

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

LILIANE ANDRADE DA SILVA

POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE
CAPRINO: ASPECTOS DE SEGURANÇA E FUNCIONALIDADE

JOÃO PESSOA
2018

LILIANE ANDRADE DA SILVA

POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE
CAPRINO: ASPECTOS DE SEGURANÇA E FUNCIONALIDADE

JOÃO PESSOA
2018

LILIANE ANDRADE DA SILVA

POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE
CAPRINO: ASPECTOS DE SEGURANÇA E FUNCIONALIDADE

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciência
e Tecnologia de Alimentos, do Centro de
Tecnologia, da Universidade Federal da
Paraíba em cumprimento aos requisitos
para obtenção do título de Doutor em
Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Dra. Haíssa Roberta Cardarelli

JOÃO PESSOA
2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586p Silva, Liliane Andrade da.
POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE
LEITE CAPRINO: ASPECTOS DE SEGURANÇA E FUNCIONALIDADE /
Liliane Andrade da Silva. - João Pessoa, 2019.
102 f.

Orientação: HAISSA ROBERTA CARDARELLI.
Tese (Doutorado) - UFPB/TECNOLOGIA.

1. Micro-organismos. 2. potencialidade. 3.
Lactobacillus plantarum. 4. exopolissacarídeos. 5.
saúde bucal. I. CARDARELLI, HAISSA ROBERTA. II. Título.

UFPB/BC

LILIANE ANDRADE DA SILVA

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE
CAPRINO: ASPECTOS DE SEGURANÇA E FUNCIONALIDADE**

Tese aprovada em / / 2018

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a. Haíssa Roberta Cardarelli
Presidente da Banca



Prof. Dr. Sócrates Golzio dos Santos
Examinador Externo



Prof.^a. Dr.^a. Janeeyre Ferreira Maciel
Examinador Externo



Prof.^a. Dr.^a. Marta Maria da Conceição
Examinador Interno



Prof.^a. Dr.^a. Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga
Examinador Interno

A Deus, pelo seu amor incondicional
A minha mãe, Luzia Andrade, pela grande mulher que és
Ao meu marido, Anderson David, por seu amor e companheirismo
Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, por colocar sua mão poderosa sobre nós e pela força para enfrentar todas as dificuldades.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida. E Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, a todos os professores que o compõem e a secretária, pelo apoio.

A Profa. Dra. Haíssa Roberta Cardarelli, pela excelente orientação, por me dar a mão em momentos difíceis, pela oportunidade de realização deste trabalho, confiança, por todo o conhecimento repassado e por todo carinho e amizade. Muito Obrigada!

A minha mãe, Luzia Andrade, pelo exemplo de mulher guerreira, por todo amor incondicional e orações. Mãe, amor eterno.

Ao meu pai, José Ramos da Silva, que me apoiou a sua maneira e pelas orações.

Ao meu marido, Anderson David, pela força durante todos os momentos, pelo carinho, amor, paciência e compreensão por todos os períodos difíceis e de ausência. Te amo muito!

A minha tia Nina querida (segunda mãe), que sempre foi meu suporte diante de todas as dificuldades. Te amo tia!

As minhas irmãs amadas Janiery, Thais e a pequenina Ester, por todo apoio, carinho e por me fazer sorrir mesmo quando queria chorar. Amo muito vocês.

Aos meus lindos e amados Pedrinho, Gabrielly e Nicolás, além de Melrinha (minha cachorrinha) e a toda família Andrade e Silva por fazerem minha vida mais colorida, feliz e leve.

Ao meu grande e querido amigo José Honório, por toda ajuda e pela amizade, além de tudo. Meus dias ficaram mais alegres com a sua presença.

A minha querida amiga Vilma, quem me incentivou desde sempre a nunca desistir e me apoiou em vários momentos nestes últimos anos. Obrigada por sua valiosa amizade!

Ao professor Dr. Fábio Correia Sampaio e a equipe do Laboratório de Biologia Bucal, professora Dra. Bernadette D. G. M. Franco e Danielle Nader Furtado pelo apoio com cepas para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos professores do PPGCTA/ UFPB e aos membros da banca avaliadora. Obrigada pela contribuição!

A todos os colegas de vários setores e laboratórios da UFPB, por onde passei nesses últimos anos e que sempre me apoiaram de forma direta e indireta, em especial a

Kerolayne, Evandro e todos do Nucal. O apoio de todos foi de extrema importância e fundamental para o desenvolvimento da pesquisa. Obrigada!

A todos os meus amigos do PPGCTA, em especial Karla Kalígia (amiga querida), Paula, Marília e Soares. Obrigada pelo carinho e amizade!

