

AMANDA RAFAELA CARNEIRO DE MESQUITA

**INFLUÊNCIA DO TWEEN 80 E DO ÁCIDO LINOLEICO SOBRE O
CRESCIMENTO E METABOLISMO DE NOVAS CEPAS DE
Lactobacillus paracasei e *Lactobacillus plantarum***

**RECIFE
2017**

AMANDA RAFAELA CARNEIRO DE MESQUITA

**INFLUÊNCIA DO TWEEN 80 E DO ÁCIDO LINOLEICO SOBRE O
CRESCIMENTO E METABOLISMO DE NOVAS CEPAS DE
Lactobacillus paracasei e *Lactobacillus plantarum***

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^a. Eulália de Azevedo Ximenes.

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^a Janaína Versiani dos Anjos.

**RECIFE
2017**

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida da Silva, CRB4-1662

M582i	Mesquita, Amanda Rafaela Carneiro de. Influência do Tween 80 e do ácido linoleico sobre o crescimento e metabolismo de novas cepas de <i>Lactobacillus paracasei</i> e <i>Lactobacillus plantarum</i> / Amanda Rafaela Carneiro de Mesquita. – 2017. 124 folhas: il. ; 30 cm. Orientadora: Eulália de Azevedo Ximenes. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2017. Inclui referências e Apêndices. 1. Ácidos Linoleicos. 2. <i>Lactobacillus</i>. 3. Metabolismo. 4. Crescimento Bacteriano. I. Ximenes, Eulália de Azevedo. (Orientadora). II. Título. 615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2017-119)
-------	---

AMANDA RAFAELA CARNEIRO DE MESQUITA

**INFLUÊNCIA DO TWEEN 80 E DO ÁCIDO LINOLEICO SOBRE O
CRESCIMENTO E METABOLISMO DE NOVAS CEPAS DE *Lactobacillus paracasei*
e *Lactobacillus plantarum***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 10/03/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Janáina Versiani dos Anjos (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Maria Amelia Vieira Maciel (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Ana Catarina de Souza Lopes (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Gustavo Santiago Dimech (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITORA

Prof.^a Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos.

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto.

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Almir Gonçalves Wanderley

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Prof. Rafael Matos Ximenes

RECIFE

2017

Aos meus pais Djalma Mesquita e Veronice Mesquita pelo amor, preocupação, cuidado e por estarem sempre ao meu lado me apoiando, confiando, incentivando e me dando força em todos os momentos e decisões.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde, força, determinação e perseverança para que eu acreditasse nesta conquista e chegasse a este fim.

À minha família por todo amor, incentivo, orações, confiança e força em todos os momentos e em especial à minha irmã Silvia Patrícia de Mesquita e meus três sobrinhos Gabriel de Mesquita, Guilherme de Mesquita e Gustavo de Mesquita que foram responsáveis pelos adoráveis momentos de carinho, descontração e pela reposição de boas energias.

À prof.^a Eulália Ximenes pelos ensinamentos científicos iniciados no período da graduação, onde surgiu meu interesse pela Microbiologia e especialmente pelo grande aprendizado que me proporcionou com os probióticos. Agradeço também a confiança neste projeto e por toda a ajuda em todo este período.

À prof.^a Janaína Versiani pela paciência, atenção, por todos ensinamentos e confiança. Agradeço também por ter aceitado a parceria neste projeto, quando já não tínhamos muito tempo disponível e pela disponibilidade, incentivo e carinho sempre demonstrados. Muito obrigada, Jana!!!

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Nerilin Trajano e Rilvan Guedes pela paciência, atenção, cooperação e presteza.

A secretária do Programa de Pós-Graduação em Patologia, Margarete Valdevino, pela amizade, apoio, carinho e abraços afetuosos.

Às professoras que me acompanharam durante o estágio de docência: prof.^a Kêsia Xisto pelo grande incentivo e credibilidade que me deu para ministrar suas aulas e à prof.^a Norma Gusmão pelo acompanhamento nas aulas, estímulo e motivação durante esse período.

Aos alunos da turma de Biomedicina 2013.2 por terem me despertado para o ensino e pela grande felicidade que me proporcionaram ao ter sido uma das professoras homenageadas durante o estágio de docência. E a Evelynne Solidonio e a monitora Hicla Moreira pela força e grande ajuda nas aulas práticas. Muito obrigada!!!

À professora Ana Maria Souto-Maior por abrir as portas do seu laboratório (Laboratório de Processos Biotecnológicos) e por sempre estar disponível a ajudar. Aos amigos desse referido laboratório Iranildo Cruz e Vanessa Lima pela amizade, ajuda, companheirismo, atenção e carinho.

Ao prof. Alexandre Schuller por permitir o uso de seu laboratório e especialmente a Valmir Lima pelos ensinamentos, conselhos e acompanhamento em todas as minhas análises.

A Vladimir Filho pela colaboração na identificação genética inicial dos lactobacilos e pela disponibilidade em sempre ser útil.

Aos professores da UFRPE, especialmente os professores Marcus Metri e Inaldo Galdino pelo apoio, preocupação e por toda a ajuda e estímulo que me deram. Faltam-me palavras para agradecê-los!!!

À professora Ana Catarina Lopes pelas importantes observações no exame de qualificação, pela disponibilidade e a sua aluna Rita de Cássia Melo pela atenção e ajuda inicial na biologia molecular.

Aos professores Cíntia Rocha e Irapuan Pinheiro e suas alunas Jéssica Frutuoso e Amanda Mota pela atenção, paciência, disponibilidade, confiança e pelo aprendizado que me proporcionaram em áreas novas e desafiadoras para mim.

Ao professor Alex Sanches Torquato (UTFPR-MD) pela colaboração, atenção e disponibilidade.

Aos amigos que a vida me deu e que se fizeram mais que especiais nesta caminhada: Fabíola Soares, Anabelle Bezerra, Adriana Andrade, Ana Luiza Ramos, Ivana Porto, Andréa Luiza, Karla Gouveia, Sônia Souza, Wanderson Costa, Nathália Percino, Marluce Teixeira, Arsênio Rodrigues, Liany Melo, Ednalva Santana, Juliana Virgínia, Walquíria Brito, Maria Cláudia Vicalvi e Igor Souza. Sem o apoio, força e estímulo de vocês eu não conseguiria.

Ao amigo Lucas Pacheco pelo belo exemplo de maturidade, pelos conselhos, apoio e grande ajuda não só durante os dois anos em que dividimos a bancada, mas também ao longo de todo o curso.

À amiga Ana Albertina Araújo pelas cepas bacterianas doadas para este trabalho, pelo carinho e amizade, sempre me encorajando com mensagens diárias de fé e ânimo.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos: Tiago Gomes, Luciana Macedo, Leonardo Aquino, Fábio Aguiar, Gustavo Dimech, Renata Ramos, Liliane Nunes pelos aprendizados diários, por tornarem o trabalho mais leve e pelos muitos momentos de alegria, risadas e descontração. E às amigas: Klewda Araújo (Mag), sempre me fortalecendo com um conselho e uma palavra amiga para cada momento; e Tacilene Silva pela calma, tranquilidade e positividade que me proporcionou. A partir de uma dupla formamos um trio massa!!!

Aos colegas do Laboratório de Síntese Orgânica: Michael Holanda, Andessa Leal, Valentina Nascimento e Paulo Henrique pelo acolhimento, assistência e cooperação durante o período em que estive lá.

Aos professores, técnicos, alunos e funcionários do Departamento de Antibióticos, em especial as Professoras Janete Magali e Maria do Carmo Alves, Emerson Silva, Fátima Regina, Jean Castro, Luis Carlos Silva, Orlando Silva, Marcela Sobral e Maria Betânia Alves pela disponibilidade e boa vontade em ajudar sempre.

A todos que fazem parte da Central analítica do DQF, em especial a Pablo Medeiros pela ajuda na realização das análises.

À equipe da Estação de Pesquisa da Biblioteca Central (UFPE): Ielma Ferro, Isabella Medeiros, Nathália Sena e Telma Arruda pela grande ajuda na pesquisa dos artigos, pela agilidade, eficiência e solicitude. Agradeço também à bibliotecária Sandra Santiago pela prestimosidade e pelos valiosos esclarecimentos sobre as normas da ABNT.

À Capes pelo suporte financeiro do projeto.

*O êxito da vida não se mede pelo caminho que
você conquistou, mas sim pelas dificuldades que
superou no caminho.*

Abraham Lincoln

RESUMO

Ácido linoleico conjugado (CLA) é um termo utilizado para designar 28 isômeros de posição do ácido linoleico, associados a diversas atividades farmacológicas, principalmente atividade anticancerígena e antiobesidade. Diferentes gêneros bacterianos estão envolvidos com a produção de CLA e a grande maioria é utilizada como probiótico. São espécies de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* e *Pediococcus* que possuem a capacidade de biossintetizar CLA a partir do ácido linoleico livre. Diante dessas observações, este trabalho teve por objetivo o isolamento e identificação de cepas de *Lactobacillus*; avaliação do efeito do Tween 80 sobre o crescimento, a produção de ácidos orgânicos e etanol, e avaliação antimicrobiana de diferentes linhagens de lactobacilos frente bactérias multirresistentes; bem como a determinação da cinética de crescimento em meio de cultura contendo diferentes concentrações de ácido linoleico, com a finalidade de selecionar cepas de lactobacilos produtoras de CLA. As bactérias foram isoladas a partir de uma bebida chamada kefir e identificadas através do sequenciamento de segmentos do gene 16S rDNA e PCRs-específicas. Foi determinada também a cinética de crescimento das dez cepas isoladas em meio MRS contendo diferentes concentrações de ácido linoleico e Tween 80. Foi observado que não houve influência do Tween 80 sobre o crescimento e produção de metabólitos de todas as espécies de lactobacilos estudadas. O ácido lático foi o metabólito mais produzido, seguido de ácido acético e etanol. O tempo de adaptação das bactérias ao meio MRS contendo ácido linoleico durou até 12 horas e foi dependente da cepa avaliada. As cepas que tiveram uma fase lag prolongada (12 horas) e que apresentaram maior sensibilidade ao ácido linoleico foram todas da espécie *L. paracasei* (LBFM 01, LBFM 05, LBFM 06 e LBFM 11). *L. plantarum* (LBFM 02, LBFM 04, LBFM 07, LBFM 08 e LBFM 09) foram as linhagens mais adaptadas à presença do ácido linoleico. Em relação à produção de CLA, *L. plantarum* LBFM 07 e *L. plantarum* 09 foram os maiores produtores, sendo trans-10, cis-12-CLA o principal isômero produzido.

Palavras chave: Ácido linoleico conjugado. *Lactobacillus* spp. Metabolismo. Crescimento bacteriano.

ABSTRACT

Conjugated linoleic acid (CLA) is a term used to denote 28 positional isomers of linoleic acid, associated with several pharmacological activities, mainly anticancer and antiobesity. Different bacterial genera are involved with the production of CLA and the vast majority is used as a probiotic. They are species of *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* and *Pediococcus* that have the ability to biosynthesize CLA from free linoleic acid. In view of these observations, this aimed at the isolation and identification of *Lactobacillus* strains; the evaluation of the effect of Tween 80 on growth, production of organic acids and ethanol, and the antimicrobial evaluation of different strains of lactobacilli against multiresistant bacteria as well as the determination of the kinetics of growth in culture medium containing different concentrations of linoleic acid, in order to select CLA-producing *Lactobacillus* strains. Bacteria were isolated from a beverage called kefir and identified through the sequencing of 16S rDNA gene and specific PCR segments. The growth kinetics of the ten strains isolated in MRS medium containing different concentrations of linoleic acid and Tween 80 was also determined. There was no influence of Tween 80 on the growth and production of metabolites of all species of lactobacilli studied. Lactic acid was the most produced metabolite, followed by acetic acid and ethanol. The time for adaptation of the bacteria to the MRS medium containing linoleic acid lasted up to 12 hours and depended on the strain evaluated. The strains that had a prolonged lag phase (12 hours) and showed the highest sensitivity to linoleic acid were all of *L. paracasei* (LBFM 01, LBFM 05, LBFM 06 and LBFM 11). *L. plantarum* (LBFM 02, LBFM 04, LBFM 07, LBFM 08 and LBFM 09) were the strains most adapted to the presence of linoleic acid. In relation to the CLA production, *L. plantarum* LBFM 07 and *L. plantarum* 09 were the major producers, and trans-10, cis-12-CLA was the main isomer produced.

Key words: Conjugated linoleic acid. *Lactobacillus* spp. Metabolism. Bacterial growth.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspecto macroscópico: semeio <i>pour plate</i> (A) e semeio em superfície (B); e aspecto microscópico (C) (1000x) de <i>Lactobacillus spp.</i> (1000x)	20
Figura 2: Esquema representativo da classificação dos lactobacilos quanto à fermentação de carboidratos	22
Figura 3: Representação esquemática da glicólise em <i>Lactobacillus spp.</i> homofermentativos	23
Figura 4: Metabolismo da galactose em bactérias ácido-láticas	24
Figura 5: Representação esquemática da glicólise por <i>Lactobacillus spp.</i> heterofermentativos	26
Figura 6: Metabolismo da lactose em lactobacilos.	27
Figura 7: Metabolismo de Fruto-oligossacarídeo (FOS) em lactobacilos através do transportados ABC.	29
Figura 8: Metabolismo de Fruto-oligossacarídeo (FOS) em lactobacilos através do sistema PTS (fosfoenolpiruvato).	30
Figura 9: Ilustração dos três tipos de transportadores da MFS.	31
Figura 10 - Sistemas de transporte de açúcares em bactérias intestinais	32
Figura 11: Representação esquemática da função e regulação do sistema proteolítico em lactococos na proteólise da caseína	34
Figura 12: Representação esquemática da parede celular e das proteínas associadas à membrana dos lactobacilos	38
Figura 13: Estrutura do ácido linoleico e dos dois principais isômeros CLA (ácido linoleico conjugado) com atividade biológica	39
Figura 14: Via metabólica simplificada de lipídios para a produção de CLA	42
Figura 15: Produção de CLA em ruminantes. Em (A) via metabólica do ácido linoleico	43
Figura 16: Efeito do CLA na fisiologia do tecido adiposo. CLA: ácido	43

linoleico conjugado

Figura 17: Mecanismo de inibição da diferenciação do pré-adipócito em adipócito pelo CLA	48
Figura 18: Mecanismo molecular do CLA na carcinogênese	53
Figura 19: Grãos de kefir	60
Figura 20: Enumeração das células viáveis de dez cepas de lactobacilos em meio MRS adicionado de diferentes concentrações de Tween 80	62
Figura 21: Aspecto macroscópico (A, C, E e G) e aspecto microscópico (B, D, F e H) (1000x) de <i>L. paracasei</i>	73
Figura 22: Aspecto macroscópico (A, C, E, G e H) e aspecto microscópico (B, D, F, H e J) (1000x) de <i>L. plantarum</i>	74
Figura 23: Crescimento das linhagens de <i>L. paracasei</i> em meio MRS adicionado de diferentes concentrações de Tween 80 (0,6 % TW, 0,4% TW e 0,2% TW).	78
Figura 24: Crescimento das linhagens de <i>L. plantarum</i> em meio MRS adicionado de diferentes concentrações de Tween 80 (0,6 % TW, 0,4% TW e 0,2% TW).	79
Figura 25: Crescimento de diferentes espécies de lactobacilos em meio MRS adicionado de diferentes concentrações de Tween 80 (0,6 % TW, 0,4% TW e 0,2% TW).	79
Figura 26: Produção de ácido láctico por diferentes linhagens de lactobacilos após 48 h de cultivo em MRS contendo 0,6% de Tween 80 (TW 0,6%)	83
Figura 27: Produção de ácido acético por diferentes linhagens de lactobacilos após 48 h de cultivo em MRS contendo 0,6% de Tween 80 (TW 0,6%)	83
Figura 28: Produção de etanol por diferentes linhagens de lactobacilos após 48 h de cultivo em MRS contendo 0,6% de Tween 80 (TW 0,6%)	84
Figura 29: Valores de pH dos caldos fermentados de diferentes linhagens de lactobacilos após 48 h de cultivo em MRS contendo 0,6% de Tween 80 (TW 0,6%)	84
Figura 30: Atividade antimicrobiana do caldo fermentado de lactobacilos após 48 h de cultivo em MRS contendo 0,6% de Tween 80 frente diferentes linhagens de MRSA	88
Figura 31: Atividade antimicrobiana do caldo fermentado de lactobacilos após	89

48 h de cultivo em MRS contendo 0,6% de Tween 80 frente diferentes linhagens de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase

Figura 32: Crescimento de linhagens de <i>L. paracasei</i> em meio MRS adicionado de diferentes concentrações de ácido linoleico (0,5 % AL, 0,25% AL e 0,125% AL).	92
Figura 33: Crescimento de linhagens de <i>L. plantarum</i> em meio MRS adicionado de diferentes concentrações de ácido linoleico (0,5 % AL, 0,25% AL e 0,125% AL).	93
Figura 34: Crescimento de diferentes espécies de lactobacilos em meio MRS adicionado de diferentes concentrações de ácido linoleico (0,5 % AL, 0,25% AL e 0,125% AL).	93
Figura 35: Cromatograma do padrão Ácido Linoleico (AL)	96
Figura 36: Cromatograma do padrão cis-9, trans-11-CLA	96
Figura 37: Cromatograma do padrão trans-10, cis-12-CLA	97
Figura 38: Cromatograma de CLA para <i>L. plantarum</i> LFBM 07 em MRS com 0,5% de ácido linoleico	97
Figura 39: Cromatograma de CLA para <i>L. plantarum</i> LFBM 09 em MRS com 0,5% de ácido linoleico	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alguns dos carboidratos utilizados por espécies de lactobacilos	21
Tabela 2: Produção total e individual dos isômeros CLA por <i>L. plantarum</i> LFBM 07 e LFBM 09 em diferentes tempos de incubação em caldo MRS contendo 0,05% de ácido linoleico	98

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Origem e perfil de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos das espécies de <i>Klebsiella pneumoniae</i> isoladas de um hospital particular do Recife.	65
Quadro 2 : Origem e perfil de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos das espécies de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de um hospital particular do Recife.	66
Quadro 3 : Origem dos lactobacilos isolados	71

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 LACTOBACILOS	20
2.1.1 Metabolismo dos carboidratos	21
2.1.2 Metabolismo de dissacarídeos	27
2.1.3 Metabolismo de oligossacarídeos	28
2.1.4 Sistemas de transportes de soluto	30
2.1.5 Sistema proteolítico e metabolismo das proteínas	32
2.1.6 Metabolismo de lipídeos: Tween 80 como fator de crescimento	35
2.1.7 Mecanismos de adaptação	36
2.2 ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA)	40
2.2.1 Efeitos do Ácido Linoleico Conjugado (CLA)	44
2.2.1.1 Atividade antiobesidade	44
2.2.1.2 Atividades antioxidante e anticancerígena	50
2.2.2 Efeitos adversos do CLA	54
3 OBJETIVOS	57
3.1 OBJETIVO GERAL	57
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	57
4 MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1. ISOLAMENTO DOS LACTOBACILOS	59
4.2. IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA	60
4.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus spp.</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TWEEN 80	61
4.4 ANÁLISE DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS E ETANOL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	63
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CALDO FERMENTADO DE LACTOBACILOS SOBRE ESPÉCIES MULTIRRESISTENTES	63
4.6 CRESCIMENTO DE LACTOBACILOS EM MRS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO LINOLEICO	66
4.7 SELEÇÃO DAS CULTURAS DE LACTOBACILOS PARA A PRODUÇÃO DE CLA	67
4.8 OTIMIZAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE cis-9, trans-11-CLA e trans-10,cis-12-CLA	68
4.9 PRODUÇÃO DE CLA	68
4.9.1 Extração de lipídios	68
4.9.2 Hidrólise de lipídios	69
4.9.3 Metilação	69
4.9.4 Detecção de CLA	69
4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	70
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1 ISOLAMENTO DOS LACTOBACILOS	71
5.2 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA	75
5.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus spp.</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TWEEN 80	77

5.4 ANÁLISE DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS E ETANOL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	82
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CALDO FERMENTADO DE LACTOBACILOS SOBRE ESPÉCIES MULTIRRESISTENTES	87
5.6 CRESCIMENTO DE LACTOBACILOS EM MRS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO LINOLEICO	91
5.7 PRODUÇÃO DE CLA	96
6 CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS	103
APÊNDICES	121

1 INTRODUÇÃO

As bactérias ácido-láticas são um grupo de bactérias Gram-positivas, não-esporuladas, com um metabolismo fermentativo que tem o ácido lático como o principal produto final. Esse grupo compreende sete gêneros: *Enterococcus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Pediococcus spp.*, *Oenococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Leuconostoc spp.* e *Lactobacillus spp.* (O'SULLIVAN et al., 2009).

Com mais de 150 espécies e subespécies, o gênero *Lactobacillus* representa o maior grupo dentro da família Lactobacillaceae. Essas bactérias são estritamente fermentativas e de acordo com o produto final da fermentação, elas são divididas em dois grupos principais: homofermentativas e heterofermentativas. As espécies do primeiro grupo fermentam carboidratos exclusivamente em ácido lático, e as espécies heterofermentativas convertem os carboidratos em ácido lático, ácido acético, etanol e CO₂ (FELIS; DELAGIO, 2007; GIRAFFA; CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010).

Lactobacilos são bactérias conhecidas por apresentarem um complexo requerimento nutricional para seu crescimento. Esses componentes nutricionais são peptídeos, vitaminas, aminoácidos, sais, carboidratos e ácidos graxos ou ésteres de ácidos graxos. A síntese e utilização desses fatores nutricionais são essenciais para o crescimento e as atividades metabólicas dessas bactérias (SALVETTI; TORRIANI; FELIS, 2012; HAYEK; IBRAHIM, 2013, RICCIARDI et al., 2015).

A evolução desses bacilos foi acompanhada por perda e aquisição de genes, mas principalmente de grande perda de genes ancestrais. A perda gênica incluiu as seguintes funções: esporulação, presença da catalase, biossíntese de aminoácidos, divisão celular e biossíntese de ácidos graxos. Em contrapartida, essas bactérias adquiriram genes específicos para peptidases e proteínas envolvidas no metabolismo e transporte de açúcar. Muitas dessas mudanças podem estar relacionadas com a transição dos lactobacilos para um meio nutricionalmente rico (MAKAROVA et al., 2006).

O meio MRS (Man, Rogosa & Sharpe) é o principal meio utilizados para o cultivo não-específico de lactobacilos. Ele contém 0,1% de Tween 80 (ácido cis-9-octadecanoico) que é um surfactante derivado do ácido oleico e conhecido por otimizar o crescimento de muitas bactérias ácido-láticas (DE MAN, ROGOSA & SHARPE, 1960; HAYEK, IBRAHIM, 2013).

Contudo, estudos realizados por Al-Naseri et al. (2013) demonstraram que o Tween 80 não afetou substancialmente o crescimento de *L. casei* no meio MRS. Por essas divergências entre influenciar ou não a multiplicação bacteriana, o efeito do Tween na fisiologia celular não está totalmente elucidado.

Em diversas bactérias ácido-láticas, os ácidos octadecanoicos são convertidos na membrana celular em ácidos graxos específicos dos lactobacilos. O ácido oleico e ácido cis-vacênico são exemplos de ácidos octadecanoicos mais predominantes neste grupo bacteriano, compondo de 14 a 67% do total de ácidos graxos. Entretanto, ácido linoleico pode ser encontrado de traços a 20%, embora seja relativamente incomum (KANKAANPÄÄ et al., 2004).

O ácido linoleico é um ácido graxo essencial que não é sintetizado pelo corpo humano, estando disponível no organismo apenas através do consumo na dieta (DAS UN, 2006). Ele pode ser isomerizado a Ácido Linoleico Conjugado (CLA) por algumas bactérias, como a bactéria ruminal *Butivibrio fibrisolvens* e outras intestinais: *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Propionobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Bacteroides spp.* e *Pediococcus spp.* (SIEBER et al., 2004; KALUPAHANA et al., 2011; CHEN et al., 2012).

CLA é um termo utilizado para designar isômeros geométricos e de posição do ácido linoleico com duplas ligações separadas por um radical metileno (HENNESSY et al., 2016). Existem vários isômeros CLA descritos na literatura, porém os isômeros cis-9, trans-11-ácido octadecadienoico (cis-9, trans11-CLA) e o trans-10,cis-12-ácido octadecadienoico (trans-10, cis-12-CLA) são os mais estudados e os que possuem mais promissoras atividades biológicas (CHEN et al., 2012; KIM et al., 2016).

As principais ações biológicas atribuídas ao CLA são: anticarcinogênica, antidiabetogênica, antiobesidade, antiesclerótica e algumas relacionadas com a melhoria das funções do sistema imune (KIM et al., 2016; LEHNEN et al., 2015; HENNESSY et al., 2016).

Os isômeros CLA são produzidos naturalmente no trato digestivo de ruminantes (bovinos, caprinos, ovinos, búfalos) por ação da bactéria *B. fibrisolvens*. Por isso os isômeros do CLA são encontrados em carnes, leites e derivados desses animais (LEHNEN et al., 2015). CLA também pode ser produzido sinteticamente por isomerização do ácido linoleico, porém essa reação pode resultar na subprodução de isômeros inesperados e substâncias tóxicas (OGAWA et al., 2005).

Devido à elevada capacidade de isomerização da microbiota intestinal, tem aumentado o interesse dos pesquisadores na busca de novas cepas bacterianas com a capacidade de produzir CLA (HENNESSY et al., 2016). A capacidade de isomerização de ácidos graxos por bactérias de diversos nichos ambientais oferece potencial produção de ácidos graxos conjugados potencialmente bioativos. Não somente as cepas provenientes de produtos lácteos, como iogurtes, queijos, mas também a busca de novas cepas são importantes para pesquisas que objetivam a produção de CLA *in situ* no trato gastrointestinal a partir dos ácidos graxos provenientes da dieta (COLAKOGLU; GURSOY, 2011; DOMAGALA et al. 2013; YE et al., 2013; VILLAR-TAJADURA et al., 2014).

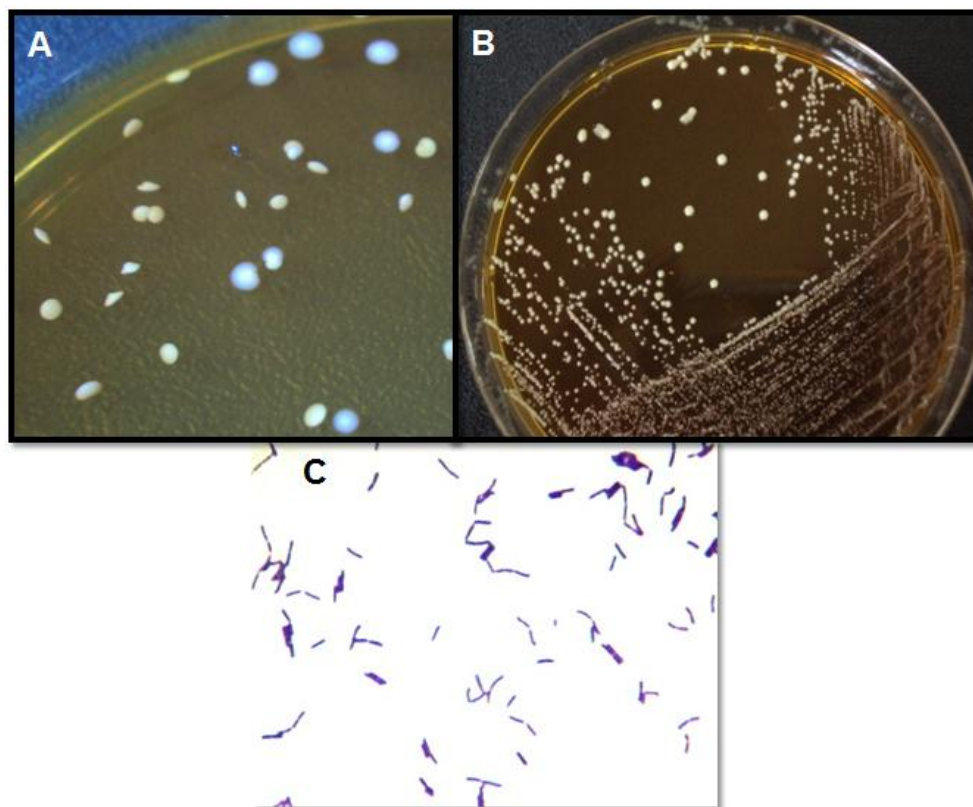
Diante do que foi abordado, este trabalho teve por objetivo estudar a influência do Tween 80 e do ácido linoleico sobre o crescimento e metabolismo de novas cepas de lactobacilos isoladas de diferentes fontes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LACTOBACILOS

Lactobacillus são bactérias Gram-positivas, imóveis, não produtoras de esporos, a maioria anaeróbias facultativas, ácido-tolerantes, e catalase negativa. O gênero *Lactobacillus* pode apresentar forma de bacilo ou cocobacilo, geralmente caracterizados pelo baixo conteúdo de G+C (guanina e citosina - 33 a 52%) no genoma. São micro-organismos fermentadores de carboidratos, sendo o ácido lático o maior produto final desse metabolismo (Figura 1) (ZHANG et al., 2011; CAI et al., 2012).

Figura 1 - Aspecto macroscópico: semeio *pour plate* (A) e semeio em superfície (B); e aspecto microscópico (C) (1000x) de *Lactobacillus* spp.(1000x).



Fonte: Mesquita, A.R.C.

O gênero *Lactobacillus* pertence ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem Lactobacillales e família Lactobacillaceae. Atualmente, mais de 150 espécies de *Lactobacillus* tem sido descritas na literatura, tornando esse gênero o mais numeroso da

ordem *Lactobacillales* (FELIS; DELAGIO, 2007; DRISSI; RAOULT; MERHEJ, 2016).

Esse grupo de micro-organismos encontra-se em diferentes ambientes, como nichos naturais tais como plantas, solo e vegetais; cavidade oral, pele, tratos gastrointestinal e urogenital de animais e humanos. Também podem ser isolados de bebidas e alimentos como: vinho, leite, kefir, carne, frutas, vegetais, cereais e em laticínios, principalmente em iogurtes e queijos (ZHANG et al., 2011; PÁL et al., 2012; BARRANGOU et al., 2012).

2.1.1 Metabolismo dos carboidratos

Lactobacilos possuem uma grande quantidade de enzimas envolvidas no metabolismo de diversos carboidratos, podendo ser classificados de acordo com a assimilação de hexoses (glicose, manose, galactose, frutose) e pentoses (arabinose e xilose), além de outros tipos apresentados na tabela 1 (KAOUTARI et al., 2013; DRISSI; RAOULT; MERHEJ, 2016).

Tabela 1 - Alguns dos carboidratos utilizados por espécies de lactobacilos

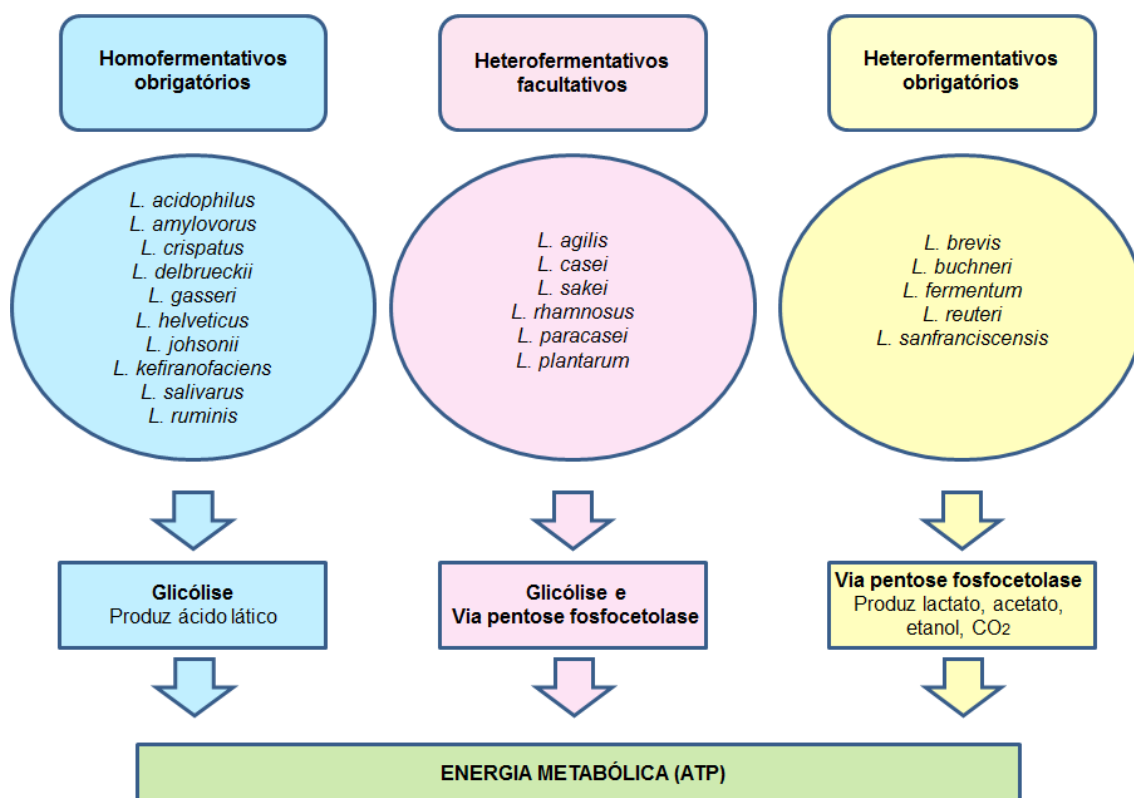
Tipo	Açúcar
Pentoses	Arabinose, ribose, ribulose, xilose, xilulose
Hexoses	Frutose, galactose, glicose, manose
Dissacarídeos	Lactose, celobiose, gentiobiose, maltose, melibiose, sacarose, trealose, turanose
Oligossacarídeos	Fruto-oligossacarídeo (FOS), melezitose, rafinose
Açúcares de álcool	Manitol, sorbitol, glicerol, galactitol
Desoxiaçúcares	Fucose, rhamnose
Açúcares modificados	Gluconato, amidalina, arbutina, esculina, malato, salicina, N-acetilglicosamina

Fonte: KLAENHAMMER et al., 2005

De acordo com o produto final da fermentação, os lactobacilos são divididos em dois grupos: homofermentativo e heterofermentativo, sendo esse último subdividido em facultativo e obrigatório (Figura 2). Os homofermentativos são classificados exclusivamente como obrigatórios, porque sempre realizam a glicólise e produzem

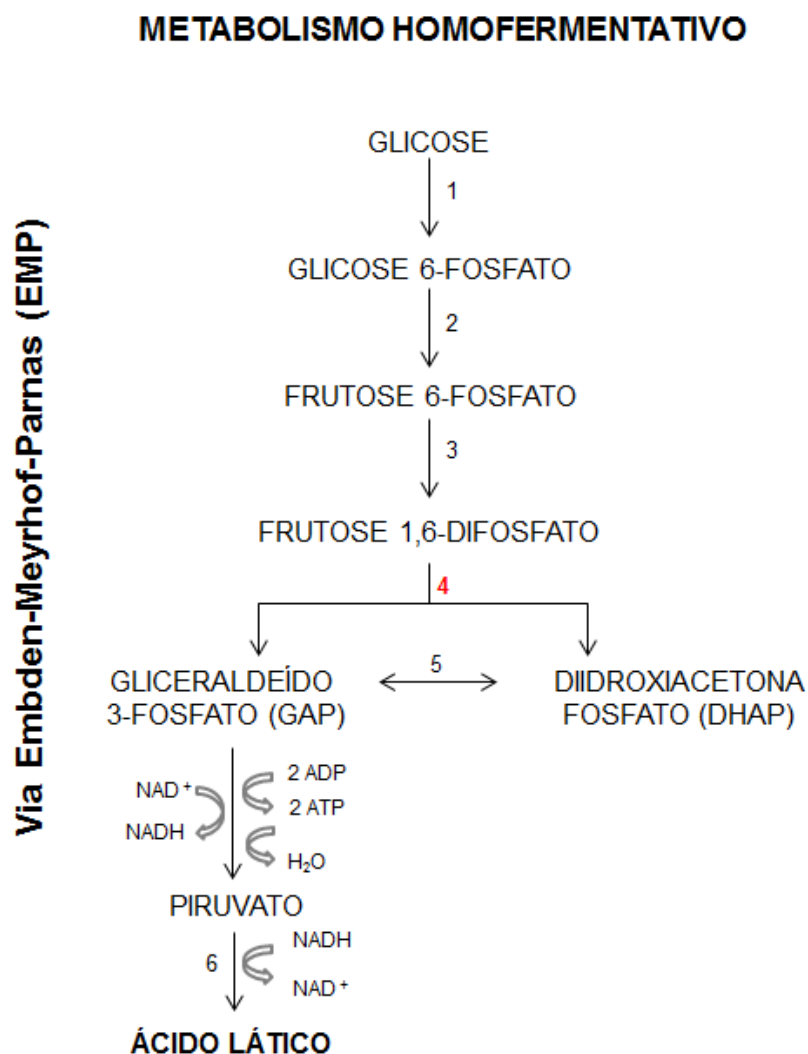
apenas ácido láctico (> 85%) pela via glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) a partir da assimilação de hexoses, que são transportadas por proteínas membranares denominadas permeases, transportadores ABC (Cassete de Ligação de ATP) e Sistema Fofoenolpiruvato:carboidrato Fosfotransferase (PEP:PTS). Esse metabolismo é caracterizado pela quebra da frutose 1,6-difosfato em duas trioses fosfatos, que são convertidas a lactato (Figura 3). (PESSIONE, 2012; SALVETTI; TORRIANI; FELIS, 2012; ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013).

