally determined mesenterocin, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* OZ. **Journal of Basic Microbiology**, Turquia, v. 51, p. 279-288, set. 2011.
- OZCELIK, S.; KULEY, E.; OZOGUL, F. Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. **LWT – Food Science and Technology**, Turquia, v. 73, p. 536-542, jun. 2016.
- PAPAGIANNI, M. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. **Computational and structural Biotechnology Journal**, Grécia, v. 3, n. 4, p. 1-8, out. 2012.
- PARTE, A. C. LPSN – List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. **Nucleic Acids Research**, Reino Unido, v. 42, p. 613-616, nov. 2014.
- PEARCE L. E. et al. Pasteurization of milk: The heat inactivation kinetics of milk-borne dairy pathogens under commercial-type conditions of turbulent flow. **Journal of Dairy Science**, Nova Zelândia, v. 95, p. 20-35, set. 2012.
- PENG, J.; YANG, J.; JIN, Q. The molecular evolutionary history of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. **Infection, Genetics and Evolution**, China, v. 9, p. 147-152, out. 2009.
- PEREIRA, A. C. M. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) strains enter and survive within cultured intestinal epithelial cells. **Microbial Pathogenesis**, Rio de Janeiro, v. 45, p. 310-314, jul. 2008.
- PESAVENTO, G. et al. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. **Food Control**, Itália, v. 54, p. 188-199, fev. 2015.
- PINU, F. R. Early detection of food pathogens and food spoilage microorganisms: Application of metabolomics. **Trends in Food Science & Technology**, Nova Zelândia, v. 54, p. 213-215, ago. 2016.

- PISANO, M. B. et al. Molecular identification of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* dairy strains and their technological and genotypic characterization. **Food Control**, Itália, v. 51, p. 1-8, nov. 2015.
- POGACIC, T. et al. Phenotypic traits of genetically closely related *Leuconostoc* spp. **International Dairy Journal**, França, v. 39, n. 1, p. 96-101, nov. 2014.
- POIANI, S. B. et al. Changes in the chemical profile of cephalic salivary glands of *Scaptotrigona postica* (Hymenoptera, Meliponini) workers are phase related. **The Journal of Experimental Biology**, Reino Unido, v. 218, p. 2738-2744, jun. 2015.
- QADRI, F. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. **Clinical Microbiology Reviews**, Estados Unidos, v. 18, n. 3, p. 465-483, jul. 2005.
- RAMÓN-SIERRA, J. M.; RUIZ-RUIZ J. C.; ORTIZ-VÁZQUEZ, E. Electrophoresis characterisation of protein as a method to establish the entomological origin of stingless bee honeys. **Food Chemistry**, México, v. 183, p. 43-48, mar. 2015.
- RANGEL, J. et al. Africanization of a feral honey bee (*Apis mellifera*) population in South Texas: does a decade make a difference?. **Ecology and Evolution**, Estados Unidos, v. 6, n. 7, p. 2158-2169, jan. 2016.
- RAO, G. V. et al. Chemical constituents and biological studies of *Origanum vulgare* Linn. **Pharmacognosy Research**, Índia, v. 3, n. 2, p. 143-145, abr. 2011.
- REDDY, G. et al. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation — A review. **Biotechnology Advances**, Índia, v. 26, p. 22-34, jul. 2008.
- RIVA, A. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Raw Milk: Prevalence, SCCmec Typing, Enterotoxin Characterization, and Antimicrobial Resistance Patterns. **Journal of Food Protection**, Itália, v. 78, n. 6, p. 1142-1146, jan. 2015.
- RODRIGUES, C. et al. Production and Application of Lactic Acid. In: PANDEY, A.; NEGI, S.; SOCCOL, C. **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products**. Índia: Elsevier, 2017. P. 543-556.
- RODRIGUES, J. B. S. et al. Effects of oregano essential oil and carvacrol on biofilms of *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces. **Food Control**, Paraíba, v. 73, p. 1237-1246, jan. 2017.
- RUGGIRELLO, M.; COCOLIN, L.; DOLCI, P. Fate of *Lactococcus lactis* starter cultures during late ripening in cheese models. **Food Microbiology**, Itália, v. 59, p. 112-118, out. 2016.
- SAMARZIJA, D.; ANTUNAC, N.; HAVRANEK, J. L. Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review. **Mljekarstvo: Journal for Dairy Production and Processing Improvement**, Croácia, v. 51, n. 1, p. 35-48, jan. 2001.

- SARKAR, S. **Diffusely adherent *Escherichia coli* (DAEC) as a cause of acute diarrhea**. Thesis (Master of Public Health) – The University of Texas, Texas, 2008.
- SCALETSKY, I. C. A.; FAGUNDES-NETO, U. Typical Enteropathogenic *Escherichia coli*. In: TORRES, A. G. ***Escherichia coli* in the Americas**. Estados Unidos: Springer, 2016. p. 59-76.
- SCANDORIEIRO, S. et al. Synergistic and Additive Effect of Oregano Essential Oil and Biological Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. **Frontiers in Microbiology**, Estados Unidos, v.7, p. 760. 2016.
- SCHELIN, J. et al. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Virulence**, Reino Unido, v. 2, n. 6, p. 580-592, nov.-dez. 2011.
- SCHWENDER, B. H. et al. Invited review: Organic and conventionally produced milk- An evaluation of factors influencing milk composition. **Journal of Dairy Science**, Nova Zelândia, v. 98, n. 2, p. 721-746, fev. 2015.
- SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, Itália, v. 27, p. 691-697, jun. 2010.
- SHAHDORDIZADEH, M. et al. Aptamer based biosensors for detection of *Staphylococcus aureus*. **Sensors and Actuators B**, Irã, v. 241, p. 619-635, mar. 2016.
- SHIN, J. M. Biomedical applications of nisin. **Journal of Applied Microbiology**, Estados Unidos, v. 120, n. 6, p. 1449-1465. 2015.
- SHULMAN, S. T.; FRIEDMANN, H. C.; SIMS, R. H. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? **Clinical Infectious Diseases**, Estados Unidos, v. 45, n. 8, p. 1025–1029, 2007.
- SIEZEN, R. J. et al. Complete Sequences of Four Plasmids of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 Reveal Extensive Adaptation to the Dairy Environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Holanda, v. 71, n. 12, p. 8371-8382, dez. 2005.
- SIROLI, L. et al. Characterization of Oregano (*Origanum vulgare*) essential oil and definition of its antimicrobial activity against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* *in vitro* system and on foodstuff surfaces. **African Journal of Microbiology Research**, Itália, v. 8, n. 29, p. 2746-2753, jul. 2014.
- SMIT G; SMIT, B. A.; ENGELS, W. J. M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**, Holanda, v. 29, p. 591-610, ago. 2005.
- SOBRINO-LÓPEZ, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. **International Dairy Journal**, Espanha, v. 18, p. 329-343, nov. 2007.

- SOUSA, J. M. et al. Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by Meliponini in the Brazilian semiarid region. **Food Research International**, Paraíba, v. 84, p. 61-68, jun. 2016.
- SOUZA, C. O. et al. *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Brasil, v. 7, n. 2, p. 79-91. 2016.
- STELLA, A. E. **Fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras de água, leite e fezes de bovinos leiteiros da região de Ribeirão Preto-SP, Brasil.** 2009. 85f. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (UNESP) – Jaboticabal, 2009.
- SUBRAMANIAN, M. R.; TALLURI S.; CHRISTOPHER, L. P. Production of lactic acid using a new homofermentative *Enterococcus faecalis* isolate. **Microbial Biotechnology**, Estados Unidos, v. 8, n. 2, p. 221-229. 2014.
- SUN, Z. et al. Phylogenesis and Evolution of Lactic Acid Bacteria. In: ZHANG, H.; CAI, Y. **Lactic Acid Bacteria: Fundamentals and Practice.** Springer, 2014. p. 01-101.
- TEREKGNE, E. et al. *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* species in milk and milk products from Tigray region, Northern Ethiopia. **African Journal of Food Science**, Etiópia, v. 9, n. 12, p. 567-576, dez. 2015.
- TEUBER, M.; GEIS, A. The Genus *Lactococcus*. In: DWORKIN, M. et al. **The Prokaryotes**. 3. ed. Nova York: Springer, 2006. p. 205-228.
- TEUSINK, B.; SMID, E. J. Modelling strategies for the industrial exploitation of lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, Holanda, v. 4, p. 46-56, jan. 2006.
- THAKER, H. C.; BRAHMBHATT, M. N.; NAYAK, J. B. Isolation and identification of *Staphylococcus aureus* from milk and milk products and their drug resistance patterns in Anand, Gujarat. **Veterinary World**, Índia, v. 6, n. 1, p. 10-13. 2013.
- TONG, Z; NI, L.; LING, J. Antibacterial peptide nisin: A potential role in the inhibition of oral pathogenic bacteria. **Peptides**, China, v. 60, p. 32-40, jul. 2014.
- TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, São Paulo, v. 8, n. 5, p. 508-513, maio. 2002.
- VOS, P. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes**. 2. ed. Estados Unidos: Springer, 2009. p. 711-721.
- VUYST, L. D.; LEROY, F. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, Bélgica, v. 13, p. 194-199. 2007.
- WAN, X.; SARIS, P. E. J.; TAKALA, T. M. Genetic characterization and expression of leucocin B, a class IId bacteriocin from *Leuconostoc carnosum* 4010. **Research in Microbiology**, Finlândia, v. 166, n. 6, p. 494-503, jul.-ago. 2015.