RESUMO

As bactérias lácticas são micro-organismos importantes do ponto de vista tecnológico, uma vez que são amplamente utilizados na fermentação de produtos lácteos. Além disso, têm capacidade de melhorar vida de prateleira, segurança, valor nutricional e qualidade dos produtos. Podem apresentar potencial probiótico e atividade antimicrobiana desejável para a conservação de alimentos, assim como, capacidade de produção de exopolissacarídeos (EPS). O objetivo desta pesquisa foi avaliar o potencial probiótico de bactérias lácticas isoladas de leite de cabra visando sua utilização como ingrediente funcional em diferentes produtos alimentícios. Para essa avaliação, foram considerados alguns aspectos de segurança e funcionalidade, incluindo a capacidade de produção de exopolissacarídeos (EPS). Ainda, foi avaliada a atividade antimicrobiana dos isolados frente aos micro-organismos que promovem a cárie. Assim, os objetivos específicos foram caracterizar os aspectos de segurança das bactérias lácticas, verificar sua atividade proteolítica, avaliar e caracterizar sua capacidade de produção de EPS. Para tanto, inicialmente foram realizados estudos de segurança (atividade hemolítica, produção de gelatinase, coagulase e sensibilidade a antibióticos), e de funcionalidade considerando a produção de EPS, atividade proteolítica, autoagregação, produção de gás, sobrevivência à passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) e atividade antimicrobiana frente a bactérias de importância para a saúde bucal. A caracterização dos EPS obtidos do isolado *Lactobacillus plantarum* DF60Mi foi realizada por meio de análises estruturais e de composição (análise termogravimétrica, espectroscopia de infravermelho, composição dos carboidratos, determinação de proteínas, açúcar total e atividade antioxidante). Os isolados apresentaram-se seguros (atividade β -hemolítica negativa, sem capacidade de hidrólise da gelatina e produção de coagulase, sensibilidade aos antibióticos: ampicilina, gentamicina, cloranfenicol, tetraciclina e clindamicina). Não houve atividade proteolítica assim como produção de gás a partir da glicose e os isolados apresentaram percentuais elevados de autoagregação ($84,24 \% \pm 3,77$ a $93,38 \% \pm 0,06$). Os isolados LS2, LS3 e DF04Mi apresentaram maior resistência à condição ácida nos testes de simulação de sobrevivência à passagem pelo TGI no compartimento correspondente ao estômago quando comparados com os demais. Os isolados DF04Mi e DF60Mi demonstraram resistências notáveis após 4 h e 6 h de incubação no compartimento correspondente ao intestino delgado. O desempenho apresentado pelos isolados permite considerá-los como possíveis candidatos a

probióticos. Destacam-se *L. plantarum* (DF60Mi) e *Lactococcus lactis* (DF04Mi) com potencial para serem empregados na fermentação de alimentos, assim como antagonistas frente a micro-organismo relacionado ao desenvolvimento da carie (*Streptococcus mutans* ATCC 25175) e, portanto, podendo ser utilizado em benefício da saúde bucal. *L. plantarum* (DF60Mi) produziu EPS tanto na fermentação em leite desnatado contendo glicose quanto sacarose. Os EPS apresentaram resistência térmica, iniciando sua decomposição em torno de 250 °C. Os EPS foram caracterizados através de espectroscopia de infravermelho e espectrometria de massas pela técnica de Maldi-TOF-MS como heteropolissacarídeos possivelmente α -D-glucanos. Ademais, foi desenvolvido um artigo de revisão de literatura sobre as propriedades tecnológicas, a atividade biológica e o potencial de exopolissacarídeos produzidos por *L. plantarum* para aplicação na indústria de alimentos.

Palavras-chave: Micro-organismos, potencialidade, *Lactobacillus plantarum*, exopolissacarídeos e saúde bucal.