Figura 2 - Esquema representativo da classificação dos lactobacilos quanto à fermentação de carboidratos



Fonte: DRISSI; RAOULT; MERHEJ, 2016

Figura 3 - Representação esquemática da glicólise em *Lactobacillus spp.* homofermentativos.

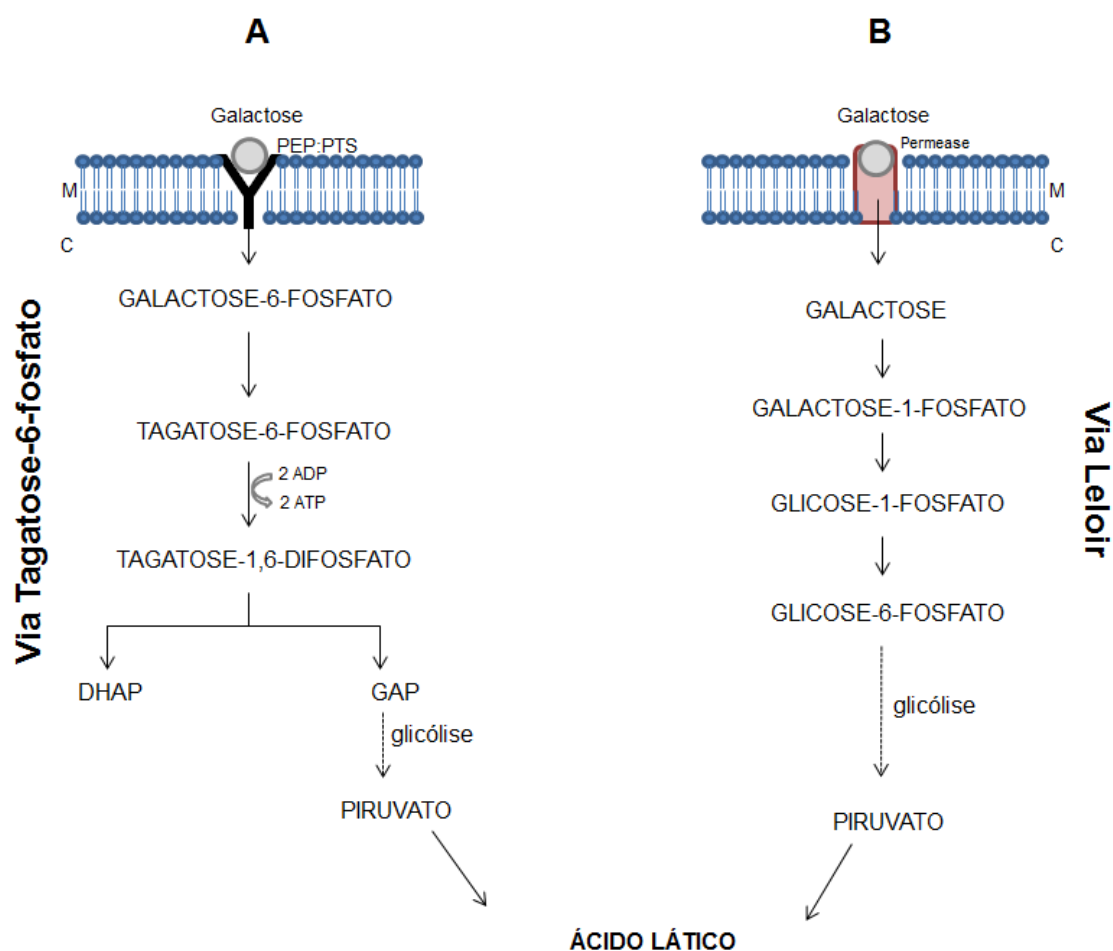


Enzimas: **(1)** hexoquinase; **(2)** glicose 6-fosfato isomerase; **(3)** 6-fosfofrutoquinase; **(4)** frutose 1,6-difosfatoaldolase; **(5)** triosefosfato isomerase; **(6)** lactato desidrogenase (Adaptado de ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013).

Outras hexoses, além da glicose, como manose, frutose e galactose entram na via Embden-Meyrhopf-Parnas após diferentes etapas de isomerizações e fosforilações até chegar a glicose-6-fosfato ou frutose-6-fosfato (VON WRIGHT; AXELSSON, 2012). Porém, a utilização dessas outras hexoses só ocorrerá após a depleção da glicose. A maltose será hidrolisada pela α -glicosidase e a frutose por uma dissacaridase (GÄNZLE; VERMEULEN; VOGEL, 2007).

Para galactose existem duas vias que diferem na forma como o carboidrato entra na célula: via Tagatose-6-fosfato e via Leloir, que vão depender das proteínas membranares transportadoras existente em cada espécie. Na primeira via, a galactose é transportada pelo sistema PEP:PTS e entra na célula na forma de galactose-6-fosfato (Figura 4A). Na segunda, a galactose é transportada diretamente para dentro da célula, sem qualquer alteração, por uma permease específica (Figura 4B) (VON WRIGHT; AXELSSON, 2012; PESSIONE, 2012).

Figura 4 - Metabolismo da galactose em bactérias ácido-láticas.

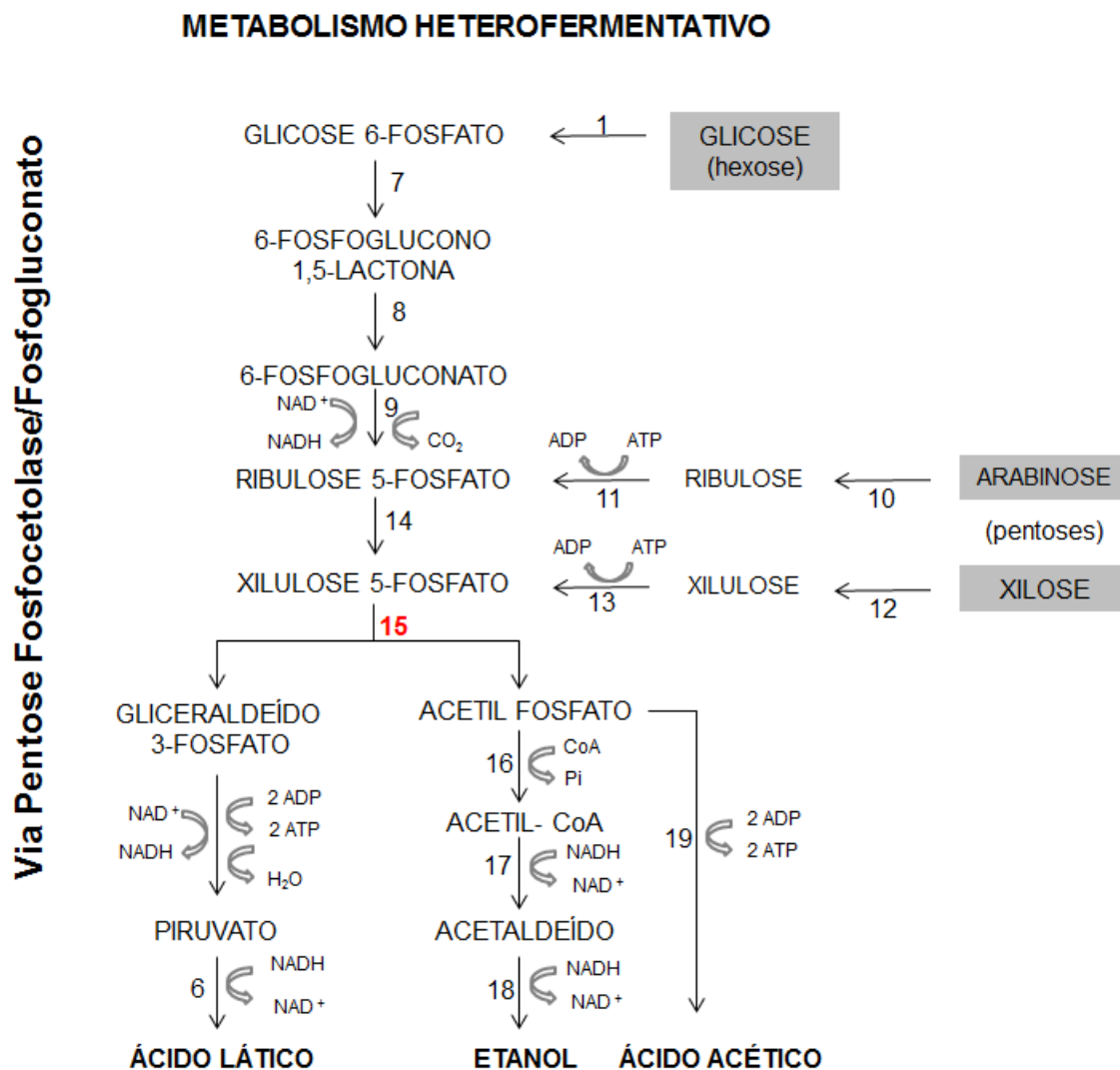


A: Via Tagatose-6-fosfato; **B:** Via Leloir; **M:** membrana citoplasmática, **C:** citoplasma; **PEP:PTS:** Sistema Foenolpiruvato:carboidrato Fosfotransferase; **DHAP:** diidroxiacetona fosfato; **GAP:** gliceraldeído fosfato (Adaptado de VON WRIGHT; AXELSSON, 2012; PESSIONE, 2012).

Lactobacilos que pertencem ao grupo heterofermentativo obrigatório podem produzir ácido láctico, ácido acético, etanol e CO₂ pela fermentação de hexoses e produzir ácido láctico, ácido acético, etanol pela fermentação de pentoses, utilizando a via pentose fosfocetolase/fosfogluconato. Esse grupo não possui a enzima frutose-1,6-difosfatase aldolase, que é a enzima chave do metabolismo glicolítico. Entretanto, eles possuem a enzima fosfocetolase presente apenas na via da pentose (Figura 5) (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013).

Espécies pertencentes ao grupo heterofermentativo facultativo podem variar entre metabolismo homo e heterofermentativo, dependendo da disponibilidade de carboidratos. Eles podem fermentar hexose pelas vias glicolíticas ou usar a via da pentose fosfato para assimilar pentose, porque esse grupo possui ambas as enzimas: frutose-1,6-difosfato aldolase e fosfocetolase. Entretanto, na fermentação de pentoses não há produção de CO₂ (Figura 5) (VON WRIGHT; AXELSSON, 2012; SUTULA; COULTHWAITE; VERRAN, 2012; DRISSI; RAOULT; MERHEJ, 2016).

Figura 5 - Representação esquemática da glicólise por *Lactobacillus spp.* heterofermentativos.



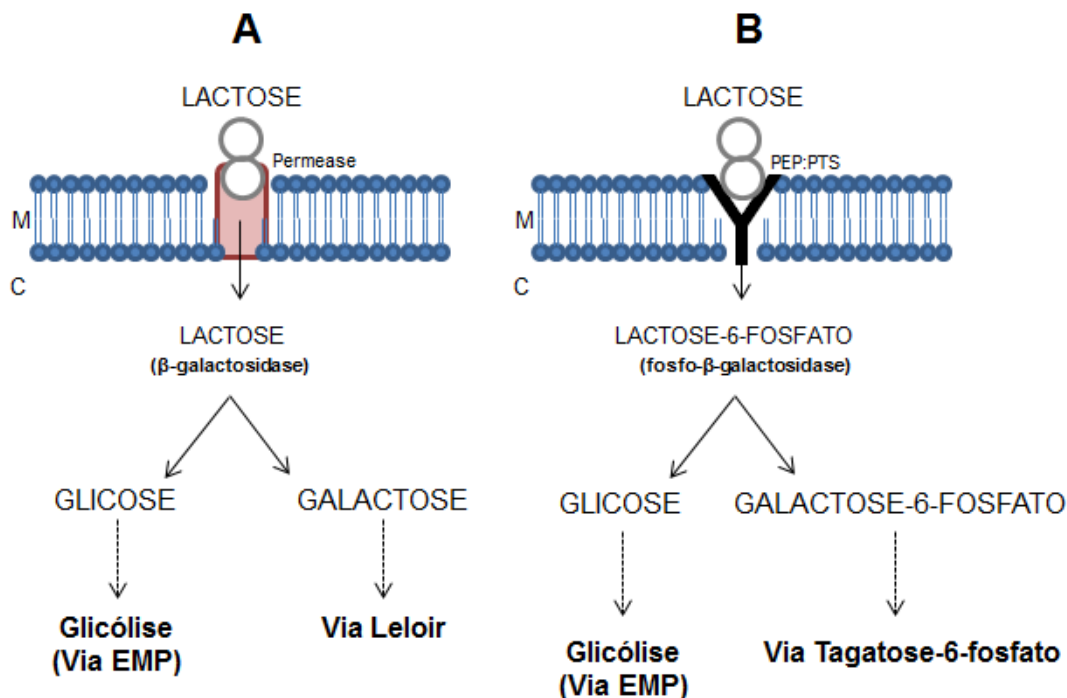
Enzimas: (1) hexoquinase; (6) lactato desidrogenase; (7) glicose 6-fosfato desidrogenase; (8) fosfogluconolactolase; (9) 6-fosfogluconato desidrogenase; (10) arabinose isomerase; (11) ribuloquinase; (12) xilose isomerase; (13) xiluloquinase; (14) ribulose 5-fosfato 3-epimerase; (15) fosfocetolase; (16) fosfotransacetilase; (17) aldeído desidrogenase; (18) álcool desidrogenase; (19) acetato cinase (ABDEL-RAHMAN; TASHIRO; SONOMOTO, 2013).

2.1.2 Metabolismo de dissacarídeos

De todos os dissacarídeos utilizados por lactobacilos e listados na Tabela 1, a lactose é o mais estudado, devido à sua presença no leite, uma das principais fontes de bactérias ácido-láticas.

A lactose pode entrar na célula através de duas formas: uma permease específica (mais comum em lactobacilos) ou como lactose fosfato, através do sistema PEP:PTS específico para lactose, em alguns casos ambos sistemas podem coexistir. Uma vez transportada por uma permease, a lactose é clivada em glicose e galactose por uma β -galactosidase no citoplasma bacteriano. A galactose é metabolizada pela via Leloir (Figura 6A), enquanto que a glicose entra na glicólise (via EMP). No sistema PEP:PTS, outra enzima denominada de fosfo- β -galactosidase é necessária para hidrolisar a lactose-6-fosfato em glicose e galactose-6-fosfato. A glicose é catabolizada pela via glicolítica e a galactose-6-fosfato entra na via Tagatose-6-fosfato (Figura 6B) (FRANCL; HOEFLINGER; MILLER, 2012).

Figura 6 - Metabolismo da lactose em lactobacilos



M: membrana citoplasmática; C: citoplasma; Via EMP: via glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas.

2.1.3 Metabolismo de oligossacarídeos

Oligossacarídeos são carboidratos formados pela união de 2 a 10 monossacarídeos, cujo metabolismo é essencial para a adaptação de lactobacilos a um determinado ambiente, principalmente nos intestinos de humanos e animais (BARRANGOU et al., 2003; GÄNZLE; FOLLADOR, 2012).

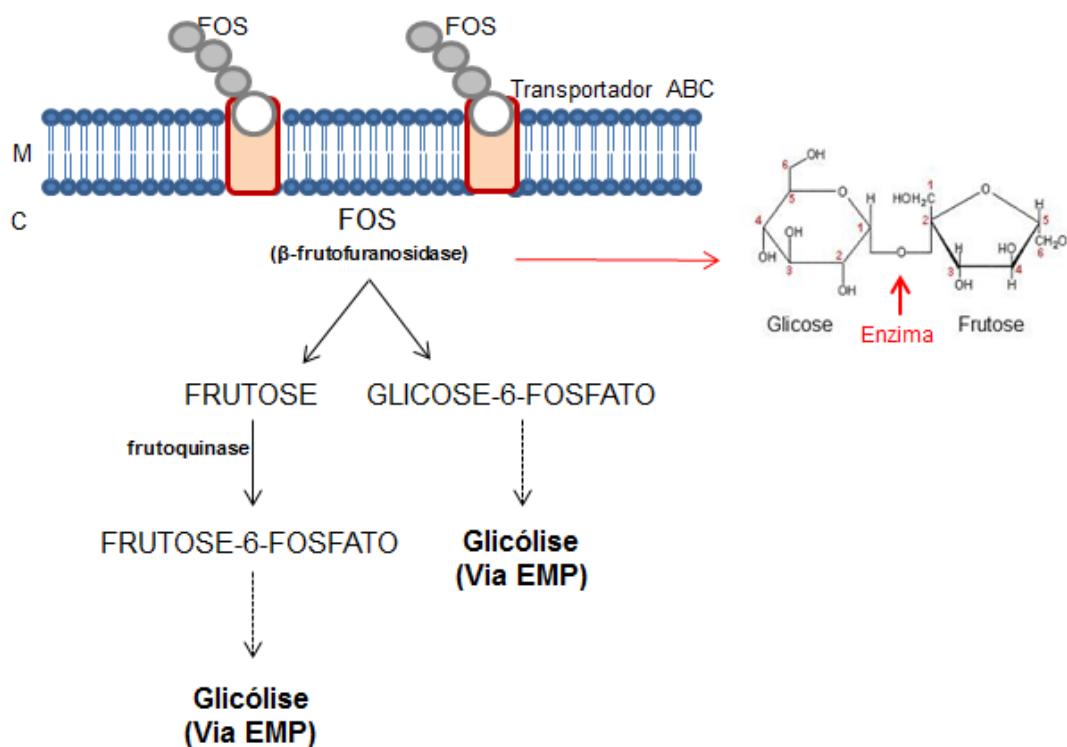
Entre esses carboidratos, os fruto-oligossacarídeo (FOS) são os mais extensivamente estudado. FOS são polímeros de frutose, cuja estrutura pode ser representada por GF_n ou F_n (G: unidades de glicose; F: unidades de frutose; n: número de unidades frutossil). São utilizados comercialmente em produtos alimentares e suplementos nutricionais, variam em comprimento de acordo com o seu grau de polimerização podendo originar inulina, levana e oligofrutose (BARRANGOU et al., 2003; SAULNIER et al., 2007).

Esses açúcares são resistentes à digestão do estômago e intestino delgado, sendo apenas digeridos no cólon onde são seletivamente fermentados por bactérias, como *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp* (CAETANO et al., 2016).

Embora FOS possam estimular o crescimento das bactérias probióticas e modular benéficamente o equilíbrio da microbiota intestinal, *in vivo* e *in vitro*, o conhecimento sobre o mecanismo molecular do FOS no metabolismo desses micro-organismos ainda é limitado (GOH et al., 2006; SAULNIER et al., 2007; CHEN et al., 2015).

Alguns pesquisadores demonstraram que o FOS é transferido para a célula bacteriana através de um transportador ABC, sendo hidrolisado no citoplasma pela enzima β -frutofuranosidase, responsável por clivar a ligação β (2 $\rightarrow$ 1) entre as moléculas de glicose e frutose, gerando a frutose livre e glicose-6-fosfato. Após essa etapa, a frutose é fosforilada a frutose -6-fosfato e entra na via glicolítica EMP, assim como a glicose-6-fosfato (Figura 7) (ALTERMANN et al., 2005; KLAENHAMMER et al., 2005).

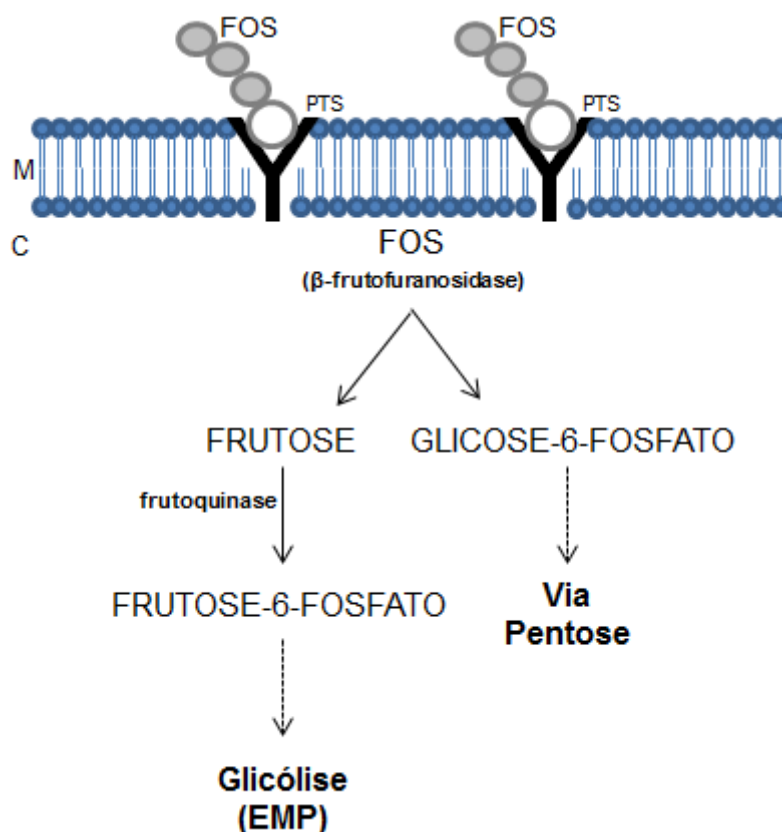
Figura 7 - Metabolismo de Fruto-oligossacarídeo (FOS) em lactobacilos através do transportados ABC.



Via EMP: via glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas

Entretanto, outros autores acreditam que o transporte do FOS através da célula bacteriana ocorre através do PTS (GOH et al., 2006; GOH; LEE; HUTKINS, 2007; CHEN et al., 2015). No citoplasma, o FOS é hidrolisado a frutose e glicose-6-fosfato pela ação da enzima β-frutofuranosidase. Posteriormente, a frutose é fosforilada a frutose-6-fosfato e segue para a via EMP e a glicose-6-fosfato segue para a via da Pentose Fosfato (Figura 8).

Figura 8 - Metabolismo de Fruto-oligossacarídeo (FOS) em lactobacilos através do sistema PTS (fosfoenolpiruvato).



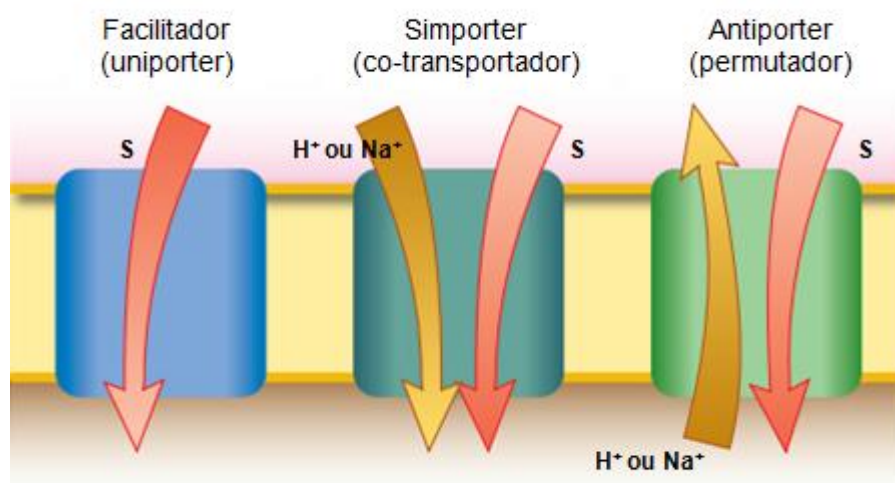
Via EMP: via glicolítica de Embden-Meyerhof-Parnas

2.1.4 Sistemas de transportes de soluto

As bactérias ácido-láticas utilizam um conjunto diversificado de transportadores para importar açúcares para o processamento intracelular. Esses transportadores são classificados em três classes principais: Superfamília de Transportadores Facilitadores Principais (MFS), transportadores ABC e PEP:PTS (COCKBURN; KOROPATIKIN, 2016).

MFS são permeases que transportam substratos como: íons orgânicos e inorgânicos, nucleosídeos, aminoácidos, pequenos peptídeos e lipídeos. Os membros MFS são formados por: facilitadores, simportes e antiportes. Os facilitadores catalisam a difusão de substratos pela membrana através de um gradiente de concentração. Os simportes e antiportes utilizam a energia liberada no processo de translocação de um substrato para transportar íons (H^+ ou Na^+) na mesma direção (simporte) ou em direção oposta (antiporte) ao gradiente de concentração (Figuras 9 e 10A) (YAN, 2015).

Figura 9 - Ilustração dos três tipos de transportadores da MFS.



S: substrato

Os transportadores ABC catalisam o transporte e fosforilação de açúcares. Eles possuem uma proteína extracelular que reconhece um açúcar específico, mantendo a especificidade do transportador, e em seguida promovem a hidrólise de ATP para importar o carboidrato (Figura 10B) (COCKBURN; KOROPATIKIN, 2016).

O sistema PEP:PTS atua no transporte de açúcares e seus derivados (açúcares de álcool, dissacarídeos, ácido glicurônico, dentre outras fontes de carbono), através da membrana com simultânea fosforilação. O PTS consiste de componentes citoplasmáticos: enzima I (EI) e proteína histidina fosforilada (HPr), e membranas: enzima II (EII), composta de 3 subunidades: IIA, IIB, IIC e às vezes IID. As duas primeiras proteínas da cascata (EI e HPr) podem ser compartilhadas por vários Sistemas Fosfotransferases (PTS), entretanto as enzimas EIIBC e EIIA são açúcar-específicas (FRANCL; HOEFLINGER; MILLER, 2012; DEUTSCHER et al., 2014).

O fosfoenolpiruvato (PEP) atua como doador do grupo fosfato para a enzima I (EI), que em conjunto com a HPr e as proteínas EIIA e EIIB, realizam uma fosforilação em cascata que resulta no transporte do carboidrato ligado à enzima II BC (EIIBC) para dentro da célula (Figura 10C) (VON WRIGHT; AXELSSON, 2012; DEUTSCHER et al., 2014).

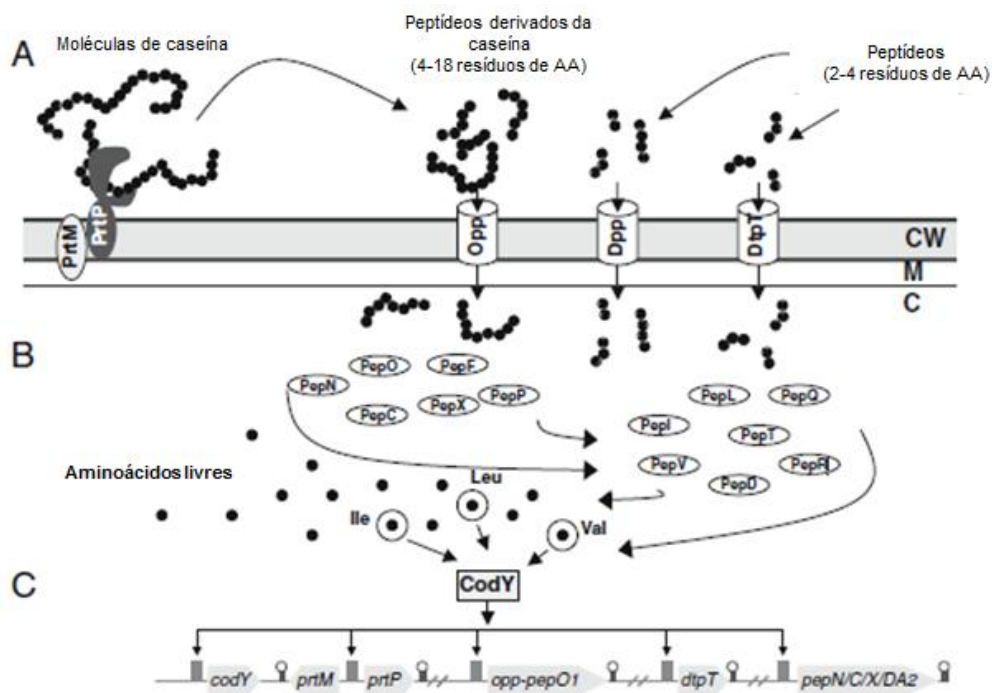
citoplasmática e (III) várias peptidases intracelulares, que degradam os peptídeos a tamanhos menores e aminoácidos (KUNJI et al., 1996; EL-GHAISH et al., 2010).

A proteólise é um importante mecanismo para gerar peptídeos e aminoácidos para o crescimento bacteriano e a formação de metabólitos que contribuem para a formação do sabor dos produtos fermentados. Aminoácidos podem ser convertidos em vários compostos responsáveis pelo sabor, como aldeídos, álcoois e ésteres (LIU et al., 2008; LIU et al., 2010).

L. bulgaricus e *L. helveticus* possuem um grande arsenal de enzimas proteolíticas, que é compatível com o conhecimento prévio da atividade proteolítica dos mesmos. *L. bulgaricus* é o principal organismo proteolítico no iogurte, com atividade superior ao *Streptococcus thermophilus*. *L. helveticus* é conhecido como cultura adjuvante que possui uma importante atividade proteolítica na degradação de peptídeos em queijos (LIU et al., 2010). Essas proteólises promovem o aumento na digestibilidade do leite e o aumento na qualidade nutricional desses alimentos (EL-GHAISH et al., 2010).

A atividade proteolítica é baseada na serina proteinase associada à parede celular (PrtP). Essa enzima degrada a proteína em oligopeptídeos de tamanhos variados. Peptídeos grandes (4-18 aminoácidos) são transportados por um sistema de transporte de oligopeptídeos (Opp-transportador ABC), enquanto que di e tripeptídeos são transportados pelos sistemas de transportes Dpp (transportador ABC) e DtpT (MFS simporter). Dentro da célula, os peptídeos são degradados a aminoácidos por peptidases intracelulares específicas (SAVIJOKI; INGMER; VARMANEN, 2006; VON WRIGHT; AXELSSON, 2012).

Figura 11 - Representação esquemática da função e regulação do sistema proteolítico em lactococos na proteólise da caseína.



A: PrtP proteinase de parede celular; Opp: oligopeptídeo permease; Dpp e DtpT (transportadores de di e tripeptídeos); CW: parede celular; M: membrana citoplasmática; C: citoplasma; B: Peptidases intracelulares: Ile: isoleucina; Leu: leucina; Val: valina; C: Transcrição do repressor CodY (SAVIJOKI; INGMER; VARMANEN, 2006).

Estudos utilizando *L. lactis* demonstraram que um pool dos aminoácidos isoleucina, leucina e valina estimulam a ligação do CodY, que reprime a expressão dos genes envolvidos no sistema proteolítico (SAVIJOKI; INGMER; VARMANEN, 2006). O mecanismo regulatório do sistema proteolítico de lactobacilos é pouco estudado e algumas pesquisas indicam que alguns componentes do meio de cultivo, como a glicose, podem influenciar a produção das enzimas envolvidas neste mecanismo (SAVIJOKI; INGMER; VARMANEN, 2006; WANG et al., 2013).

Algumas enzimas são encontradas apenas em poucas cepas de bactérias ácido-láticas, tais como PrtP que são encontradas somente em *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *S. thermophilus* e *L. lactis*. Endopeptidases (PepE/PepG), prolina peptidase (PepI, PepR, PepL, PepX, PepQ) e aminopeptidases (PepC, PepN e PepM). As endopeptidases e prolina peptidases estão presentes nos bacilos do grupo de bactérias ácido-láticas e ausentes nos cocos do mesmo grupo,

enquanto que as aminopeptidases estão presentes em todos os genomas (LIU et al., 2010; VON WRIGHT; AXELSSON, 2012).

PepP, PepQ e PepM pertencem à família M24 peptidase e requerem íons metálicos para suas atividades catalíticas, por exemplo, PePM requer o cobalto e a PepQ tem preferência pelo manganês (CHRISTENSEN et al., 1999).

De modo geral, as peptidases podem remover o aminoácido *N*-terminal de um peptídeo, a especificidade vai depender do tamanho do peptídeo e da natureza do resíduo *N*-terminal do aminoácido (SAVIJOKI; INGMER; VARMANEN, 2006).

L. acidophilus, *L. brevis*, *L. casei*, *L. rhamnosus* e *L. lactis* possuem os três sistemas de transportes presente nas bactérias ácido-láticas: di/tripeptídeos DPP e DtpT e o sistema de oligopeptídeo Opp. Em contrapartida, *L. reuteri* possui apenas um transporte funcional de peptídeos, o sistema DtpT (LIU et al., 2010).

Lactobacilos aumentam o catabolismo de aminoácidos livres, gerando energia (ATP) especialmente a partir de na fase estacionária ou em condições de estresse ambiental (acidez, falta de nutrientes) (DE ANGELIS et al., 2016).

2.1.6 Metabolismo de lipídeos: Tween 80 como fator de crescimento

O meio padrão MRS (Man, Rogosa & Sharpe), utilizado para o cultivo não-específico de lactobacilos, contém 0,1% de Tween 80 (ácido cis-9-octadecanoico) que é um surfactante derivado do ácido oleico e conhecido por otimizar o crescimento de muitas bactérias ácido-láticas (DE MAN, ROGOSA & SHARPE, 1960). No entanto, nem sempre ele é requerido para o crescimento dos micro-organismos. Segundo Al-Naseri et al. (2013), o Tween 80 é utilizado como fonte de carbono após a finalização das seguintes fontes prioritárias: citrato, aminoácidos, acetato e traços de carboidratos presentes no extrato de levedura.

Em muitas bactérias ácido-láticas, os ácidos octadecanoicos são convertidos na membrana celular em ácido oleico e ácido cis-vacênico (ácido cis-11-octadecanoico), que são metilados para formar ácido diidroesterculínico (9, 10- metileno-octadecanoico) e ácido lactobacílico (ácido 11, 12-metileno-octadecanoico), respectivamente (POLACHECK, TROPP, LAW, 1966; JOHNSON et al., 1995; PARTANEN, MARTTINEN, ALATOSSAVA, 2001, BROADBENT et al., 2014). Entretanto, *L. plantarum*, *L. brevis* e *L. delbrueckii* não sintetizam ácido lactobacílico a partir do cis-vacênico. Devido a este fato, ainda não está esclarecido se há duas diferentes enzimas

para a conversão dos ácidos oleico e vacênico a seus ácidos graxos correspondentes. Outra dúvida é se essa conversão ocorre em diferentes locais da célula (JOHNSSON et al., 1995).

O ácido oleico e ácido cis-vacênico são os ácidos octadecanoicos mais predominantes em lactobacilos, compondo de 14 a 67% do total de ácidos graxos. Contudo, ácido linoleico pode ser encontrado de traços a 20%, embora seja relativamente incomum (KANKAANPÄÄ et al., 2004).

Alguns autores acreditam que o ácido diidroesterculínico promove um aumento na fluidez da membrana celular de bactérias ácido-láticas, além de protegê-las contra os efeitos adversos do ambiente, como baixas temperaturas no processo do congelamento e baixo pH (PARTANEN, MARTTINEN, ALATOSSAVA, 2001; ANANTA et al., 2004). Entretanto, outros autores acreditam que a presença de ácidos graxos, como o ácido oleico, pode conferir a essas bactérias uma maior rigidez da membrana plasmática e essa característica promoveria um aumento na tolerância à bile e adesão ao epitélio intestinal (CORCORAN et al., 2007). Essas discordâncias ocorrem porque o mecanismo do Tween 80 na fisiologia celular ainda não está totalmente esclarecido (AL-NASERI et al., 2013).

2.1.7 Mecanismos de adaptação

O solo e as plantas foram os primeiros nichos hipotéticos atribuídos as primeiras bactérias ácido-láticas, tornando natural supor que o segundo *habitat* seria o intestino dos animais herbívoros (MORELLI et al., 2012). Três grandes adaptações genômicas foram necessárias para essas bactérias sobreviverem e se multiplicarem no intestino dos animais: resistência ao baixo pH gástrico e aos sais biliares do intestino, adesão ao epitélio intestinal para resistir ao fluxo intestinal e habilidade para fermentar alguns substratos mais eficientemente do que as bactérias patogênicas (LEBEER et al., 2008).