- WEE, Y.; KIM, J.; RYU, H. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. **Food Technology and Biotechnology**, Coréia do Sul, v. 44, n. 2, p. 163-172, mar. 2006.
- WELCH, R. A. The Genus *Escherichia*. In: DWORKIN, M. et al. **The Prokaryotes**. 3. ed. Nova York: Springer, 2006. P. 60-71.
- WILLIAMS, N. D.; TORRES, A. G.; LLOYD, S. J. Evolution and Epidemiology of Diarrheagenic *Escherichia coli*. In: TORRES, A. G. **Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America**. Estados Unidos: Bentham Science Publishers, 2010. p. 8-24.
- WORAPRAYOTE, W. et al. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. **Meat Science**, Tailândia, v. 120, p. 118-132, abr. 2016.
- XU, F. et al. Immunoassay of chemical contaminants in milk: A review. **Journal of Integrative Agriculture**, China, v. 14, n. 11, p. 2282-2295, jun. 2015.
- XU, J. et al. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, China, v. 47, n. 3, set. 2008.
- YUSUF, M. A.; HAMID, T. A. T. A. Optimization of temperature and pH for the growth and bacteriocin production of *Enterococcus faecium*. B3L3. **Journal of Pharmacy**, Malásia, v. 2, n. 6, p. 49-59, nov.-dez. 2012.
- ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria - A Review Article. **APCBEE Procedia**, Reino Unido, v. 2, p. 50-56, abr. 2012.
- ZAHAVI, E. E. et al. Bundle-forming pilus retraction enhances enteropathogenic *Escherichia coli* infectivity. **Molecular Biology of the Cell**, Israel, v. 22, n. 14, p. 2436-2447, jul. 2011.
- ZAUNMULLER, T. et al. Variations in the energy metabolism of the biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. **Applied Microbiology Biotechnology**, Alemanha, v. 72, p. 421-429, jul. 2006.
- ZEINHOM, M. M. A.; ABDEL-LATEF, G. K. Public health risk of some milk borne pathogens. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, Egito, v. 3, n. 3, p. 209-215, set. 2014.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo

O estudo teve como objetivo padronizar a detecção de *Escherichia coli* diarrreio gênica em leite bovino utilizando *multiplex*-PCR, e verificar a eficiência na atividade antibacteriana do óleo essencial de orégano e de méis contra bactérias ácido lácticas, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

### 4.2. Objetivos Específicos

- Padronizar e validar um sistema de *multiplex*-PCR para detecção de *E. coli* diarrreio gênica (STEC e ETEC) no leite;
- Avaliar a ação antibacteriana do OEO e de méis em bactérias ácido lácticas, utilizadas em produtos lácteos fermentados;
- Avaliar a ação antibacteriana do OEO e de méis em bactérias patogênicas alimentares (*E. coli* e *S. aureus*);
- Avaliar a ação antibacteriana de substâncias produzidas por bactérias ácido lácticas contra *E. coli* e *S. aureus*.

## 5. ARTIGO 1

### DETECÇÃO DE *stx2* (STEC) E *elt* (ETEC) EM LEITE BOVINO ATRAVÉS DE UM SISTEMA DE MULTIPLEX-PCR

Renata D. S. Nandi<sup>1</sup>, Anna C. Campos<sup>1</sup>, Jeanne W. Vendruscolo<sup>1</sup>, Sérgio P. D. da Rocha<sup>1</sup>, Renata K. T. Kobayashi<sup>1</sup>, Gerson Nakazato<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil.

## RESUMO

O leite bovino é um alimento completo por apresentar uma variedade de nutrientes, e é consumido mundialmente na sua forma original ou utilizado como matéria-prima na fabricação de diferentes produtos lácteos fermentados. A produção do leite e de seus derivados envolve diversas etapas importantes que podem interferir na qualidade do alimento, como a presença de contaminantes biológicos, incluindo *Escherichia coli*. Esses microrganismos são importantes contaminantes, devido sua capacidade de causar infecções e intoxicações no homem. O objetivo do estudo foi detectar *E. coli* diarrreio gênica em leite utilizando uma *multiplex*-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase – *multiplex*) desenvolvida pelo nosso grupo de pesquisa. Para a padronização da *multiplex*-PCR foram pesquisados os genes *stx2* e *elt* para detecção de *E. coli* produtora de Shiga-toxina (STEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), respectivamente. As quantidades celulares testadas foram  $10^1$  a  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> de leite UHT (*Ultra-High-Temperature*) e leite pasteurizado, ambos desnatados. O sistema de *multiplex*-PCR utilizado demonstrou detecção de *E. coli* apenas a  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> tanto para o leite UHT quanto para o leite pasteurizado. Esses resultados indicam que a *multiplex*-PCR pode ser utilizada para detecção de *E. coli* diarrreio gênica direto no leite.

**Palavras-chave:** Alimento; *Escherichia coli* diarrreio gênica; Multiplex-PCR; Identificação bacteriana.

## 1. INTRODUÇÃO

O leite bovino é um alimento com grandes quantidades de nutrientes consumido por pessoas de todas as faixas etárias, principalmente crianças. É utilizado como matéria-prima para produção de vários produtos lácteos, dentre eles iogurtes, manteiga, queijos e doces. Tanto o leite quanto os produtos lácteos passam por diversas etapas envolvendo produção, processamento e estocagem, que apresentam fatores que podem interferir na qualidade do alimento, como a presença de contaminantes biológicos devido seu alto valor nutritivo, pH neutro e alta atividade de água (CERVA et al., 2014; XU et al., 2015).

Os contaminantes biológicos incluem os microrganismos capazes de causar deterioração no alimento e potenciais patógenos capazes de causar infecção ou intoxicação em humanos veiculadas por alimentos. Dentre esses microrganismos, cepas de *Escherichia coli* patogênicas podem estar presentes em alimentos, como o leite e os produtos lácteos, e causar diarreia. Essas cepas são denominadas *E. coli* diarreio gênicas (DEC) e podem ser divididas em seis patotipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de Shiga-toxina (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Esses patotipos são diferenciados de acordo com os fatores de virulência produzidos pelas cepas, como a produção de toxinas específicas e a capacidade de se ligar e invadir a célula-alvo (FERNANDEZ et al., 2015; FUJIOKA; OTOMO; AHSAN, 2012; GUILLÉN; MILLÁN; ARAQUE, 2014; WELCH, 2006; WILLIAMS; TORRES; LLOYD, 2010).

Atualmente, STEC é o patotipo de *E. coli* mais relacionado com contaminação de leite e produtos lácteos. Essa associação é possível, uma vez que, está frequentemente presente no trato gastrointestinal de bovinos, podendo ou não causar doença nesses animais. Outro patotipo importante é ETEC, que causa diarreia aquosa e doença de origem alimentar semelhante a cólera, atingindo todas as faixas etárias. Sua transmissão ocorre através de água e alimentos contaminados, como leite e produtos lácteos, sendo um dos patotipos mais comuns em países em desenvolvimento (COURA; LAGE; HEINEMANN, 2014; NOBILI et al., 2016; QADRI et al., 2005)

STEC inclui cepas capazes de causar diarreia em humanos ao colonizar o cólon, podendo evoluir para colite hemorrágica (HC) e síndrome urêmica hemolítica (HUS). São cepas de STEC capazes de produzir citotoxinas atualmente denominadas toxinas Shiga (Stx1 e Stx2), que apresentam ação importante no sistema circulatório e renal. Atualmente, o sorotipo O157:H7 é o mais frequente. ETEC inclui cepas capazes de causar diarreia tanto em crianças quanto em adultos e geralmente estão relacionadas com a contaminação fecal de alimentos e água. A patogenicidade dessas cepas está relacionada com a capacidade de produzir enterotoxinas, a toxina termolábil (LT) e a toxina termoestável (ST) (DUBREUIL, 2014; GOUALI; WEILL, 2013; IN et al., 2016; JAFARI; ASLANI; BOUZARI, 2012).