ABSTRACT

The Lactic bacteria are important microorganisms from the technological point of view, since they are widely used in the fermentation of dairy products. In addition, they have the ability to improve shelf life, safety, nutritional value and product quality. They may present probiotic potential and desirable antimicrobial activity for food preservation, as well as the production capacity of exopolysaccharides (EPS). The objective of this research was to evaluate the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from goat milk for its use as a functional ingredient in different food products. For this evaluation, some aspects of safety and functionality, including exopolysaccharide (EPS) production capacity, were considered. Furthermore, the antimicrobial activity of the isolates was evaluated against the microorganisms that promote caries. Thus, the specific objectives were to characterize the safety aspects of lactic bacteria, verify their proteolytic activity, evaluate and characterize their EPS production capacity. For this, safety studies (hemolytic activity, gelatinase production, coagulase and sensitivity to antibiotics) were performed, and functionality was considered considering EPS production, proteolytic activity, autoaggregation, gas production, survival through passage through the gastrointestinal tract) and antimicrobial activity against bacteria of importance for oral health. The characterization of the EPS the isolate *Lactobacillus plantarum* DF60Mi was performed through structural analyzes and composition (thermogravimetric analysis, infrared spectroscopy, carbohydrate composition, protein determination, total sugar and antioxidant activity) was performed. Isolates were safe (negative β -hemolytic activity, no gelatin hydrolysis and coagulase production, sensitivity to antibiotics: ampicillin, gentamicin, chloramphenicol, tetracycline and clindamycin). There was no proteolytic activity as well as gas production from glucose and the isolates presented high percentage of autoaggregation ($84.24\% \pm 3.77$ to $93.38\% \pm 0.06$). Isolates LS2, LS3 and DF04Mi showed greater resistance to the acidic condition in the survival simulation tests when the TGI passed in the compartment corresponding to the stomach when compared with the others. Isolates DF04Mi and DF60Mi showed remarkable resistance after 4 h and 6 h of incubation in the small intestine compartment. The performance presented by isolates allows them to be considered as possible probiotic candidates. We highlight *L. plantarum* (DF60Mi) and *Lactococcus lactis* (DF04Mi) with potential to be used in the fermentation of foods, as well as antagonists against the microorganism related to the development of caries (*Streptococcus mutans* ATCC

25175) and, therefore, used for the benefit of oral health. *L. plantarum* (DF60Mi) produced EPS both in the fermentation in skim milk containing glucose and sucrose. The EPS presented thermal resistance, starting to decompose at around 250 ° C. EPS were characterized by infrared spectroscopy and mass spectrometry by the Maldi-TOF-MS technique as possibly heteropolysaccharides α -D-glucans. In addition, an article was developed to review the literature on the technological properties, biological activity and potential of exopolysaccharides produced by *L. plantarum* for application in the food industry.

Keywords: Microorganisms, potentiality, *Lactobacillus plantarum*, exopolysaccharides and oral health.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1	LEITE DE CABRA.....	13
2.2	BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS.....	13
2.3	EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS) PRODUZIDOS POR BAL.....	20
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1	MICRO-ORGANISMOS.....	22
3.2	FLUXOGRAMA DO EXPERIMENTO.....	22
3.3	ANÁLISES DE SEGURANÇA DE BAL.....	23
3.4	ANÁLISES DE FUNCIONALIDADE DE BAL.....	24
3.5	EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO.....	27
	REFERÊNCIAS	30
4	RESULTADOS.....	35
	Artigo 1 (artigo de revisão): PROPERTIES OF EXOPOLYSACCHARIDES PRODUCED BY <i>Lactobacillus plantarum</i>.....	41
	Artigo 2: ASPECTOS DE SEGURANÇA E FUNCIONALIDADE DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE DE CABRA.....	58
	Artigo 3: CARACTERIZAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR <i>Lactobacillus plantarum</i> DM60.....	79
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100

1 INTRODUÇÃO

O leite de cabra é um alimento que possui propriedades físico-químicas e sensoriais peculiares. O incentivo à produção de derivados lácteos caprinos com alto valor agregado surge como um coadjuvante na criação de nichos de mercado que sejam capazes de atender demandas e garantir a segurança alimentar. Considerando a adaptabilidade e rusticidade dos caprinos, é crescente a atenção de órgãos de pesquisa, especialmente no tocante aos aspectos técnicos de produção em regiões semiáridas, buscando estratégias para o desenvolvimento rural sustentável e solidário, com a utilização da caprinocultura leiteira (PAULA, 2013).

O leite constitui um excelente meio de multiplicação de micro-organismos devido a sua composição química e alta atividade de água. O leite de cabra é considerado um dos alimentos mais completos por apresentar uma composição química constituída de proteínas de alto valor biológico e ácidos graxos essenciais, além do conteúdo mineral e vitamínico (SILVA, 2014). Assim, ele vem sendo estudado como uma boa fonte de oligossacarídeos quando comparado ao leite bovino (PAULA, 2013) e as bactérias ácido lácticas (BAL) encontradas nele podem produzir metabólitos secundários como exopolissacarídeos e apresentarem características potencialmente probióticas, sendo uma ferramenta valiosa para a compreensão e aplicação como ingrediente funcional devido a sua importância na tecnologia de alimentos.