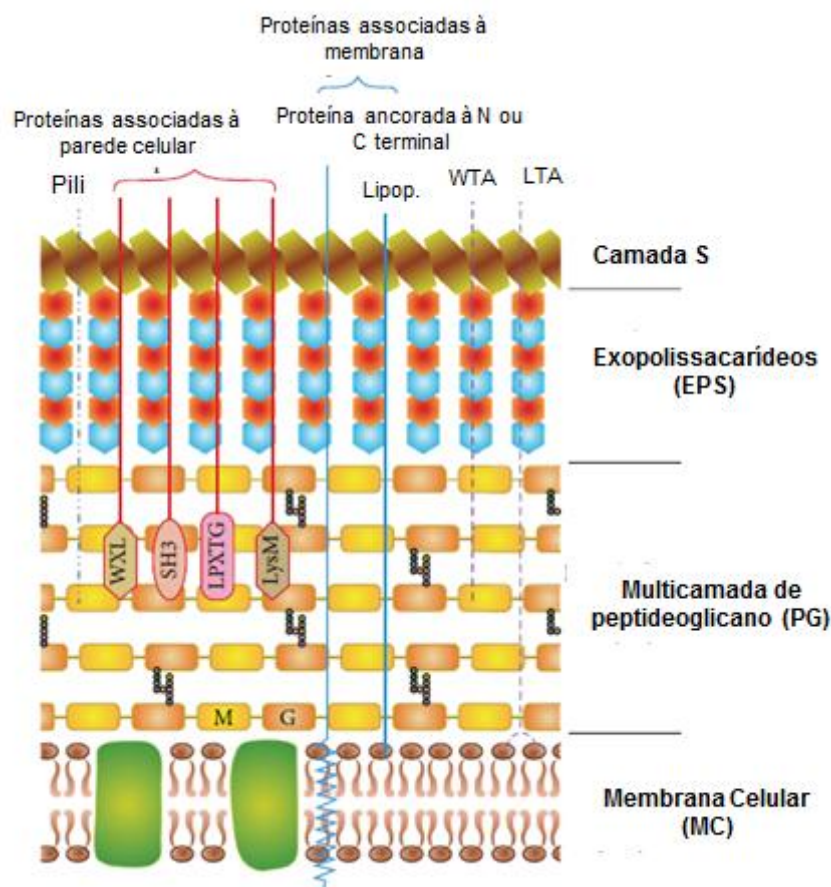
Espécies desse gênero estão presentes em produtos lácteos (*L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *L. helveticus*), trato gastrointestinal de humanos e animais (*L. acidophilus* e *L. gasseri*), ou em uma variedade de nichos (*L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. brevis* e *L. paracasei*) (SMOKVINA et al., 2013).

A adesão de lactobacilos ao epitélio intestinal é uma das características mais importantes, pois promove a colonização e estimula a interação micro-organismos-hospedeiro, formando uma barreira intestinal e consequente proteção através de vários mecanismos, incluindo atividade antimicrobiana contra patógenos (SERVIN, 2004).

O envelope celular é o primeiro alvo do estresse físico-químico e ambiental (SENGUPTA et al., 2013). Os lactobacilos apresentam grande diversidade na estrutura da superfície celular e são conhecidos por modificar suas propriedades estruturais em resposta às mudanças do meio ambiente (TARANTO et al., 2003; FOZO; KAJFASZ; QUIVEY, 2004). Diferentes macromoléculas constituem a parede celular dessas bactérias e contribuem para manter a integridade da célula bacteriana durante o estresse ambiental (GUERZONI; LANCIOTTI; COCCONCELLI, 2001).

A parede celular dos lactobacilos consiste de múltiplas camadas de peptideoglicano (PG), com ácidos teicóico (WTA - ancorados na própria parede celular) e/ou ácidos lipoteicóicos (LTA – ligados à membrana celular), exopolissacarídeos (EPS), filamentos proteicos chamados pili, e proteínas ancoradas à parede celular (Figura 12). Algumas espécies podem apresentar ainda uma camada paracristalina adicional de proteínas que envolve a camada de PG, referida como a camada S. Estas macromoléculas em conjunto, podem desempenhar um papel importante na determinação de espécies e características específicas da linhagem de lactobacilos, influenciando interações hospedeiro-micro-organismo e adaptações microbianas para o novo ambiente (SENGUPTA et al., 2013).

Figura 12 - Representação esquemática da parede celular e das proteínas associadas à membrana dos lactobacilos.



Lipop: lipoproteína; WTA: ácidos teicóicos; LTA: ácidos lipoteicóicos (SENGUPTA et al., 2013).

Lactobacilos encontram vários fatores de estresse ambiental durante sua passagem pelo trato gastrointestinal, como baixo pH e a presença dos sais biliares. A sobrevivência em ambientes ácidos ocorre pela adaptação aos baixos valores de pH através de um mecanismo chamado de resposta ácido tolerância (ATR) (SENGUPTA et al., 2013).

A acidez é um importante fator de estresse ambiental que ocorre em bactérias ácido-láticas durante a fermentação de comidas e bebidas (DE ANGELIS; GOBBETTI, 2004).

O ácido lático na forma não dissociada atravessa a membrana plasmática, por difusão ou por meio de um transportador para dentro do citoplasma, e dissocia-se liberando prótons no interior da célula, devido ao pH intracelular ser mais alcalino do que o extracelular. Este afluxo de prótons induz a acidificação citoplasmática,

dissipando o potencial da membrana (ΔpH) e reduzindo a atividade de enzimas, sensíveis à acidez, resultando em danos para proteína, DNA e consequente inibição de processos fornecedores de energia e a síntese de macromoléculas. O mesmo mecanismo também é promovido pelo ácido acético (OGAWA et al, 2001; GOBETTI et al, 2005; LEBEER et al, 2008;. BROADBENT et al., 2010).

Três mecanismos principais regulam a homeostase do pH intracelular (pHi) em bactérias fermentativas. O mais importante é a translocação de prótons (H^+) através da ATPase, este complexo enzimático desempenha um papel importante na regulação do pHi por estes micro-organismos, promovendo a extrusão de prótons H^+ , o que resulta no aumento do pHi (DE ANGELIS; GOBETTI, 2004; COTTER; HILL, 2003).

Outra via é a arginina deaminase (ADI), que catalisa a conversão do aminoácido arginina em ornitina, amônia e CO_2 . Resultando na elevação do pH pela amônia formada e também pela expulsão de prótons do citoplasma pelo complexo ATPase, com consequente geração de ATP (LEBEER et al., 2008). O terceiro mecanismo é o sistema glutamato descarboxilase (GAD) que internaliza o aminoácido glutamato, o qual em seguida é descarboxilado no citoplasma, resultando no consumo intracelular de um próton. O produto dessa reação é o γ -aminobutirato (GABA), que é exportado a partir da célula via antiporter. Consequentemente, há um aumento do pH intracelular, devido à extrusão de íons H^+ e um pequeno aumento do pH extracelular pela liberação de GABA no meio (HIGUCHI; HAYASHI; ABE 1997; COTTER; HILL, 2003).

Para chegar ao cólon em estado viável, os lactobacilos precisam superar além da acidez estomacal, a presença de bile na parte superior do intestino delgado (RUIZ; MARGOLLES; SÁNCHEZ, 2013). Os principais mecanismos responsáveis pela resistência desses micro-organismos são: o ativo efluxo dos ácidos/sais biliares (PFEILER; KLAENHAMMER, 2009; BUSTUS et al., 2011), hidrólise dos sais biliares (LAMBERT et al., 2008) e modificações na estrutura/composição da membrana e parede celular (TARANTO et al., 2003).

A expulsão ativa dos ácidos e sais biliares acumulados no citoplasma ocorre através de um sistema de efluxo, pertencente à família de transportadores multidroga resistente (MDR) (DE ANGELIS; GOBETTI, 2004). Outro mecanismo utilizado para neutralizar o efeito nocivo da bile é a atividade da enzima bile-sal hidrolase (BSH) (LEBEER et al., 2008). A bile é composta por ácidos biliares, que são sintetizados a partir do colesterol, e conjugados com os aminoácidos glicina ou taurina no fígado, para gerar sais biliares conjugados que são lançados no intestino (DE ANGELIS;

GOBBETTI, 2004). As BSHs geralmente são enzimas intracelulares que catalisam a hidrólise da ligação amida entre o esteroide e a cadeia dos ácidos biliares (LEBEER et al., 2008).

Os sais biliares são moléculas anfipáticas com potente atividade antimicrobiana, atuando como detergentes e desestruturando as membranas biológicas (DE ANGELIS; GOBBETTI, 2004). Devido a essa característica lipofílica, as membranas bacterianas representam um dos principais alvos da bile que destrói a estrutura do envelope bacteriano, afetando a célula e a morfologia celular (RUIZ; MARGOLLES; SÁNCHEZ, 2013).

Estudo sobre a resposta da acidez e sais biliares em lactobacilos tem identificados genes envolvidos na síntese de peptidoglicano e no envelope celular (SENGUPTA et al., 2013). Outras estruturas de superfície celular (LTA, WTA e EPS) têm sido sugeridas por desempenharem importantes funções na integridade celular em ambientes ácidos e com presença de bile (NEUHAUS; BADDILEY, 2003).

2.2 ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA)

Ácido linoleico conjugado é um termo utilizado para designar 28 isômeros geométricos e de posição do ácido linoleico os quais possuem duas ligações duplas conjugadas. Essas duplas ligações geralmente são localizadas nas posições dos carbonos 8 e 10, 9 e 11, 10 e 12, 11 e 13, e por isso pode ocorrer nas configurações cis ou trans (PARIZA et al., 2001; BANNI, 2002).

O ácido linoleico ou cis-9,cis-12 ácido octadienóico é um ácido graxo poliinsaturado da família ômega-6 ou n-6 que possui 18 carbonos (18:2, 9c-12c) e está em grande quantidade em óleos, como os de sementes girassol, soja e linhaça (SILVEIRA et al., 2007; McCORIE et al., 2011). Os ácidos graxos poliinsaturados podem ser classificados em duas famílias: n-6 e n-3. Essas famílias abrangem ácidos graxos que apresentam insaturações separadas apenas por um carbono metilênico, com a primeira insaturação no sexto e terceiro carbono, respectivamente, enumerado a partir do grupo metil terminal (MARTIN et al., 2006).

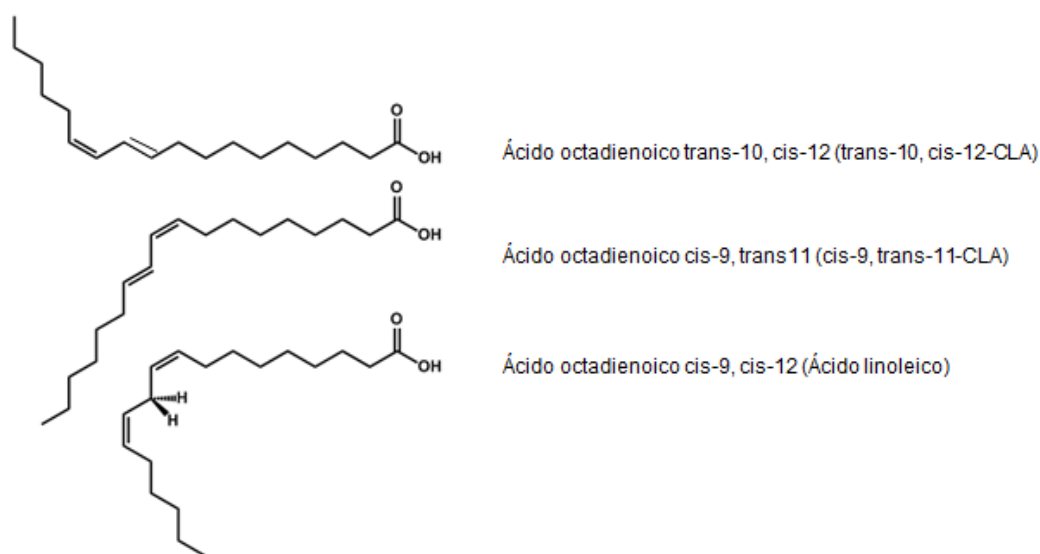
Dos isômeros do ácido linoleico, os mais encontrados na natureza são: o cis-9,trans-11- ácido octadecadienóico (cis-9, trans11-CLA), que representa entre 80% - 90% do total de CLA nos alimentos, e o isômero trans-10,cis-12-ácido octadecadienóico (trans-10, cis-12-CLA), associados principalmente à atividade anticancerígena e

antiobesidade, respectivamente (Figura 13) (CHURRUCA et al., 2009; MACOUZET, et al.; 2009; O'SHEA et al., 2011).

O CLA foi descoberto por Pariza e seus colaboradores, em 1985, quando investigavam componentes carcinogênicos em carne grelhada. Esses ácidos graxos foram reconhecidos por terem surpreendentes propriedades anti-cancerígenas (Wahle et. al., 2004). Podem ser encontrados na carne, no leite e seus derivados (GRIINARI et al., 2000; ALONSO et al., 2003; SIEBER et al., 2004; ING; BELURY, 2011).

Esta molécula pode ser produzida sinteticamente ou naturalmente no organismo de animais ruminantes. Nestes animais, ele é formado através de biohidrogenação realizada no rúmen por algumas bactérias (KENNEDY et al., 2010).

Figura 13 - Estrutura do ácido linoleico e dos dois principais isômeros CLA (ácido linoleico conjugado) com atividade biológica.

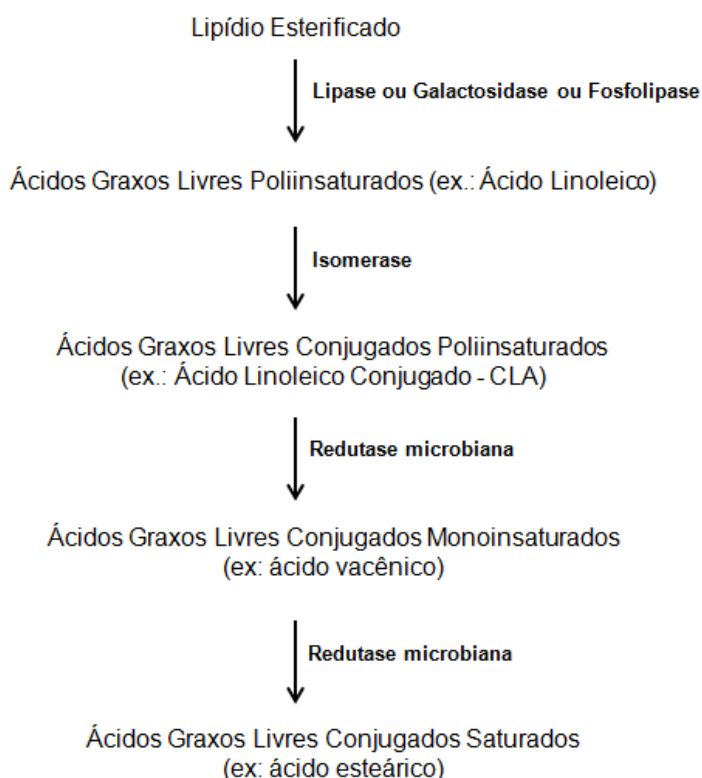


A lipólise é a etapa inicial no metabolismo dos lipídios no rúmen, pré-requisito para que ocorra a biohidrogenação (CHALUPA; KUTCHES, 1968). Os lipídios esterificados da dieta na forma de triglicerídeos, fosfolipídios e galactolipídios são hidrolisados, respectivamente por lipases, fosfolipases e galactosidases específicas presentes em bactérias que fazem parte da microbiota do rúmen, promovendo assim a liberação de seus ácidos graxos de cadeia longa (Figura 14) (JENKIS, 1993; JENKIS et al., 2008).

A primeira bactéria descoberta com a função de produzir CLA foi *B. fibrisolvens* (KEPLER et al., 1966). Entretanto, muitas bactérias estão sendo estudadas com este propósito, dentre elas *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* e *Pediococcus* (SIEBER et al., 2004; VAN NIEUWENHOVE et al., 2007; O'SHEA et al., 2011).

A reação seguinte a lipólise no rúmen é realizada por uma enzima presente na membrana celular bacteriana - linoleato isomerase, que converte o ácido linoleico em seu isômero, o cis-9, trans11-CLA (também denominado de ácido rumênico, devido a sua origem ser no rúmen dos animais), através da mudança da dupla ligação do carbono cis-12 para posição trans-11. Após sua formação, o ácido rumênico pode ser diretamente absorvido ou metabolizado através de biohidrogenação, redução por redutase microbiana, originando o ácido vacênico. Essas reações são realizadas pelos micro-organismos como um mecanismo para minimizar os efeitos tóxicos provocados pelos ácidos graxos insaturados (GRIINARI; BAUMAN, 1999; GRIINARI et al., 2000; GORISSEN et al., 2011; BUCCIONI et al., 2012).

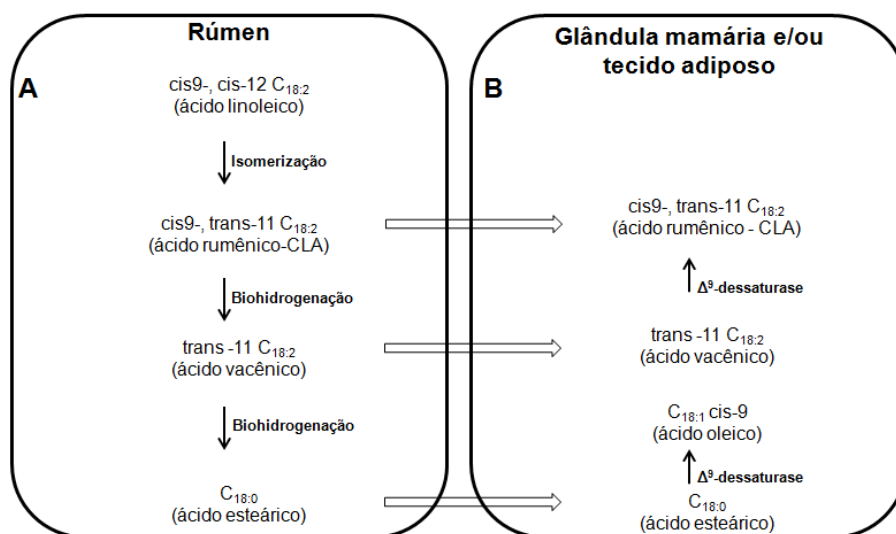
Figura 14 - Via metabólica simplificada de lipídios para a produção de CLA



Fonte: Adaptado de Jenkins, 1993

Quando o cis-9, trans-11-CLA é absorvido pelo intestino, ele entra na corrente sanguínea e chega nas glândulas mamárias e tecido adiposo, sendo incorporado nas reservas de gordura do tecido adiposo e do leite. Caso ele não seja diretamente absorvido, há uma nova biohidrogenação do ácido vacênico originando o ácido esteárico. Depois da ocorrência dessas reações, o ácido vacênico e o ácido esteárico irão atuar na glândula mamária e no tecido adiposo, onde serão substratos da enzima esteroil-CoA dessaturase ou Δ^9 -dessaturase, enzima que introduz uma ligação cis-dupla entre os carbonos 9 e 10, formando assim o ácido oleico e o cis-9, trans-11-CLA, respectivamente (Figura 15) (KEPLER et al., 1966; BAUMAN; GRIINARI, 2001; MARTIN et al., 2006).

Figura 15 - Produção de CLA em ruminantes. Em (A) via metabólica do ácido linoleico. (B) Via metabólica de produção do CLA a partir do ácido esteárico na glândula mamária e/ou tecido adiposo.



Fonte: Adaptado de Griinari; Bauman., 1999

Nos mamíferos, essas dessaturações podem ocorrer nos carbonos de números 5, 6 e 9, não ocorrendo além deste último devido à ausência das enzimas Δ^{12} e Δ^{15} -dessaturase, presentes apenas nos vegetais. A Δ^9 -dessaturase atua, predominantemente, na síntese de ácidos graxos monoinsaturados, sendo o ácido esteárico (precursor do ácido oleico) seu principal substrato. Enquanto que as enzimas Δ^5 e Δ^6 dessaturase

atuam na dessaturação de ácidos graxos poliinsaturados (PERFIELD et al., 2002; MARTIN et al., 2006).

O ácido linoleico conjugado pode ser produzido também através de síntese orgânica, por isomerização alcalina, com solução concentrada de KOH em propilenoglicol, a partir de óleos de plantas com altas concentrações de ácido linoleico, como os óleos de girassol e cártamo. Neste processo, o rendimento do CLA é de aproximadamente 50% cis-9, trans11-CLA e 50% trans-10, cis-12-CLA (BANNI, 2002; YAMASAKI; YANAGITA, 2013).

Ao contrário do cis-9, trans11-CLA, os estudos sobre a origem do trans-10, cis-12-CLA são escassos. Provavelmente devido a sua pouca quantidade nos alimentos, porém acredita-se que ele seja produzido exclusivamente no rúmen dos animais (KHANAL; DHIMAN, 2004).

2.2.1 Efeitos do Ácido Linoleico Conjugado (CLA)

Apesar dos vários isômeros de CLA existentes, o cis-9, trans11-CLA e o trans-10, cis-12-CLA são os mais estudados associados principalmente à atividade anticancerígena e antiobesidade, respectivamente (MELE et al., 2013; PIERRE et al., 2013). O cis-9, trans11-CLA é predominante na alimentação humana, presente em aproximadamente 90% das carnes e produtos lácteos e trans-10, cis-12-CLA nos 10% restante. A quantidade de CLA nos alimentos depende de vários fatores que incluem a raça, o estado nutricional e a idade do animal (KENNEDY et al., 2010).

Diferentes estudos realizados em animais relacionam o CLA com vários outros efeitos benéficos que podem favorecer a saúde humana, tais como: redução das lesões no processo da arterosclerose, efeito imunomodulatório, aumento da massa óssea (CHURRUCA et al., 2009; PARK, 2009; ING; BELURY, 2011; OLESZCZUK et al., 2012).

2.2.1.1 Atividade antiobesidade

O CLA tem atraído à atenção da comunidade científica devido ao seu efeito sobre a composição corporal, reduzindo a massa gorda e aumentando a massa magra. O aumento na prevalência da obesidade nos últimos 30 anos, induziu um crescimento na admiração do CLA como opção de tratamento na perda de peso. Pesquisas relatam que

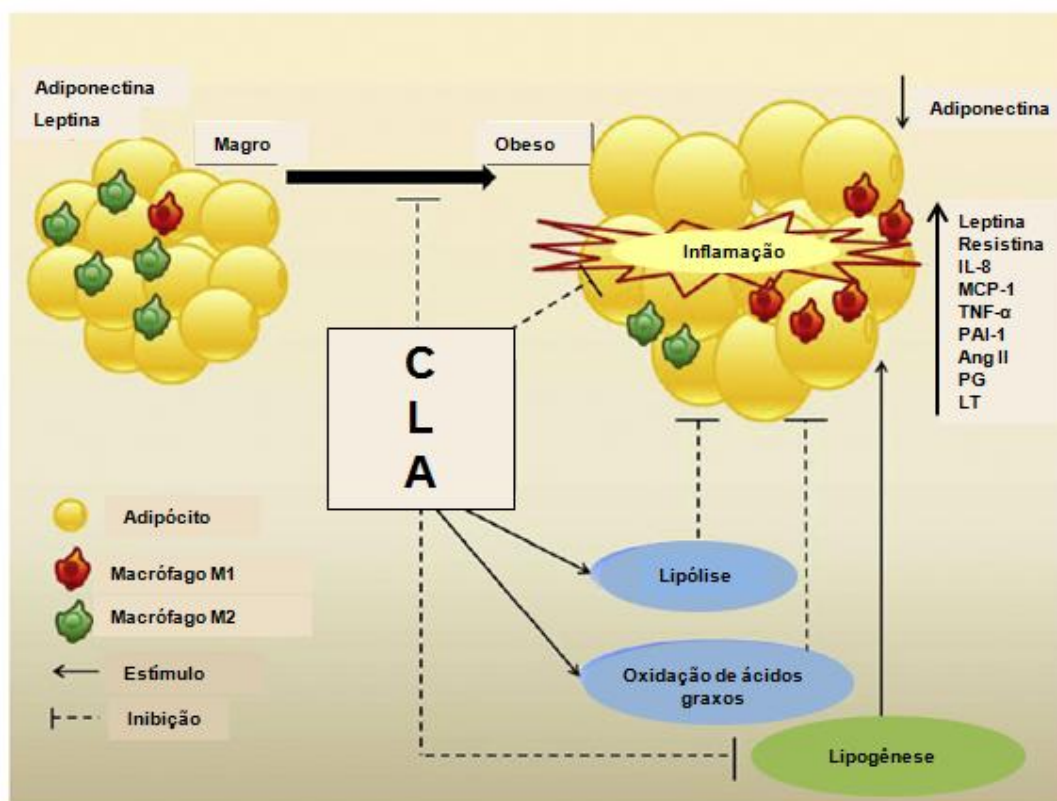
a suplementação alimentar com a mistura racêmica de CLA reduziram a massa gorda em animais e humanos (SILVEIRA et al., 2007; KENNEDY et al, 2010).

O exato mecanismo do isômero trans-10, cis-12-CLA sobre a obesidade ainda é desconhecido, porém alguns estudos sugerem que essa ação pode estar relacionada aos seguintes efeitos: modulação do metabolismo do adipócito e das adipocinas, inibição da lipoproteína lipase, aumento do gasto energético, aumento da β -oxidação (PARK; PARIZA, 2007; SIRIWARDHANA et al, 2013).

Adipócitos e pré-adipócitos presentes no tecido adiposo possuem linfócitos e macrófagos que ajudam a manter a função metabólica normal do tecido adiposo. O tecido adiposo de indivíduos magros contem pequena quantidade de adipócitos sensíveis à insulina e formados predominantemente por macrófagos “alternativamente ativados” (M2). Enquanto que o tecido adiposo de indivíduos obesos é caracterizado por uma grande resistência à insulina, acompanhado da presença de macrófagos “classicamente ativados” (M1) (Figura 16) (LUMENG et al, 2007; ODEGGARD; CHAWLA, 2011).

A ativação dos macrófagos tem sido definida através de dois estados de polarização: M1 e M2. No estado M1, os macrófagos são ativados por lipopolissacarídeos e interferon-gama ($\text{IFN-}\gamma$). Caracterizam-se por aumentar a secreção de citocinas pró-inflamatórias ($\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-12) e gerar espécies reativas do oxigênio, como o óxido nítrico (NO). Os macrófagos M2 possuem baixa expressão de citocinas pró-inflamatórias e altos níveis de citocinas anti-inflamatórias (IL-1 e IL-10) (LUMENG et al, 2007).

Figura 16 - Efeito do CLA na fisiologia do tecido adiposo.



CLA: ácido linoleico conjugado; IL-8: interleucina 8; MCP-1 proteína quimioatraente de monócito-1 (MCP-1), TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; PAI-1: inibidor da ativação de plasminogênio-1; Ang: angiotensina II (Adaptado de Siriwardhana et al, 2013).

A hipertrofia dos adipócitos na obesidade, juntamente com a morte dos mesmos, hipóxia do tecido adiposo e mudança na população de células imunes alteram o padrão das adipocinas (citocinas produzidas no tecido adiposo). Esta mudança no padrão secretório das adipocinas promove uma mudança no perfil celular de não-inflamatório para predominantemente inflamatório (KALUPAHANA et al, 2011; KALUPAHANA et al, 2012).

As adipocinas/citocinas pró-inflamatórias comumente produzidas são: fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-1beta (IL-1 β), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), proteína quimioatraente de monócito-1 (MCP-1), inibidor da ativação de plasminogênio-1 (PAI-1), resistina, prostaglandinas e leucotrienos, além do hormônio angiotensina (Ang II) (KERSHAW; FLIER, 2004; BHATTACHARYA et al, 2006; OUCHI et al, 2011).

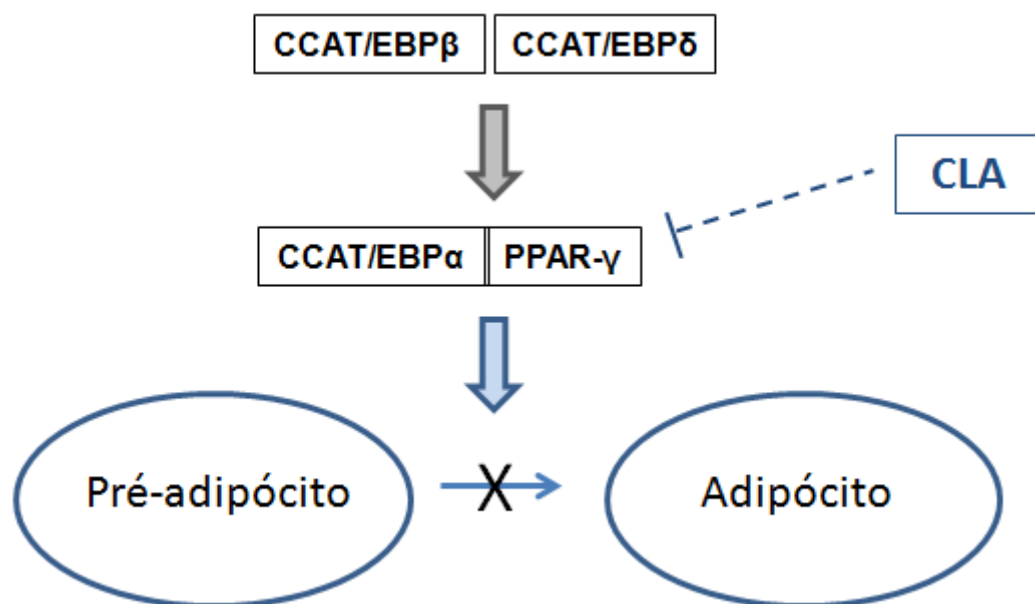
Desta forma, a obesidade é classificada como inflamação crônica de baixo grau, inicialmente devido ao desequilíbrio entre a produção/secreção de citocinas pró-inflamatórias e citocinas anti-inflamatórias. Este desequilíbrio está associado também a várias alterações metabólicas, como diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (DANDONA et al, 2004; FRANKS, 2006; HOTAMISLIGIL, 2006).

O armazenamento de ácidos graxos nos adipócitos, como os triglicerídeos é a sua principal função. O CLA atua inibindo a lipogênese por inibir a expressão de várias proteínas envolvidas neste mecanismo: acetil-CoA carboxilase, ácido graxo sintase, esteroil-CoA dessaturase e principalmente a lipase. A referida lipase é responsável pela hidrólise de triglicerídeos, encontrados nos quilomicrons e proteínas de muito baixa densidade (VLDL), e consequente liberação de ácidos graxos que serão absorvidos e re-esterificação pelos adipócitos. Segundo alguns estudos, este mecanismo está relacionado a baixa absorção de lipídios no tecido adiposo (WANG; JONES, 2004a; TARLING et al., 2009).

Esse mecanismo está relacionado à interação do CLA com receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR- γ). O PPAR- γ é um receptor nuclear que controla o metabolismo dos lipídios no tecido adiposo, regulando a diferenciação dos adipócitos, multiplicação destes e lipogênese (PARK; PARIZA, 2007; KENNEDY et al., 2010).

Além disso, o CLA inibe a diferenciação do pré-adipócito em adipócito, maturação fundamental também para o acúmulo de lipídios. A ativação de pré-adipócitos em adipócitos envolve a ativação de fatores transcricionais como o supracitado PPAR- γ e das proteínas CCAT/EBP (*enhancer binding protein*). Durante este processo de diferenciação, o aumento da atividade de CCAT/EBP β e CCAT/EBP γ induz a transcrição de CCAT/EBP α e PPAR- γ , potenciais reguladores da diferenciação dos adipócitos. Estas proteínas são inibidas pelo CLA comprometendo a maturação e formação do adipócito (Figura 17) (KENNEDY et al., 2010; ING; BELURY, 2011).

Figura 17 - Mecanismo de inibição da diferenciação do pré-adipócito em adipócito pelo CLA (ácido linoleico conjugado).



CCAT/EBP β : *enhancer binding protein* beta; CCAT/EBP γ *enhancer binding protein* gama; CCAT/EBP α : *enhancer binding protein* alfa; PPAR- γ : receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama; X: bloqueio;  : inibição (Adaptado de Ing; Belury, 2011).

O CLA também tem sido relacionado com a redução das taxas de gordura nos animais por aumentar o gasto de energia via termogênese, atividade física e oxidação dos lipídios. O aumento da termogênese e atividade física podem estar relacionados com a ativação de genes que codificam as *uncoupling protein* (UCPs). Essas proteínas estão presentes na membrana interna das mitocôndrias e atuam como um canal de prótons que permite o regresso de prótons H^+ gerados no ciclo de Krebs para a matriz mitocondrial, desviando-os do complexo ATP sintase, comprometendo a síntese de ATP e dissipando a energia com a produção de calor, processo conhecido como termogênese adaptativa (WANG, JONES, 2004a; VIRTANEN et al., 2009).

As UCPs fazem parte de uma família de proteínas que regulam a adiposidade que são expressas em vários tecidos, além do adiposo. A UCP1 foi a primeira proteína desta família a ser isolada e é exclusivamente expressa no tecido adiposo marrom. As UCP2 e UCP3 são expressas em uma grande variedade de tecidos, sendo a primeira predominante no tecido adiposo branco e a segunda no tecido muscular. Segundo alguns pesquisadores, a elevada concentração de UCP2 no tecido adiposo branco está

diretamente relacionada ao aumento do gasto de energia promovido pelo CLA (WEST et al., 2000; WANG, JONES, 2004b).

Nos mamíferos existem dois tipos de tecido adiposo: o branco e o marrom. O tecido adiposo branco armazena energia na forma de triglicerídio. Possui distribuição generalizada pelo organismo: órgãos e grupamentos musculares (FONSECA-ALANIZ, 2009). O tecido adiposo marrom possui a cor escurecida devido à alta concentração de citocromo oxidase presente em suas mitocôndrias. Seus adipócitos são menores, em relação ao tecido anterior, possuem várias gotículas citoplasmáticas de diferentes tamanhos, citoplasma abundante e numerosas mitocôndrias que liberam calor pela oxidação de ácidos graxos. Por isso, ele é especializado na produção de calor. Esse tipo de tecido adiposo era considerado praticamente ausente em humanos adultos, mas presente em fetos e recém-nascidos. Entretanto, pesquisas recentes revelaram que ele está presente em adultos humanos nas regiões cervical, axilar, mediastinal, supraclavicular e região abdominal superior (FONSECA-ALANIZ, 2009; SAELY et al, 2012).

O CLA também aumenta a expressão de outra proteína mitocondrial, como a carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1), no tecido adiposo branco. A CPT1 está envolvida na absorção dos ácidos graxos pela mitocôndria e posterior oxidação dos mesmos para produção de energia (WENDEL et al., 2009).

Belury (2002) e Nagao et al. (2003) sugerem que o CLA aumenta o gasto energético por estimular o sistema nervoso simpático. Segundo esses pesquisadores, um aumento das catecolaminas na circulação resultaria em aumento da atividade metabólica devido ao estímulo da lipólise no tecido adiposo, liberando ácidos graxos para o músculo esquelético.

Segundo estudos realizados em animais, o CLA pode estimular a produção de TNF- α , o qual induz a produção de leptina, hormônio produzido nos adipócitos e que promove a lipólise, bem como a apoptose dos adipócitos e pré-adipócitos (HOUSE et al, 2005, GIANCAMILLO et al, 2009; KENNEDY et al., 2010). Entretanto, em estudos realizados *in vitro* com adipócitos humanos não foi demonstrado efeito algum do CLA sobre a produção de TNF- α (BROWN et al, 2004).

2.2.1.2 Atividades antioxidante e anticancerígena

A atividade antioxidante do CLA foi reconhecida em 1990 a partir de estudos realizados *in vitro*. Nesses estudos foi reportado que o CLA é um efetivo antioxidante, mais potente que o α -tocoferol (vitamina E) (HUR et al, 2007). Antioxidantes são substâncias que protegem as células dos efeitos tóxicos dos radicais livres, espécies reativas do oxigênio geradas pelo metabolismo celular que contribuem para o desenvolvimento de doenças crônicas, como o câncer (DALEY et al, 2010).

Não existe um único mecanismo de ação do CLA sobre a inibição da carcinogênese. O efeito inibitório do CLA cis-9,trans-11 e do CLA trans-10, cis-12 em células cancerígenas depende do tipo de tecido, do estágio proliferativo do tumor, assim como o isômero de CLA administrado (MAGGIORA et al., 2004; COAKLEY et al., 2003; KELLEY et al., 2007).

Várias pesquisas relatam a atividade anticarcinogênica do CLA sobre diversos tipos de câncer: estômago, pele, próstata e principalmente de cólon e de mama, sendo estes últimos os mais prevalentes no mundo Ocidental (MAGGIORA et al., 2004; CHO et al., 2006; COAKLEY et al., 2003; LEE et al., 2006). Porém, poucos estudos são realizados para comparar o mecanismo individual dos isômeros do CLA, cujos efeitos e mecanismos de ação ainda são controversos (ROZ et al., 2013).