O objetivo do estudo foi aplicar um sistema de *multiplex-PCR* (*Multiplex Polymerase Chain Reaction*) para detecção de STEC e ETEC no leite UHT (*Ultra High Temperature*) e pasteurizado, contaminado artificialmente.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Cepas bacterianas**

As cepas utilizadas no estudo como controles positivos para os genes *stx2* (EHEC EDL 933 - O157:H7) e *elt* (ETEC H104:07) pertencem a coleção bacteriana do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, do Departamento de Microbiologia, na Universidade Estadual de Londrina (Londrina-PR, Brasil). Essas cepas foram inoculadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI - Difco®) e incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 24 h. Posteriormente, o caldo BHI foi semeado em ágar Nutriente (NA - Difco®) e incubado a  $35 \pm 2$  °C por 24 h para posterior contaminação artificial do leite (UHT e pasteurizado) e extração de DNA bacteriano.

### **2.2. Leite Bovino UHT e Pasteurizado**

O leite UHT e o leite pasteurizado foram obtidos de forma comercial e contaminados artificialmente com as cepas de controle positivo para STEC e ETEC. Para isso, colônias dessas cepas foram isoladas do ágar NA e diluídas separadamente em salina estéril 0,85 % para ajuste do inóculo na escala 5 de McFarland (correspondente a  $1,5 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>). Na sequência, diluições em série foram realizadas em leite UHT e em leite pasteurizado para detecção das cepas ( $10^1$

a  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>). Todas as diluições foram submetidas à fervura e centrifugadas. Cada diluição foi considerada como amostra na realização do sistema de *multiplex*-PCR.

### 2.3. *Multiplex*-PCR

O sistema *multiplex*-PCR utilizado no estudo foi desenvolvido por Vendruscolo e colaboradores (2016), utilizando os iniciadores *stx2* (STEC) e *elt* (ETEC), conforme descrito na Tabela 1. Os reagentes foram utilizados nas seguintes concentrações: Tampão 1x; MgCl<sub>2</sub> 2,2 mM; dNTP 0,46 mM cada e *Taq* polimerase 3U.

**Tabela 1** – Descrição dos iniciadores e das concentrações de reagentes utilizados no *multiplex*-PCR.

Gene (GenBank)	Iniciadores (5'→3')	Tamanho do fragmento de amplificação (pb)	Referências
<b><i>stx2</i>*</b> (AY633471.1)	TTAACCACACCCCACCGGGCAGT GCTCGGATGCATCTCTGGT	346	LEOTTA et al., 2005
<b><i>elt</i>**</b> (EU113248.1)	AGGCGTATACAGCCCTCACCCA ACCTGAAATGTTGCGCCGCTCT	530	VENDRUSCOLO et al., 2016

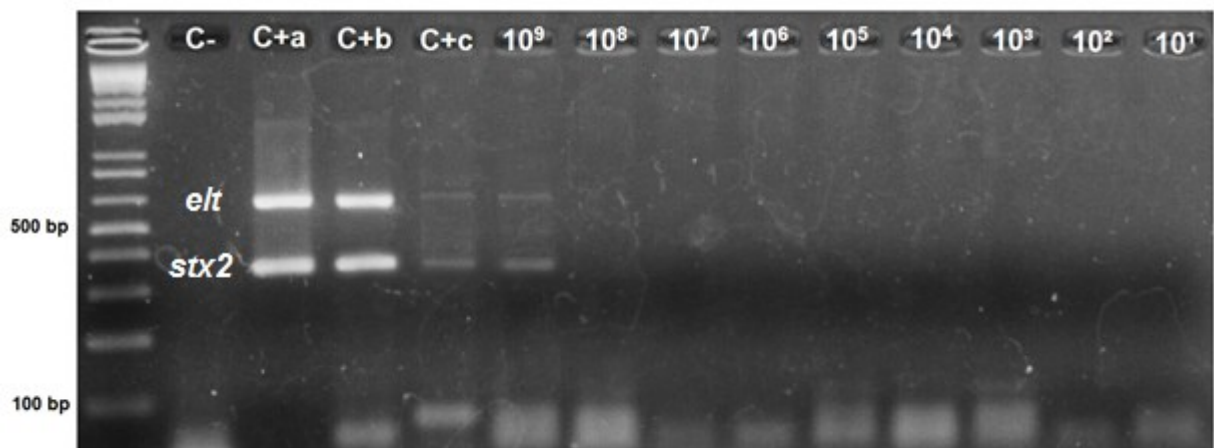
As reações de *multiplex*-PCR foram realizadas em termociclador (ESCO-Swift MaxPro®) adotando a programação: 95 °C / 5 min, 15 ciclos de 95 °C / 1 min, 62 °C / 2min e 72 °C / 2 min, 20 ciclos de 95 °C / 1min, 59 °C / 2,5min e 72 °C / 1 min, com uma temperatura final de 72 °C / 7 min. O volume final utilizado na reação foi de 25 µL. Os produtos do *multiplex*-PCR contendo Gel Red (Biotium®) foram separados em gel de agarose a 2,5 % a 70 V por 90 min. Os fragmentos amplificados foram visualizados em transiluminador de UV.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

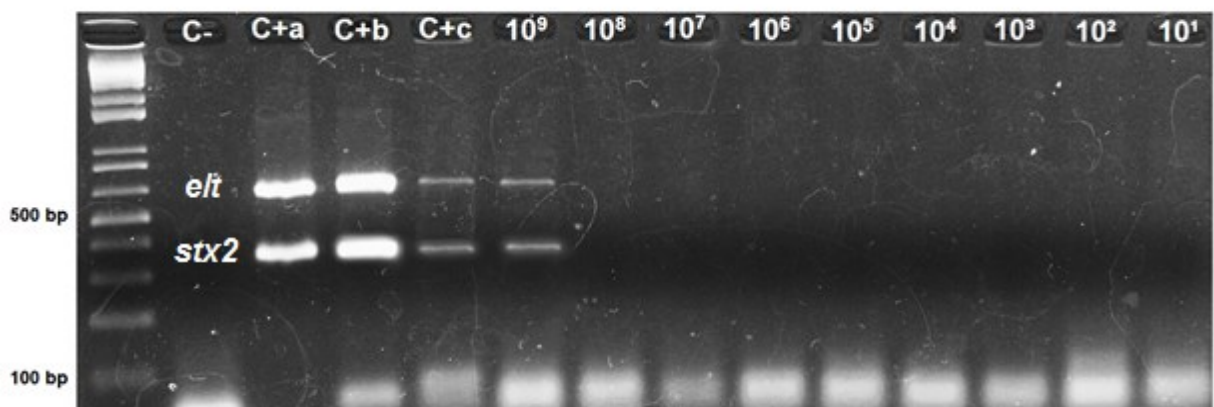
Nas Figuras 13 e 14 é possível verificar o resultado obtido do *multiplex*-PCR para o leite UHT e pasteurizado, respectivamente, após a eletroforese em gel de agarose. Nos experimentos foi verificada a detecção do DNA bacteriano em três situações distintas, descritas na tabela 2.

**Tabela 2** – Descrição dos tratamentos testados na *multiplex*-PCR.

Tratamento	Descrição
C <sup>+</sup> <sub>a</sub>	DNA bacteriano extraído por fervura e mantido em estoque (3 meses).
C <sup>+</sup> <sub>b</sub>	DNA bacteriano extraído por fervura previamente à utilização, durante o experimento.
C <sup>+</sup> <sub>c</sub>	DNA bacteriano extraído por fervura com adição de leite na proporção 1:1 (DNA extraído: Leite, v/v).