As BAL são empregadas para a fermentação de vários laticínios como queijos e iogurtes, melhorando assim a qualidade microbiológica e tecnológica desses produtos, devido à produção de vários compostos antimicrobianos como peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos, diacetil e bacteriocinas (ARAUZ, 2011; BISCOLA et al., 2013).

A avaliação de BAL é essencial para otimizar a sua utilização como probióticos (AWAD et al., 2010). Cada cepa candidata a probiótico deve cumprir uma série de requisitos, incluindo a seguridade (isolamento de habitats adequados, correta identificação e sensibilidade a antibióticos), a funcionalidade (aderência intestinal e resistência ao ambiente gastrointestinal) e a capacidade de produção de ácido láctico e antagonismo contra patógenos (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2016).

As bactérias probióticas pertencem a várias espécies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus*, além de *Lactococcus lactis* e alguns espécies de *Enterococcus* e leveduras. Alguns dos benefícios dos probióticos incluem a redução de certas intolerâncias (como intolerância à lactose), o aumento da biodisponibilidade de

alguns nutrientes e a prevenção ou redução da prevalência de alergias em indivíduos suscetíveis. Probióticos são relatados por terem também características antimutagênica, anticarcinogênica, hipocolesterolêmica, anti-hipertensiva, anti-osteoporose, e produtoras de efeitos imunomoduladores (ANGMO et al., 2016).

Além de possuir potencial probiótico, muitas BAL possuem atividade antimicrobiana desejável para a conservação de alimentos (GÁLVEZ et al., 2007; BARBOSA et al., 2014). Os antimicrobianos de bactérias láticas oferecem uma série de propriedades que as tornam adequadas para o uso como conservantes de alimentos: são produzidos por bactérias GRAS (Generally Recognized as Safe); não são ativos e não são tóxicos às células eucarióticas; são inativados por enzimas digestivas e têm pequena influência na microbiota intestinal; são normalmente estáveis a ampla faixa de pH e temperatura; podem ter amplo espectro de ação; podem ter ação bactericida; e seus determinantes genéticos estão normalmente codificados em plasmídeos facilitando a manipulação genética (GÁLVEZ et al., 2007). Além disso, há um crescente interesse quanto à utilização de novas BAL como culturas probióticas e com aplicação na área clínica, evitando o desenvolvimento de bactérias que promovem caries (SAAD, 2006; SCHWENDICKE et al., 2017).

Logo, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o potencial probiótico de bactérias láticas isoladas de leite de cabra visando sua utilização como ingrediente funcional em diferentes produtos alimentícios. Para essa avaliação, foram considerados alguns aspectos de segurança e funcionalidade, incluindo a capacidade de produção de exopolissacarídeos (EPS). Ainda, foi avaliada a atividade antimicrobiana dos isolados frente aos micro-organismos que promovem a cárie. Assim, os objetivos específicos foram caracterizar os aspectos de segurança das bactérias láticas, verificar sua atividade proteolítica, avaliar e caracterizar sua capacidade de produção de EPS.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEITE DE CABRA

O leite de cabra é um alimento que possui efeitos benéficos para a manutenção da saúde e de funções fisiológicas. Pode ser consumido por pessoas que possuem alergias ou outros problemas gastrointestinais (HAENLEIN 2004; PARK 2007; RIBEIRO; RIBEIRO, 2010). O leite caprino possui melhor digestibilidade em comparação ao leite de vaca, pois fornece ácidos graxos de cadeia média de alta qualidade, além de possuir proteínas mais absorvíveis e excelente valor nutricional (OLALLA et al., 2009; NAVARRO-ALARCÓN et al., 2011; BERGILLOS-MECA et al., 2013).

A microbiota natural do leite de cabra possui grande interesse industrial e econômico. Além de ser útil para se identificar as condições higiênicas de produção e sanidade dos animais produtores (pela pesquisa de micro-organismos indicadores de higiene e patógenos), a microbiota autóctone dessa matéria-prima pode ser explorada visando a produção de derivados e a segurança alimentar. Nesse sentido, estudos já foram publicados em diversos países visando a caracterização dessa microbiota a ser aplicada na produção de derivados de leite de cabra, bem como por sua atividade antimicrobiana (HERREROS et al., 2005; ASTERI et al., 2010).