Um dos mais comuns eventos requeridos para o desenvolvimento do câncer em humanos é a desregulação do ciclo celular. O ciclo celular dos mamíferos é dividido em 4 fases: G₁, S, G₂ e fase M. Durante a fase G₁, a célula responde a sinais extracelulares para avançar a fase seguinte ou permanecerem em estado de repouso (G₀). Na fase G₁ ocorre a produção de enzimas para a produção de DNA. A fase S é onde ocorre a síntese do DNA; na G₂ há síntese de RNA e proteínas e na fase M ocorre a mitose, divisão celular propriamente dita (LIM et al., 2005).

A progressão do ciclo celular é controlada por uma sequência de ativação de várias proteínas cinases dependentes de ciclina (CDK). A CDK 2 e CDK 4/6 em associação com as proteínas ciclinas D, E e A ativam a proteína retinoblastoma (Rb), através de fosforilação e regulam a transição da fase G₁ para a fase S e a progressão desta fase para a G₂ e mitose (NURSE, 2000).

Inibidores da cinase dependentes de ciclina (CKI) se ligam à CDK, inibindo sua atividade e consequentemente a proliferação celular. O gene *p21^{CIP1/WAF1}* é um dos membros da família CIP/KIP dos CKI, que também incluem *p27^{KIP1}* e *p57^{KIP2}*. Além de

inibir CDK, $p21^{CIP1/WAF1}$ também se liga e inibe a atividade de outra proteína envolvida na replicação do DNA e multiplicação celular: antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (CHO et al., 2006).

Estudos realizados *in vitro* mostraram que o CLA inibe a progressão do ciclo celular da fase G_1 para S em células do cólon (HT-29) por induzir a expressão de $p21^{CIP1/WAF1}$, inibindo a ativação de CDK, ciclinas D, E e A e a fosforilação da proteína Rb. Esses efeitos foram observados com o isômero trans-10, cis-12-CLA, mas não com o cis-9, trans11-CLA (LIM et al., 2005; CHO et al., 2006).

O CLA também previne o câncer de cólon por diminuir a expressão do gene APC- β -catenina TCF-4 e por diminuir a sinalização do PPAR-delta (PPAR- δ). O gene APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) é um dos principais *gatekeepers* presentes no cólon. Pacientes com mutações hereditárias neste gene desenvolvem tumores (adenomas) no cólon. O APC se liga a uma proteína chamada β -catenina e estimula a sua fosforilação. A β -catenina se liga ao fator de transcrição TCF-4 ativando o gene em suas regiões regulatórias. Este complexo APC- β -catenina TCF-4 induz a expressão dos genes *c-myc*, *c-jun* e ciclina D1, os quais promovem o crescimento e a proliferação celular (LAMPEM et al., 2005).

Segundo He e colaboradores (1999), o complexo APC- β -catenina TCF-4 também induz a expressão de PPAR- δ nas células cancerígenas do cólon, sugerindo que o PPAR- δ é o maior alvo do complexo APC- β -catenina TCF-4 envolvido no desenvolvimento do câncer de cólon. O cis-9, trans11-CLA atua inibindo os genes-alvo do complexo APC- β -catenina TCF-4: *c-myc*, *c-jun* e ciclina D1 e a expressão do RNAm do PPAR- δ (LAMPEM et al., 2005).

Além dos mecanismos citados anteriormente, o trans-10, cis-12-CLA pode inibir o câncer de cólon por promover a apoptose, através da ativação do fator de transcrição 3 (ATF-3) e do aumento da expressão do gene pró-apoptótico e antitumorigênico NAG-1. Porém a base molecular para a indução de ATF-3 e sua consequente ação na expressão de genes ainda não está bem elucidada (LEE et al., 2006).

Os isômeros cis-9, trans11-CLA e o trans-10, cis-12-CLA também são efetivos na redução do câncer de mama, que é uma das formas mais comuns de câncer em mulheres ocidentais e importante causa de morte em mulheres de muitos países (MIGLIETTA et al., 2006, ERICKSON; HUBBARD, 2010).

O CLA promove a redução do tumor mamário devido à sua ação anti-estrogênica e neste caso, o isômero responsável é o cis-9, trans11-CLA (SANTOS-

ZAGO et al., 2008). O estrógeno é um hormônio esteroide produzido pelos ovários e responsável por controlar o crescimento do ducto alveolar das glândulas mamárias normais. Porém acredita-se que ele é um dos responsáveis pelo desenvolvimento e progressão do câncer de mama (THAKKAR; MEHTA, 2011).

Segundo alguns estudos realizados, o CLA inibe a expressão de receptores de estrógenos (ER), através da fosforilação do receptor mediada pela estimulação da fosfatase 2A (PP2A). Consequentemente, há uma redução na ligação do hormônio ao seu respectivo elemento responsivo no DNA (TANMAHASAMUT et al., 2004; LIU; SIDELL, 2005). A fosfatase 2A pertence a um grupo de proteínas chamado serina/treonina fosfatase, importante por regular importantes padrões de sinalização na célula, como por exemplo a indução de mitose. Esta enzima está sendo amplamente expressa em células de câncer de mama (AOYAMA et al., 2003; LIU; SIDELL, 2005).

O CLA também estimula a apoptose em tumores de mama através da regulação de proteínas. Bak e Bcl-x_L são proteínas que se encontram na superfície externa da membrana mitocondrial. Em estudo realizado com células MDA-MB-231, pertencentes a linhagem de câncer de mama, o CLA estimulou a apoptose ao induzir uma proteína a Bak (pró-apoptótica) e inibir a Bcl-x_L (anti-apoptótica). A função da Bcl-x_L é ativar Bak responsável por formar poros na membrana mitocondrial e induzir a liberação de citocromo *c* no citosol. O aumento nos níveis de Bak e citocromo *c* promovem a ativação das proteínas caspase-3, caspase-9 e consequentemente a apoptose (MIGLIETTA et al., 2006).

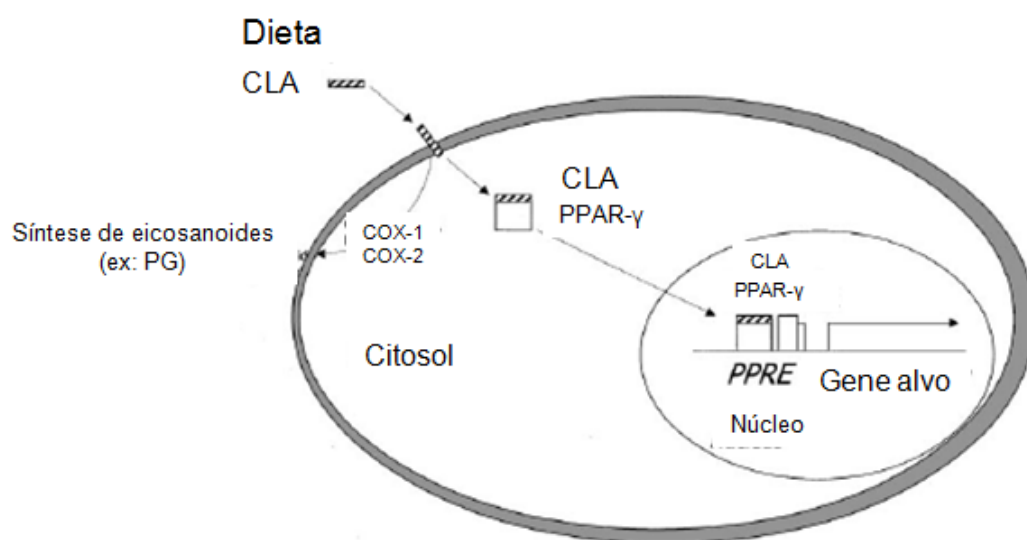
As cicloxigenases (COX) são enzimas que catalisam a conversão do ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas (PG). Os dois tipos de COX são diferentemente expressos e regulados. A COX-1 possui a função de manter a homeostase celular, enquanto a expressão de COX-2 é rapidamente induzida por fatores de crescimento, oncogenes, citocinas e endotoxinas. A COX-2 também tem sido expressa em uma grande variedade de tumores, incluindo câncer de mama (DEGNER et al., 2006).

O CLA pode exercer efeito protetor por diminuir a concentração de AA nos fosfolipídios da membrana celular, reduzindo assim a produção de PG, bem como inibindo a expressão de COX-2. O mecanismo pelo qual o CLA inibe a expressão de COX-2 ainda não está totalmente elucidado, porém dois possíveis mecanismos são sugeridos por Eferl & Wagner (2003) e Degner et al. (2006). Primeiro o CLA pode reprimir a expressão de COX-2 por antagonizar a ação do complexo AP-1 (fator de transcrição proteína ativadora 1). AP-1 é uma proteína dimérica (com duas cadeias

polipeptídicas) que pode exercer a função de oncogene ou anti-oncogene por regular genes envolvidos na proliferação celular, diferenciação, apoptose, angiogênese e invasão tumoral.

A segunda hipótese é que o CLA pode reprimir a transcrição de COX-2 por interferir na ativação do mesmo no PPRE (elemento de resposta ao proliferador de peroxissomo) (Figura 18). Ácidos graxos podem regular a expressão de genes através de PPAR- γ , sendo o CLA um potencial ligante de PPAR- γ . PPARs atuam alterando a transcrição de genes com os quais eles estão associados por reconhecer a sequência chamada de PPRE (DEGNER et al., 2006).

Figura 18 - Mecanismo molecular do CLA na carcinogênese.



CLA: ácido linoleico conjugado; PG: prostaglandinas; COX: cicloxigenase, PPAR- γ : receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama; PPRE: elemento de resposta ao proliferador de peroxissomo (Adaptado Belury, 2002).

2.2.2 Efeitos adversos do CLA

Os possíveis efeitos benéficos da suplementação com o CLA são amplamente reportados. Entretanto é importante ressaltar que o CLA pode produzir efeitos adversos. Apesar dos poucos estudos sobre sua possível toxicidade, alguns autores descreveram, em experimentos realizados com animais e humanos, efeitos como: resistência à insulina, aumento da proteína C reativa (PCR), esteatose hepática, aumentos dos níveis de VLDL e redução dos níveis de leptina e HDL (colesterol de alta densidade) (KELLEY; ERICKSON, 2003; WANG; JONES, 2004a; MIRANDA et al., 2013).

Esses efeitos adversos podem estar relacionados com a dose, a duração do tratamento e o tipo de isômero utilizado. Os maiores riscos à saúde são atribuídos ao trans-10, cis-12-CLA, enquanto que o cis-9, trans11-CLA é considerado mais seguro para a saúde humana (KELLEY; ERICKSON, 2003; LEE et al., 2011).

A suplementação com trans-10, cis-12-CLA aumentou o estresse oxidativo, elevando os níveis dos produtos do metabolismo oxidativo, principalmente PCR em homens obesos. Segundo os autores do trabalho, o estresse oxidativo provocado por este isômero induziu a resistência à insulina (RISÉRIUS et al., 2002).

Em relação à esteatose hepática, os mecanismos moleculares, bioquímicos e celulares envolvidos no seu desenvolvimento e sua relação com a ingestão de CLA ainda não estão esclarecidos. Sugere-se que este acúmulo de CLA no fígado pode ser consequência do aumento da lipogênese, em decorrência da redução da deposição de gordura no tecido adiposo e hiperinsulinemia (WANG; JONES, 2004a).

Algumas pesquisas evidenciaram que a esteatose hepática é um efeito indireto da hiperinsulinemia, que promove alta absorção e síntese de gorduras. Um dos supostos mecanismos envolvidos no aumento dos níveis de insulina no sangue seria a indução da expressão do gene PPAR- γ promovida pelo trans-10, cis-12-CLA no fígado, que promoveria o aumento do acúmulo de gordura no fígado (CLÉMENT et al., 2002).

A maioria dos estudos apresenta tempos de suplementação relativamente curtos, com média de 4 a 8 semanas, sendo poucos os trabalhos com meses de duração (SANTOS-ZAGO et al., 2008; BOGDANOV; DERBENEVA, 2013; MELE et al., 2013). Entretanto em estudos realizados com indivíduos de ambos os sexos, com sobrepeso e /ou obesidade, com concentrações que variaram entre 3-6g/dia durante 1 ano, nenhum efeito adverso sobre a saúde humana foi observado (WHIGHAM et al., 2004; GAULLIER et al., 2005; LARSEN et al., 2006). No entanto Gaullier et al.

(2004), relataram a presença de vários efeitos adversos como: desconforto, dores abdominais e dispepsia em 68% dos participantes da pesquisa, dentre estes 30 foram considerados relacionados aos isômeros cis-9, trans11-CLA e o trans-10, cis-12-CLA.

O uso de suplementos com o CLA ainda é bastante controverso. Nos Estados Unidos, a mistura equimolar dos isômeros cis-9, trans11-CLA e o trans-10, cis-12-CLA é considerada como segura (GRSA-*Generally regarded as safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*), podendo ser adicionadas em leites, iogurtes e sucos de frutas (TARLING et al., 2009). Há também o livre comércio de suplementos dietéticos contendo CLA, como: Your Life[®], Natrol[®], Nature's Way[®] e Tonalin[®], dentre outros (HOUSE et al., 2005).

Na União Europeia, a *European Food Safety Authority* (EFSA) considera uso de CLA seguro para o uso como um ingrediente para leite e iogurte, com uma recomendação de ingestão diária equivalente a 3,5g de CLA/dia, por um período máximo de seis meses. No entanto, a EFSA destaca que a segurança do consumo do CLA por períodos superiores não foi estabelecida, bem como sua segurança para indivíduos com diabetes tipo 2 (EFSA, 2010; EFSA, 2012).

Na Austrália e Nova Zelândia o *Food Standard Australia New Zealand* (FSANZ) não autorizou o uso de CLA em alimentos com a finalidade de auxiliar em programas de controle de peso e dietas. Isso devido aos possíveis efeitos adversos do produto sobre os lipídios sanguíneos e o metabolismo da glicose (FSANZ, 2011).

No Brasil, a segurança do uso do CLA isolado, nas formas líquidas, em cápsulas ou como ingrediente para adição em vários alimentos foi avaliada de 2003 a 2013 pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Todos os processos foram indeferidos porque segundo este órgão, as empresas não demonstraram a segurança de usos. Os principais aspectos técnicos, científicos e legais que fundamentaram o indeferimento dessas solicitações são relatados a seguir (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013):

- A partir das definições contidas na RDC n. 360/2003, o CLA é considerado uma gordura *trans* e não pode ser enquadrado como uma gordura poliinsaturada devido à presença de duplas ligações na configuração *trans* e pelo fato das duplas ligações não serem separadas por um grupo metileno;
- O CLA também não pode ser considerado um ácido graxo poliinsaturado ômega 6, pois este sistema de classificação é aplicável

somente a ácidos graxos insaturados com dupla ligação na configuração *cis*, separadas por um grupo metileno;

- Estudos realizados apresentam resultados controversos quanto à segurança da suplementação de CLA: alterações negativas no perfil de lipídios plasmáticos, com aumento dos níveis de LDL e triglicerídeos totais e redução dos níveis de HDL; aumento da resistência à insulina em indivíduos com diabetes tipo 2 e insulina; aumento de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo;
- Outro aspecto que impossibilita a segurança do CLA é a ausência da identificação dos mecanismos de atuação dos isômeros CLA. Estudos sugerem que *cis*-9, *trans*-11-CLA e o *trans*-10, *cis*-12-CLA possuem efeitos metabólicos diferentes, sendo o primeiro responsável pelos efeitos deletérios observados em alguns estudos;
- Ausência de estudos que tenham avaliado a segurança ou os efeitos da ingestão do CLA em grupos populacionais mais vulneráveis como crianças, adolescentes e idosos é mais um fator adicional a proibição da comercialização do CLA no Brasil

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do Tween 80 e do ácido linoleico sobre o crescimento e metabolismo de novas cepas de *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar fenotipicamente novas linhagens de lactobacilos obtidos de kefir artesanal, leites fermentados e medicamentos, através da coloração de Gram e dos testes de catalase e oxidase;
- Identificar geneticamente os lactobacilos isolados;
- Avaliar parâmetros do crescimento de diferentes cepas de lactobacilos em meio Man Rogosa e Sharp (MRS) contendo diferentes concentrações de Tween 80;
- Verificar a influência de Tween 80 a 0,6% sobre a produção de ácido lático, ácido acético e etanol;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do caldo fermentado de lactobacilos isento de células, sobre *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes;
- Avaliar a capacidade de crescimento das dez linhagens de lactobacilos em meio MRS contendo diferentes concentrações de ácido linoleico;
- Selecionar as linhagens de lactobacilos que produziram uma maior quantidade de CLA em meio MRS contendo 0,5% de ácido linoleico;

- Otimizar a produção de CLA (cis-9,trans-11-ácido octadecadienoico e trans-10,cis-12- ácido octadecadienoico) pelas linhagens selecionadas utilizando uma concentração reduzida de ácido linoleico (0,05%) e diferentes tempos de incubação.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ISOLAMENTO DOS LACTOBACILOS

Um mililitro de cada uma das três diferentes marcas de leites fermentados (A, B e C) utilizadas foi colocado em contato com 9 mL de caldo MRS e incubado a 30°C por 48 h. Em seguida cada respectiva cultura foi semeada em ágar MRS modificado, contendo 0,002% de azul de bromofenol (Merck®) e as placas foram incubadas a 30°C por 48 h.

Os medicamentos probióticos utilizados foram: Vaginorm forte® e Arkoprobiotics®. Meio grama de cada medicamento foi dissolvido em 4,5 mL de caldo MRS e incubado a 30°C por 48 h. Posteriormente, um mililitro desta cultura foi inoculado em 9 mL de caldo MRS e os tubos foram incubados a 30°C por 24 horas. Esse procedimento foi repetido por mais dois dias seguidos, totalizando três repiques sucessivos. Em seguida cada respectiva cultura foi semeada em ágar MRS modificado, contendo 0,002% de azul de bromofenol (Merck®) e as placas foram incubadas a 30°C por 48 h.

Os grãos de kefir (Figura 19) foram obtidos por doação provenientes dos estados de Alagoas e Pernambuco. Os grãos foram incubados em leite integral pasteurizado e água contendo açúcar mascavo (proporção de 1:10 p/v) durante 48 horas. Subsequentemente um mililitro de cada cultura foi inoculado em 9 mL de caldo MRS incubados a 30°C por 24 horas. Três repiques consecutivos foram realizados a partir do caldo e em seguida as culturas foram semeadas em ágar MRS modificado, contendo 0,002% de azul de bromofenol (Merck®) e as placas foram incubadas a 30°C por 48 h.

Esse indicador de pH promove o desenvolvimento de diferentes colorações das colônias no meio e detecta diferentes intervalos de valores de pH de 3 (amarelo) a 5 (azul) gerados por bactérias ácido-láticas (LEE; LEE, 2008). Estas culturas foram incubadas a 30°C durante 48 horas sob anaerobiose.

Todas as colônias foram diferenciadas de acordo com o tempo de crescimento, coloração, morfologia e tamanho. A coloração de Gram foi realizada para verificar a forma celular, tamanho e características tintoriais. A partir desta leitura foram realizados os testes para a presença de catalase e de citocromo oxidase.

Figura 19 - Grãos de kefir



Fonte: <http://www.yourkefirsource.com/kefir/>

4.2. IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA

A identificação de espécies de lactobacilos por biologia molecular foi obtida em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), sob a orientação da Prof.^a Dr^a Cíntia Rocha. Através do sequenciamento de segmentos do gene 16S rDNA e Reações em Cadeia da Polimerase (PCRs) específicas baseadas na literatura (Song et al., 2000).

Nove isolados diferentes, cujas características foram descritas no item 3.1, foram taxonomicamente identificados pelo sequenciamento do DNA genômico 16S rRNA. Inicialmente, o DNA genômico bacteriano foi isolado conforme o protocolo descrito no Kit ZR Fungal/Bacterial DNA (Zymo Research, Irvine, CA, USA). O fragmento 16S rRNA analisado foi amplificado por PCR para cada cepa isolada utilizando os pares de *primers* universais 8F (5'-CAC GGA TCC AGA CTT TGA TYM TGG CTC AG-3') e 1512R (5'-GTG AAG CTTACG GYTAGC TTG TTA CGA CTT-3'), onde Y significa C + T e M significa A + C (Todorov et al. 2010). Com a finalidade de diferenciar as espécies de lactobacilos do grupo *L. casei*, foram amplificados fragmentos da região intergênica 16–23S, usando os pares de *primers* Lu-5 (5'-CTA GCG GGT GCG ACT TTG TT-3') e Lac-2 (5'-CCT CTT CGC TCG CCG CTA CT-3') (Song et al., 2000).

Todas as reações de PCR foram realizadas com um volume final de 25µL, contendo 1 µL da suspensão de DNA extraído, 2,5 µL de tampão de PCR, 2,5 µL de dNTPs, 1 µL de primer *foward* (5 pmol/µL), 1 µL de primer *reverse* (5 pmol/µL), 0,125 µL de Taq DNA polimerase (New England Biolabs[®]) e 16,875 µL de água ultrapura. A

reação de amplificação consistiu de 30 ciclos de 95°C por 20 seg, 61°C por 30 seg, 68°C por 1 min. e a elongação foi realizada a 68°C por 5 min. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% contendo solução de brometo de etídio (0,5 mg/mL) e visualizado através da luz ultravioleta (UV). Os amplicons foram purificados por meio do QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN®). Os produtos amplificados foram quantificados em espectrofotômetro. O sequenciamento foi realizado utilizando o Kit DYEnamic™ET Cycle Sequencing (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) e as sequências obtidas foram analisadas pelo software *Sequence Analyser V 3.0* (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). A ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) e a sequência de referência do genoma de várias linhagens de lactobacilos do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) foram utilizadas como padrão para identificação dos micro-organismos (*L. casei* ATCC 334 – AF121200, *L. paracasei* JCM1181- AF182724, *L. plantarum* ATCC 14917 – AF080101, *L. pentosus* ATCC 8041 – U97134).

Foram considerados apenas os resultados com valores de identidade e pontuação máxima (*Score*) e valor de erro (*E-value*) mais baixo. Alinhamentos de sequências adicionais foram realizados usando o programa APE (A Plasmid Editor V 2.0 (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>)). *L. plantarum* ATCC 8014 e *L. rhamnosus* ATCC 9595 foram utilizados como organismos controles no processo de identificação.

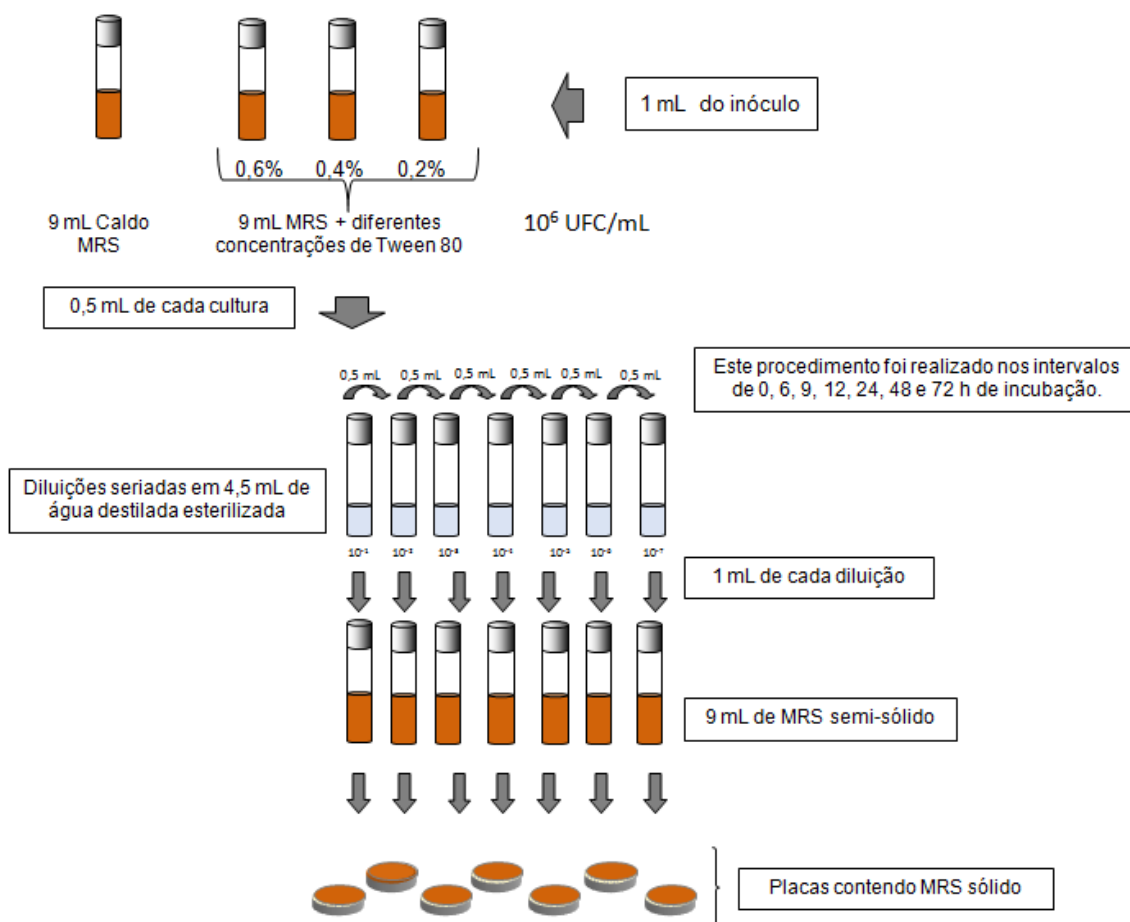
4.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Lactobacillus spp.* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TWEEN 80

Nesta determinação, 1 mL da cultura de cada lactobacilo padronizada em 10⁶ UFC/mL foi adicionada a 9 mL do meio líquido de MRS (controle), 9 mL do meio líquido de MRS com 0,6 %, 0,4% e 0,2% de Tween 80.

A enumeração das células viáveis dos lactobacilos ao longo de 72 horas de incubação foi realizada após diluições seriadas em 4,5 mL de água destilada, seguida de plaqueamento realizado através de *pour plate* em meio MRS sólido. Estes procedimentos foram repetidos após 6h, 9h, 12h, 24h, 48h e 72 horas de incubação. Após cada etapa, as placas foram incubadas a 30°C por 48 horas sob condições anaeróbicas (Figura 20).

Os resultados da enumeração das células viáveis serviram para traçar um gráfico representando o crescimento microbiano expresso pelo $\log_{10}$ das UFC/mL (unidade formadora de colônia por mililitro) em função do tempo, em horas.

Figura 20 - Enumeração das células viáveis de dez cepas de lactobacilos em meio MRS adicionado de diferentes concentrações de Tween 80.



4.4 ANÁLISE DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS E ETANOL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

As culturas de lactobacilos foram cultivados em caldo MRS/TW (MRS contendo 0,6% de Tween 80) foram incubadas a 30°C em condições anaeróbias durante 48 horas. Em seguida, elas foram centrifugadas a 4.000 rpm durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados em membrana de 0,22µm politetrafluoroetileno (Chromafil®). Em seguida, os sobrenadantes isentos de lactobacilos foram utilizados para a detecção e quantificação de ácido láctico, ácido acético e etanol.

As análises foram realizadas em um equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de índice de refração (RID) (Agilent, série 1200), equipado com bomba binária, detector de matriz de diodos e detector de ultravioleta (215 nm). As separações foram realizadas com uma coluna Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8 milímetros, Bio-Rad). A fase móvel foi composta por ácido sulfúrico 5,0 mM a um fluxo de 0,6 mL/min a 35 °C. O tempo de corrida foi de 25 min e o volume de injeção das amostras foi de 20 µL (HABE et al., 2015). Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CALDO FERMENTADO DE LACTOBACILOS SOBRE ESPÉCIES MULTIRRESISTENTES

Para determinar a atividade antimicrobiana, quatro linhagens de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA), três linhagens de *Staphylococcus aureus* metilicina sensível (MSSA) e oito de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase, pertencentes à coleção do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Micro-organismos (LFBM) foram postas em contato com o caldo fermentado contendo 0,6% de Tween 80, isento de células, de dez linhagens de lactobacilos: *L. rhamnosus* ATCC 9595, *L. paracasei* (LFBM 01, LFBM 05, LFBM 06 e LFBM 10) e *L. plantarum* (LFBM 02, LFBM 04, LFBM 07, LFBM 08 e LFBM 09).

Staphylococcus aureus ATCC 25923 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705 foram incluídas neste estudo como cepas controle. A origem e o perfil de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos de todos os patógenos encontram-se nos quadros 1 e 2.

Após 48h de incubação, as culturas de lactobacilos foram centrifugadas a 3.500 rpm por 15 minutos. Em seguida, os sobrenadantes foram filtrados em membrana de 0,22µm politetrafluoroetileno (Chromafil[®]), obtendo-se o caldo fermentado isento de células.

A partir da cultura crescida em ágar Mueller-Hinton, três colônias de cada patógeno foram inoculadas em caldo Mueller-Hinton a 35°C por 18 horas. Em seguida, uma alíquota de 0,1mL foi transferida para outro tubo contendo caldo Mueller-Hinton e incubada por 3 horas a 35°C. Obtendo dessa forma, uma suspensão calibrada com o tubo 0,5 da escala de Mac Farland que corresponde a 10^8 UFC/mL. Posteriormente, foi realizada uma diluição ao centésimo de forma a obter uma suspensão de concentração de 10^6 UFC/mL.

Em seguida, 190 µL do caldo fermentado isento de células foram depositadas em microplaca estéril de 96 poços (da coluna 1 à 10). As colunas 11 e 12 foram destinadas aos controles e foram preenchidas com 190 µL de caldo MRS. No controle negativo foi utilizado água destilada esterilizada (10 µL). Posteriormente, foi acrescentado 10 µL de cada suspensão bacteriana calibrada, resultando em uma concentração final do inóculo de 10^4 UFC/mL. As placas foram incubadas por 24 horas a 35°C. Em seguida, foi realizada a leitura do resultado por densidade óptica a 630 nm utilizando um leitor de microplacas (Thermo plaque - TP Reader[®] Bio tek[®] ELx800) (ILAVENIL et al., 2015). A ausência de crescimento no controle negativo foi considerado como inibição de 100%. A partir dessa interpretação foi calculado o percentual de inibição do crescimento dos patógenos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Quadro 1 - Origem e perfil de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos das espécies de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de um hospital particular do Recife.

Microrganismos	Origem	Resistência	Sensibilidade
<i>Klebsiella pneumoniae</i> BAA ATCC 1705	ATCC	*	*
<i>Klebsiella pneumoniae</i> LFBM 01	Secreção traqueal	AMI; AMP; AMS;TZP; ERT; MER; CIP; FEP; CAZ; CTX; CXM; IMP	CS
<i>Klebsiella pneumoniae</i> LFBM 02	Urina	AMP; AMC;CFL; CTX; FEP; ERT; MER; AMI; GEN; CIP; NOR; SXT	ND
<i>Klebsiella pneumoniae</i> LFBM 03	Urina	AMP; AMC;CFL; CTX; FEP; ERT; MER; AMI; GEN; CIP; NOR; SXT	CS
<i>Klebsiella pneumoniae</i> LFBM 04	Urina	AMP; AMC;CFL; CTX; FEP; ERT; MER	AMI; GEN; CIP; NOR; SXT
<i>Klebsiella pneumoniae</i> LFBM 05	Sangue	GEN; AMP; AMS;TZP; ERT; MER; CIP; FEP; CAZ; CTX; CXM; IMP	AMI; CIP; TGC; CS
<i>Klebsiella pneumoniae</i> LFBM 06	Secreção traqueal	GEN; AMP; AMS;TZP; ERT; MER; CIP; FEP; CAZ; CTX; CXM; IMP	AMI; CS
<i>Klebsiella pneumoniae</i> LFBM 08	Urina	AMP; AMC;CFL; CTX; FEP; ERT; MER; AMI; GEN; CIP; NOR; STX	ND

AMI: Amicacina; AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina/ Ácido clavulânico; AMS: Ampicilina/Subactam; CAZ: Ceftazidima; CFL: Cefalotina; CIP: Ciprofloxacina; CTX: Cefotaxima; CXM: Cefuroxima; CS: Colistina; ERT: Ertapenem; FEP: Cefepime; GEN: Gentamicina; IMP: Imipenem; NOR: Norfloxacin; MER: Meropenem; TZP: Piperacilina/Tazobactam; STX: Sulfametoxazol/Trimetoprima; TGC: Tigeciclina; **ATCC**: American Type Culture Collection; **ND**: não determinado; *: cepa controle; LFBM: Laboratório de Fisiologia e bioquímica de Micro-organismos.

Quadro 2 - Origem e perfil de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos das espécies de *Staphylococcus aureus* isoladas de um hospital particular do Recife.

Microrganismos	Origem	Resistência	Sensibilidade
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25.923	ATCC	*	*
<i>Staphylococcus aureus</i> LFBM 13	Secreção vaginal	PEN	CIP; TEC; GEN; CLI; OXA
<i>Staphylococcus aureus</i> LFBM 14	Secreção de ferida	PEN	CIP; TEC; GEN; CLI; OXA
<i>Staphylococcus aureus</i> LFBM 17	Hemocultura	ERI	CIP; CLI; OXA;PEN; OXA
<i>Staphylococcus aureus</i> LFBM 29	Sangue	AMP; CFL; OXA; PEN	CIP; CLI; ERI; TET
<i>Staphylococcus aureus</i> LFBM 30	Secreção traqueal	AMP; CFL; CIP; CLI; ERI; PEN; OXA;	GEN; LIN; TET; VAN
<i>Staphylococcus aureus</i> LFBM 34	Secreção de ferida	PEN; CIP; CLI; ERI; OXA	GEN; LIN; SXT
<i>Staphylococcus aureus</i> LFBM 35	Secreção de ferida	PEN; OXA;	GEN; CIP; ERI, CLI; LIN; STX; VAN

AMP: Ampicilina; CFL: Cefalotina; CIP: Ciprofloxacina; CLI: Clindamicina; ERI: Eritromicina; GEN: Gentamicina; LIN: Linezolid; OXA: Oxacilina; PEN: Penicilina; TEC: Teicoplanina; TET: Tetraciclina; STX: Sulfametoxazol/Trimetoprima; VAN: Vancomicina; **ATCC**: American Type Culture Collection; **ND**: não determinado; *: cepa controle; LFBM: Laboratório de Fisiologia e bioquímica de Micro-organismos.

4.6 CRESCIMENTO DE LACTOBACILOS EM MRS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO LINOLEICO

Com a finalidade de aumentar a solubilidade do ácido linoleico em água, uma solução estoque deste ácido graxo foi preparada (20 mg/mL) em 1% de Tween 80 (VAN NIEWENHOVE et al., 2007). A partir dessa solução estoque foram preparados meios líquidos MRS cujas concentrações finais de ácido linoleico foram 0,5% ou 0,25% ou 0,125%.

Para avaliar a capacidade das bactérias crescerem na presença de ácido linoleico, foi inoculado 1 mL da cultura de cada lactobacilo com 24 h de incubação em 9 mL de MRS contendo as diferentes concentrações de ácido linoleico, finalizando uma concentração do inóculo em 10^6 UFC/mL. Em seguida, todas as amostras foram incubadas a 30 °C por 72 h.

A enumeração das células viáveis dos lactobacilos ao longo de 72 horas de incubação foi realizada após diluições seriadas em 4,5 mL de água destilada, seguida de plaqueamento realizado através de *pour plate* em meio MRS sólido. Estes procedimentos foram repetidos após 6h, 9h, 12h, 24h, 48h e 72 horas de incubação. Após cada etapa, as placas foram incubadas a 30°C por 48 horas sob condições anaeróbicas.

Os resultados da enumeração das células viáveis serviram para traçar um gráfico representando o crescimento microbiano expresso pelo $\log_{10}$ das UFC/mL (unidade formadora de colônia por mililitro) em função do tempo, em horas.

4.7 SELEÇÃO DAS CULTURAS DE LACTOBACILOS PARA A PRODUÇÃO DE CLA

A partir da solução estoque de ácido linoleico (20 mg/mL) foi preparado meio líquido MRS com concentração final de ácido linoleico igual a 0,5% (MRS/AL).

As culturas de lactobacilos crescidos em caldo MRS/AL foram incubadas a 30°C em condições anaeróbicas durante 48 horas. Em seguida, elas foram centrifugadas a 4.000 rpm durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados em membrana de 0,22µm politetrafluoroetileno (Chromafil®) e isentos de lactobacilos foram utilizados para a detecção e quantificação de CLA.

Apenas as linhagens que apresentaram uma maior capacidade para produzir CLA, foram selecionadas para a etapa seguinte.

4.8 OTIMIZAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE cis-9, trans-11-CLA e trans-10,cis-12-CLA

A partir da mesma solução estoque de ácido linoleico utilizada na etapa anterior, foi preparado meio líquido MRS cuja concentração final de ácido linoleico foi de 0,05%.

Para avaliar a capacidade das bactérias selecionadas anteriormente de produzirem CLA, foi inoculado 1 mL da cultura de cada linhagem de lactobacilo com 24 h de incubação em 9 mL de MRS contendo as diferentes concentrações de ácido linoleico, finalizando uma concentração de inóculo em 10^6 UFC/mL. Em seguida, todas as amostras foram incubadas a 30 °C por 24 e 48 h, com o objetivo de detectar o melhor período para a produção.