**Figura 13** – Imagem dos produtos amplificados através do *multiplex*-PCR em gel de agarose a 2,5% para o leite UHT.

C- (controle negativo); C<sup>+</sup><sub>a</sub> (controle positivo – DNA extraído em estoque por 3 meses); C<sup>+</sup><sub>b</sub> (controle positivo – DNA extraído previamente a utilização); C<sup>+</sup><sub>c</sub> (controle positivo extraído a aproximadamente  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> na presença de leite);  $10^9$  a  $10^1$  (quantidade de UFC mL<sup>-1</sup> presente na amostra de leite).

**Figura 14** – Imagem dos produtos amplificados através do *multiplex*-PCR em gel de agarose a 2,5% para o leite pasteurizado.

C- (controle negativo); C<sup>+</sup><sub>a</sub> (controle positivo – DNA extraído em estoque por 3 meses); C<sup>+</sup><sub>b</sub> (controle positivo – DNA extraído previamente a utilização); C<sup>+</sup><sub>c</sub> (controle positivo extraído a aproximadamente

$10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> na presença de leite);  $10^9$  a  $10^1$  (quantidade de UFC mL<sup>-1</sup> presente na amostra de leite).

Foi possível verificar que tanto no leite UHT quanto no leite pasteurizado, não houve diferença no uso de C<sub>a</sub> e C<sub>b</sub>, e, além disso, foi possível detectar os controles positivos de STEC e ETEC na presença do leite (C<sub>c</sub>).

Abdelhai, Hassanin e Sun (2016) compararam quatro métodos de extração de DNA, utilizando kits de extração, métodos físicos, utilização de fenol/etanol e por fervura. Com relação ao método por fervura, o DNA foi extraído, refrigerado, amplificado e submetido a eletroforese para verificar sua eficiência. Os resultados mostraram que o método por fervura é aplicável, em que o DNA extraído se apresentou adequado para utilização em análises moleculares como PCR, sendo similar aos resultados obtidos em nosso estudo. Dashti e colaboradores (2009) verificaram a eficiência de dois métodos térmicos, por fervura e utilizando micro-ondas, para extração do DNA de bactérias Gram negativas e sua aplicação em PCR. Como resultados, comprovaram a eficiência de ambos os métodos, obtendo DNA adequado para utilização em técnicas de PCR, assim como verificado em nosso estudo.

Tanto no leite UHT quanto no leite pasteurizado, a detecção das cepas bacterianas contendo os genes *elt* e *stx2* através da diluição em série ( $10^9$  a  $10^1$  UFC mL<sup>-1</sup>) foi possível apenas à  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>. Essa quantidade celular é semelhante à utilizada para C<sub>c</sub>. Assim, é possível verificar que o leite pode interferir na detecção dos genes *stx2* e *elt* quando a concentração celular for abaixo de  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>, uma vez que, em concentrações menores não ocorreu a detecção desses genes.

Resultados distintos ao nosso estudo foram demonstrados por Fode-Vaughan e colaboradores (2003). O estudo verificou a aplicação de PCR para detecção de *E. coli* O157:H7 de forma direta, sem extração do DNA bacteriano, utilizando diluição seriada. Como resultado verificaram a detecção do gene *stx2* entre uma concentração celular de  $10^{-2}$  e  $10^0$  UFC mL<sup>-1</sup>. Os autores atribuíram a presença de substâncias no leite que impediram a detecção bacteriana na concentração celular de  $10^{-3}$  UFC mL<sup>-1</sup>. Em um estudo desenvolvido por Omiccioli e colaboradores (2009) foi analisada a aplicação de *multiplex*-PCR em amostras de leite contaminadas artificialmente. A extração do DNA bacteriano foi realizada, no entanto, utilizando fenol/clorofórmio, diferindo do nosso estudo, realizado por fervura. Com isso, conseguiram obter uma detecção de genes bacterianos em uma quantidade celular

de  $10^1$  UFC mL<sup>-1</sup> a  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>. Esses dados sugerem a possibilidade de modificação do sistema de extração do DNA bacteriano do nosso estudo para detecção dos genes a uma quantidade celular inferior.

#### 4. CONCLUSÃO

A *multiplex-PCR* pode ser utilizada para detecção direta no leite, de *E. coli* diarréiogênica.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELHAI, M. H.; HASSANIN, H. A. M.; SUN, X. Comparative Study of Rapid DNA Extraction Methods of Pathogenic Bacteria. **American Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 4, n. 1, p. 1-8, jan. 2016.
- CERVA, C. et al. Food safety in raw milk production: risk factors associated to bacterial DNA contamination. **Tropical Animal Health Production**, v. 46, p. 877-882, mar. 2014.
- COURA, F. M.; LAGE, A. P.; HEINEMANN, M. B. Patotipos de *Escherichia coli* causadores de diarreia em bezerros: uma atualização. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, São Paulo, v. 34, n. 9, p. 811-81, set. 2014.
- DASHTI, A. A. et al. Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. **Kuwait Medical Journal**, v. 41, n. 2, p. 117-122, jun. 2009.
- DUBREUIL, J. D. Enterotoxigenic *E. coli*. **Encyclopedia of Food Microbiology**, v. 1, p. 728-734. 2014.
- FERNANDEZ, M. et al. Impact on Human Health of Microorganisms Present in Fermented Dairy Products: An Overview. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-13, set. 2015.
- FODE-VAUGHAN, K. A. et al. Direct PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 239-243, um. 2003.
- FUJIOKA, M.; OTOMO, Y.; AHSAN, C. R. A novel single-step multiplex polymerase chain reaction assay for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 92, p. 289-292, mar. 2012.
- GOUALI, M.; WEILL, F. X. Les *Escherichia coli* entérohémorragiques: des entérobactéries d'actualité. **La Presse Médicale**, v. 42, p. 68-75, jan. 2013.
- GUILLEN, L.; MILLAN, B.; ARAQUE, M. Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en

- Mérida, Venezuela. **Infectio - Asociación Colombiana de Infectología**, v. 18, n. 3, p. 100-108, jul. 2014.
- IN, J. et al. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* reduces mucus and intermicrovillar bridges in human stem cell-derived colonoids. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 2, p. 48-62, jan. 2016.
- JAFARI, A.; ASLANI, M. M.; BOUZARI, S. **Escherichia coli: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. Iranian Journal of Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 102-117, set. 2012.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Echerichia coli*. **Nature**, Estados Unidos, v. 2, p. 123-140, fev. 2004.
- LEOTTA, G. A. et al. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. **Revista Argentina de Microbiología**, Argentina, v. 37, n. 1, p. 1-10, mar. 2005.
- NOBILI, G. et al. *Short communication*: Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw milk and mozzarella cheese in southern Italy. **Journal of Dairy Science**, Itália, v. 99, p. 7877-7880, jul. 2016.
- OMICCIOLI, E. et al. Simultaneous Direct Detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in Milk Samples by Magnetic Extraction and Multiplex PCR. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, v. 17, p. 195-213, set. 2009.
- QADRI, F. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. **Clinical Microbiology Reviews**, Estados Unidos, v. 18, n. 3, p. 465-483, jul. 2005.
- VENDRUSCOLO, J. W. **Desenvolvimento de multiplex PCR para detecção de Escherichia coli diarreiogênica isoladas de amostras de fezes e água**. 2016. 43f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2016.
- WELCH, R. A. The Genus *Escherichia*. In: DWORKIN, M. et al. **The Prokaryotes**. 3. ed. Nova York: Springer, 2006. P. 60-71.
- WILLIAMS, N. D.; TORRES, A. G.; LLOYD, S. J. Evolution and Epidemiology of Diarrheagenic *Escherichia coli*. In: TORRES, A. G. **Pathogenic Escherichia coli in Latin America**. Estados Unidos: Bentham Science Publishers, 2010. p. 8-24.
- XU, F. et al. Immunoassay of chemical contaminants in milk: A review. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 14, n. 11, p. 2282-2295, jun. 2015.

## 6. ARTIGO 2

### AÇÃO ANTIBACTERIANA DE COMPOSTOS NATURAIS EM BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS, *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus*

Renata D. S. Nandi<sup>1</sup>, Anna C. Campos<sup>1</sup>, Renata K. T. Kobayashi<sup>1</sup>, Gerson Nakazato<sup>1</sup>, Ana A. S. Baptista<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil.