No Brasil estudos têm sido desenvolvidos principalmente no Nordeste e Sudeste do país (SILVA, 2014; FURTADO et al., 2014; DE LIMA et al., 2016). Dessa forma, BAL específicas, isoladas do leite de cabra podem ser amplamente utilizadas como ferramentas de segurança alimentar (ASTERI et al., 2010). Além disso, essas BAL isoladas do leite caprino, podem apresentar características probióticas por propiciar o equilíbrio da microbiota intestinal dentre outros benefícios à saúde como a melhora do sistema imune, a redução de intolerância à lactose, a redução no nível do colesterol sérico e pressão sanguínea, a atividade anti-carcinogênica, atividade antagonista frente a patógenos e manutenção na integridade do cólon intestinal (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010; RODRIGUES et al., 2011).

2.2 BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS

As bactérias ácido lácticas (BAL) compõem um grupo filogeneticamente muito heterogêneo (BURGAIN et al., 2014), constituído por diversos gêneros. BAL são usualmente descritas como micro-organismos Gram-positivos, desprovidos de citocromos e que se adaptam melhor em condições anaeróbias, mas são aerotolerantes, fastidiosos, ácido-tolerantes e estritamente fermentativos, produzindo ácido láctico como produto principal (VODNAR et al., 2010; SILVA, 2015). São, também, características comuns a este grupo a não formação de esporos, catalase, oxidase e gelatinase negativos, apresentarem morfologias de cocos ou bacilos, não reduzirem nitrato a nitrito e serem incapazes de utilizar o lactato (CARR; CHILL; MAIDA, 2002; KLAENHAMMER et al., 2002). Contudo, podem ocorrer exceções como algumas cepas serem produtoras de pseudocatalase ou serem catalase positivas e apresentarem cadeia de citocromos quando em meios contendo hematina ou compostos similares (INÊS et al., 2008).

As BAL são caracterizadas como GRAS (JUODEIKIENE et al., 2016; VARSHA; NAMPOOTHIRI, 2016), sendo amplamente utilizadas na indústria alimentícia e farmacêutica para consumo humano (FDA, 2010). O grupo de BAL inclui os gêneros *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Mlissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella* (RUAS-MADIEDO et al., 2012). Dentre estes, os gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Pediococcus* são os mais comumente utilizados como culturas “starter” na fermentação de vegetais, produtos lácteos e cárneos (HLADÍKOVÁ et al., 2012; NIETO-LOZANO et al., 2010). Estes micro-organismos são capazes de multiplicar-se em temperaturas de 5 a 45 °C e em condições ótimas de pH entre 5,5 a 6,5 (VODNAR et al., 2010). As espécies que fazem parte desse grupo são exigentes nutricionalmente e requerem a disponibilidade de moléculas orgânicas complexas (BURGAIN et al., 2014), incluindo aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos, vitaminas, sais minerais, ácidos graxos e carboidratos (VODNAR et al., 2010). O habitat natural de BAL é representado por ambientes nutricionalmente ricos e geralmente são associados com matérias-primas de origem animal e vegetal, produtos fermentados e mucosas do trato gastrointestinal

(TGI), respiratório e urogenital do homem e animais (SETTANNI; MOSCHETTI, 2010).

Estas bactérias também são caracterizadas quanto a sua morfologia celular, rota metabólica utilizada para fermentar a glicose, multiplicação em diferentes temperaturas, configuração do ácido láctico produzido e capacidade de multiplicação em altas concentrações salinas (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010). BAL podem ser classificadas em dois grandes grupos de acordo com seu metabolismo: homofermentativas, as quais metabolizam glicose convertendo-a mais facilmente em ácido láctico; e heterofermentativas, as quais além do ácido láctico formam outros compostos como dióxido de carbono, ácido acético e etanol a partir da fermentação da glicose, bem como compostos aromáticos, como aldeído e diacetil (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

São micro-organismos importantes do ponto de vista tecnológico, uma vez que são amplamente utilizados na fermentação de produtos lácteos devido ao seu caráter fermentador (culturas starters). Além disso, têm capacidade de melhorar vida de prateleira, segurança, valor nutricional e qualidade dos produtos (ARAUZ, 2011; BISCOLA et al., 2013). BAL também têm a capacidade de produção de exopolissacarídeos (EPS). Estes carboidratos são, em geral, produzidos por plantas, porém vários tipos de EPS sintetizados por micro-organismos são relevantes para os seres humanos, por possuírem propriedades desejáveis para aplicação industrial (FREITAS et al., 2011). Podem apresentar potencial probiótico e atividade antimicrobiana desejável para a conservação de alimentos (GÁLVEZ et al., 2007; BARBOSA et al., 2014).