Após esses dois períodos de incubação, as respectivas culturas foram centrifugadas a 4.000 rpm durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados em membrana de 0,22µm politetrafluoroetileno (Chromafil®). Posteriormente, o caldo fermentado isento de lactobacilos foi utilizado para a detecção e quantificação de CLA.

4.9 PRODUÇÃO DE CLA

4.9.1 Extração de lipídios

Um mililitro e meio de cada caldo fermentado e 3 mL de isopropanol foram misturados vigorosamente em vórtex por 30 segundos. Em seguida, foram adicionados 2mL de hexano bidestilado, agitados novamente em vórtex por 3 minutos e a amostra foi deixada em repouso por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos. Após essa etapa, a camada superior foi recolhida e mais 2 mL de hexano foi adicionado, repetindo a etapa da centrifugação e recolhimento da fase hexânica. As fases hexânicas foram reunidas e evaporadas para a realização da etapa seguinte (ALONSO; CUESTA; GILLILAND, 2003).

4.9.2 Hidrólise de lipídios

Os lipídios extraídos foram hidrolisados em ácidos graxos livres pela adição de três mililitros de KOH 1M em etanol e aquecimento em banho ultrassônico (Branson B2510E-DTH) a 50°C por 30 minutos. Após resfriamento, dois mililitros de água destilada e dois mililitros de hexano foram adicionados às amostras e a mistura foi homogenizada vigorosamente. A fase hexânica contendo os compostos insaponificáveis foi descartada e a fase aquosa recolhida e acidificada com um mililitro de HCl até pH 3. Após acidificação foi acrescentado dois mililitros de hexano, em seguida as fases foram homogeneizadas, separadas e as fases orgânicas reunidas para a etapa da metilação (JIANG et al., 1996; ALONSO; CUESTA; GILLILAND, 2003)

4.9.3 Metilação

Os ácidos graxos livres em hexano (etapa anterior) foram metilados pela adição de 300 µL de trifluoreto de boro em metanol a 14% (Sigma[®]) por 30 minutos a 50°C em banho ultrassônico (Branson B2510E-DTH). Posteriormente, as amostras foram homogenizadas em agitador magnético e em seguida a camada orgânica foi recolhida e depositada em novos tubos. O hexano foi evaporado sob Argônio e as amostras armazenadas a -20°C até serem analisadas através de cromatografia gasosa (JIANG et al., 1996; ALONSO; CUESTA; GILLILAND, 2003).

4.9.4 Detecção de CLA

Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) foram dissolvidos em um mililitro de hexano e armazenados a -20 ° C antes da análise por cromatografia gasosa (CG). Os FAMES foram analisados utilizando um cromatógrafo Fast GC-Master (Dani, Milan, IT) equipado com uma coluna HP INNOWAX (60 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de espessura).

Foi injetado um microlitro de cada amostra. O injetor foi mantido a 250 ° C e o forno da coluna foi ajustado para 140 ° C durante 4 min, depois aumentado para 190°C (taxa, 10°C/min) e 240°C durante 12 min. Os compostos foram detectados utilizando um detector de ionização de chama (FID, a 250°C), enquanto o fluxo de nitrogênio através da coluna foi mantido constante a 2,0 mL/min. Os tempos de retenção foram

comparados com os padrões cis-9, trans-11-CLA e trans-10,cis-12- CLA (Sigma) para identificar os ácidos graxos presentes na amostra. As concentrações foram então calculadas utilizando curvas de calibração do padrão interno ácido heptadecanoico (Sigma[®]) (MULLER et al., 2011).

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Cálculos estatísticos foram utilizados para descrição do comportamento individual da variável em estudo (crescimento microbiano estimado em Unidades Formadoras de Colônias): médias e desvios padrão.

Para verificação de variação destes dados obtidos em função da concentração do Twenn 80 e do ácido linoleico, foi utilizado o teste estatístico de análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Dunnett.

Em relação à atividade antimicrobiana, foram utilizados o teste estatístico de análise de variância (ANOVA), seguido dos testes de Dunnett e Turkey's.

Para análise dos dados de pH, produção de ácidos orgânicos, etanol e produção de CLA foi utilizado o teste t.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism[®], versão 5.01 para Windows. Foram consideradas diferenças significativas para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DOS LACTOBACILOS

Nove isolados que se apresentaram como bacilos Gram positivos, não esporulados sem atividade de catalase e citocromo oxidase, com colônias de forma regular e coloração variando em sua maioria do amarelo ao azul no MRS com azul de bromofenol foram selecionados como sugestivos de *Lactobacillus spp* (Quadro 3, figuras 21 e 22). Apenas um de nossos isolados apresentou colônia de coloração esbranquiçada no meio (Figura 22G).

Quadro 3 - Origem dos lactobacilos isolados

Cepas isoladas	Origem
LFBM 01	Leite fermentado A
LFBM 02	Medicamento Arkoprobiotics [®]
LFBM 04	Kefir-AL cultivado em leite
LFBM 05	Leite fermentado B
LFBM 06	Kefir-PE cultivado em leite
LFBM 07	Medicamento Vaginorm forte [®]
LFBM 08	Kefir-PE cultivado em água
LFBM 09	Kefir-PE cultivado em água
LFBM 10	Leite fermentado C

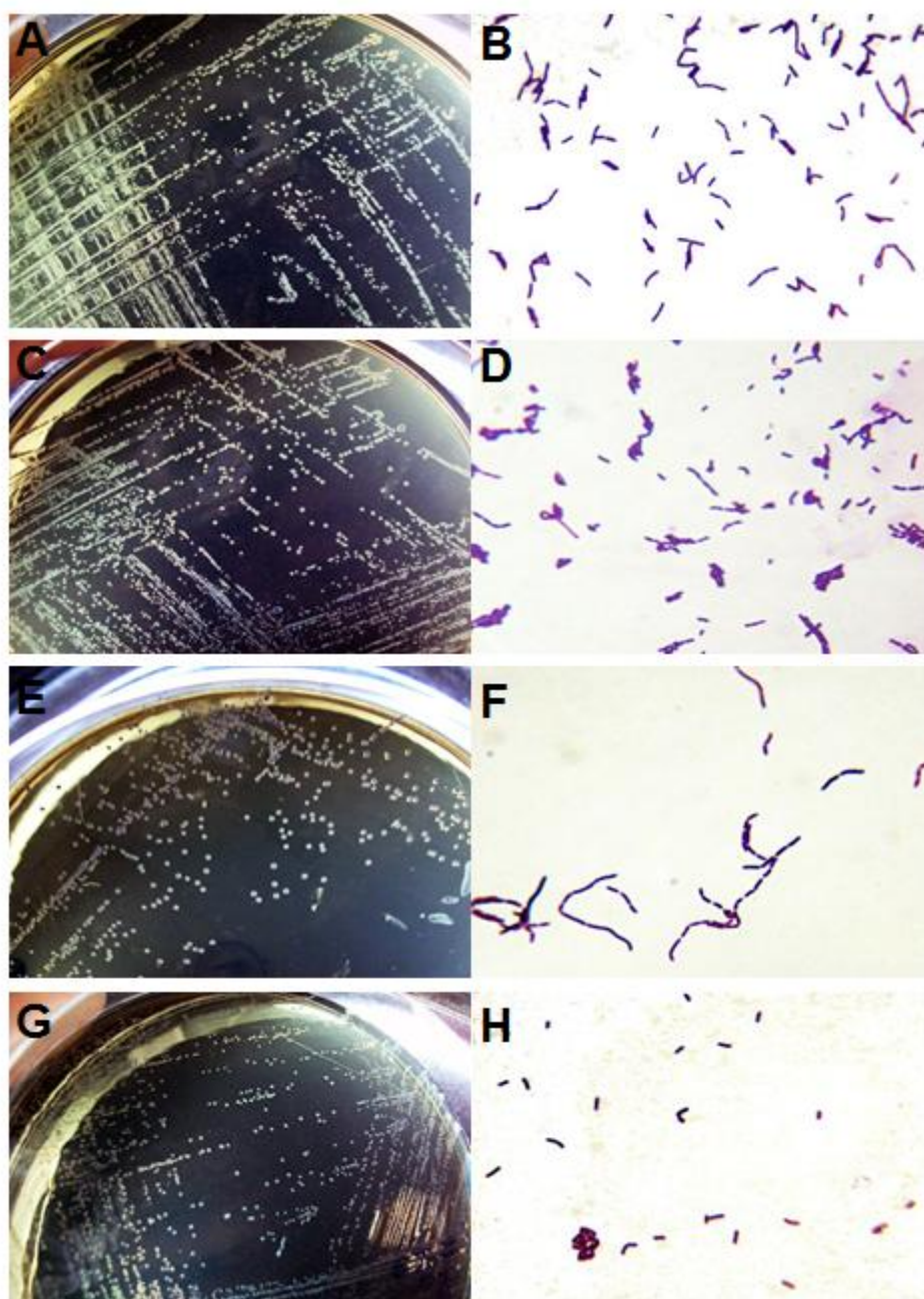
Nossos resultados corroboraram aos de Lee & Lee (2008), que isolaram lactobacilos a partir de iogurtes comerciais utilizando MRS com azul de bromofenol. As linhagens encontradas pelos autores também variaram em tamanho, cor (diferentes tons de azul) e forma, permitindo o isolamento de espécies a partir de uma cultura mista de bactérias. Eles também obtiveram colônias de *L. plantarum* com o centro azul escuro, semelhante à encontrada em nosso estudo (Figura 22E).

Sutula, Coulthwaite e Verran (2012) também utilizaram MRS com azul de bromofenol para isolar *L. casei* Shirota de amostras da cavidade oral de voluntários que tomavam Yakult® diariamente. Neste experimento, eles utilizaram diferentes espécies de lactobacilos como referência e, assim como em nosso trabalho, obtiveram isolamento de colônias brancas e com diferentes tons de azul.

Segundo Hartemink, Domenech e Rombouts (1997), essa ausência de coloração pode ocorrer em algumas linhagens de lactobacilos, que são incapazes de modificar sua coloração, mesmo em diferentes valores de pH.

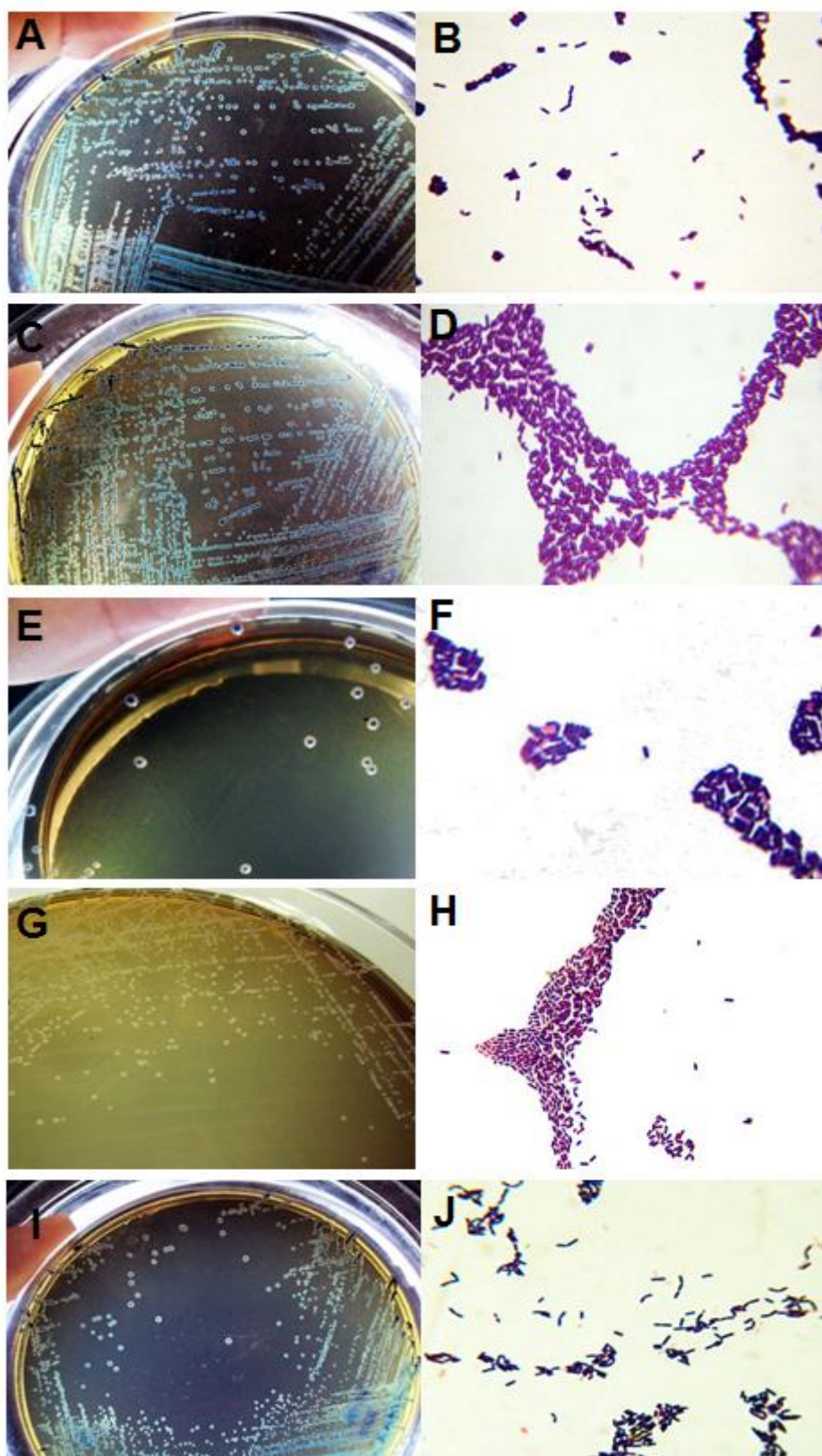
O isolamento diferencial de bactérias ácido-láticas é muitas vezes difícil, devido à presença de espécies com característica fenotípicas semelhantes. Por isso, os meios de isolamento seletivos são preferidos para o isolamento desse grupo de micro-organismos (SACCARO et al., 2012).

Figura 21 - Aspecto macroscópico (A, C, E e G) e aspecto microscópico (B, D, F e H) (1000x) de *L. paracasei* (**AB** - LFBM 01, **CD** - LFBM 05, **EF** - LFBM 06, **GH** - LFBM 10).



Fonte: Mesquita, A. R. C.

Figura 22 - Aspecto macroscópico (A, C, E, G e H) e aspecto microscópico (B, D, F, H e J) (1000x) de *L. plantarum* (**AB** – LFBM 02, **CD** - LFBM 04, **EF** - LFBM 07, **GH** - LFBM 08, **IJ** - LFBM 09).



Fonte: Mesquita, A. R. C.

Diversos meios têm sido utilizados para isolar bactérias ácido-láticas (LEE, LEE et al., 2008). Porém, os mais amplamente utilizados são: MRS (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960), Rogosa (ROGOSA; MITCHEL; WISEMAN, 1951) e ágar seletivo para lactobacilos (MITSUOKA, 1978), entretanto esses meios não são seletivos para o isolamento exclusivo de lactobacilos (SUTULA; COULTHWAITE; VERRAN, 2012).

Por isso, uma grande variedade de modificações nos meios de cultura tem sido empregada para melhorar o isolamento diferencial dessas bactérias. As mudanças incluem a adição de substâncias que favorecem o crescimento (vitaminas e minerais); modificação das temperaturas de incubação, suplementação com agentes seletivos (antibióticos, bile, cloreto de lítio, propionato de sódio), e a adição de indicadores de pH, principalmente azul de bromofenol e púrpura de bromocresol (LIN et al., 2006; LEE, LEE et al., 2008; SUTULA; COULTHWAITE; VERRAN, 2012; ASHRAF; SMITH, 2015).

5.2 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA

A identificação genética de *Lactobacillus spp.* foi realizada utilizando o sequenciamento das regiões 16S rDNA, que identificou conclusivamente (99% - 100%) cinco amostras, *L. plantarum* (LFBM 02, LFBM 04, LFBM 07, LFBM 08 e LFBM 09). Como controle negativo das reações, foi utilizado o mix da PCR sem amostra de DNA e como controle positivo *L. plantarum* ATCC 8014.

Para determinação conclusiva da espécie das amostras *Lactobacillus spp.* LFBM 01, LFBM 05, LFBM 06 e LFBM 10, foram utilizados os parâmetros descritos por Song et al. (2000), através da amplificação da região intergênica 16-23S. Como controle negativo das reações, foi utilizado o mix da PCR sem amostra de DNA e como controle positivo *L. rhamnosus* ATCC 9595. Dessa forma, estes isolados puderam ser identificados como *L. paracasei* (99% - 100%).

Pesquisas relatam o isolamento de *Lactobacillus spp.* a partir do cultivo de grãos de kefir em leite ou açúcar realizadas em diversos países como: Alemanha (GULITZ et al., 2011), China (GAO et al., 2012), Turquia (KESMEN; KACMAZ, 2011), África do Sul (WITTHUHN; SCHOEMAN; BRITZ, 2004), Argentina (GARROTE; ABRAHAM; ANTONI, 2001), e Brasil (MIGUEL et al., 2011).

Miguel et al. (2011) isolaram *L. paracasei* e *L. casei*, mas não encontraram *L. plantarum* a partir de amostras de kefir obtidas de diferentes regiões do país (SP, GO, MG, AL, RJ, DF, ES, BA) e identificadas através da análise da sequência de DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*).

Zaniratti et al. (2015) identificaram diferentes espécies de lactobacilos através da análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) ou do sequenciamento do gene 16S rRNA. *L. casei* pertencente ao grupo de mesmo nome, foi a espécie mais isolada, porém os autores não encontraram *L. paracasei* ou *L. plantarum*, espécies prevalentes em nossas amostras. As amostras de kefir desse estudo foram provenientes dos estados de MG, BA e PR.

Nossos resultados corroboraram com os de Santos et al. (2003) que também encontraram *L. plantarum* e *L. paracasei* em amostras de kefir, porém neste estudo as amostras foram originadas de diferentes países europeus.

De acordo com alguns autores, a composição microbiana dos grãos de kefir, pode variar de acordo com o local de origem do mesmo, o substrato utilizado no processo de fermentação, o cultivo e os métodos de manutenção (PRADO et al., 2015; ZANIRATI et al., 2015). Isso pode justificar a não obtenção das mesmas espécies de lactobacilos que as isoladas em nosso trabalho, mesmo nas mesmas regiões do país.

A atual taxonomia do grupo *Lactobacillus casei* compreende cinco espécies intimamente relacionadas: *L. casei*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. paracasei* subsp. *tolerans*, *L. zae* e *L. rhamnosus* (FELIS; DELLAGLIO, 2007). Uma análise comparativa da sequência do 16S rRNA é comumente utilizada como método de identificação molecular. Cepas que apresentam uma similaridade superior a 97% no 16S rRNA são consideradas da mesma espécie. Infelizmente, um alto grau de similaridade (entre 98,7-99,9%) é observado nas sequências genéticas do 16S rDNA de cepas pertencentes ao grupo *L. casei*. Por isso, é necessária a utilização de parâmetros da PCR específica do 16S rDNA (WARD; TIMMINS, 1999; HUANG et al., 2011).

Outro grupo de espécies intimamente relacionadas é o grupo *L. plantarum*, que consiste nas espécies *L. plantarum*, *L. paraplantarum*, e *L. pentosus*. Segundo Singh et al. (2009), este grupo apresenta níveis muito elevados de homologia do DNA e a semelhança entre *L. plantarum* e *L. pentosus*, por exemplo é em torno de 99%, com apenas uma diferença de 0,3% na sequência do gene 16S rRNA. Porém, mesmo com essa similaridade, é possível fazer a identificação baseado no 16S rRNA.

Torriani et al. (2001) também realizou com sucesso a diferenciação entre as espécies desse grupo, entretanto eles utilizaram metodologia baseada em *primers* direcionados ao gene rec A.

5.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Lactobacillus* spp. EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TWEEN 80

Objetivando a influência do Tween 80 no crescimento de lactobacilos, amostras contendo diferentes concentrações desse composto em caldo MRS foram inoculadas com diferentes linhagens de *Lactobacillus* por 72 horas de incubação. Os respectivos perfis de crescimento foram analisados através de uma curva de crescimento construída a partir de alíquotas coletadas em diferentes intervalos de tempo (0, 6, 9, 12, 24, 48 e 72 horas). Os resultados desta avaliação estão representados nas figuras 23, 24 e 25.

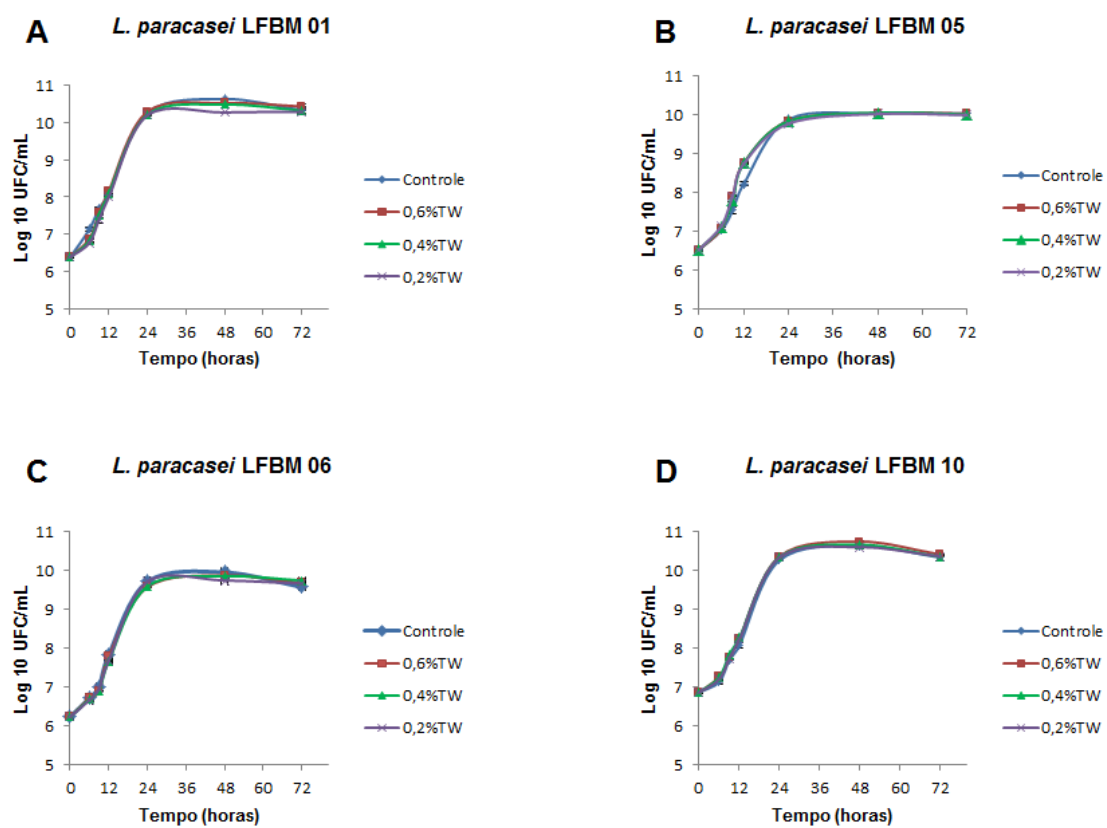
O crescimento de todas as linhagens *L. paracasei* (LFBM 01, LFBM 05, LFBM 06 e LFBM 10); *L. plantarum* (LFBM 02, LFBM 04, LFBM 07, LFBM 08 e LFBM 09) e *L. rhamnosus* ATCC 9595 foram semelhantes. Não foi visualizada diferença significativa ($p < 0,05$) entre o crescimento dos grupos controles e as culturas com o Tween 80 em diferentes concentrações.

L. paracasei apresentou uma fase estacionária prolongada, quando comparada a de *L. plantarum* e *L. rhamnosus*. Essa fase teve início com 24 h de incubação e continuou até as 72 h de experimento (Figura 23).

L. plantarum e *L. rhamnosus* apresentaram uma queda no crescimento logo após as 24 h, tempo de crescimento máximo para ambas as espécies (Figuras 24 e 25).

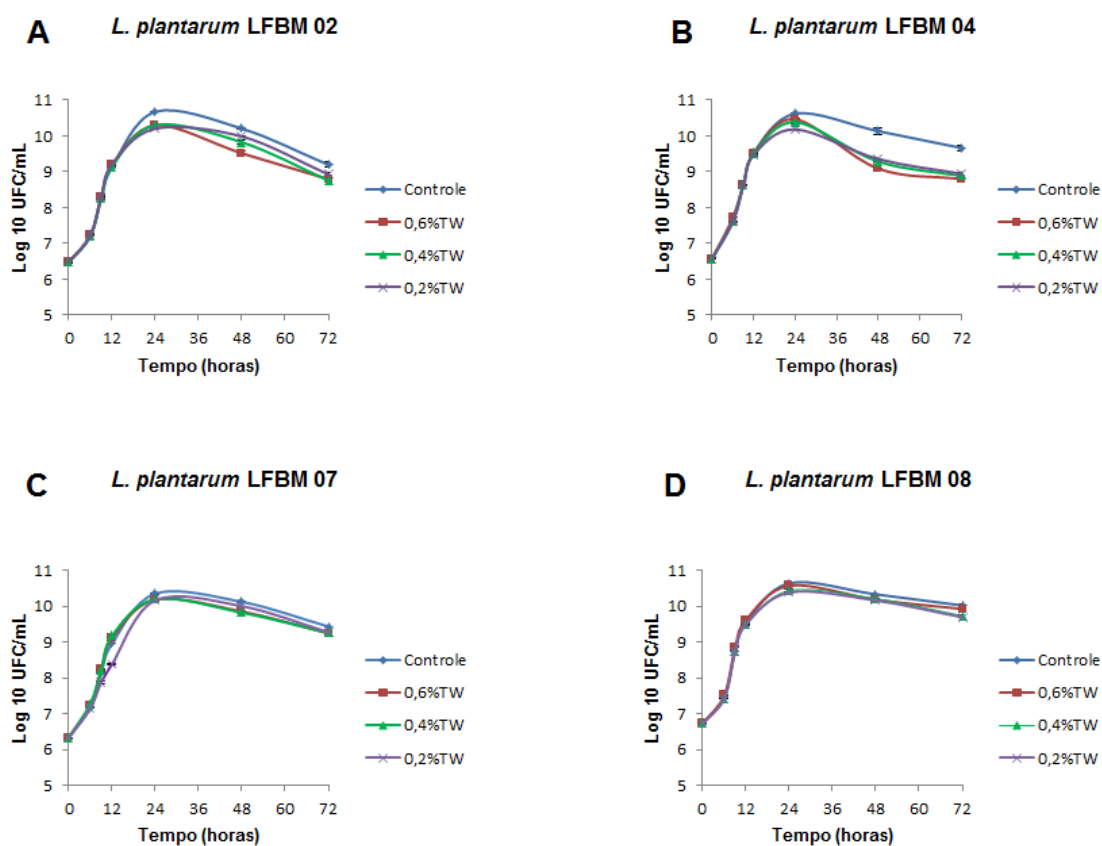
O crescimento máximo das culturas de *L. rhamnosus* e *L. plantarum* ocorreu após 24 horas de crescimento e foi de $10,36 \pm 0,05$ e $10,38 \pm 0,17$, respectivamente. Em contrapartida, as culturas de *L. paracasei* apresentaram crescimento máximo de $9,98 \pm 0,28$ após 48 h de incubação.

Figura 23 - Crescimento das linhagens de *L. paracasei* em meio MRS adicionado de diferentes concentrações de Tween 80 (0,6 % TW, 0,4% TW e 0,2% TW).



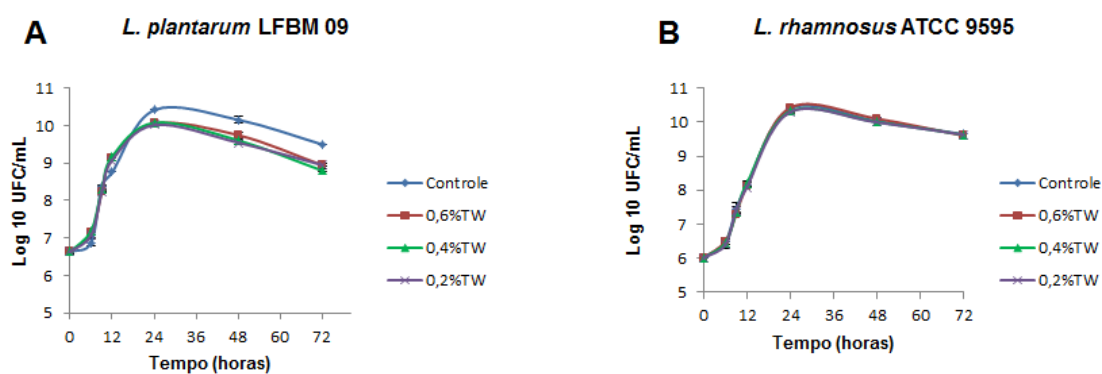
A: *L. paracasei* LFBM 01, **B:** *L. paracasei* LFBM 05, **C:** *L. paracasei* LFBM 06; **D:** *L. paracasei* LFBM 10. Controle: meio MRS; AL: MRS + Tween 80.

Figura 24 - Crescimento das linhagens de *L. plantarum* em meio MRS adicionado de diferentes concentrações de Tween 80 (0,6 % TW, 0,4% TW e 0,2% TW).



A: *L. plantarum* LFBM 02, B: *L. paracasei* LFBM 04, C: *L. paracasei* LFBM 07; D: *L. paracasei* LFBM 08. Controle: meio MRS; AL: MRS + Tween 80.

Figura 25 - Crescimento de diferentes espécies de lactobacilos em meio MRS adicionado de diferentes concentrações de Tween 80 (0,6 % TW, 0,4% TW e 0,2% TW).



A: *L. plantarum* LFBM 09, B: *L. rhamnosus* ATCC 9595. Controle: meio MRS; AL: MRS + Tween 80.

De forma geral, o Tween 80 não alterou significativamente ($p < 0,05$) o crescimento das culturas de lactobacilos, quando as mesmas foram comparadas com os seus respectivos controles. Estes resultados corroboram aos encontrados por Corcoran et al. (2007) que ao realizar pesquisas com *L. rhamnosus* GG, encontraram a mesma taxa de crescimento das culturas, independente da presença ou não do Tween 80 em meio GEM (meio de cultura alternativo ao MRS).

Os resultados obtidos em nossa pesquisa também estão de acordo com os de Li et al. (2011), que estudaram o efeito de 1,5% de Tween 80 sobre o crescimento de *L. acidophilus* F0221 em presença de 0,1 a 0,9% de bile bovina. Esses autores também não encontraram influência deste surfactante sobre o número de células bacterianas viáveis, quando comparada a amostra controle sem Tween. Porém nas culturas com a presença da bile, o Tween teve um efeito protetor sobre a membrana celular, mantendo a integridade da mesma e a viabilidade celular.

Ricciardi et al. (2015) e Zota et al. (2016) obtiveram resultados semelhantes utilizando meio quimicamente definido e Tween 80 para cultivar diferentes espécies de lactobacilos em condições aeróbicas e anaeróbicas. Eles concluíram que a suplementação com Tween 80 promoveu o crescimento em culturas aeróbicas de lactobacilos, mas não afetou o crescimento da cultura anaeróbica, mesma condição e resultado obtido em nosso trabalho. Os autores sugerem uma relação positiva do Tween 80 na membrana celular e ativação do padrão aeróbico.

Segundo Zota et al. (2016) mais investigações são necessárias para descobrir o mecanismo do Tween 80 sobre a ativação do padrão aeróbico das bactérias ácido-láticas, que promove um aumento no crescimento bacteriano.

Partanen et al. (2001), investigaram o efeito do Tween 80 sobre o crescimento de diferentes linhagens de *L. delbrueckii*. Estes autores usaram várias fontes de ácidos graxos incluindo Tweens 20, 40, 60 e 80 como fatores de crescimento. Eles concluíram que a maioria destas linhagens necessitou dos Tweens 20 e 80 para o seu crescimento, Tweens que possuem em comum a presença do ácido oleico em sua composição. Esses Tweens diferem entre si pelo tipo de ácido graxo associado ao radical polioxietileno sorbitano, que é comum aos quatro surfactantes. Monolaurato, monopalmitato, monoestearato e monooleato são os ácidos graxos correspondentes aos Tweens 20, 40, 60 e 80, respectivamente.

Endo et al. (2006) substituíram o Tween 80 do meio MRS por ácidos graxos saturados e insaturados e cultivaram 5 linhagens de *Lactobacillus* (2 *L. gasseri*, 2 *L. plantarum* e 1 *L. reuteri*) por 24 h, com o objetivo de estudar o efeito dos ácidos graxos sobre o crescimento de lactobacilos. Entre os ácidos graxos utilizados, ácidos ocatadecanoicos como o ácido oleico foram capazes de estimular o crescimento das referidas linhagens. Entretanto, em nossos resultados não evidenciamos diferença significativa ao acrescentar diferentes concentrações de Tween 80 ao meio MRS.

Tween 80 é um surfactante, não iônico que contém mais de 90% de ácido oleico e tem sido extensivamente utilizado para facilitar a dissolução dos compostos insolúveis em água (TAOKA et al., 2011; ZOU et al., 2013).

O ácido oleico é incorporado na membrana bacteriana, conferindo maior permeabilidade celular e atuando como ácidos graxos estruturais. Podendo também atuar como promotor de crescimento, por ser utilizado como fonte de carbono (TAOKA et al., 2011).

Depois de incorporado, o ácido oleico pode ser convertido a ácido diidroesterculínico, ácido graxo característico dos lactobacilos (PARTANEN et al., 2001). Esse ácido graxo junto com o ácido oleico e ácido vacênico são os ácidos ocatadecanoicos mais prevalentes em lactobacilos, perfazendo de 14 a 67% do total de ácidos graxos de sua composição (KANKAANPÄÄ et al., 2004).

Alguns autores acreditam que o ácido diidroesterculínico promove um aumento na fluidez da membrana celular de bactérias ácido lácticas, além de protegê-las contra os efeitos adversos do ambiente, como baixas temperaturas no processo do congelamento e baixo pH (PARTANEN et al., 2001; ANANTA et al., 2004). Entretanto, outros autores acreditam que a presença do ácido oleico, pode conferir a essas bactérias uma maior rigidez da membrana plasmática e essa característica promoveria um aumento na tolerância à bile e adesão ao epitélio intestinal (CORCORAN et al., 2007).

5.4 ANÁLISE DOS ÁCIDOS ORGÂNICOS E ETANOL POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Os tempos de retenção para os padrões ácido láctico, ácido acético e etanol foram 13,22 min.; 15,51 min. e 20,13 min., respectivamente. As concentrações dos metabólitos foram calculadas através da equação da reta obtida a partir da curva de calibração de cada padrão.

As dez espécies de lactobacilos cultivadas em MRS contendo 0,6% de Tween 80 produziram quantidades significativas de ácido láctico, ácido acético e etanol, confirmando o padrão heterofermentativo dessas linhagens.

Não houve diferença significativa entre a produção dos três metabólitos, quando foram comparados às suas respectivas amostras controles ($p < 0,05$). Entre esses metabólitos secundários, o ácido láctico foi o principal ácido orgânico produzido após 48 horas de incubação.

A quantidade de ácido láctico produzida pelas linhagens em estudo variou entre 18,59 g/L e 23,32 g/L e as linhagens responsáveis por essa produção foram *L. plantarum* LFBM 09 e *L. paracasei* LFBM 06, respectivamente (Figura 26). Ácido acético e etanol também foram detectados no sobrenadante, mas em menores quantidades.

Para ácido acético, a produção variou entre 3,93 g/L a 4,74 g/L produzido por *L. paracasei* LFBM 10 e *L. plantarum* LFBM 08, nesta sequência (Figura 27). Em relação ao etanol os valores mínimo e máximo foram de 1,08 g/L e 1,49 g/L, para *L. plantarum* LFBM 04 e *L. paracasei* LFBM 05, respectivamente (Figura 28).

Os valores de pH dos caldos fermentados após 48 h de fermentação variaram entre 3,85 e 4,10 (Figura 29). Não houve diferença significativa entre esses valores ($p < 0,05$). *L. plantarum* LFBM 09 foi a linhagem que apresentou maior valor para o pH. Este resultado está de acordo com o obtido para produção de ácido láctico, no qual a mesma linhagem foi a que apresentou menor produção do referido ácido.

Figura 26 - Produção de ácido láctico por diferentes linhagens de lactobacilos após 48 h de cultivo em MRS contendo 0,6% de Tween 80 (TW 0,6%).