## RESUMO

O leite bovino e seus derivados podem ser afetados pela presença de contaminantes biológicos, ou seja, microrganismos que atingem o alimento a partir de falhas durante a produção. Dentre esses microrganismos, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* estão frequentemente relacionados com doenças de origem alimentar, sendo capazes de causar infecções e intoxicações no homem. O objetivo do estudo foi avaliar a ação antibacteriana do óleo essencial de orégano (OEO) e de três tipos de méis (*Scaptotrigona postica* – SP, *Scaptotrigona bipunctata* - SB e *Apis mellifera* - Apis) sob bactérias ácido lácticas (LAB), *E. coli* e *S. aureus*. Para avaliar a ação antibacteriana do OEA e dos méis, foram determinadas a concentração inibitória mínima (MIC), a concentração bactericida mínima (MBC) e determinação da atividade antibacteriana das bacteriocinas produzidas por LAB. Os testes realizados para os compostos naturais demonstraram importante atividade antibacteriana do OEO (MIC variando entre 0,06 - 0,31 %, contra *E. coli* e *S. aureus*) e dos méis SP e SB (MIC variando entre 1,25 - 5 %, dos méis contra *E. coli* e *S. aureus*), além de indicar que essas concentrações também são bactericidas. No entanto, essa atividade antibacteriana é similar para as LAB (MIC de 0,15 % para o OEO; e entre 1,25 - 5 %, para os méis SP e SB), indicando que o uso desses compostos naturais em produtos lácteos fermentados deve ser controlado. Não foi possível detectar a MIC do mel Apis (acima das concentrações testadas). Não foi possível determinar a atividade antibacteriana das bacteriocinas. Dessa forma, os compostos naturais podem ser utilizados no controle de microrganismos patogênicos, como *E. coli* e *S. aureus*, no entanto, seu uso deve ser controlado em produtos lácteos fermentados, uma vez que atua sob em LAB, podendo afetar na qualidade do produto final.

**Palavras-chave:** Antibióticos naturais; Abelhas indigenas; Apis; Óleo essencial de orégano; Mel; *Scaptotrigona* sp.; Antibacteriano.

## 1. INTRODUÇÃO

Leite e produtos fermentados são alimentos básicos da dieta humana e são produzidos e consumidos desde o início da civilização. Os produtos fermentados são definidos como alimentos desenvolvidos a partir do crescimento de microrganismos de forma controlada com diversas reações enzimáticas envolvidas (JAY, 2005; MARCO et al., 2017). Esses microrganismos incluem bactérias, leveduras e fungos que contribuem para o sabor, textura, aparência e outras propriedades funcionais de alimentos como queijos maturados e conservas. Na maioria dos casos, mais de um grupo de microrganismos está envolvido na fermentação, sendo que as bactérias ácido lácticas (LAB) são as principais utilizadas (HUTKINS, 2006).

As LAB produzem compostos a partir da degradação de carboidratos. Dentre esses compostos pode-se citar o ácido láctico, principal produto do metabolismo, e as bacteriocinas, que apresentam atividade antimicrobiana. Diversos gêneros estão inclusos nesse grupo de bactérias, dentre eles *Lactococcus* sp. e *Leuconostoc* sp. No gênero *Lactococcus* duas subespécies são muito utilizadas na produção de produtos lácteos como culturas *starter*: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. São bactérias homofermentativas e produzem L(+)-ácido láctico (CASALTA E MONTEL, 2008; RUGGIRELLO et al., 2016). No gênero *Leuconostoc* duas espécies são utilizadas como culturas *starters*: *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Realizam o metabolismo heterofermentativo e são capazes de produzir D(-)-ácido láctico, ácido acético e etanol. Além disso, são utilizados para a fabricação de alguns tipos de queijo devido sua capacidade de produzir CO<sub>2</sub> (POGACIC et al., 2014).

Por serem alimentos perecíveis, o leite e os produtos lácteos podem ser facilmente contaminados por microrganismos, sendo considerados veículos de doenças (KUMAR; PRASAD, 2010).

*Escherichia coli* é uma bactéria presente no trato gastrintestinal de humanos e animais, no entanto, algumas cepas adquiriram fatores de virulência, o que as torna importantes causadores de doenças em humanos. As cepas de *E. coli* podem ser veiculadas por alimentos, como o leite e produtos lácteos, devido à contaminação fecal associada as más condições higiênico-sanitárias durante as etapas de produção desses alimentos. Além disso, é um importante patógeno relacionado com

mastite em bovinos, sendo uma das causas de contaminação direta do leite. As cepas denominadas *E. coli* diarreio gênicas (DEC) são capazes de causar doenças no trato gastrointestinal de humanos e são divididas em seis patótipos: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* produtora de Shiga-toxina (STEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; FARROKH et al., 2012).

*Staphylococcus aureus* é um importante microrganismo contaminante, e um dos agentes etiológicos de mastite em bovinos. É uma bactéria que tem a capacidade de produzir enterotoxinas termoestáveis, que não são inativadas por processos térmicos, e tem sido causa de intoxicações alimentares em humanos em diferentes países. A contaminação por *S. aureus* pode ocorrer diretamente a partir do animal ou devido às más condições higiênico-sanitárias durante a ordenha, processamento e armazenamento do leite e produtos lácteos (SCHUBERT et al., 2016; WILLIAMS; TORRES; LLOYD, 2010).

Atualmente, diversas maneiras de controle desses agentes patogênicos têm sido pesquisadas. A utilização de compostos naturais, como os óleos essenciais, está recebendo destaque por não deixarem resíduos nos alimentos, não comprometendo a saúde humana, além de apresentarem componentes que têm ação antimicrobiana. O óleo essencial de orégano (OEO) é um óleo essencial que apresenta diversos constituintes importantes com ação antimicrobiana, dentre eles destacam-se o carvacrol e o timol em maior quantidade (SCANDORIEIRO et al., 2016).

O mel é um alimento utilizado pela população a muitos anos devido suas características nutricionais e terapêuticas. Apresenta ação antimicrobiana dada a presença de alta quantidade de açúcares, gerando um meio de baixa atividade de água para multiplicação dos microrganismos. Além disso, outros constituintes como peróxido de hidrogênio e compostos fenólicos estão relacionados com a ação antimicrobiana do mel (LEE; CHUREY; WOROBO, 2008; NAZZARO et al., 2013; SWAMY; AKHTAR; SINNI AH, 2016).

O objetivo do estudo foi verificar a ação antimicrobiana do OEO e de méis produzidos pelas espécies *Scaptotrigona bipunctata* (Lepeletier, 1836),

*Scaptotrigona postica* (Latreille, 1807) e *Apis mellifera scutellata* (Lepeletier, 1836) contra cepas de *E. coli* e *S. aureus* e a ação desses compostos em bactérias ácido lácticas utilizadas na produção de produtos lácteos.

## **2. MATERIAL E METODOS**

### **2.1. Compostos antimicrobianos**

O OEO utilizado no estudo foi obtido de forma comercial, puro (Ferquima®). Para os ensaios o produto foi diluído com o emulsificante dimetilsulfóxido (DMSO - Sigma-Aldrich®) a 50 % (v/v).

Os méis utilizados no estudo foram obtidos do setor de apicultura da Universidade Estadual de Londrina, localizada na cidade de Londrina-PR, e Unidade de Conservação Monte Sinai, localizada na cidade de Mauá da Serra-PR. As amostras de méis foram denominadas SP, SB e Apis de acordo com a espécie de abelha produtora, sendo elas *Scaptotrigona postica* (Lepeletier, 1836), *Scaptotrigona bipunctata* (Latreille, 1807) e *Apis mellifera scutellata* (Lepeletier, 1836), respectivamente. Foram realizadas diluições 50 % (v/v) dos méis com água deionizada, e realizada a esterilização por filtração através de filtros de 0,22 µm (Millipore®).

### **2.2. Cepas bacterianas**

#### **2.2.1. Bactérias ácido lácticas (LAB)**

As LAB foram obtidas de forma comercial, liofilizadas (Chr. Hansen®). Dois pools de LAB liofilizadas foram utilizadas no estudo: CHN22 (*L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* e *Ln. pseudomesenteroides*) e R704 (*L. lactis* subsp. *cremoris* e *L. lactis* subsp. *lactis*). Por estarem liofilizadas, essas culturas passaram por um processo de ativação em leite UHT (*Ultra-High-Temperature*), conforme Pereira e Gómez (2007) com modificações. Cada cultura liofilizada foi inoculada em 10 mL de leite esterilizado desnatado e incubadas por 18-24 h em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a 35 ± 2 °C. Após, 1 mL do leite de cada inóculo foi transferido para um tubo de ensaio contendo 10 mL de leite esterilizado desnatado e incubado sob as mesmas condições descritas anteriormente. Esse processo foi realizado duas vezes para cada cultura

até completar a ativação. Posteriormente, as culturas foram transferidas para o caldo MRS (Man Rogosa & Sharpe - Kasvi®) na proporção de 10 % (v/v) cada e incubadas a  $35 \pm 2$  °C em estufa contendo 5 % de CO<sub>2</sub>, por 48 h. O crescimento foi observado pela turbidez do caldo MRS. As LAB foram inoculadas em placas contendo ágar MRS e incubadas nas mesmas condições já descritas.