2.2.1 Bactérias Lácticas Probióticas: Aspectos de segurança e funcionalidade

O termo probióticos foi definido em 2002 por especialistas da WHO (World Health Organization) e FAO (Food and Agriculture Association of United Nations) como sendo “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”. Este conceito tem sido aceito e utilizado mundialmente por pesquisadores, entidades governamentais e de segurança de alimentos (FAO/WHO, 2002; EFSA, 2012; FOOD SAFETY AUTHORITY OF IRELAND, 2013; HILL et al., 2014). Várias BAL são comumente usadas como probióticos, incluindo os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*,

Streptococcus, *Weissella* entre outros (OLIVEIRA-SEQUEIRA, RIBEIRO E GOMES, 2008).

Os probióticos devem ser resistentes ao suco gástrico e à toxicidade dos sais biliares após serem ingeridas. Elas devem ser capazes de ultrapassar as barreiras do trato gastrointestinal e chegarem em número viável para colonizarem o intestino (KHEADR, 2006; BOTELHO et al., 2017). A legislação brasileira considera como micro-organismos probióticos aqueles que podem ser adicionados aos alimentos e que trazem benefícios ao organismo, como: *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei shirota*, *Lb. casei variedade rhamnosus*, *Lb. casei variedade defensis*, *Lb. paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *B. longum* e *Enterococcus faecium* (BRASIL, 2008). Ainda, estabelece que a quantidade mínima viável de cada cultura, nos alimentos considerados probióticos deve ser de 10^8 a 10^9 UFC na porção diária do produto pronto para consumo, conforme indicação do fabricante (BRASIL, 2008).

O consumo de probióticos está relacionado a efeitos benéficos como alívio da intolerância à lactose; prevenção e redução dos sintomas de diarreia associada a antibióticos e causadas por rotavírus. Outros efeitos com caráter potencial vem sendo estudados, incluindo propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, estimulação do sistema imune, redução de doenças atópicas e alergias, além de redução do risco associado à mutagenicidade e carcinogenicidade (RANADHEERA et al., 2010). Os probióticos podem exercer seus efeitos benéficos no organismo a partir de alguns mecanismos de ação: modulação da imunidade, inibição de patógenos, restabelecimento da homeostase microbiana, e proteção da barreira epitelial. Produzem também uma variedade de compostos tais como bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos voláteis, ácido lático e acético que exercem ação antimicrobiana direta (OELSCHLAEGGER, 2010).

Os probióticos são selecionados, na maioria das vezes, a partir de bactérias isoladas da microbiota endógena, o que aumenta as chances de obtenção de bactérias com melhor capacidade adaptativa às condições intestinais do hospedeiro, principalmente a disponibilidade de nutrientes. Isso permite que os micro-organismos probióticos realizem no intestino uma rápida metabolização de substratos, como carboidratos, vitaminas, aminoácidos e proteínas, impedindo que eles estejam

disponíveis para os patógenos e resultando, conseqüentemente, na redução da proliferação destes (FERREIRA; KUSSAKAWA, 2015).

Os probióticos mais usados pertencem aos gêneros *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (KOMATSU, 2008). Tais bactérias são isoladas de várias matérias-primas alimentícias, assim como do trato gastrointestinal dos seres humanos saudáveis, principalmente do cólon, no caso de *Bifidobacterium* spp., e do íleo terminal, no caso de *Lactobacillus* spp. (BARRETO et al., 2003; SAAD, 2006). Várias BAL vêm sendo estudadas e caracterizadas como potencialmente probióticos (Tabela 1).

Tabela1. Alguns novos isolados de BAL potencialmente probióticos

ISOLADOS	ORIGEM	REFERÊNCIA
<i>L. plantarum</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>S. thermophilus</i>	-	Higashikawa et al. (2010)
<i>L. plantarum</i> WCFS1	-	Remus et al. (2013)
<i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. delbrueckii bulgaricus</i> <i>L. plantarum</i> <i>Streptococcus salivarius</i> <i>thermophilus</i>	-	Rashid et al. (2014)
<i>L. kefiranofaciens</i>	Kefir	Owaga et al. (2014)
<i>L. casei</i> CCFM0412	-	Chen et al. (2014 a)
<i>L. rhamnosus</i> GG	—	Kim et al. (2016)
<i>L. plantarum</i> CCFM0236	Iogurte	Li et al. (2016a)
<i>Lactobacillus plantarum</i> X1	Picles	Li et al. (2016b)
<i>L. plantarum</i> NIZO2877 <i>L. plantarum</i> WLJ	-	Schwarzer et al. (2016)

Fonte: Autoria própria

Contudo, a simples identificação de bactérias pertencentes a algumas das espécies supracitadas não garante que estas apresentem propriedades probióticas, sendo necessária a realização de testes que comprovem a existência de tais propriedades. Vários fabricantes desenvolvem suas próprias bactérias probióticas e, com isso, há uma busca frequente por novas cepas bacterianas, oriundas de diversas fontes, que possam ser utilizadas em alimentos (OLIVERA et al., 2012).