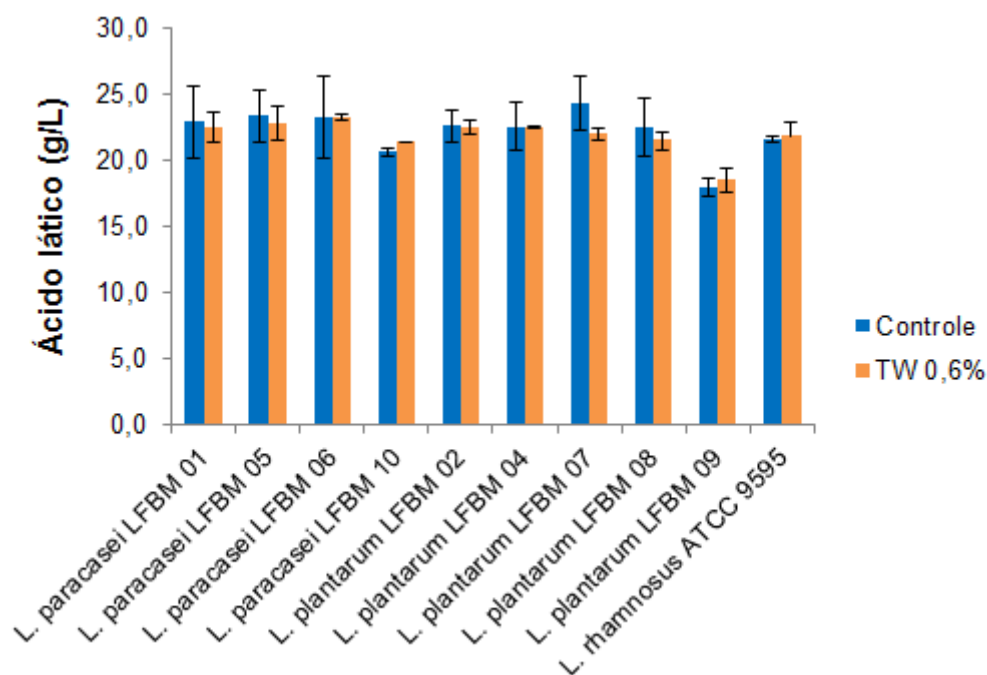


Figura 27 - Produção de ácido acético por diferentes linhagens de lactobacilos após 48 h de cultivo em MRS contendo 0,6% de Tween 80 (TW 0,6%).

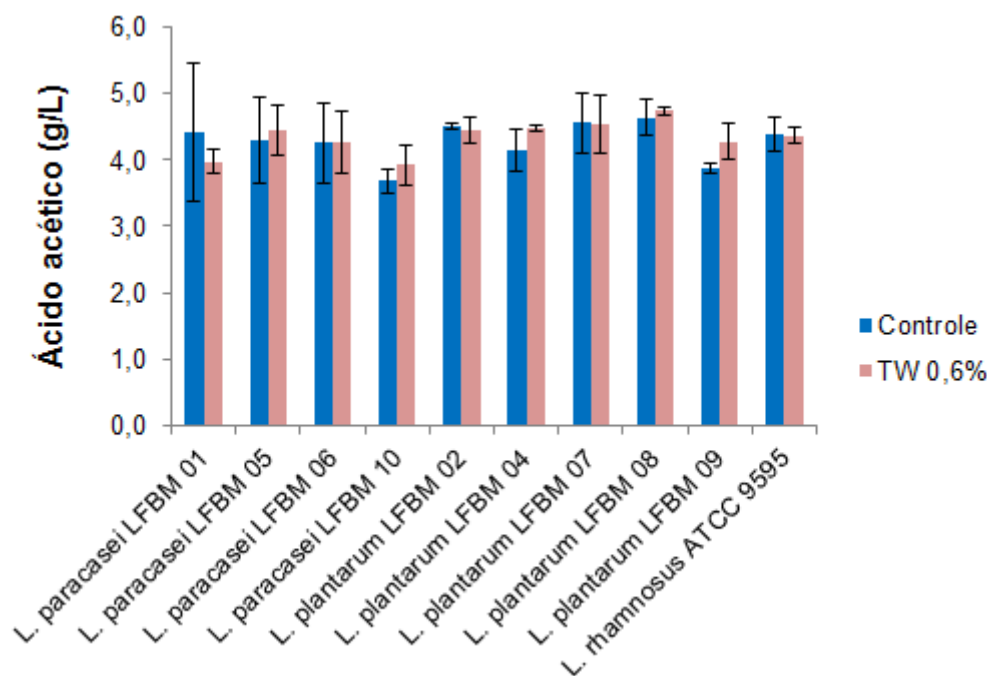


Figura 28 - Produção de etanol por diferentes linhagens de lactobacilos após 48 h de cultivo em MRS contendo 0,6% de Tween 80 (TW 0,6%).

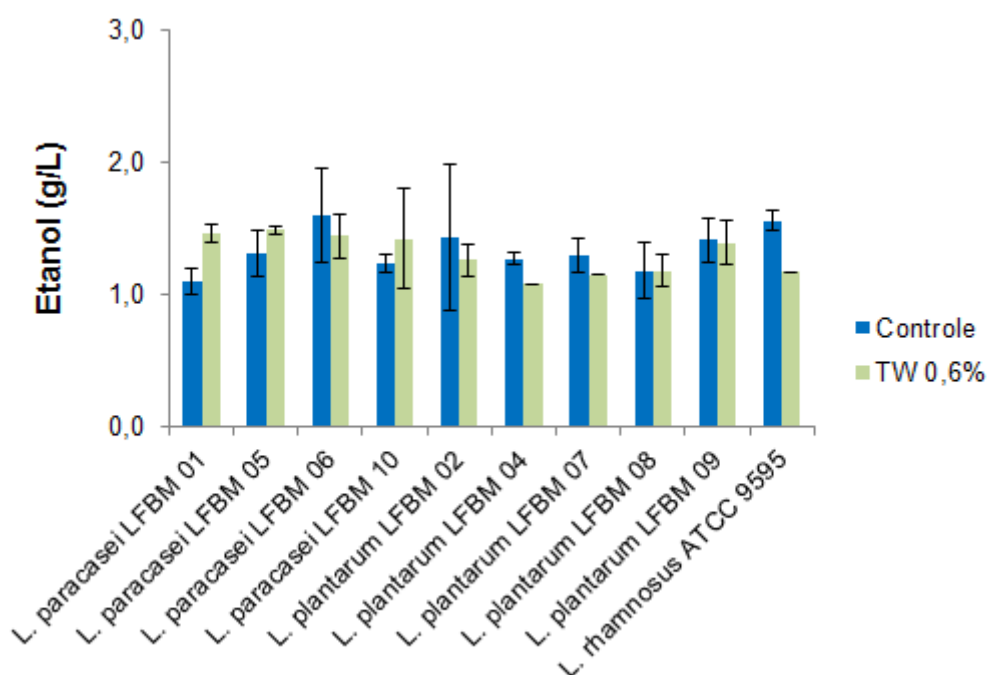
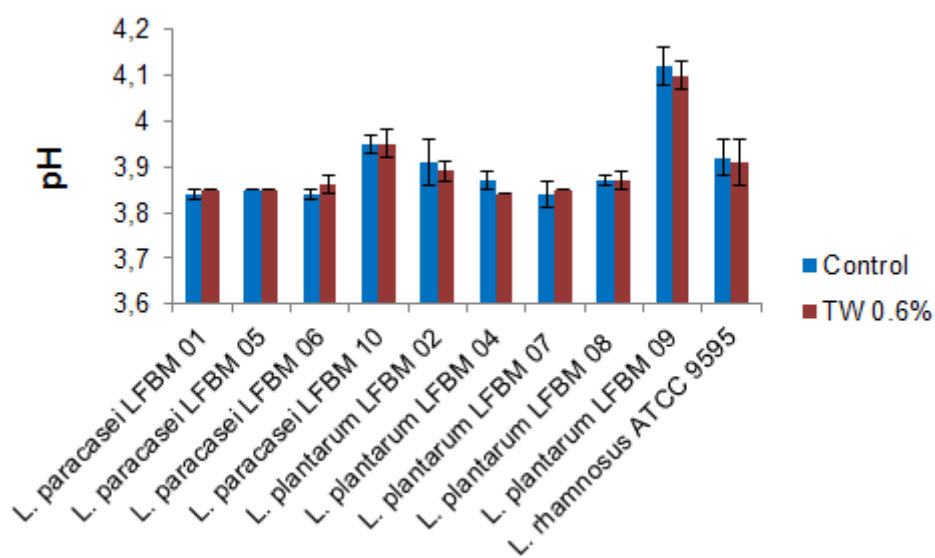


Figura 29 - Valores de pH dos caldos fermentados de diferentes linhagens de lactobacilos após 48 h de cultivo em MRS contendo 0,6% de Tween 80 (TW 0,6%).



Broadbent et al. (2014) estudaram a influência da suplementação de Tween 80, em menores concentrações que a nossa (0,02 e 0,2 %) e diferentes valores de pH (4,5; 4,0; 3,8) na produção dos ácidos láctico e acético por *L. casei* ATCC 334. Os autores também concluíram que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos rendimentos dos dois ácidos por *L. casei* após fermentação em pH 4,0 e 4,5 nas diferentes concentrações de Tween 80. Por outro lado, a adição de 0,2 % desse surfactante aumentou significativamente o rendimento de ácido láctico pelos lactobacilos em pH 3,8. Os pesquisadores atribuíram esse aumento à influência do Tween 80 na composição e consequente proteção da membrana celular contra o estresse ácido do meio. Porém esse aumento na produção não foi observado em nossos resultados, mesmo utilizando uma concentração maior de Tween 80.

Nossos resultados corroboram aos de Endo et al. (2006) que investigaram a produção de ácido láctico por *L. gasseri* LA158 com outros ácidos octadecanoicos substituindo o Tween 80 (ácido oleico, ácido elaídico e ácido cis-vacênico) durante 24 h a 37°C com a finalidade de estudar o efeito desses ácidos na fermentação dos lactobacilos. Os autores verificaram que não houve influência desses ácidos octadecanoicos na produção de ácido láctico. Embora, eles tenham observado que os ácidos octadecanoicos foram incorporados nos lipídios presentes na membrana citoplasmática. A concentração de ácido láctico detectada no meio de cultura variou entre 9,6 e 10,0 g/L, resultado muito inferior ao encontrado em nosso estudo, cujos valores ficaram entre 18,59 e 23,32 g/L.

Zalán et al. (2010) também estudaram a produção de ácidos orgânicos por dez linhagens de lactobacilos em três diferentes meios de cultura, incluindo o caldo MRS. Assim como em nosso estudo, eles relataram que ácido láctico e ácido acético (nesta ordem) foram os principais ácidos orgânicos produzidos no caldo MRS. Entretanto, eles encontraram uma concentração de ácido láctico superior a que encontramos, os valores ficaram entre 36,03 e 76,65 g/L. Em contrapartida, os valores de ácido acético (1,5 – 9 g/L) foram semelhantes aos encontrados no presente estudo.

Segundo Panesar et al. (2010), essas variações na produção de ácido láctico entre diversas pesquisas, ocorre devido às diferentes condições de cultivo, do tipo de meio de cultura e da natureza de cada linhagem utilizada. Os referidos autores estudaram a produção de ácido láctico por *L. casei* cultivado em meio à base de soro de leite em pó, com 4% lactose como fonte de carboidrato sob diferentes parâmetros (tempo de incubação, pH, tamanho do inóculo, temperatura). Eles concluíram que a produção

máxima de ácido láctico ocorreu após 36 h de incubação e foi de 33,73 g/L, valor baixo se considerarmos que os autores utilizaram o dobro de carboidrato que utilizamos em nosso estudo.

Diversos autores relatam o período de incubação de 48 h como o ideal a ser utilizado para produção de ácido láctico por lactobacilos (CHIARNI et al., 1992; GANDHI et al., 2000; KUMAR et al., 2001). Esse período corresponde a fase estacionária do crescimento, sendo o ácido láctico um produto final do metabolismo microbiano, é esperado que nessa fase ocorra uma maior concentração desse ácido (KOSTOV et al., 2011).

Lima et al. (2010) elaboraram um meio de cultura para lactobacilos contendo 55 g/L de lactose e obtiveram um rendimento de ácido láctico equivalente a 18,68 g/L. Esse valor foi semelhante ao que encontramos em nosso estudo. Porém, os autores também utilizaram o dobro da concentração de carboidrato que utilizamos. Com o objetivo de otimizar a produção de ácido láctico, os autores modificaram parâmetros como temperatura, pH e concentração de lactose (59,64 g/L) e verificaram que a concentração de ácido aumentou para 52,37 g/L. Esses resultados confirmam o que Panesar et al. (2010) afirmou sobre a relação entre a influência das condições de cultivo e a produção de ácido láctico.

Nossos resultados foram equivalentes aos de Kostov et al. (2011). Esses pesquisadores estudaram a influência da glicose e lactose separadamente na produção de ácido láctico por *L. casei* NBIMCC 1013. O meio utilizado foi o caldo MRS, contendo 20 g/L de glicose ou lactose. Eles observaram que a produção máxima ocorreu após 48 h de incubação e o melhor carboidrato foi a glicose. Após as 48 h de incubação, a produção de ácido láctico foi equivalente aos nossos resultados (19,81 g/L). Segundo os autores os outros componentes do meio MRS que influenciaram na produção de ácido láctico foram: extrato de carne e extrato de levedura.

Slavica et al. (2015) também estudaram a produção de ácidos orgânicos por lactobacilos (*L. coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004) a partir do caldo MRS. Foi constatado que os principais ácidos produzidos foram os mesmos encontrados em nosso trabalho: ácido láctico e ácido acético. No entanto, os valores encontrados foram bem inferiores aos nossos: 13,07 g/L e 2,02 g/L, respectivamente. Também foram detectados etanol, ácido fórmico e CO₂.

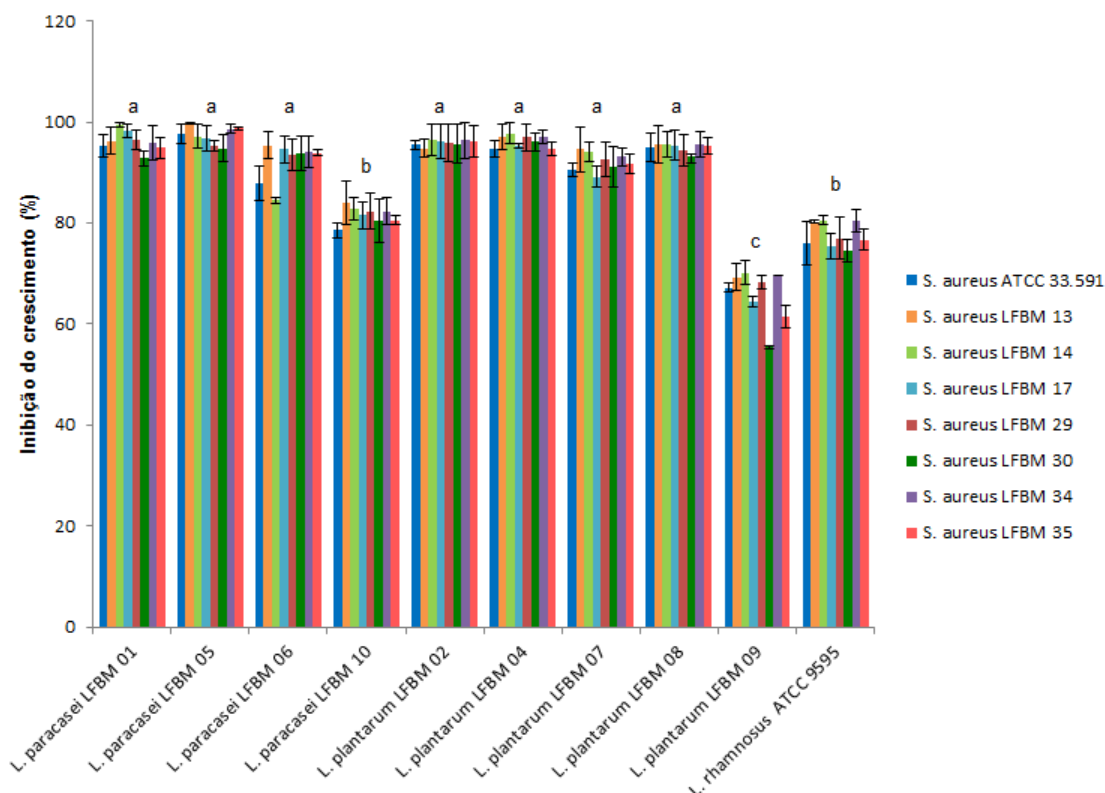
Costa et al. (2008) estudou a produção de ácido láctico, ácido acético e etanol por 17 linhagens de lactobacilos isolados de fermentações alcoólicas industriais. De todas essas cepas, apenas nove produziram os três metabólitos. Os valores variaram de acordo com cada cepa e o metabólito produzido: ácido láctico (5,32 – 10,8 g/L), ácido acético (0,1 – 1,68 g/L) e etanol (0,00 – 1,31 g/L). Esses valores menores que os encontrados em nossa pesquisa podem ser justificados pela menor quantidade de glicose utilizada (10 g/L). Segundo os autores as variações entre as cepas ocorreu em decorrência dos diferentes padrões metabólicos de cada uma delas.

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO CALDO FERMENTADO DE LACTOBACILOS SOBRE ESPÉCIES MULTIRRESISTENTES

Os resultados da atividade antimicrobiana do caldo fermentado de lactobacilos após 48 h de cultivo em MRS contendo 0,6% de Tween 80 frente espécies multirresistentes de *S. aureus* e *K. pneumoniae* estão apresentados nas figuras 30 e 31.

Para as cepas de *S. aureus*, a maior ($97,5\% \pm 1,3$) e a menor ($65,7\% \pm 5,0$) atividade inibitória foram promovidas por *L. paracasei* LFBM 05 e *L. plantarum* LFBM 09, respectivamente, quando comparadas com as outras linhagens de lactobacilos ($p < 0,05$) (Figura 30). *L. plantarum* LFBM 09 também apresentou a menor produção de ácido láctico e o maior valor de pH. Esses resultados demonstram uma forte influência do ácido láctico na atividade antimicrobiana sobre *S. aureus*.

Figura 30 - Atividade antimicrobiana do caldo fermentado de lactobacilos após 48 h de cultivo em MRS contendo 0,6% de Tween 80 frente diferentes linhagens de MRSA e MSSA.

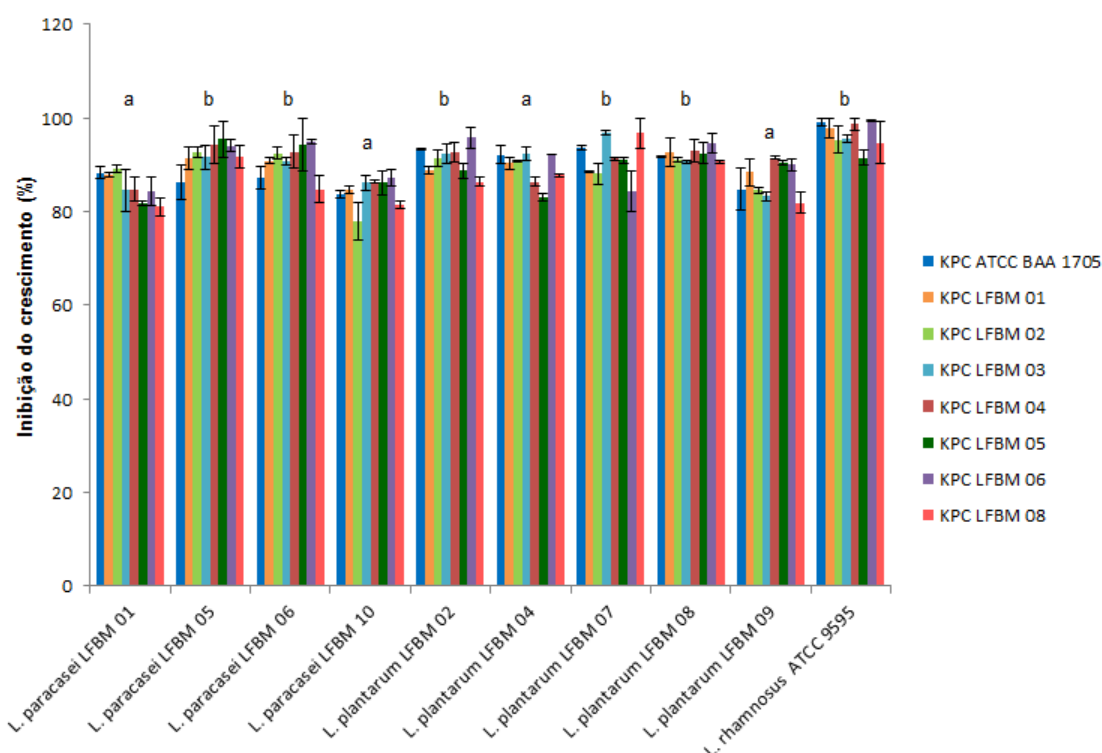


O valor percentual da inibição do crescimento seguido por diferentes letras diferem significativamente ($p < 0,05$).

Em relação às linhagens de *K. pneumoniae*, *L. rhamnosus* ATCC 9595 apresentou a melhor atividade inibitória ($96,3 \% \pm 2,7$) e *L. paracasei* LFBM 10, *L. paracasei* LFBM 01 e *L. plantarum* LFBM 09 apresentaram as menores atividades: $84,1 \pm 3,1$; $85,2 \pm 3,0$; e $86,8 \pm 3,6$, respectivamente, quando comparadas com as outras linhagens de lactobacilos ($p < 0,05$) (Figura 31).

Quando comparamos as atividades dos caldos fermentados frente às duas espécies de patógenos testados, verificamos que não houve diferença significativa entre as atividades inibitórias ($p < 0,05$).

Figura 31 - Atividade antimicrobiana do caldo fermentado de lactobacilos após 48 h de cultivo em MRS contendo 0,6% de Tween 80 frente diferentes linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase.



O valor percentual da inibição do crescimento seguido por diferentes letras diferem significativamente ($p < 0,05$).

Bian et al. (2016) estudaram a atividade inibitória do caldo fermentado de *L. helveticus* e também encontraram forte atividade antimicrobiana frente bactérias Gram positivas (*S. aureus*, *Listeria monocytogenes*) e Gram negativas (*Salmonella enterica* sorovar Typhi, *Escherichia coli* O157:H7). Os autores reportaram que a atividade antimicrobiana primária foi devido à produção de ácidos orgânicos, especialmente láctico e acético.

Nossos resultados também estão de acordo com os de Tejero-Sariñena et al. (2012) que relataram a produção de ácidos (láctico e acético) por *Lactobacillus spp.* e a consequente redução de pH, como um dos principais mecanismos inibitórios contra bactérias patogênicas.

Amin et al. (2017) comprovaram uma significativa atividade antimicrobiana de 59 linhagens de lactobacilos isolados da vagina frente a *Clostridium perfringes*, utilizando *E-test* modificado como metodologia. Dec et al. (2016) também comprovaram a atividade inibitória de diferentes espécies de lactobacilos frente *C.*

perfringes, além de *Salmonella enterica* e *E. coli*. Os autores deste estudo relataram que a redução do pH promovida pela produção de ácido lático pode ser o principal mecanismo envolvido na inibição do crescimento dos patógenos.

Leite et al. (2015) estudaram a atividade antimicrobiana de *L. paracasei* frente a *S. aureus* ATCC 25.923 através do teste de spot e não encontrou inibição do crescimento para este micro-organismo. Porém em nossos estudos, *L. paracasei* LFBM 05 demonstrou a melhor atividade inibitória para *S. aureus*, quando comparado aos demais lactobacilos, inclusive para *S. aureus* ATCC 25.923. Contudo os autores obtiveram uma boa atividade inibitória das linhagens de *L. paracasei* frente *E. coli*, *S. enteria* e *L. monocytogenes*.

Pesquisas realizadas anteriormente confirmam a atividade inibitória de diversas espécies de lactobacilos (*L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus* e *L. fermentum*) frente cepas de MRSA (AROKIYAMARY; SIVAKUMAR, 2011; MAXTON et al., 2013; AL-MADBOLY; ABDULLAH, 2015).

Diferentes estudos também relatam a forte atividade inibitória de *L. plantarum* contra diversas espécies de patógenos alimentares (*Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* sorovar Typhi, *E. coli*), além de *Pseudomonas aeruginosa* (ABUMOURAD et al., 2013; AL-MADBOLY; ABDULLAH, 2015).

A atividade antimicrobiana do caldo fermentado de lactobacilos também foi evidenciada por estudos realizados com *P. aeruginosa* multirresistentes, através do teste de spot (JAMALIFAR et al., 2011).

Os ácidos lático e acético na forma não dissociada ao entrarem na célula do patógeno se dissociam liberando prótons no seu interior. O aumento intracelular desses prótons induz a acidificação citoplasmática, prejudicando a atividade de enzimas sensíveis à acidez, o que gera danos para proteínas, DNA e consequente inibição de processos fornecedores de energia e a síntese de macromoléculas. (GOBETTI et al, 2005; LEBEER et al, 2008). Esse pode ter sido o mecanismo que gerou a atividade antimicrobiana dos lactobacilos em nosso estudo.

5.6 CRESCIMENTO DE LACTOBACILOS EM MRS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO LINOLEICO

Objetivando observar a influência da concentração do ácido linoleico sobre o crescimento de lactobacilos, amostras contendo diferentes concentrações desse ácido graxo em caldo MRS foram inoculadas com diferentes linhagens de *Lactobacillus* por 72 horas de incubação. Os respectivos perfis de crescimento foram analisados através de uma curva de crescimento construída a partir de alíquotas coletadas em diferentes intervalos de tempo (0, 6, 9, 12, 24, 48 e 72 horas). Os resultados desta avaliação estão representados nas figuras 32, 33 e 34.

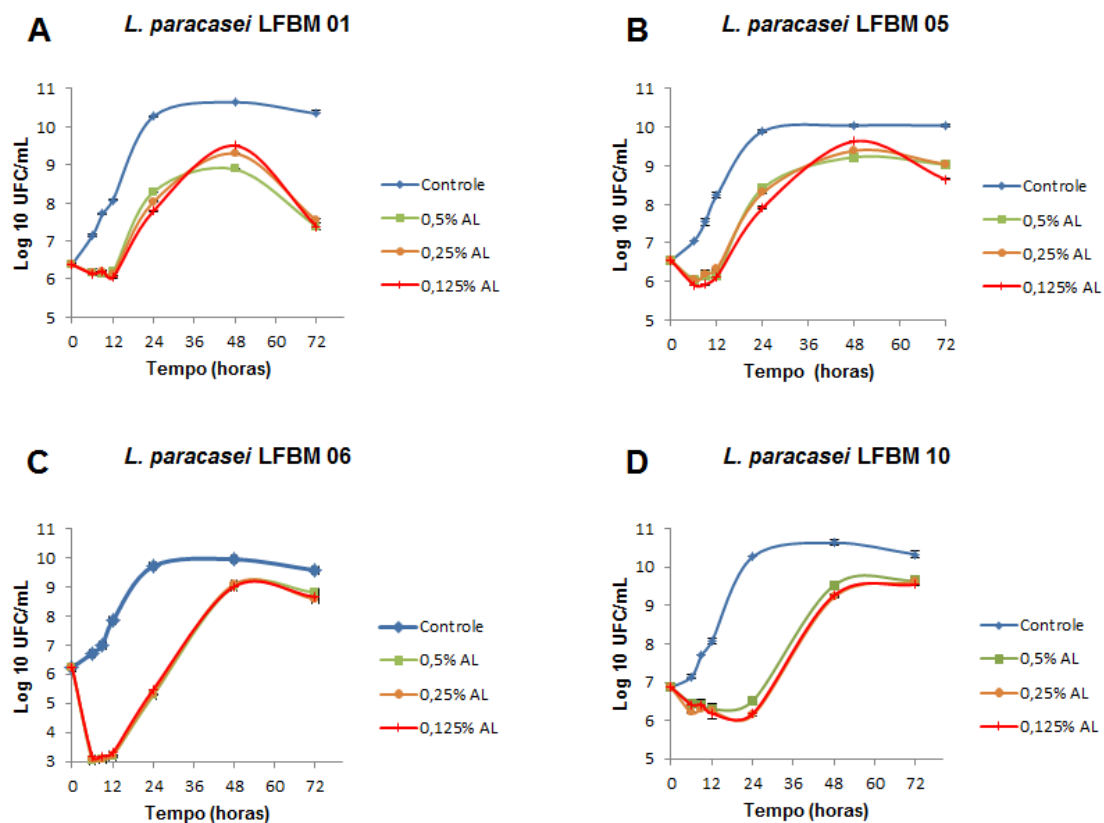
A apresentação gráfica do crescimento dos lactobacilos apresentaram curvas com exibição das fases de adaptação (fase lag), crescimento (fase log) e estacionária. A duração de cada uma destas fases variou de acordo com a espécie e a presença do ácido linoleico nas diferentes concentrações. O tempo de adaptação dos lactobacilos ao meio contendo ácido linoleico variou entre 6 e 12 horas. As linhagens que tiveram uma fase lag prolongada e que apresentaram maior sensibilidade ao ácido linoleico, independente da concentração do mesmo, foram todas *L. paracasei* (LFBM 01, LFBM 05, LFBM 06, LFBM 10), nas demais linhagens esta fase foi de apenas 6 horas.

L. paracasei LFBM 06 foi a linhagem mais sensível à presença do ácido linoleico, como ilustra a figura 1C. Sua fase de adaptação durou 12 horas e exibiu uma queda no crescimento de $3 \log_{10}$ UFC/mL, quando comparado a população inicial de 6,24 UFC/mL. O crescimento máximo das culturas de *L. paracasei* em contato com o ácido linoleico ocorreu após 48 horas e a média deste crescimento foi $9,25 \pm 0,21$.

Diferente do que foi observado com as espécies de *L. paracasei*, não foi visualizada diferença significativa ($p < 0,05$) nas primeiras 24 horas no crescimento de todas as espécies de *L. plantarum* LFBM 02, LFBM 04, LFBM 07, LFBM 08 e LFBM 09 nas diferentes concentrações de ácido linoleico.

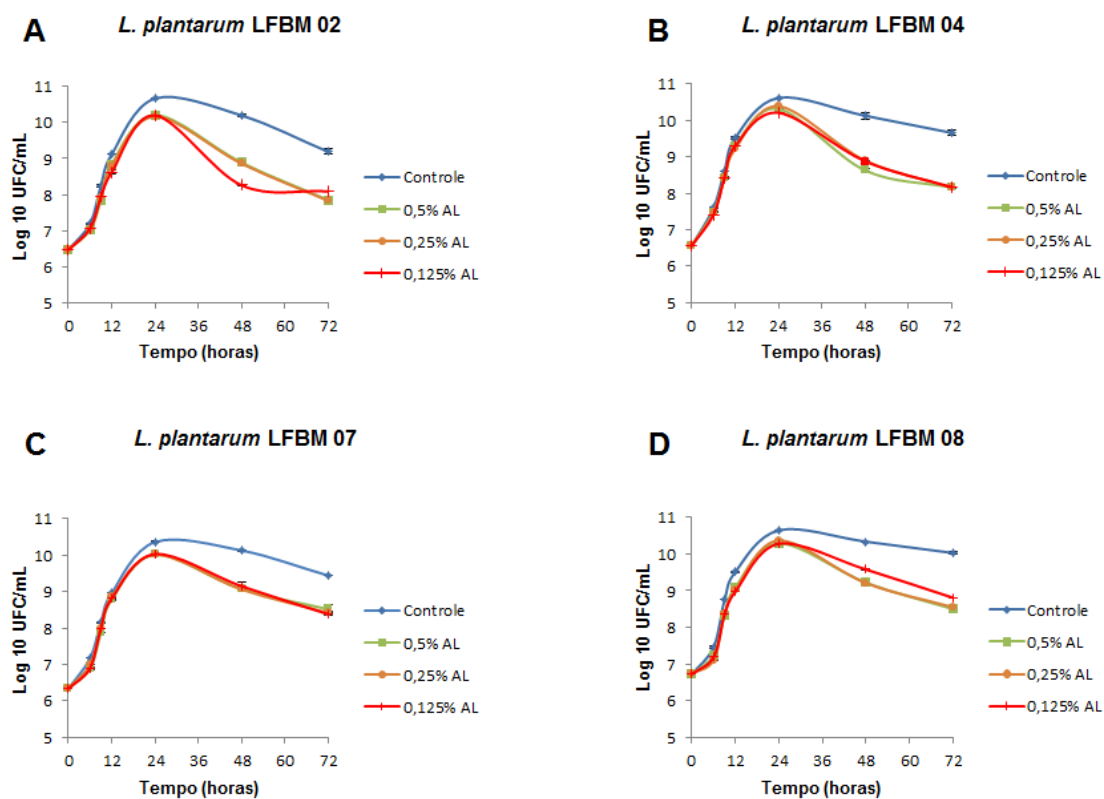
A taxa de crescimento máximo foi em média de $10,20 \pm 0,12$ para os cultivos em MRS com ácido linoleico.

Figura 32 - Crescimento de linhagens de *L. paracasei* em meio MRS adicionado de diferentes concentrações de ácido linoleico (0,5 % AL, 0,25% AL e 0,125% AL).



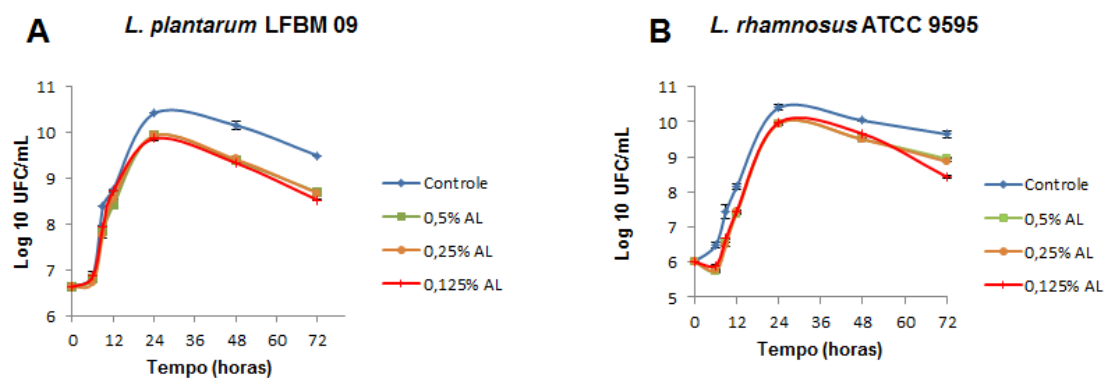
A: *L. paracasei* LFBM 01, **B:** *L. paracasei* LFBM 05, **C:** *L. paracasei* LFBM 06; **D:** *L. paracasei* LFBM 10. Controle: meio MRS; AL: MRS + Ácido Linoleico.

Figura 33 - Crescimento de linhagens de *L. plantarum* em meio MRS adicionado de diferentes concentrações de ácido linoleico (0,5 % AL, 0,25% AL e 0,125% AL).



A: *L. plantarum* LFBM 02, **B:** *L. plantarum* LFBM 04, **C:** *L. plantarum* LFBM 07; **D:** *L. plantarum* LFBM 08. Controle: meio MRS; AL: MRS + Ácido Linoleico.

Figura 34 - Crescimento de diferentes espécies de lactobacilos em meio MRS adicionado de diferentes concentrações de ácido linoleico (0,5 % AL, 0,25% AL e 0,125% AL).



A: *L. plantarum* LFBM 09, **B:** *L. rhamnosus* ATCC 9595. Controle: meio MRS; AL: MRS + Ácido Linoleico.

L. rhamnosus ATCC 9595 não demonstrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras contendo diferentes concentrações de ácido linoleico. Seu crescimento máximo ocorreu após 24 horas de incubação e foi da ordem de $9,96 \pm 0,01$ UFC/mL.

Ácido linoleico apresentou uma atividade inibitória sobre o crescimento das espécies de *L. paracasei* e essa atividade tem sido relatada por vários autores que estudaram bactérias ácido-láticas (BOYAVAL et al., 1995; JIANG et al., 1998; COAKLEY et al., 2003). Em concordância com esses autores, foi demonstrado que o referido ácido graxo inibiu o crescimento das diferentes linhagens de *L. paracasei*, quando comparados aos controles que não o possuíam.

Os resultados deste trabalho também estão de acordo com os encontrados por Kankaanpää et al. (2001) que relataram inibição de *L. casei* Shirota e *L. bulgaricus*, entretanto também não evidenciaram esta inibição em cepas de *L. rhamnosus* GG. Os autores utilizaram concentrações bem inferiores as nossas (de 5 a 40 μ g), demonstrando que a inibição não ocorre apenas em altas concentrações.

Segundo Nieman (1954), essa inibição acontece porque os ácidos graxos alteram na membrana celular das bactérias ácido-láticas, promovendo o bloqueio da entrada de nutrientes essenciais ou liberação de componentes vitais para a célula bacteriana. Entretanto, Kankaanpää et al. (2001) revelaram que esses ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) não foram letais na concentração de 40 μ g, porém comprometeram o funcionamento do ciclo celular normal das células bacterianas.