### **2.2.2. *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***

As cepas de *E. coli* e *S. aureus* utilizadas nos testes foram isoladas de amostras de queijos minas frescal fabricados e comercializados na região de Londrina-PR-Brasil. *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 29213 também foram utilizadas nos testes como controle. As culturas foram obtidas a partir do crescimento em caldo BHI, a  $35 \pm 2$  °C em aerobiose por 24 h seguido de semeadura em ágar Nutriente (NA - Difco®) e incubação a  $35 \pm 2$  °C em aerobiose por 24 h.

### **2.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)**

Para se determinar a MIC, foram utilizados ensaios de microdiluição em caldo proposto pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards (Clinical and Laboratory Standards Institute)* (CLSI, 2012), com modificações. O teste foi realizado em microtubos de 200 µL (Ependorf®) para o OEO e microplacas de 96 poços (Corning®) para os méis. Foram utilizadas diferentes concentrações dos compostos (0,015 %; 0,03 %; 0,06 %; 0,15 %; 0,31 %; 0,62 %; 1,25 %; 2,5 % e 5 %), para se determinar a MIC.

#### **2.3.1. LAB**

As colônias de LAB obtidas em ágar MRS foram diluídas em salina estéril 0,85% para ajuste do inóculo na escala 0,5 de McFarland (correspondente a  $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>). Para utilização no teste, foi realizada uma nova diluição em caldo MRS para se obter uma quantidade bacteriana de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. Foram inoculados 50 µL da suspensão bacteriana nos microtubos e nos orifícios das placas previamente preparados com 50 µL de caldo MRS em diferentes concentrações de OEO e dos méis, totalizando 100 µL por microtubo/orifício. Os microtubos e as placas foram incubados a  $35 \pm 2$  °C em estufa contendo 5 % de CO<sub>2</sub> durante 48 h. O

crescimento foi verificado pela turbidez do meio, sendo que a concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento bacteriano. Os testes foram realizados em triplicata.

### **2.3.2. *E. coli* e *S. aureus***

Para as cepas de *E. coli* e *S. aureus* o procedimento foi semelhante ao utilizado para as LAB, no entanto, o meio de cultura utilizado foi o caldo Muller-Hinton (MHB - Difco®). Os microtubos e as placas foram incubados a  $35 \pm 2$  °C por 24 h em condições de aerobiose. O crescimento foi verificado pela turbidez do meio, sendo que a concentração inibitória mínima foi definida como a menor concentração do composto que inibiu o crescimento de *E. coli* e *S. aureus*. Os testes foram realizados em triplicata.

### **2.4. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (MBC)**

A determinação da MBC foi realizada de acordo com Marques e colaboradores (2015). Após a determinação do MIC, foram retiradas alíquotas de 5 µL dos microtubos/orifícios que não apresentaram crescimento microbiano. Essas alíquotas foram semeadas em ágar MRS, ágar McConkey (Oxoid®) e ágar Baird Parker (Oxoid®) para verificar o crescimento das LAB, *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. A incubação do ágar MRS foi a  $35 \pm 2$  °C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>, enquanto o ágar McConkey e o ágar Baird Parker foram incubados a  $35 \pm 2$  °C em aerobiose por 24 h. No dia seguinte avaliou-se o crescimento bacteriano nas placas. A ausência de crescimento indicou atividade bactericida.

### **2.5. Determinação da atividade antibacteriana das bacteriocinas**

Para determinação da atividade antibacteriana das bacteriocinas produzidas pelas LAB que compõe as duas culturas (CHN22 e R704), empregou-se o método de antagonismo (“*Spot on the lawn*”), descrito por Lima e colaboradores (2007), com modificações. As LAB liofilizadas foram ativadas em leite UHT e transferidas para o caldo MRS na proporção de 1:10 e incubadas em aerobiose a  $35 \pm 2$  °C por 48 h. Posteriormente, o caldo MRS foi centrifugado (7.500 x g) e o sobrenadante obtido das duas culturas lácticas foi separado em duas alíquotas. Uma alíquota de cada cultura láctica foi corrigido o pH para valores próximos de 6, enquanto a outra

permaneceu com o pH inicial (CHN22 – 4,5; R704 – 4,2). Após, o sobrenadante foi filtrado com filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore®). As duas alíquotas das culturas lácticas foram aplicadas sobre ágar MRS, e incubadas por 12 h a  $35 \pm 2$  °C em estufa contendo 5 % de  $\text{CO}_2$ .

As cepas de *E. coli* e *S. aureus* foram inicialmente cultivadas em ágar NA e incubadas em aerobiose a  $35 \pm 2$  °C por 24 h. As colônias obtidas foram diluídas em salina (0,85%) para ajuste do inóculo na escala 0,5 de McFarland (correspondente a  $1,5 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ). Em seguida, 200  $\mu\text{L}$  de cada suspensão bacteriana foram transferidos para 20 mL de ágar Muller-Hinton (MHA - Difco®) semi-sólido mantido em banho-maria a 45°C. Em seguida, foram distribuídos sobre as placas contendo as alíquotas das culturas R704 e CHN22 e incubadas a  $35 \pm 2$  °C, em condições aeróbicas. A atividade antibacteriana das bacteriocinas foi determinada pela formação de halo de inibição nos pontos em que as alíquotas com pH ajustado foram semeadas. O teste foi realizado em triplicata.

## **2.6. Análise estatística**

Os dados foram analisados por ANOVA e a diferença entre médias foi determinada pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os testes foram realizados com o programa estatístico R versão 3.4.0.

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Concentração Inibitória Mínima**

De acordo com a ANOVA, é possível notar que há diferença significativa nas concentrações de inibição obtidas entre as bactérias testadas (LAB, *E. coli* e *S. aureus*) e diferenças entre os compostos testados ( $p\text{-valor} < 0,05$ ). Os resultados podem ser observados nas tabelas 3, 4 e 5.

Apenas para o composto OEO, o teste de Tukey demonstrou que as concentrações capazes de inibir as cepas foram semelhantes para todas as bactérias testadas. Além disso, a concentração necessária de OEO para inibir todas as cepas foi a menor dentre todos os compostos testados.

Para o mel SP, pode-se notar pelo teste de Tukey que a cepa de LAB, R704 e a cepa de *S. aureus*, *S. aureus* A3 foram mais sensíveis a esse mel, enquanto as cepas de *E. coli*, EPEC atípica e STEC 2 foram menos sensíveis dentre todas as bactérias. Para o mel SB, foi possível verificar que as cepas de *S. aureus* foram as mais sensíveis, enquanto que as cepas de *E. coli* foram as menos sensíveis, sendo necessária uma concentração maior para inibi-las. Com relação ao mel Apis, não foi encontrada a MIC desse composto dentro das concentrações testadas.

Assim, é possível verificar que existe diferença na inibição entre os compostos e diferença entre as cepas testadas, no entanto, a ação do OEO foi semelhante entre todas as bactérias testadas. O mel SP teve uma ação variável entre as cepas, enquanto que o mel SB demonstrou uma ação maior nas cepas de *S. aureus* e menor nas cepas de *E. coli*.

**Tabela 3** – Concentração Inibitória Mínima das diferentes BAL para os compostos OEO, SP, SB e Apis. DP – desvio padrão. ND – não determinado.

\* *L. lactis* subsp. *cremoris* e *L. lactis* subsp. *lactis*;

\*\* *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *Ln. mesenteroides* subsp. *cremoris* e *Ln. pseudomesenteroides*;

\*\*\* Não foi encontrada ação antimicrobiana do mel Apis dentro das concentrações testadas (0,015% - 0,03% - 0,06% - 0,15% - 0,31% - 0,62% - 1,25% - 2,5% e 5%).