A Resolução da diretoria colegiada RDC nº 241, de 26 de julho de 2018, destaca critérios para comprovação da segurança dos probióticos. A comprovação deve ser realizada por meio de documentos técnicos ou estudos científicos que demonstrem: histórico de uso seguro; ausência de registros de eventos adversos relevantes, obtidos a partir de estudos clínicos ou vigilância pós-uso; ausência de fatores de virulência e patogenicidade relevantes para a saúde humana; ausência de produção de substâncias ou metabólitos que representem risco à saúde humana; ausência de resistência a antibióticos relevantes para a saúde humana potencialmente transferível e susceptibilidade a, pelo menos, dois antibióticos. Quando os probióticos forem destinados ao consumo por gestantes ou por crianças menores de três anos, a segurança da linhagem deve ser comprovada por meio de estudos clínicos que avaliem a ocorrência de efeitos adversos e os parâmetros de crescimento e de desenvolvimento (BRASIL, 2018).

2.2.2 *Weissella cibaria*

As bactérias do gênero *Weissella* são encontradas ocasionalmente no leite cru, (YU et al., 2011). *Weissella cibaria* (previamente classificada no gênero *Lactobacillus*) trata-se de uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, produtora de ácido lático. Tem sido consistentemente isolada de seres humanos e está presente em alimentos, dentre eles, os fermentados, sendo considerado um potencial agente probiótico (BONIFAIT et al., 2009; MOHANTY et al., 2011). Esta cepa bacteriana secreta uma quantidade significativa de peróxido de hidrogênio, assim como uma bacteriocina que atua contra bactérias Gram-positivas. Além disso, possui a capacidade de coagregação com *Fusobacterium nucleatum* e de adesão às células epiteliais. Destaca-se por ser uma das espécies clinicamente relevantes. As suas propriedades podem permitir que *W. cibaria* efetivamente colonize a cavidade oral e possa, de algum modo, limitar a proliferação de bactérias patogênicas (BONIFAIT et al., 2009; DEVINE et al., 2009;

LIU et al., 2010; SINGH, 2011; AGARWAL et al., 2011; MOHANTY et al., 2011). Este micro-organismo também vem sendo relatado por produzir EPS com propriedades tecnológicas, sensoriais e nutricionais importantes para a indústria de alimentos (WOLTER et al., 2014).

2.2.3 *Lactococcus lactis subsp. lactis*

Lactococcus lactis é uma BAL Gram-positiva, homofermentativa, utilizada tradicionalmente em alimentos fermentados, e cada vez mais utilizada em aplicações de biotecnologia moderna. Esta espécie passou por grande progresso com o desenvolvimento de ferramentas de engenharia genética, que contribuiu para a caracterização molecular (MIERAU; KLEEREBEZEM, 2005). Uma bactéria bastante usada na fabricação de produtos lácteos, como soro de leite coalhado, manteiga fermentada, muitas variedades de queijos duros, outros lácteos fermentados e como um parceiro simbiótico no kefir. Esta cultura bacteriana contribui tanto para o sabor quanto para a textura do produto em processos secundários (LEROY; DEVUYST 2004; MIERAU; KLEEREBEZEM, 2005).

Lactococcus lactis subsp. lactis pertence a um grupo de bactérias usadas principalmente em alimentos enlatados e produtos lácteos. É extensivamente estudada também por produzir bacteriocinas. A mais conhecida e utilizada produzida por *Lactococcus lactis subsp. lactis* é a nisina, especialmente efetiva quando utilizada na produção de queijo processado e aplicada em superfícies de queijo, onde protege contra micro-organismos patogênicos e formadores de esporos termorresistentes (DEEGAN et al., 2006). Recentemente, Bekhit et al. (2018) estudaram este micro-organismo para o desenvolvimento de novos filmes bioativos na aplicação de polímeros de polissacarídeos, obtendo efeito antimicrobiano de filmes bioativos contra *Listeria monocytogenes* e propriedades de barreira melhoradas.