O preciso mecanismo dessa atividade antibacteriana dos ácidos graxos insaturados ainda não está totalmente elucidado. Estudos realizados por Zheng et al. (2005), demonstraram que o ácido linoleico inibe a enzima FabI enoil-(proteína transportadora de acila) redutase, responsável por catalisar a etapa de elongação da síntese de ácidos graxos na membrana citoplasmática. Esses resultados foram observados em bactérias Gram negativas e positivas como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

Jenkins & Courtney (2003) avaliaram a atividade antibacteriana de diferentes concentrações de ácido linoleico (250-1000 μ g/mL) suplementadas em meio MRS sobre cinco cepas de lactobacilos (duas linhagens de *L. reuteri*, *L. zeae*, *L. acidophilus* e *L. helveticus*) após 10 horas de incubação. Eles observaram que a inibição dos lactobacilos foi dose-dependente, e que variou de acordo com a espécie. Os autores obtiveram diferenças significativas entre as duas linhagens de *L. reuteri*. Esta afirmação vai de encontro aos resultados obtidos neste estudo, pois as linhagens da mesma espécie

apresentaram resultados muito semelhantes e a inibição do crescimento pelos lactobacilos não foi dose-dependente. Entretanto, também foi encontrada variação dos resultados em espécies diferentes.

Van Nieuwenhover et al. (2007) utilizaram diferentes concentrações de ácido linoleico (50-100 µg/mL) incorporados no meio MRS e estudaram a influência deste sobre diferentes espécies de bactérias ácido lácticas (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus spp.*) durante 48 horas de incubação. Eles observaram que todos os micro-organismos foram capazes de crescer na concentração máxima de ácido linoleico utilizada. Este resultado mais uma vez corrobora com os resultados da nossa pesquisa.

Estudos de cinética microbiana realizados também com diferentes concentrações do referido ácido graxo (0,1-1 mg/mL) com *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* e *Bifidobacterium longum* durante 48 horas, mostrou que todas foram capazes de crescer na presença do ácido linoléico, não havendo diferença significativa ($p < 0,05$) entre *L. casei*, *L. paracasei* e *L. acidophilus*. *B. longum* foi a cepa mais sensível em relação a todas testadas. Ao contrário do que observamos em nossa cinética, este estudo não apresentou uma fase de adaptação observada no estudo das linhagens de *L. paracasei* (XU et al., 2008).

O efeito antibacteriano do ácido linoleico presente no óleo de girassol (1-1,2 mg/mL) foi observado em cinco das seis linhagens de *L. plantarum* em estudo realizado por Li et al. (2011). Estes resultados são divergentes aos observados nos nossos experimentos, onde as cepas de *L. plantarum* foram as mais tolerantes ao ácido linoleico em relação a todas as cepas estudadas. Em contrapartida, nossos resultados corroboram aos de Khosravi et al. (2015) que trabalharam com nove espécies diferentes de lactobacilos e relataram que apenas *L. plantarum* foi tolerante à concentração de ácido linoleico (0,3%) utilizada no meio MRS. Os autores atribuíram essa alta tolerância ao mecanismo de detoxificação realizado por essa espécie.

A detoxificação é realizada através da biohidrogenação, que é transformação dos ácidos graxos insaturados em saturados com a finalidade de inibir a atividade antimicrobiana das moléculas de ácidos graxos (MAIA et al., 2010).

Uma das explicações para justificar a maior toxicidade dos ácidos graxos insaturados em lactobacilos em relação aos saturados, é que a presença de duplas ligações presentes nos primeiros, pode mudar a conformação da molécula e, desta forma, de promover o rompimento dos lipídios da bicamada da membrana plasmática

(KEWELOH; HEIPIEPER, 1996). Entretanto, ainda não está claro se a toxicidade é necessariamente um efeito membranar (MAIA et al., 2010).

5.7 PRODUÇÃO DE CLA

Visto que não houve diferença significativa entre o crescimento dos lactobacilos nas diferentes concentrações de ácido linoleico, foram selecionadas as amostras contendo 0,5% de ácido linoleico para verificação da produção de CLA.

Os cromatogramas dos padrões ácido linoleico, cis-9, trans-11-CLA e trans-10, cis-12-CLA demonstraram que os tempos de retenção encontrados foram 20,58 min.; 21,72 min. e 21,88 min., respectivamente (Figuras 35, 36 e 37).

Figura 35 - Cromatograma do padrão Ácido Linoleico (AL)

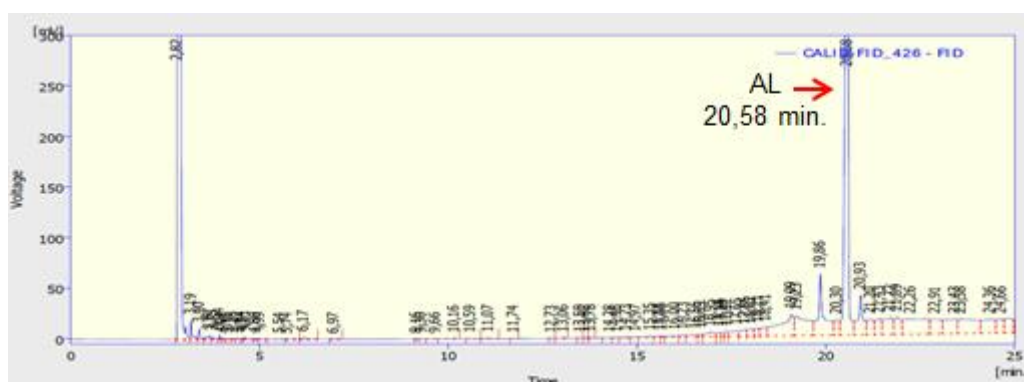


Figura 36 - Cromatograma do padrão cis-9, trans-11-CLA

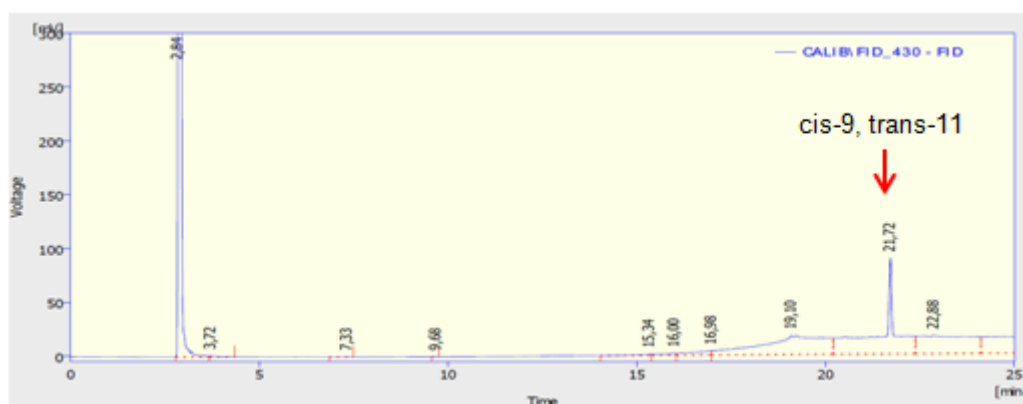
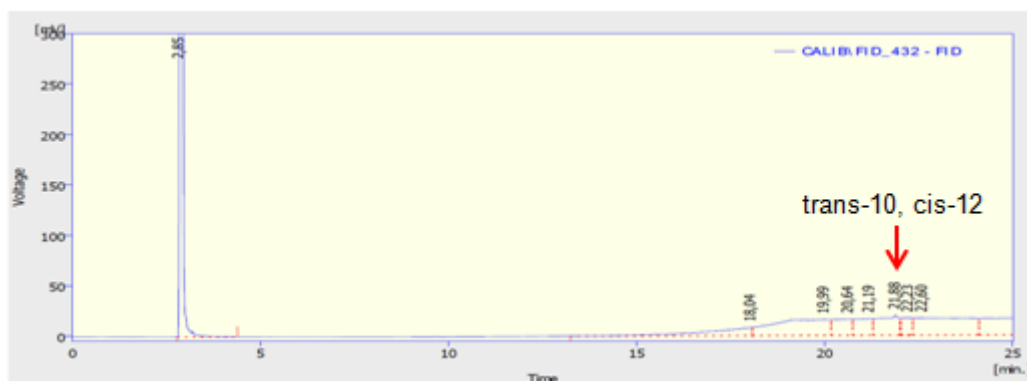


Figura 37 - Cromatograma do padrão trans-10, cis-12-CLA



A capacidade de todas as linhagens de lactobacilos, incluindo *L. paracasei* (LFBM 01, LFBM 05, LFBM 06, LFBM 10) e *L. plantarum* (LFBM 02, LFBM 04, LFBM 07, LFBM 08 e LFBM 09) em produzir CLA foi analisada. Entretanto, das dez cepas estudadas, apenas duas produziram picos visíveis, porém não quantificáveis de CLA: *L. plantarum* LFBM 07 e *L. plantarum* LFBM 09 (Figura 38 e 39).

Figura 38 - Cromatograma de CLA para *L. plantarum* LFBM 07 em MRS com 0,5% de ácido linoleico.

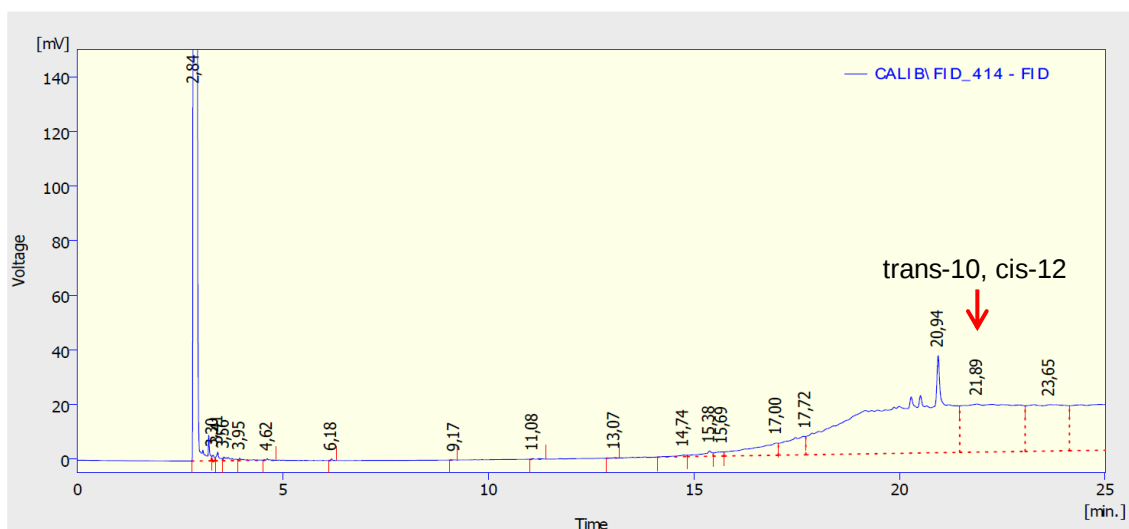
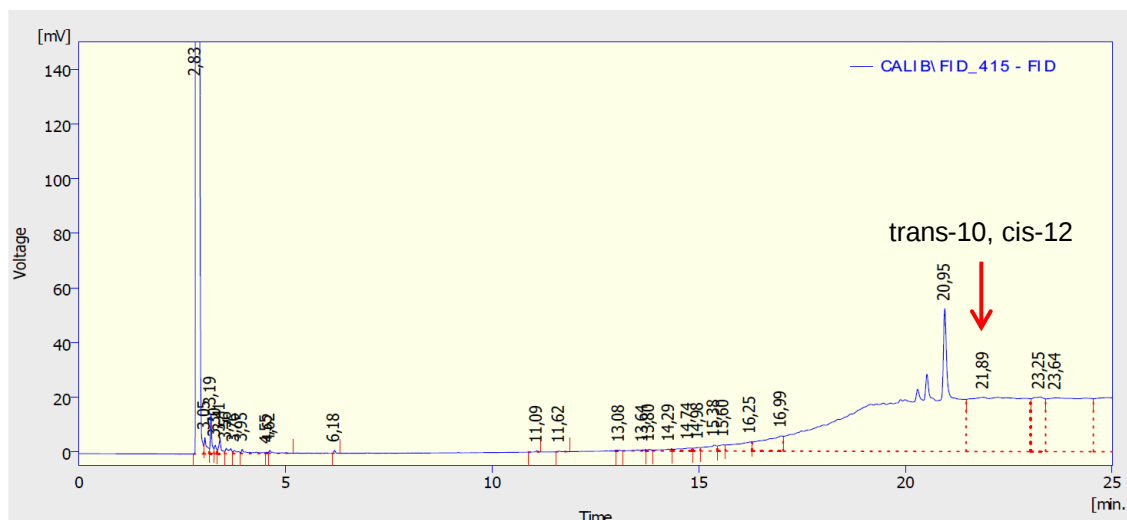


Figura 39 - Cromatograma de CLA para *L. plantarum* LFBM 09 em MRS com 0,5% de ácido linoleico.



Quando analisamos as amostras de *L. plantarum* LFBM 07 e *L. plantarum* LFBM 09 nas concentrações de 0,05%, verificamos que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as duas linhagens.

Em relação a *L. plantarum* LFBM 07, não houve diferença significativa para a produção total de CLA, porém o maior valor foi obtido após 24h de incubação foi de (73,62 $\mu\text{g/mL}$) e o isômero com maior produção foi trans-10, cis-12-CLA (56,90 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 2).

L. plantarum LFBM 09 foi a linhagem que mais produziu CLA (83,62 $\mu\text{g/mL}$). Essa produção foi máxima após 48h, não ocorrendo diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dois isômeros: cis-9, trans-11-CLA (41,05 $\mu\text{g/mL}$) e trans-10, cis-12-CLA (42,57 $\mu\text{g/mL}$).

Tabela 2 - Produção total e individual dos isômeros CLA por *L. plantarum* LFBM 07 e LFBM 09 em diferentes tempos de incubação em caldo MRS contendo 0,05% de ácido linoleico

Amostras	Tempo de incubação (h)	CLA		
		cis-9-tans-11 ($\mu\text{g/mL}$)	trans-10-cis12 ($\mu\text{g/mL}$)	Total ($\mu\text{g/mL}$)
<i>L. plantarum</i> LFBM07	24	16,72	56,90	73,62
<i>L. plantarum</i> LFBM07	48	33,23	37,79	71,02
<i>L. plantarum</i> LFBM09	24	29,53	41,70	71,23
<i>L. plantarum</i> LFBM09	48	41,05	42,57	83,62

Devido a essas linhagens terem apresentado picos dos isômeros CLA na concentração de 0,5%, elas foram escolhidas para serem inoculadas em meio MRS com uma menor concentração de ácido linoleico (0,05%), visto que a alta concentração desse ácido graxo pode ter um efeito inibitório sobre a produção de CLA.

Embora o ácido linoleico atue como substrato na biossíntese de CLA, ele também inibe o crescimento bacteriano e consequentemente a produção deste metabólito. A tolerância dos micro-organismos ao ácido linoleico varia entre as diferentes concentrações e linhagens bacterianas (NIEMAN, 1954; JIANG et al., 1998; KIM et al., 2000; VAN NIEUWENHOVE et al., 2007). E segundo alguns autores, essa produção é maior na fase estacionária (LIN et al., 1999; ALONSO; CUESTA; GILLILAND, 2003; LIU et al., 2011).

Liu et al. (2011) selecionaram 43 linhagens de bactérias ácido-láticas isoladas de pickles, cultivadas em caldo MRS com uma concentração de ácido linoleico cinco vezes menor (0,1 mg/mL) do que a utilizada nesse trabalho (0,5 mg/mL). O valor máximo de CLA produzido relatado pelos autores foi de 26,1 µg/mL por *L. plantarum* lp15. Valor bem inferior comparado ao nosso, cuja média foi $74,87 \pm 5,9$ µg/mL.

Esses resultados divergem de alguns autores os quais afirmam que altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados conduzem à inibição da bio-hidrogenação, particularmente em seu processo final (McKAIN; SHINGFIELD; WALLACE, 2010).

Nossos resultados corroboram com os de Khosravi et al. (2015), que cultivaram *L. plantarum* em caldo MRS contendo 0,06% de ácido linoleico, e obtiveram 95,25 µg/mL como valor máximo de CLA produzido, resultado semelhante ao encontrado em nossa pesquisa.

Yang et al. (2014) avaliaram a capacidade de produção de CLA em diferentes espécies de lactobacilos originados de variadas fontes alimentares. Os autores cultivaram *L. plantarum* ZS2058 em caldo MRS com 0,05% de AL (mesma concentração utilizada em nosso trabalho). Entretanto, valor de CLA obtido por eles foi muito superior ao nosso (221,7 µg/mL).

Nossos resultados confirmam *L. plantarum* como uma espécie promissora para a produção de CLA, como relatado por diversos autores em trabalhos anteriores (KISHINO et al., 2002; ZENG et al., 2009; LIU et al., 2011; YANG et al., 2014; KHOSRAVI et al., 2015).

Entretanto, ainda é incerta a razão pela qual algumas linhagens de lactobacilos, em particular *L. plantarum*, apresentarem uma maior produção de CLA enquanto outras não produzem níveis significativos (YANG et al., 2014). Porém, acredita-se que esse mecanismo está relacionado com o processo de detoxificação que esses micro-organismos realizam para se manterem vivos em ambientes com a presença de ácidos graxos, como o ácido linoleico (MAIA, 2007; 2010).

Contudo, outras bactérias podem transformar ácido linoleico em CLA, principalmente cis-9, trans-11-CLA e trans-10, cis-12-CLA. Essas incluem: *Propionobacterium freudenreichii*, *Streptococcus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *L. delbrueckii*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium bifementans*, *Clostridium sordelli* e *Bacteroides spp.* (VERHULST et al., 1985; LIN et al., 1999; OGAWA et al., 2001; RAINIO et al., 2001; ALONSO; CUESTA; GILLILAND, 2003; LEE et al., 2003; OGAWA et al., 2005).

Identificar e caracterizar os mecanismos pelos quais essas bactérias catalisam a conversão do ácido linoleico em CLA tem sido o assunto de muitas pesquisas (HENNESSY et al., 2016). Essas resultaram na identificação da enzima conhecida como *Propionibacterium acnes* isomerase (PAI) cuja atividade é caracterizada pela bioconversão de ácido linoleico em trans-10, cis-12-CLA (LIAVONCHANKA; FEUSSNER, 2008; LIAVONCHANKA et al., 2009), e um complexo enzimático caracterizado pela bioconversão do ácido linoleico em cis-9, trans-11-CLA e trans-9, trans-11-CLA referida como linoleato isomerase (LAI) (IRMAK et al. 2006; KISHINO et al. 2011a, 2011b).

Posteriormente, em uma análise genômica com *L. plantarum* AKU1009a, Kishino et al. (2013) demonstraram que esse complexo é formado por três enzimas: CLA-HY, CLA-DH e CLA-DC, todas indispensáveis para a produção dos isômeros cis-9, trans-11 e trans-10, cis-12.

Estudos indicaram que a enzima (LAI) está associada à membrana celular e tem uma especificidade para conjugar ácidos graxos insaturados C18 que contêm uma ligação dupla nas posições 9, 12 (KISHINO et al. 2011b; HENNESSY et al., 2016).

Em uma pesquisa sobre a produção de CLA em diferentes linhagens de *B. fibrisolvens*, bactéria Gram positiva muito prevalente em animais ruminantes, Fukuda et al. (2005) verificaram que as cepas mais tolerantes ao ácido linoleico apresentavam uma maior quantidade de linoleato isomerase.

O CLA produzido por bactérias ácido-láticas é mais puro e seguro do que aquele sintetizado por processos químicos. Isso acontece, porque durante o processo de produção, substâncias tóxicas podem ser produzidas. Além desse fato, o custo do CLA sintético é muito elevado (ZHENG; ZHANG; SUN, 2003). Dessa forma, a produção biotecnológica de CLA pode ser uma solução para esse problema e é de grande interesse comercial (CHEN et al., 2012).

6 CONCLUSÕES

- Foram isoladas 4 diferentes linhagens de *L. paracasei* (LFBM 01, LFBM 05, LFBM 06, LFBM 10) e 5 diferentes linhagens de *L. plantarum* (LFBM 02, LFBM 04, LFBM 07, LFBM 08, LFBM 09);
- Não houve influência do Tween 80 sobre o crescimento e produção de metabólitos de todas as espécies de lactobacilos estudadas;
- Ácido lático foi o metabólito mais produzido, seguido de ácido acético e etanol;
- Os valores de pH dos caldos fermentados após 48 h de fermentação variaram entre 3,85 e 4,10;
- Foi evidenciada uma grande atividade antimicrobiana dos caldos fermentados dos lactobacilos frente a *S. aureus* e *K. pneumoniae*.
- *L. paracasei* (LFBM 01, LFBM 05, LFBM 06 e LFBM 10) foram as linhagens que tiveram a fase lag mais prolongada e que apresentaram maior sensibilidade ao ácido linoleico;
- *L. plantarum* (LFBM 02, LFBM 04, LFBM 07, LFBM 08 e LFBM 09) foram as linhagens mais adaptadas à presença do ácido linoleico;
- *L. plantarum* LFBM 07 e 09 foram os maiores produtores de CLA;
- Trans-10, cis-12-CLA foi o principal isômero produzido.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 877-902, 2013.
- ABUMOURAD, M. K. I. et al. Evaluation of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic in aquaculture: emphasis on growth performance and innate immunity. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 9, p. 572–582, 2013.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Esclarecimentos sobre as avaliações de segurança e eficácia do Ácido Linoléico Conjugado – CLA. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/23_190407.htm>. Acesso em 7 out. 2013.
- AL-MADBOLY, L.; ABDULLAH, A. Potent antagonistic activity of Egyptian *Lactobacillus plantarum* against multiresistant and virulent food-associated pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-11, 2015.
- AL-NASERI A. et al. Impact of lactose starvation on the physiology of *Lactobacillus casei* GCRL163 in the presence or absence of tween 80. **Journal of Proteome Research**. v. 12, n. 11, p. 5313-22, 2013.
- ALONSO, L.; CUESTA, E. P.; GILLILAND, E. Production of free conjugated linoleic acid by *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* of human intestinal origin. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1941-1946, 2003.
- ALTERMANN E. et al. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus*. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**. v. 102, n.11, p.3906-12, 2005.
- AMIN, M. ScienceDirect In vitro antimicrobial activities of metabolites from vaginal *Lactobacillus* strains against *Clostridium perfringens* isolated from a woman 's vagina. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 80, n. 1, p. 29-33, 2017.
- ANANTA, E. et al., Processing effects on the nutritional advancement of probiotics and prebiotics. **Microbial Ecology in Health Disease**, v. 16, p. 114-124, 2004.
- AOYAMA, H. et al. Proteínas tirosina fosfatases: propriedades e funções biológicas. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 896-900, 2003.
- ASHRAF, R.; SMITH, S.C. Selective enumeration of dairy based strains of probiotic and lactic acid bacteria. **International Food Research Journal**, v. 22, n. 6, p. 2576-86, 2015.
- AROKIYAMARY, A.; SIVAKUMAR, P. K. Antibacterial activity of Bacterocin producing *Lactobacillus* species isolated from traditional milk products. **Current Botany**, v. 2, p. 5-8, 2011.

BANNI, S. Conjugated linoleic acid metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, v. 13, n. 3; p. 261-266, 2002.

BARRANGO R. et al. Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**. v. 100, n.15, p.8957-62, 2003.

BARRANGO, R. et al. Genus *Lactobacillus*. In: LAHTINEN et al. **Lactic acid bacteria – microbiological and functional aspects**. 4.ed. Boca Raton: CRC Press, 2012. Cap. 5. p. 78, 81.

BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v.70, p.15-29, 2001.

BELURY, M. A. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 505-531, 2002.

BELURY, M. A. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 22, p. 505-531, 2002.

BIAN, X. et al. Effect of *Lactobacillus* strains on intestinal microflora and mucosa immunity in *Escherichia coli* O157 : H7-induced diarrhea in mice. **Current Microbiology**, 2015.

BHATTACHARYA, A. et al. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p. 789-810, 2006.

BOGDANOV, A. R.; DERBENEVA, S. A. Influence of dietotherapy enriched with conjugated linoleic acid on anthropometrical indicators and bodycomposite structure in patients with an overweight. **Voprosy Pitaniia**, v. 82, v. 4, p. 55-62, 2013.

BOYAVAL, P. et al. Effects of free fatty acids on propionic acid bacteria. **Lait**, v.75, p.17-29, 1995

BROADBENT, J. R. et al. Physiological and Transcriptional Response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to Acid Stress. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 9, p. 2445-2458, 2010.

BROADBENT, J. R. et al. Influence of polysorbate 80 and cyclopropane fatty acid synthase activity on lactic acid production by *Lactobacillus casei* ATCC 334 at low pH. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 41, n. 3, p. 545-53, 2014.

BROWN, J.M. et al. Conjugated Linoleic Acid Induces Human Adipocyte Delipidation: autocrine/paracrine regulation of mek/erk signaling by adipocytokines. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 25, p. 26735-26747, 2004.

BUCCIONI, A. et al. Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. **Animal Feed Science and Technology**, v. 174, p. 1-25, 2012.

- BUSTOS, A. Y. et al. Efflux of bile acids in *Lactobacillus reuteri* is mediated by ATP. **Biotechnology Letters**. v. 33, p. 2265–69, 2011.
- CAETANO B. F. et al. Yacon(*Smallanthus sonchifolius*) as a Food Supplement: Health-Promoting Benefits of Fructooligosaccharides. **Nutrients**. Jul 21;8(7). doi:10.3390/nu8070436, 2016.
- CAI Y. et al. *Lactobacillus nasuensis* spp. nov., a lactic acid bacterium isolated and emended description of the genus *Lactobacillus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**., v. 62, p.1140–1144, 2012.
- CHALUPA, W; KUTCHES, A. J. Biohydrogenation of linoleic-l-14c acid by rumen protozoa. **Journal of Animal Science**, v.27, n. 5, p. 1502-1508, 1968.
- CHEN, H. et al. Purification and characterization of a linoleate isomerase from *Lactobacillus plantarum* ZS2058. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 20, p. 4579-87, 2012.
- CHEN C. et al. Metabolism of Fructooligosaccharides in *Lactobacillus plantarum* ST-III via Differential Gene Transcription and Alteration of Cell Membrane Fluidity. **Applied Environmental Microbiology**, v. 81, n. 22, p.:7697-707, 2015.
- CHIARINI, L. et al. Influence of growth supplements on lactic acid production in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 461-464, 1992.
- CHRISTENSEN, J. E. et al. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v.76, n. 1-4, p.217-46, 1999.
- CHO, H. J. et al. Trans-10, cis-12, not cis-9, trans-11, conjugated linoleic acid inhibits G1-S progression in HT-29 human colon cancer cells. **Journal of Nutrition**, v. 136, n. 4, p. 893-898, 2006.
- CHURRUCA, I. et al. Conjugated linoleic acid isomers: differences in metabolism and biological effects. **Biofactors**, v. 35, n. 1, p. 105-111, 2009.
- CLÉMENT, L. et al. Dietary *trans-10,cis-12* conjugated linoleic acid induces hyperinsulinemia and fatty liver in the mouse. **Journal of Lipid Research**, v. 43, p. 1400-1409, 2002.
- COAKLEY, M. et al. Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 1, p. 38-45, 2003.
- COCKBURN D. W., KOROPATKIN N. M. Polysaccharide Degradation by the Intestinal Microbiota and Its Influence on Human Health and Disease. **Journal of Molecular Biology**. v.428, n.16,p. 3230-52, 2016
- COLAKOGLU H.; GURSOY, O. Effect of lactic adjunct cultures on conjugated linoleic acid (CLA) concentration of yogurt drink. **Journal of Food Agriculture and Environmental**. v. 9, n. 1, p. 60–64, 2011.

CORCORAN, B. M. et al. Growth of probiotic lactobacilli in the presence of oleic acid enhances subsequent survival in gastric juice. **Microbiology**, v. 153, p. 291-299, 2007.

COSTA, V. et al. Production of acetic acid, ethanol and optical isomers of lactic acid by *Lactobacillus* strains isolated from industrial ethanol fermentations. **Ciência Agrotecnológica**, v. 32, n. 2, p. 503-9, 2008.

COTTER, P. D., HILL, C. Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 67, n. 3, p. 429-453, 2003.

DALEY, C. A. et al. A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef. **Nutrition Journal**, v. 9, n. 10, p. 1-12, 2010.

DANDONA, P. et al. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends in Immunology**, v. 25, p. 4-7, 2004.

DAS UN. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. **Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 420–439, 2006

DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. **Proteomics**, v. 4, n. 1, p. 106-22, 2004.

DE ANGELIS, M. et al. Functional proteomics within the genus *Lactobacillus*. **Proteomics**. v. 16, n. 6, p.946-62, 2016.

DEC, M. et al. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* strains of chicken origin against bacterial pathogens. **International Microbiology**, p. 57-67, 2016.

DEGNER, S.C. et al. Conjugated Linoleic Acid Attenuates cyclooxygenase-2 transcriptional activity via an anti-AP-1 mechanism in MCF-7 breast cancer cells. **Nutrition and Disease**, v. 136, p. 421-427, 2006.

DE MAN, J. C., ROGOSA, M. & SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 23, p. 130–135, 1960.

DEUTSCHER J. et al. The bacterial phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system: regulation by protein phosphorylation and phosphorylation-dependent protein-protein interactions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 78, n. 2, p. 231-56, 2014.

DOMAGALA J., PLUTA-KUBICA A., PUSTKOWIAK H. Changes in conjugated linoleic acid content in Emmental-type cheese during manufacturing. **Czech Journal of Food Science**. v. 31, n. 5, p. 432–437, 2013.

DRISSI F., RAOULT D., MERHEJ V. Metabolic role of *Lactobacilli* in weight modification in humans and animals. **Microbial Pathogenesis**. S0882-4010(15)30152-2. doi: 10.1016/j.micpath.2016.03.006, 2016.

EFERL, R.; WAGNER, E. F. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. **Nature Reviews. Cancer**, v. 3, n. 11, p. 859-868, 2003.

EFSA. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the safety of “conjugated linoleic acid (CLA)-rich oil” (Clarinol®) as a Novel Food ingredient. **EFSA Journal**, v. 8, n. 5:1601, 2010.

EFSA. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Statement on the safety of the “conjugated linoleic acid (CLA)-rich oils” Clarinol® and Tonalin TG 80 as Novel Food ingredients. **EFSA Journal**, v.10; n. 5:2700, 2012.

EL-GHAISH, S. et al. Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO 3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity. **European Food Research and Technology**. V. 230, p. 635–643, 2010.

ENDO, Y et al. Trans fatty acids promote the growth of some *Lactobacillus* strains. **The Journal of General and Applied Microbiology**. v. 52, n. 1, p. 29-35, 2006.

ERICKSON, K. L.; HUBBARD, N. E. Fatty acids and breast cancer: the role of stem cells. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 82, p. 237-241, 2010.

FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*. **Curr. Issues Intestinal Microbiol.**, v. 8, p. 44-61, 2007.

FONSECA-ALANIZ, M.H. et al. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. **Jornal de Pediatria**, v. 83, p. 192-203, 2009.

FOZO, E. M.; KAJFASZ, J. K.; QUIVEY Jr., R. G. Low pH- induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 238, n. 2, p.291–295, 2004.

FRANCL A.L., HOEFLINGER, J.L., MILLER, M.J. Identification of lactose phosphotransferase systems in *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 required for lactose utilization. **Microbiology**, v. 4, p.944-52, 2012.

FRANKS, P.W. Obesity, inflammatory markers and cardiovascular disease:distinguishing causality from confounding. **Journal of Human Hypertension**, v. 20, p. 837-840, 2006.

FSANZ. Exclusive use of Tonalin CLA as a novel food assessment report. **Food Standards Australia and New Zealand (FSANZ)**, 2011.

FUKUDA, S. et al.A new strain of *Butyrivibrio fibrisolvens* that has high ability to isomerise linoleic acid to conjugated linoleic acid.**The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 51, p.105-113, 2005.

GANDHI, D.N. et al. Effect of agro-based by-products on production of lactic acid in whey permeate medium. **Journal of Food and ScienceTechnology**, v. 37, p. 292-295, 2000.

GÄNZLE, M. G.; VERMEULEN, N., VOGEL, R. F. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. **Food Microbiology**. v. 24, n. 2, p. 128-38, 2007.

GÄNZLE M. G., FOLLADOR R. Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: a review. **Frontiers in Microbiology**. v.3, n. 3, p. 340, 2012

GAULLIER, J.M. et al. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y reduces body fat mass in healthy overweight humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 6, p. 1118-1125, 2004.

GAO, J.; GU, F. ; ABDELLA, N.H. ;RUAN, H.; HE, G. Investigation on culturable microflora in Tibetan kefir grains from different areas of China. **Journal of Food and Science**, v. 77, p. 425-433, 2012.

GARROTE, G. L. ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains, **Journal Dairy Research**, v. 68, p. 639-652, 2001.

GAULLIER, J.M. et al. Supplementation with conjugated linoleic acid for 24 months is well tolerated by and reduces body fat mass in healthy, overweight humans. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 4, p. 778-784, 2005.

GIANCAMILLO, A. et al. Dietary Conjugated Linoleic Acids Decrease Leptin in Porcine Adipose Tissue. **The Journal of Nutrition**, v. 139, p. 1867-1872, 2009.

GIRAFFA, G., CHANISHVILI, N., WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research of Microbiology*. v. 161, n. 6, p. 480-7, 2010.

GOBETTI, M. et al. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. **Trends in Food Science & Technology**. v. 16, n. 1-3, p. 57-69, 2005.

GOH Y. J. et al. Identification of a putative operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus paracasei*. **Applied Environmental Microbiology** v.72, n. 12, p. 7518-30, 2006.

GOH, Y. J., LEE, J. H., HUTKINS, R. W. Functional analysis of the fructooligosaccharide utilization operon in *Lactobacillus paracasei* 1195. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 5716–5724, 2007.

GORISSEN, L. et al. Linoleate isomerase activity occurs in lactic acid bacteria strains and is affected by pH and temperature. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 593-606, 2011.

GULITZ, A.; STADIE, J.; WENNING, M.; EHRMANN, M. A.; VOGEL, R. F. The microbial diversity of water kefir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, p. 284-288, 2011.

GRIINARI, J. M.; BAUMAN, D. E. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza, & G. Nelson (Eds.), **Advances in conjugated linoleic**

acid research, p. 180–200. Champaign, IL: American Oil Chemists Society Press, 1999.

GRIINARI, J.M. et al. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Δ^9 – desaturase. **Nutrient Metabolism**, v. 130, n. 9, p. 2285-2291, 2000.

GUERZONI, M. E.; LANCIOTTI, R.; COCCONCELLI, P. S. Alteration in cellular fatty acid composition as a response to salt, acid, oxidative and thermal stresses in *Lactobacillus helveticus*. **Microbiology**, v.147, n. 8, p.2255–2264, 2001.

GULITZ, A. et al. The microbial diversity of water kefir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, p. 284-288, 2011.

HABE, H. et al. Bacterial production of short-chain organic acids and trehalose from levulinic acid: A potential cellulose-derived building block as a feedstock for microbial production. **Bioresource Technology**, v. 177, p. 381-386, 2015.

HARTEMINK, R., DOMENECH, V. R.; ROMBOUTS, F. M. LAMVAB—a new selective medium for the isolation of Lac- tobacilli from faeces. **Journal of Microbiological Methods**, v. 29, p. 77–84, 1997.

HAYEK, S.A.; IBRAHIM, S. A. Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. **Food and Nutrition Sciences**, v. 4, p. 73–87, 2013.

HE, T.C. et al. PPAR-delta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, **Cell**, v.99, n. 3, p. 335– 345, 1999.

HENNESSY A. A. et al. Sources and Bioactive Properties of Conjugated Dietary Fatty Acids. **Lipids**. v.51, n. 4, p. 377-97, 2016.

HIGUCHI, T., HAYASHI, H., ABE, K. Exchange of Glutamate and g-Aminobutyrate in a *Lactobacillus* Strain. **Journal of Bacteriology**. v. 179, n. 10, p. 3362-64, 1997.

HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, p. 860-867, 2006.

HOUSE, R. L. et al. Conjugated linoleic acid evokes de-lipidation through the regulation of genes controlling lipid metabolism in adipose and liver tissue. **Obesity Reviews**, v 6, p. 247-258, 2005.

HUANG, C. H. et al. Application of the SNaPshot minisequencing assay to species identification in the *Lactobacillus casei* group. **Molecular and Cellular Probes**, v. 25, p. 153-157, 2011.

HUR, S. J. et al. Biological activities of conjugated linoleic acid (CLA) and effects of CLA on animal products. **Livestock Science**, v. 110, p. 221-229, 2007.

ILAVENIL, S. et al. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antifungal activity isolated from animal manure. **The Scientific World Journal**, 2015.

ING, S.W.; BELURY, M.A. Impact of conjugated linoleic acid on bone physiology: proposed mechanism involving inhibition of adipogenesis. **Nutrition Reviews**, v. 69, n. 3, p. 123-131, 2011.