<b>Culturas Lácticas</b>		
<b>Compostos</b>	CHN22* (±DP)	R704** (±DP)
OEO	0,15% (±0,069)	0,15% (±0,069)
SP	2,5% (±1,44)	1,25% (±0,72)
SB	5% (±1,44)	5% (±1,44)
Apis	ND***	ND***

**Tabela 4** – Resultados da MIC das cepas de *E. coli* para os compostos OEO, SP, SB e Apis. ND – não determinado.

\* Não foi encontrada ação antimicrobiana do mel Apis dentro das concentrações testadas (0,015% - 0,03% - 0,06% - 0,15% - 0,31% - 0,62% - 1,25% - 2,5% e 5%).

Cepas bacterianas				
Compostos	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>
	ATCC 25922 (±DP)	EPEC atípica (±DP)	STEC 1 (±DP)	STEC 2 (±DP)
OEO	0,31 % (±0,092)	0,06 % (±0)	0,06% (±0,017)	0,06 % (±0)
SP	2,5 % (±1,44)	5 % (±1,44)	2,5 % (±1,44)	5 % (±1,44)
SB	5 % (±0)	5 % (±0)	5 % (±0)	5 % (±0)
Apis	ND*	ND	ND	ND

**Tabela 5** – Resultados da MIC para cepas de *S. aureus* para os compostos OEO, SP, SB e Apis. ND – não determinado.

\* Não foi encontrada ação antimicrobiana do mel Apis dentro das concentrações testadas (0,015% - 0,03% - 0,06% - 0,15% - 0,31% - 0,62% - 1,25% - 2,5% e 5%).

Cepas bacterianas				
Compostos	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>
	ATCC 29213 (±DP)	A1 (±DP)	A2 (±DP)	A3 (±DP)
OEO	0,31 % (±0,092)	0,31 % (±0,18)	0,31 % (±0,092)	0,15 % (±0,092)
SP	2,5 % (±0)	2,5 % (±0,72)	2,5 % (±0,72)	1,25 % (±0,72)
SB	2,5 % (±1,08)	2,5 % (±1,44)	2,5 % (±0)	2,5 % (±0,72)
Apis	ND	ND	ND	ND

### 3.2. Concentração Bactericida Mínima

As alíquotas obtidas da MIC para as LAB, *E. coli* e *S. aureus* mostraram que o OEO, o mel SP e o mel SB obtiveram concentração bactericida igual da inibitória, uma vez que, não houve crescimento bacteriano nas concentrações inibitórias. Não foi possível determinar a MBC do mel Apis, uma vez que, não foi observada inibição bacteriana dentro das concentrações testadas.

### 3.3. Atividade antibacteriana das bacteriocinas

Não foi observado a formação de halos de inibição para as alíquotas das duas culturas lácticas (CHN22 e R704) que passaram pelo ajuste de pH para 6. No entanto, as alíquotas que permaneceram com o pH inicial apresentaram halos de inibição que podem ser visualizados na tabela 6. Não foi possível verificar a atividade das bacteriocinas pelas espécies que compõe as culturas CHN22 e R704. No entanto, foi possível verificar que outros fatores atuaram na inibição das cepas de *E. coli* e *S. aureus*.

**Tabela 6** – Diâmetros dos halos de inibição formados pelas culturas lácticas CHN22 e R704, sem o ajuste de pH, no crescimento de *E. coli* e *S. aureus*.

Cepas bacterianas	Culturas lácticas/ Halos de Inibição ( $\pm$ DP)	
	CHN22	R704
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	14 mm ( $\pm$ 0,71)	15 mm ( $\pm$ 0,71)
<i>E. coli</i> EPEC atípica	13 mm ( $\pm$ 0,71)	14 mm ( $\pm$ 0,71)
<i>E. coli</i> STEC 1	14 mm ( $\pm$ 0,71)	16 mm ( $\pm$ 0,71)
<i>E. coli</i> STEC 2	14 mm ( $\pm$ 0,71)	16 mm ( $\pm$ 0,71)
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	12 mm ( $\pm$ 0,71)	12 mm ( $\pm$ 0,71)
<i>S. aureus</i> A1	11 mm ( $\pm$ 0,71)	11 mm ( $\pm$ 0,71)
<i>S. aureus</i> A2	12 mm ( $\pm$ 0,71)	11 mm ( $\pm$ 0,71)
<i>S. aureus</i> A3	12 mm ( $\pm$ 0,71)	13 mm ( $\pm$ 0,71)

#### 4. DISCUSSÃO

Resultados semelhantes ao nosso estudo foram encontrados por Souza e colaboradores (2016). Em seu estudo foi demonstrada a capacidade inibitória do OEO, contra *S. aureus* e uma cultura láctica utilizada como cultura *starter*, composta por *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*. O OEO foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* a uma concentração de 0,25 %, no entanto, também foi capaz de inibir o desenvolvimento da cultura láctica, a uma concentração de 0,06 %. Em nosso estudo foi possível verificar a inibição de cepas de *S. aureus* e das culturas lácticas em concentrações de 0,15-0,31% e 0,15%, respectivamente. Esses resultados indicam que as concentrações de OEO utilizadas em produtos lácteos devem ser avaliadas para que não afetem o desenvolvimento das culturas lácticas, interferindo na qualidade do produto.

Gaan (2013) verificou a capacidade inibitória de compostos presentes em óleos essenciais contra diferentes espécies de LAB, dentre elas *Ln. mesenteroides*. Como resultado, conclui que os constituintes presentes no OEO, carvacrol e timol, apresentaram a maior capacidade inibitória dentre os compostos testados. Tanto o carvacrol quanto o timol foram capazes de inibir *Ln. mesenteroides* numa concentração de 0,05 %. Além disso, verificaram a capacidade bactericida desses compostos, determinada em 0,2 % tanto para o carvacrol quanto para o timol. Esses resultados são semelhantes aos resultados obtidos em nosso estudo, uma vez que a concentração inibitória mínima e bactericida mínima foi de 0,15%.

Burt e Reinders (2003) verificaram que o OEO tem uma ação bactericida em cepas de *E. coli* O157:H7 numa concentração de 0,06 %, sendo igual ao resultado obtido em nosso estudo para as cepas de *E. coli* isoladas de queijo. Peñalver e colaboradores (2005) verificaram a ação de vários óleos essenciais contra bactérias patogênicas, como *E. coli*. O OEO foi um dos óleos essenciais testados e mostrou a capacidade de inibição de *E. coli* numa concentração de 4 %. Esse resultado é superior à concentração inibitória mínima encontrada para as cepas de *E. coli* isoladas do queijo.

Araújo e Longo (2016) verificaram a ação do OEO (Lazlo®) na inibição de *E. coli* e *S. aureus* relacionados a intoxicação alimentar. Para ambas as espécies, a concentração de inibição pelo OEO variou entre 2,5 a 0,62%, em que o OEO teve

ação bactericida. Por outro lado, Scandorieiro e colaboradores (2016) verificaram que o OEO (Ferquima®) apresentou alta atividade bactericida contra cepas de *E. coli* (0,06% - 0,12%) e *S. aureus* (0,06%), e com efeito sinérgico quando associada às nanopartículas de prata biogênicas. Esses estudos demonstram relação com os resultados encontrados em nosso estudo, no entanto, também indicam a variação da concentração inibitória mínima do OEA de acordo com a cepa testada.

Wasihun e Kasa (2016) avaliaram a capacidade inibitória e bactericida de seis tipos de méis, três méis branco e três méis vermelho, produzidos pelo gênero *Apis* sp., obtidos em três distritos diferentes da Etiópia contra diversas bactérias patogênicas, dentre elas, *E. coli* e *S. aureus*. Não houve diferenças nas concentrações de inibição entre os dois tipos de méis. Com relação as bactérias, os méis foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli* numa concentração entre 25-12,5 %. Para *S. aureus* a concentração de inibição foi de 12,5-6,25 %. A capacidade bactericida dos méis foi em 50 % para *E. coli* e entre 50-25 % para *S. aureus*. Ao se comparar com os resultados do nosso estudo, é possível verificar que existe uma variação na capacidade inibitória dos méis, sugerindo que essa variação pode estar relacionada com a composição, espécie produtora e/ou local de produção. Essa variação é demonstrada em nosso estudo, uma vez que, ao se testar os méis SP, SB e Apis, foi verificada que os méis produzidos pelas espécies do gênero *Scaptotrigona* apresentaram capacidade de inibição das bactérias em concentrações semelhantes, enquanto que o mel produzido pela espécie *Apis mellifera scutellata* não apresentou capacidade inibitória.