IRMAK S. et al. Biocatalysis of linoleic acid to conjugated linoleic acid. **Lipids**, v. 41, n. 8, p. 771–776, 2006.

JAMALIFAR, H. et al. Antimicrobial activity of different *Lactobacillus* species against multi- drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 21-25, 2011.

JENKINS, T.C. Lipid Metabolism in the Rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 12, p. 3851-3863, 1993.

JENKINS, J. K.; COURTNEY, P. D. *Lactobacillus* growth and membrane composition in the presence of linoleic or conjugated linoleic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 51-57, 2003.

JENKINS, T.C. et al. REVIEW: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 397-412, 2008.

JIANG, J. et al. Occurrence of conjugated cis-9, trans-11-octadecadienoic acid in bovine Milk: effects of feed and dietary regimen. **Journal Dairy Science**, v. 79, p. 438-445, 1996.

JIANG, J. et al. Production of conjugated linoleic acid by dairy starter cultures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n. 1, p. 95-102, 1998.

JOHNSON, T. et al. Cellular fatty acid profiles of *Lactobacillus* and *Lactococcus* strains in relation to the oleic acid content of the cultivation medium. **Applied Environmental Microbiology**, v. 61, p. 4497–4499, 1995.

KALUPAHANA, N. S. et al. Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights. **Advances in Nutrition**, v. 2, p. 304-316, 2011.

KALUPAHANA, N.S. et al. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, p. 26-34, 2012.

KANKAANPÄÄ et al. The influence of polyunsaturated fatty acids on probiotic growth and adhesion. **FEMS Microbiology Letters**, v. 194, p. 149-153, 2001.

KANKAANPÄÄ, P. et al. Effects of polyunsaturated fatty acids in growth medium on lipid composition and on physicochemical surface properties of *Lactobacilli*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p. 129–136, 2004.

KAOUTARI, A. et al. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 11, n. 7, p. 497-504, 2013.

KELLEY, D. S.; ERICKSON, K. L. Modulation of body composition and immune cell functions by conjugated linoleic acid in humans and animal models: benefits vs. risks. **Lipids**, v. 38, n. 4, p. 377-386, 2003.

KELLEY, N. S. et al. Conjugated linoleic acid isomers and cancer. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 2599-2607, 2007.

KENNEDY, A. et al. Antiobesity mechanisms of action of conjugated linoleic acid. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, p. 171-179, 2010.

KEPLER, C. R. et al. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 241, p. 1350-1354, 1966.

KERSHAW, E.E; FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 89, p. 2548–56, 2004.

KESMEN, Z.; KACMAZ, N. Determination of lactic microflora of kefir grains and kefir beverage by using culture-dependent and culture-independent methods, **Journal of Food Science**, v. 76, p. 276-283, 2011.

KEWELOH, H.; HEIPIEPER, H. J. Trans unsaturated fatty acids in bacteria. **Lipids**, v. 31, p.129-137, 1996.

KHANAL, RC.C; DHIMAN, T. R. Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA): A REVIEW. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 3, n. 2, p. 72-81, 2004.

KHOSRAVI, A. et al. Bioconversion enhancement of conjugated linoleic acid by *Lactobacillus plantarum* using the culture media manipulation and numerical optimization. **Journal of Food Science Technology**, v. 52, n. 9, p. 5781-9, 2015.

KIM, Y.J. et al. Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5226-5230, 2000.

KIM, J. H. et al. Conjugated Linoleic Acid: Potential Health Benefits as a Functional Food Ingredient. *Annual Review of Food Science and Technology*. v. 7, p. 221-44, 2016.

KISHINO, S. et al. Conjugated linoleic acid production from linoleic acid by lactic acid bacteria. **Journal of American Oil Chemists' Society**, v. 79, p.159–163, 2002.

aKISHINO, S. et al. Novel multi-component enzyme machinery in lactic acid bacteria catalyzing C=C double bond migration useful for conjugated fatty acid synthesis. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 416, n. 1-2, p. 188-93, 2011.

bKISHINO S. et al. Linoleic acid isomerase in *Lactobacillus plantarum* AKU1009a proved to be a multi-component enzyme system requiring oxidoreduction cofactors. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, n. 2, p. 318–322, 2011.

KISHINO, S. et al. Polyunsaturated fatty acid saturation by gut lactic acid bacteria affecting host lipid composition. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, v. 110, n. 44, p. 17808-13, 2013.

KLAENHAMMER, T. R. et al. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. **FEMS Microbiol.** v.29, n.3, p.393-409, 2005.

KOSTOV, G. et al. Lactic acid production with *Lactobacillus casei ssp . rhamnosus* NBIMCC 1013 : Modeling and optimization of the nutrient medium Lactic acid production with *Lactobacillus casei ssp . rhamnosus* NBIMCC 1013 : Modeling and optimization of the nutrient medium. **Engineering in Life Sciences**, v. 11, n. 5, p. 517-27, 2011.

KUMAR, S. et al. Process optimization for lactic acid production from whey using *Lactobacillus* strains. **Journal of Food Science Technology**, v. 38, p. 59-61, 2001.

KUNJI E. R. et al. The proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**. v. 70, n. 2-4, p.187-221, 1996.

LAMBERT, J. M. et al. Functional analysis of four bile salt hydrolase and penicillinacylase family members in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Applied Environmental Microbiology**.v. 74, p. 4719–26, 2008.

LAMPEN, A. et al. Molecular and cellular effects of cis-9, trans-11-conjugated linoleic acid in enterocytes:effects on proliferation, differentiation, and gene expression. **Biochimica et Biophys Acta**, v. 1735, n. 1, p. 30-40, 2005.

LARSEN, T.M. et al. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y does not prevent weight or body fat regain. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 3, p. 606-612, 2006.

LEBEER, S. et al. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 72, n. 4, p. 728-64, 2008.

LEE H. M., LEE Y. A differential medium for lactic acid-producing bacteria in a mixed culture. **Letters Applied Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 676-81, 2008.

LEE, J. et al. Natural products and body weight control. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 13-19, 2011.

LEE, S. H. Conjugated linoleic acid stimulates an anti-tumorigenic protein NAG-1 in an isomer specific manner. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 5, p. 972-81, 2006

- LEE, S. O. et al. Bioconversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid during fermentation and by washed cells of *Lactobacillus reuteri*. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 12, p. 935-38, 2003.
- LEHNEN, T. E. et al. A review on effects of conjugated linoleic fatty acid (CLA) upon body composition and energetic metabolism. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**. v. 12, n. 36,, 2015.
- LEITE, A. et al. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 6, p. 3622-32, 2015.
- LIIVONCHANKA, A; FEUSSNER, I. Biochemistry of PUFA double bond isomerases producing conjugated linoleic acid. **ChemBioChem**, v. 9, n. 12, p. 1867–1872, 2008.
- LIIVONCHANKA, A. et al. On the mechanism of a polyunsaturated fatty acid double bond isomerase from *Propionibacterium acnes*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 12, p. 8005–8012, 2009.
- LI, J et al. Effect of tween series on growth and *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid production of *Lactobacillus acidophilus* F0221 in the presence of bile salts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 9138-9154, 2011.
- LIN, T.Y. et al. Conjugated linoleic acid concentration as affected by lactic cultures and added linoleic. **Food Chemistry**, v. 67, n. 1, p. 1-5, 1999.
- LIM, Y. et al. Inhibition of colon cancer cell proliferation by the dietary compound conjugated linoleic acid is mediated by the CDK inhibitor p21 CIP1/WAF1. **Journal of Cellular Physiology**, v. 205, n.1, p. 107-13, 2005.
- LIMA, C. et al. The Use of Response Surface Methodology in Optimization of Lactic Acid Production : Focus on Medium Supplementation , Temperature and pH Control. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 175-181, 2010.
- LIN, W.H. et al. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiology**, v. 23, p. 74–81, 2006.
- LIU, M. et al. Comparative genomics of enzymes in flavor-forming pathways from amino acids in lactic acid bacteria. **Applied Environmental Microbiology** v. 74, n. 15, p.4590-600, 2008.
- LIU, M. et al. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. **BMC Genomics**. v. 11, n. 36, 2010.
- LIU, J; SIDELL, N. Anti-estrogenic effect of conjugated linoleic acid through modulation of estrogen receptor phosphorylation. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 94, p. 161-169, 2005.
- LUMENG, C.N. et al. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 175–84, 2007.

- MACOUZET, M. et al. Production of conjugated linoleic acid by probiotic *Lactobacillus acidophilus* La-5. **J. Appl. Microbiol.** v. 106, p. 1886-1891, 2009.
- MAGGIORA, M. et al. An overview of the effect of linoleic and conjugated-linoleic acids on the growth of several human tumor cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 112, n. 6, p. 909-919, 2004.
- MAIA, M.R. et al. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 91, p. 303-314, 2007.
- MAIA, M.R. et al. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 52, 2010.
- MAKAROVA et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 42, p. 15611-15616, 2006.
- MARTIN, C.A. et al. Ácidos graxos poliinsaturados omega-3 e omega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Brazilian Journal of Nutrition**. Campinas, 19(6): 761-770, 2006.
- MAXTON, A. et al. Antibacterial activity of isolated human intestinal microbiota *Lactobacillus* strains against methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 18, p. 1802-08, 2013.
- McCRORE, T. A. et al. Human health effects of conjugated linoleic acid from milk and supplements. **Nutrition Research Reviews**, v. 24, p. 206-227, 2011.
- McKAIN, N.; SHINGFIELD, K. J.; WALLACE, R. J. Metabolism of conjugated linoleic acids and 18 : 1 fatty acids by ruminal bacteria: products and mechanisms. **Microbiology**, v.156, n. 2, p. 579-88, 2010.
- MELE, M. C. et al. Metabolism of c9,t11-conjugated linoleic acid (CLA) in humans. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 89, p. 115-119, 2013.
- MIGLIETTA, A. et al. Conjugated linoleic acid induces apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells through ERK/MAPK signalling and mitochondrial pathway. **Cancer Letters**, v. 234, p. 149-157, 2006.
- MIGUEL, M. G. C. P. et al. Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian states. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 1875-1884, 2011.
- MIRANDA, J. et al. Son los isómeros del ácido conjugado una alternativa a isómeros del ácido linoleico conjugado em la prevención de la obesidad? **Endocrinología y nutrición**, 2013.
Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.endonu.2013.04.016>.
- MITSUOKA, T. **Intestinal Bacteria and Health**. Tokyo, Harcourt Brace Jovanovich Japan, 1978.

MORELLI, L. et al. Lactic acid bacteria: an introduction. In: LAHTINEN et al. **Lactic acid bacteria – microbiological and functional aspects**. 4.ed. Boca Raton: CRC Press, 2012. Cap. 1. p. 23-27.

MULLER, J. A. et al. Modification of the technical properties of *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 by supplementing the growth medium with unsaturated fatty acids. **Applied Environmental Microbiology**, v. 77, n. 19, p. 6889-98, 2011

NEUHAUS, F. C.; BADDILEY, J. A continuum of anionic charge: structures and functions of d-alanyl-teichoic acids in Gram positive bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 67, n. 4, p. 686–723, 2003.

NIEMAN, C. Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. **Bacteriological Reviews.**, v. 18, 147–163, 1954.

NURSE, P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 71–78, 2000.

ODEGAARD, J.I.; CHAWLA, A. Alternative macrophage activation and metabolism. **Annual Review of Pathology**, v. 6, p. 275-297, 2011.

OGAWA J. et al. Production of conjugated fatty acids by lactic acid bacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 100, n. 4, p. 355-64, 2005.

OGAWA, M. et al. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxinproducing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 135–140, 2001.

OLESZCZUK, J. et al. Biological effects of conjugated linoleic acids supplementation. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 15, n. 2, p. 403-408, 2012.

O'SHEA, E. F. et al. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explain probiotics mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. **International Journal of Food. Microbiology**, 2011.

O'SULLIVAN, O. et al. Comparative genomics of lactic acid bacteria reveals a niche-specific gene set. **BMC Microbiology**. v. 9, n. 50, 2009

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Review Immunology**, v. 11, p. 85–97, 2011.

PÁL, K et al. Comparison and evaluation of molecular methods used for identification and discrimination of lactic acid bacteria. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 9, p. 1931-1936, 2012.

PANESAR, P. et al., Production of L (+) Lactic acid using *Lactobacillus casei* from whey. **Brazilian Archives of Biology and Technology**v. 53, p. 219-226, 2010.

PARIZA, M.W. et al. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Prog. Lipid. Res.**, v. 40, p. 283-298, 2001.

PARK, Y; PARIZA, M.W. Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). **Food Research International**, v. 40, p. 311-323, 2007.

PARTANEN, L.; MARTTINEN, ALATOSSAVA T. Fats and Fatty Acids as Growth Factors for *Lactobacillus delbrueckii*. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, p. 500-506, 2001.

PERFIELD, J. W. et al. Effects of dietary supplementation of rumen-protected conjugated linoleic acid in dairy cows during established lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2609-2617, 2002.

PESSIONE, E. Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. Resultados da pesquisa. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. 86, p. 1-15, 2012.

PFEILER, E. A.; KLAENHAMMER, T. R. Role of transporter proteins in bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 75, p. 6013-16, 2009.

PIERRE, A.S. et al. Trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid induced cell death in human colon cancer cells through reactive oxygen species-mediated ER stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1831, p. 759-768, 2013.

POLACHECK, J. W. et al. Biosynthesis of cyclopropane compounds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 241, p. 3362-3364, 1966.

PRADO, M. R. et al. Milk Kefir: Composition, Microbial Cultures, Biological Activities, and Related Products. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1177, 2015.

RAINIO, A. Reduction of linoleic acid inhibition in production of conjugated linoleic acid by *Propionibacterium freudenreichii* sp. *shermanii*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 735-740, 2001.

RICCIARDI, A. et al. Modified chemically defined medium for enhanced respiratory growth of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* groups. **Journal Applied Microbiology**, v. 119, n. 3, p. 776-85, 2015.

RISÉRIUS, U. et al. Supplementation with conjugated linoleic acid causes isomer-dependent oxidative stress and elevated c-reactive protein. **Circulation**, v. 106, p. 1925-1929, 2002.

ROGOSA, M., MITCHEL, J. A.; WISEMAN, R. F. A selective medium for the isolation of oral and faecal *Lactobacilli*. **Journal of Bacteriology**, v. 62, p. 132-133, 1951.

ROZ, A. E. et al. The anti-proliferative and pro-apoptotic effects of the trans9, trans11 conjugated linoleic acid isomer on MCF-7 breast cancer cells are associated with LXR

activation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 88, p. 265-272, 2013.

RUIZ, L.; MARGOLLES, A.; SÁNCHEZ, B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. 396, 2013.

SACCARO et al. Evaluation of different selective media for enumeration of probiotic micro-organisms in combination with yogurt starter cultures in fermented milk. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 10, p. 2239-45, 2012.

SAELY, C.H. et al. Brown versus White Adipose Tissue: a mini-review. **Gerontology**, v. 58, p. 15-23, 2012.

SALVETTI E., TORRIANI S., FELIS G.E. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. **Probiotics Antimicrob Proteins**, v. 4, n. 4, p.217-26, 2012.

SANTOS, A. et al. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 434-7, 2003.

SANTOS-ZAGO, L. F. et al. Os efeitos do ácido linoleico conjugado no metabolismo animal: avanço das pesquisas e perspectivas para o futuro. **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 195-221, 2008.

SAULNIER D .M. et al. Identification of prebiotic fructooligosaccharide metabolism in *Lactobacillus plantarum* WCFS1 through microarrays. **Applied Environmental Microbiology**. v 73, n.6, p.1753-65, 2007.

SAVIJOKI K, INGMER H, VARMANEN P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 71, n. 4, p. 394-406, 2006

SENGUPTA, R. et al. The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators of Inflammation*, 2013;237921.

SERVIN, A. L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifi- dobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v.28, n.4, p. 405–440, 2004.

SIEBER, R. et al. Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products – a review. **International Dairy Journal**., v. 14, p. 1-15, 2004.

SILVEIRA, M.B.et al. Conjugated linoleic acid (CLA) and obesity. **Public Healthy Nutrition**, v. 10, p. 1181-1186, 2007.

SINGH, S. et al. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, p. 448–57, 2009.

SLAVICA, A. Production of lactate and acetate by *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004T in comparison with *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531T. **Journal of Biotechnology**, v. 202, p.50-59, 2015.

SIRIWARDHANA, N. et al. Modulation of adipose tissue inflammation by bioactive food compounds. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 613-623, 2013.

SMOKVINA, T. et al. *Lactobacillus paracasei* comparative genomics: towards species pan-genome definition and exploitation of diversity. **Plos One**, v. 8, n. 7, p. 1-18, 2013.

SONG, Y.L et al. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 187, p. 167-173, 2000.

SUTULA J, COULTHWAITE L, VERRAN J. Culture media for differential isolation of *Lactobacillus casei* Shirota from oral samples. **Journal of Microbiology Methods**, v. 90, n.1, p.65-71, 2012.

TANMAHASAMUT, P. et al. Conjugated linoleic acid blocks estrogen signaling in human breast cancer cells. **Journal of Nutrition**, v. 134, n. 3, p. 674-680, 2004.

TAOKA, Y. et al. Effect of Tween 80 on the growth, lipid accumulation and fatty acid composition of *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, n. 4, p. 420-4, 2011.

TARANTO, M. P. et al. Bile salts and cholesterol induce changes in the lipid cell membrane of *Lactobacillus reuteri*. **Journal of Applied Microbiology**. v.95, n.1, p. 86–91, 2003.

TARLING, E. J. et al. Effect of dietary conjugated linoleic acid isomers on lipid metabolism in hamsters fed high-carbohydrate and high-fat diets. **British Journal of Nutrition**, v. 101, n. 11, p. 1630-8, 2009.

THAKKAR, J. P.; MEHTA, D. G. A Review of an Unfavorable Subset of Breast Cancer: Estrogen Receptor Positive Progesterone Receptor Negative. **The Oncologist**, v. 16, p. 276-285, 2011.

TEJERO-SARIÑENA, S. et al. Anaerobe In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens : Evidence for the effects of organic acids. **Anaerobe**, v. 18, n. 5, p. 530-38, 2012.

TODOROV, S. D. et al. Characterisation of an antiviral peциocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. **Food Microbiology**, v. 27, p. 869-879, 2010.

TORRIANI, S.; FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3450-3454, 2001.

VAN NIEUWENHOVE, C. P. et al. Conjugated linoleic acid conversion by dairy bacteria cultured in MRS broth and buffalo milk. **Letters in Applied and Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 467-74, 2007.

- VILLAR-TAJADURA M. A. et al. Production of conjugated linoleic and conjugated alpha-linolenic acid in a reconstituted skim milk-based medium by bifidobacterial strains isolated from human breast milk. **Biomed Research International**, 2014.
- VIRTANEN, K. A. et al. Functional Brown Adipose Tissue in Healthy Adults. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, p. 1518-1525, 2009.
- VAN NIEUWENHOVE, C. P. et al. Conjugated linoleic acid conversion by dairy bacteria cultured in MRS broth and buffalo milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 467-474, 2007.
- VERHULST, A. et al. Biohydrogenation of linoleic acid by *Clostridium sporogenes*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium sordellii* and *Bacteroides* sp. **FEMS Microbiology Letters**, v. 31, n. 4, p. 255-259, 1985.
- VON WRIGHT, A.; AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: an introduction. In: LAHTINEN et al. **Lactic acid bacteria – microbiological and functional aspects**. 4.ed. Boca Raton: CRC Press, 2012. Cap. 1. p. 4-6, 11-13, 26.
- WANG J. et al. Proteomic comparison of the probiotic bacterium *Lactobacillus casei* Zhang cultivated in milk and soy milk. **Journal Dairy Science**. v. 96, n. 9, p.5603-24, 2013.
- aWANG, Y.; JONES, P.J.H. Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. **International Journal of Obesity**, v. 28, p. 941-955, 2004.
- bWANG, Y.; JONES, P.J.H. Dietary conjugated linoleic acid and body composition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 1153S-1158S, 2004.
- WARD, L. J.; TIMMINS, M. J. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, p. 90-92, 1999.
- WENDEL, A. A. et al. Conjugated linoleic acid induces uncoupling protein 1 in white adipose tissue of ob/ob mice. **Lipids**, v. 44, p. 975-982, 2009.
- WEST, B. W. et al. Conjugated Linoleic Acid Persistently Increases Total Energy Expenditure in AKR/J Mice without Increasing Uncoupling Protein Gene Expression. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 10, p. 2471-2477, 2000.
- WHIGHAM, L. D. et al. Safety profile of conjugated linoleic acid in a 12-month trial in obese humans. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 10, p. 1701-1709, 2004.
- WITTHUHN, R.C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T.J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains, **International Journal Dairy Technology**, v. 57, p. 33-37, 2004.
- XU, H. et al. Kinetics of microbial hydrogenation of free linoleic acid to conjugated linoleic acids. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 2239-2247, 2008.

YAMASAKI, M.; YANAGITA, T. Adipocyte response to conjugated linoleic acid. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 7, p. 235-242, 2013.

YAN N. Structural Biology of the Major Facilitator Superfamily Transporters. **Annual Review of Biophysics**. v.44, p. 257-83, 2015.

YANG, B. et al. Synthesis of conjugated linoleic acid by the linoleate isomerase complex in food-derived lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 2, p. 430-39, 2014.

YE S. et al. Optimal culture conditions for producing conjugated linoleic acid in skim-milk by co-culture of different *Lactobacillus* strains. **Annals of Microbiology**. v. 63, n. 2, p. 707–717, 2013.

ZALÁN, Z. et al. Production of organic acids by *Lactobacillus* strains in three different media. **European Food Research and Technology**, v. 230, p. 395-404, 2010.

ZANIRATI D.F. et al. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. **Anaerobe**, v.32, p. 70-76, 2015.

ZENG, Z. et al. Identification of lactic acid bacterial strains with high conjugated linoleic acid-producing ability from natural sauerkraut fermentations. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 4, 2009.

ZHENG, C. J. et al., Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. **Federation of European Biochemical Societies – FEBS Letters**, v. 579, p. 5157-5162, 2005.

ZHANG, Z.G., et al. Phylogenomic reconstruction of lactic acid bacteria: an update. **BMC Evolutionary Biology**. v. 11, n.1, 2011.

ZHENG, G.; ZHANG, G.; SUN, Y. Research development of the preparation methods of conjugated linoleic acid. **Chemistry**, v. 9, p. 592–7, 2003.

ZOTTA, T. et al. Tween 80 and respiratory growth affect metabolite production and membrane fatty acids in *Lactobacillus casei* N87. **Journal of Applied Microbiology**, 2016.

ZOU, H. Not only osmoprotectant: betaine increased lactate dehydrogenase activity and L-lactate production in lactobacilli. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 591-5, 2013.

APÊNDICES

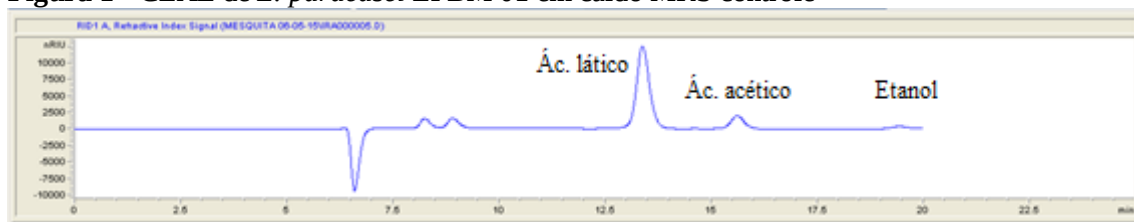
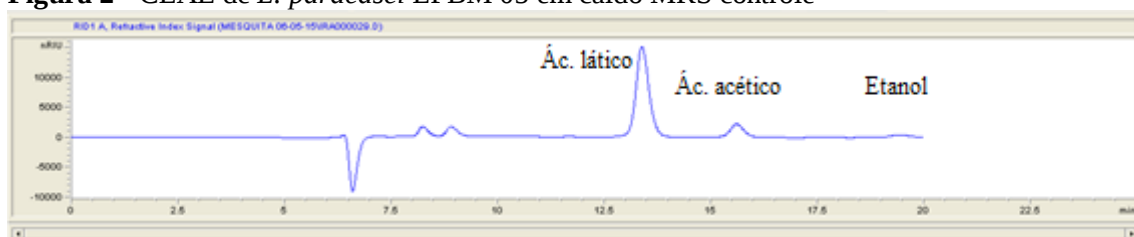
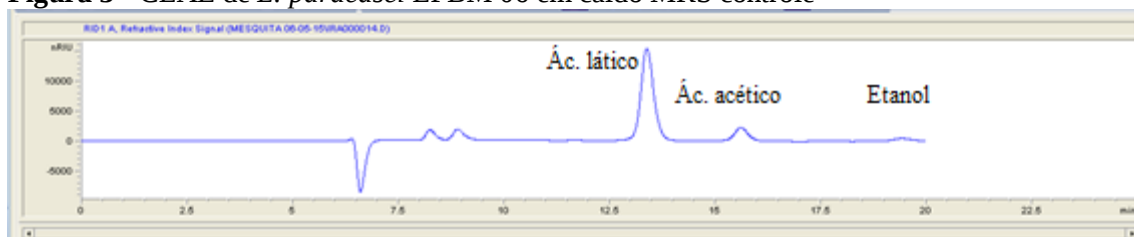
Figura 1 - CLAE de *L. paracasei* LFBM 01 em caldo MRS controle**Figura 2** - CLAE de *L. paracasei* LFBM 05 em caldo MRS controle**Figura 3** - CLAE de *L. paracasei* LFBM 06 em caldo MRS controle**Figura 4** - CLAE de *L. paracasei* LFBM10 em caldo MRS controle**Figura 5** - CLAE de *L. plantarum* LFBM 02 em caldo MRS controle

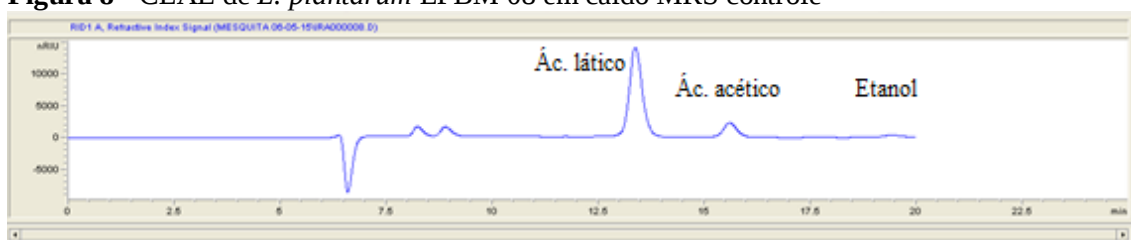
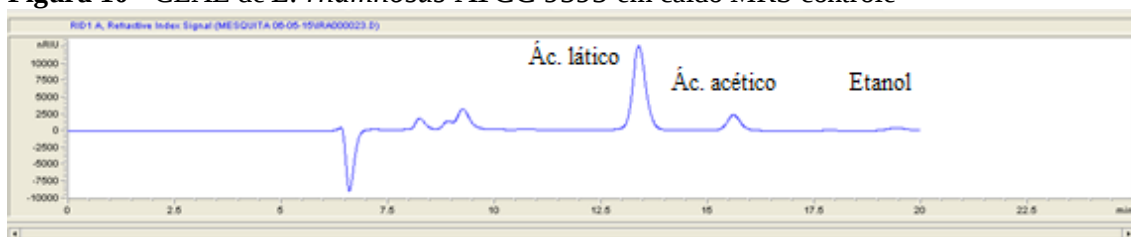
Figura 6 - CLAE de *L. plantarum* LFBM 04 em caldo MRS controle**Figura 7** - CLAE de *L. plantarum* LFBM 07 em caldo MRS controle**Figura 8** - CLAE de *L. plantarum* LFBM 08 em caldo MRS controle**Figura 9** - CLAE de *L. plantarum* LFBM 09 em caldo MRS controle**Figura 10** - CLAE de *L. rhamnosus* ATCC 9595 em caldo MRS controle

Figura 11 - CLAE de *L. paracasei* LFBM 01 em caldo MRS com 0,6% de Tween 80

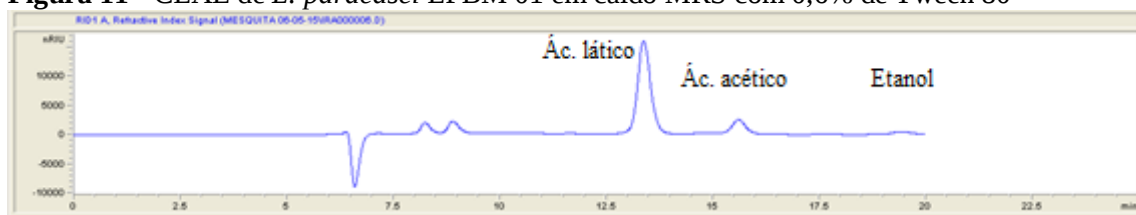


Figura 12 - CLAE de *L. paracasei* LFBM 05 em caldo MRS com 0,6% de Tween 80

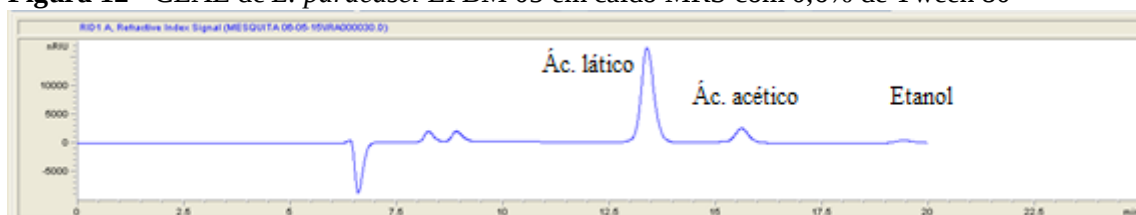


Figura 13 - CLAE de *L. paracasei* LFBM 06 em caldo MRS com 0,6% de Tween 80

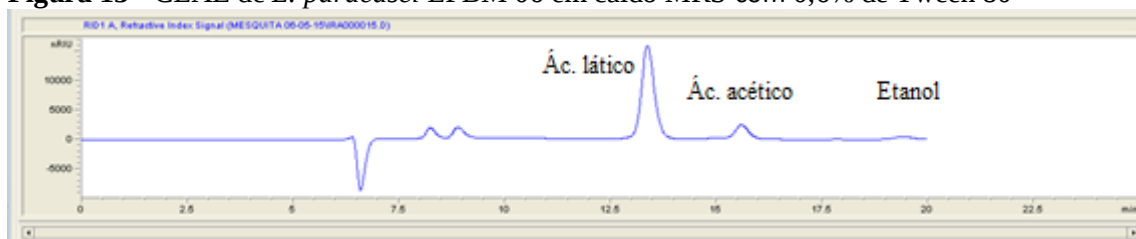


Figura 14 - CLAE de *L. paracasei* LFBM 10 em caldo MRS com 0,6% de Tween 80

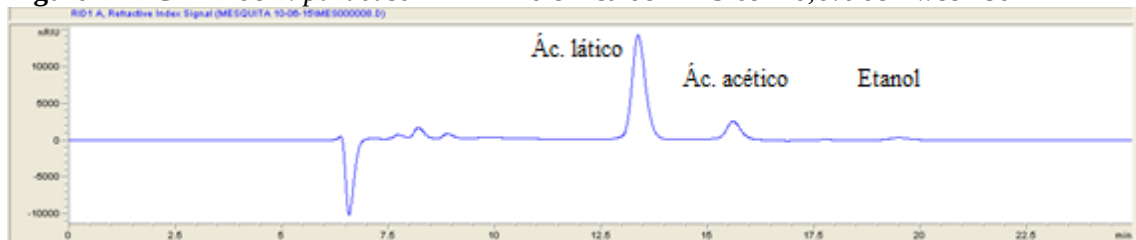


Figura 15 - CLAE de *L. plantarum* LFBM 02 em caldo MRS com 0,6% de Tween 80

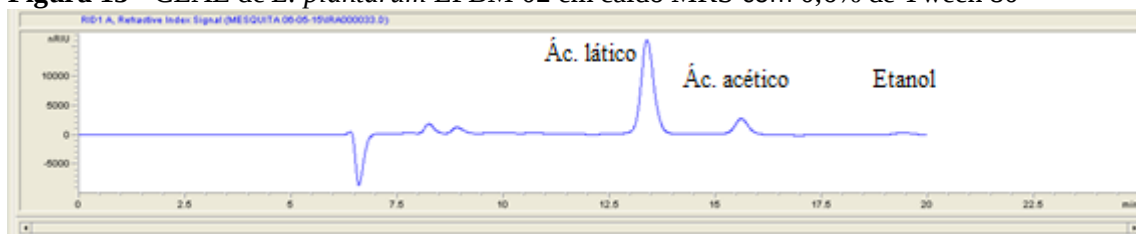


Figura 16 - CLAE de *L. plantarum* LFBM 04 em caldo MRS com 0,6% de Tween 80

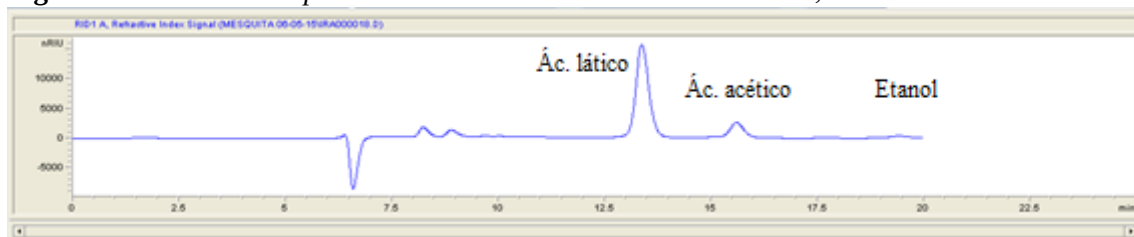


Figura 17 - CLAE de *L. plantarum* LFBM 07 em caldo MRS com 0,6% de Tween 80

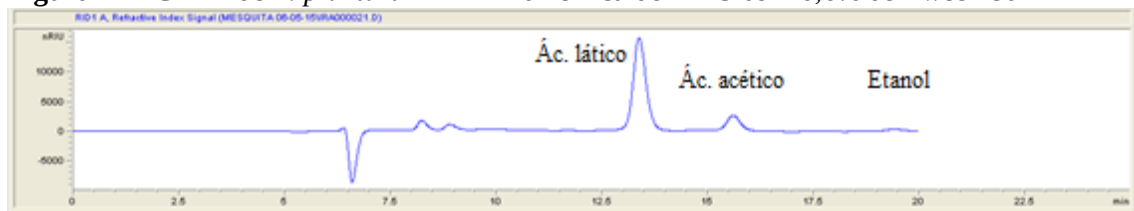


Figura 18 - CLAE de *L. plantarum* LFBM 08 em caldo MRS com 0,6% de Tween 80

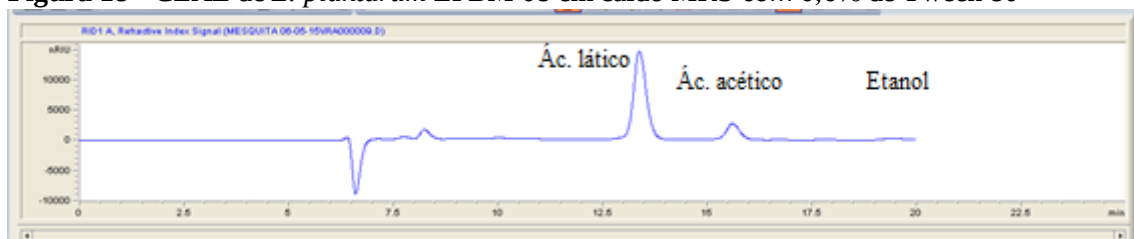


Figura 19 - CLAE de *L. plantarum* LFBM 09 em caldo MRS com 0,6% de Tween 80

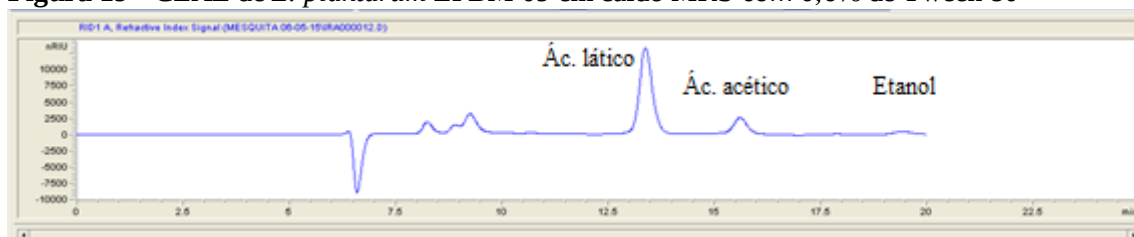


Figura 20 - CLAE de *L. rhamnosus* ATCC 9595 em caldo MRS com 0,6% de Tween 80