Outros estudos demonstram essa variação. Al-Waili e colaboradores (2014) verificaram que amostras de méis coletados nos Emirados Árabes Unidos eram capazes de inibir o crescimento de *E. coli* numa concentração de 30 % enquanto que a inibição do crescimento de *S. aureus* ocorreu numa concentração de 50 %. Nishio e colaboradores (2016) verificaram a capacidade inibitória de dois tipos de méis, produzidos respectivamente por *Scaptotrigona bipunctata* (Lepelletier, 1836) e *S. postica* (Latreille, 1807) contra cepas de *S. aureus* resistentes a metilina (MRSA). Os valores da concentração capaz de inibir *S. aureus* foram de 0,62-1,25 % para o mel produzido por *S. bipunctata* e 1,25-2,5 % para o mel produzido por *S. postica*, sendo semelhantes aos resultados obtidos em nosso estudo para os méis produzidos por essas espécies.

Tatsadjieu e colaboradores (2009) verificaram a ação de sobrenadantes obtidos do cultivo de diferentes espécies de *Lactobacillus* contra *E. coli*. Assim como em nosso estudo, os sobrenadantes foram testados em dois pHs diferentes, 4,5 e 7. Os autores, verificaram que a capacidade de inibição foi maior para o sobrenadante com pH 4,5, sugerindo a influência dos ácidos produzidos pelas espécies de *Lactobacillus* contra *E. coli*. O sobrenadante com pH 4,5 formou halos de inibição de 12 mm de diâmetro, enquanto que o sobrenadante com pH 7 formou halos de inibição de 6 a 8 mm de diâmetro. Os halos de inibição obtidos nesse estudo para o sobrenadante a pH 4,5 são semelhantes aos obtidos em nosso estudo.

Aslim e colaboradores (2005) verificaram a capacidade de inibição de bacteriocinas produzidas por diferentes espécies de *Lactobacillus* contra *E. coli* e *S. aureus*. Foram utilizadas 19 espécies de *Lactobacillus* e obtido o sobrenadante de cada cultura. De forma semelhante ao nosso estudo, verificaram a inibição com o ajuste de pH para 6,5 e sem o ajuste de pH. Como resultados, observaram halos de inibição produzidos por todas as bactérias lácticas testadas sem o ajuste de pH contra as cepas de *E. coli* e *S. aureus*. Os diâmetros dos halos variaram de 8 a 30mm, dependendo da cepa de *Lactobacillus*, tanto para *E. coli* quanto para *S. aureus*. Com relação aos sobrenadantes que passaram por ajuste de pH, houve a formação de halos de inibição por apenas 3 espécies das 19 testadas, contra as duas cepas patogênicas, com diâmetros variando de 8 a 10mm para *E. coli* e de 13 a 20 para *S. aureus*. Esses resultados são semelhantes aos obtidos em nosso estudo, mostrando que os ácidos produzidos por essas bactérias têm influência na inibição de cepas patogênicas.

## 5. CONCLUSÃO

Dessa forma, é possível concluir que o OEO e os méis SP e SB apresentam importante ação contra microrganismos patogênicos. A concentração desses compostos para uso em produtos lácteos deve ser avaliada devido à capacidade inibitória de LAB, o que pode influenciar na qualidade desses produtos. Diversos estudos mostram diferentes concentrações desses compostos naturais na inibição de LAB, *E. coli* e *S. aureus*, sugerindo que a capacidade inibitória do OEO e dos méis varia consideravelmente de acordo com a cepa analisada. Não foi verificada a

produção de bacteriocinas pelas culturas lácticas, uma vez que, a inibição de *E. coli* e *S. aureus* ocorreu apenas em pH ácido.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-WAILI, N. S. et al. Effects of natural honey on polymicrobial culture of various human pathogens. **Archives of Medical Science**, v. 2, p. 246-250, maio. 2014.
- ARAÚJO, M. M.; LONGO, P. L. Teste da ação antibacteriana *in vitro* de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-7, abr. 2016.
- ASLIM, B. et al. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. **LWT - Food Science and Technology**, Turquia, v. 38, p. 691-694, ago. 2004.
- BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 162-167, dez. 2003.
- CASALTA, E.; MONTEL, M. C. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 271-273. 2008.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved Standard Standard, M07-A9. 9. ed. Wayne, PA, USA: CLSI; 2016.
- FARROKH, C. et al. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 190-212, mar. 2013.
- GANN, L. D. **Antimicrobial Activity of Essential Oils and Their Components Against Lactic Acid Bacteria**. 2013. 50f. Thesis (Master of Science Degree) - The University of Tennessee, Knoxville, 2013.
- HUTKINS, R. **Microbiology and technology of fermented foods**. Estados Unidos: Blackwell Publishing, 2006. 473p.
- JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.
- KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Echerichia coli*. **Nature**, Estados Unidos, v. 2, p. 123-140, fev. 2004.
- KUMAR, R; PRASAD, A. Detection of *E.coli* and *Staphylococcus* in Milk and Milk Products in and around Pantnagar. **Veterinary World**, Índia, v. 3, n. 11, p. 495-496. 2010.

- LEE, H.; CHUREY, J. J.; WOROBO, R. W. Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 240-244, abr. 2008.
- LIMA, E. T. et al. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 71, p. 103-107, ju. 2007.
- MARCO, M. L. et al. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond **Current Opinion in Biotechnology**, v. 44, p. 94-102, jan. 2017.
- MARQUES, J. L. et al. Antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. against *Staphylococcus aureus* isolated from poultry meat. **Industrial Crops and Products**, Rio Grande do Sul, v. 77, p. 444-450, set. 2015.
- NAZZARO, F. et al. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, p. 1451-1474, nov. 2013.
- NISHIO, E. K. Antibacterial activity of honey from stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 and *S. postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Apicultural Research**, v. 54, n. 5, p. 1-9, maio. 2016.
- PEÑALVER, P. et al. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae Family. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 113, p. 1-6, jul. 2005.
- PEREIRA, V. G.; GOMÉZ, R. J. H. C. Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* against foodborne pathogens. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 2, p. 229-240, abr.-jun. 2007.
- POGACIC, T. et al. Phenotypic traits of genetically closely related *Leuconostoc* spp. **International Dairy Journal**, v. 39, n. 1, p. 96-101, nov. 2014.
- RUGGIRELLO, M.; COCOLIN, L.; DOLCI, P. Fate of *Lactococcus lactis* starter cultures during late ripening in cheese models. **Food Microbiology**, v. 59, p. 112-118, out. 2016.
- SCANDORIEIRO, S. et al. Synergistic and Additive Effect of Oregano Essential Oil and Biological Silver Nanoparticles against Multidrug-Resistant Bacterial Strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 760.
- SCHUBERT, J. et al. Production of staphylococcal enterotoxins in microbial broth and milk by *Staphylococcus aureus* strains harboring *seh* gene. **International Journal of Food Microbiology**, v. 235, p. 36-45, out. 2016.
- SOUZA, G. T. et al. Effects of the Essential Oil from *Origanum vulgare* L. on Survival of Pathogenic Bacteria and Starter Lactic Acid Bacteria in Semihard Cheese Broth and Slurry. **Journal of Food Protection**, v. 79, n. 2, p. 246-252, ago. 2016.

- SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIHAH, U. R. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1-21, out. 2016.
- TATSADJIEU, N. L. Characterization of lactic acid bacteria producing bacteriocins against chicken *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 5, p. 220-227, maio, 2009.
- WASIHUN, A. G.; KASA, B. G. Evaluation of antibacterial activity of honey against multidrug resistant bacteria in Ayder Referral and Teaching Hospital, Northern Ethiopia. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1-8, jun. 2016.
- WILLIAMS, N. D.; TORRES, A. G.; LLOYD, S. J. Evolution and Epidemiology of Diarrheagenic *Escherichia coli*. In: TORRES, A. G. **Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America**. Estados Unidos: Bentham Science Publishers, 2010. p. 8-24.

## **7. CONCLUSÃO**

O sistema de *multiplex*-PCR testado pode ser utilizada para detecção de *E. coli* diarrreio gênica direta no leite.

Os compostos naturais podem ser utilizados no controle de microrganismos patogênicos, como *E. coli* e *S. aureus*, no entanto, seu uso deve ser controlado em produtos lácteos fermentados, uma vez que age em LAB, podendo afetar na qualidade do produto final