2.2.4 *Lactobacillus plantarum*

O gênero *Lactobacillus* inclui cepas classificadas como bacilos, Gram-positivos, catalase negativos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos e anaeróbios facultativos (ANAL; SINGH, 2007; MOZZI et al., 2010). Compreende inúmeras espécies diferentes capazes de sintetizar peptídeos ou proteínas antimicrobianas

conhecidas como bacteriocinas além de ácidos orgânicos como ácido láctico, ácido acético e ácido succínico, sendo reconhecido cientificamente como limitador da multiplicação de fungos toxigênicos (MASCO et al., 2005; ARASU et al., 2016). Possui a capacidade de utilizar uma grande variedade de açúcares, especialmente monossacarídeos e dissacarídeos bem como produzir enzimas extracelulares, como amilase e protease (ARASU et al., 2016).

Cepas de *L. plantarum* são utilizadas como probióticos comerciais (DE VRIES et al., 2006; LEE et al., 2011; JENSEN et al. 2012; VIJAYAKUMAR et al., 2015). É encontrada em produtos lácteos, carnes e em vegetais em conserva devido à sua versatilidade e flexibilidade, sendo a primeira bactéria do gênero *Lactobacillus* a ter seu genoma sequenciado (KLEEREBEZEM et al., 2003). Estudos mostram que cepas de *L. plantarum* são capazes de sobreviver ao trânsito gástrico (TROPICHEVA; GEORGIEVA; DANOVA, 2011; COSTA et al., 2013), possuem atividade imunomoduladora (REMUS et al., 2013; ZVANYCH et al., 2014), aliviam os sintomas de distúrbios intestinais (DUCROTTÉ; SAWANT; JAYANTHI, 2012), diminuem os níveis de colesterol sanguíneo (HU et al., 2013; GORENJAK et al., 2014), agem de forma antagônica contra patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* e são resistentes à bile (RAMOS et al., 2013).

Por tradição os indivíduos desse gênero foram divididos em três grupos funcionais, dependendo das suas capacidades de fermentação, os obrigatoriamente homofermentativos (Grupo I), os facultativos heterofermentativos (Grupo II) e os obrigatoriamente heterofermentativos (Grupo III) (KANDLER, WEISS, 1986; AZAMBUJA, 2014). Os indivíduos do Grupo I são capazes de fermentar exclusivamente hexoses em ácido láctico, enquanto que os do Grupo II além de fermentarem hexoses em ácido láctico são capazes de fermentar pentoses e/ou glutamato. Já os pertencentes ao Grupo III fermentam hexoses em ácido láctico, ácido acético e/ou etanol e dióxido de carbono. *L. plantarum* é heterofermentativo facultativo e difere dos demais *Lactobacillus* spp., pois tem o genoma relativamente grande, o que indica a capacidade para se adaptar a diversas condições (KLEEREBEZEM et al., 2003).

2.3 EXOPOLISSACARÍDEOS (EPS) PRODUZIDOS POR BAL

Exopolissacarídeos de bactérias ácido lácticas tem apresentado aplicações no aprimoramento da reologia, em especial na textura de produtos lácteos fermentados, tal

como iogurte. Esses exopolissacarídeos apresentam cadeias longas e ramificadas, com unidades repetidas de monossacarídeos, principalmente glicose, manose, galactose, ácido glucurônico e, as vezes, ramnose em diferentes proporções ou derivados destes açúcares. Estes podem ser cultivados em vários tipos de meio de cultura de baixo custo para a obtenção do metabólito desejado. Algumas bactérias ácido lácticas como *Lactococcus lactis* produzem polissacarídeos extracelulares que são economicamente interessantes porque podem conferir efeitos funcionais nos alimentos e benefícios à saúde (DE SOUZA et al., 2004). Os EPS tem sido utilizados na melhoria das características sensoriais e do valor nutritivo de uma grande variedade de produtos lácteos, sendo comum o uso de bactérias produtoras de EPS na fabricação de leites fermentados (GRANDI, 2010; DAS et al., 2014).

Exopolissacarídeos produzidos por bactérias lácticas ou por outras bactérias são usados como agentes espessantes, estabilizantes ou emulsificantes para modificar as propriedades reológicas e de textura dos produtos na indústria de alimentos. O uso de linhagens produtoras de exopolissacarídeos recebeu maior atenção nos últimos anos por se tratar de fonte natural de bioespessantes alimentícios. Outra característica interessante é que alguns exopolissacarídeos produzidos por bactérias ácido lácticas parecem ser benéficos para a saúde humana mediante efeitos hipocolesterolêmico, prebiótico, imunomodulatório e anticarcinogênico (LIN, CHANG CHIEN, 2007; WANG et al., 2014; FONTANA et al., 2015).

O exopolissacarídeo pode ser classificado como homopolissacarídeo (contém um único tipo de monossacarídeo); e heteropolissacarídeo (formado por unidades repetidas de diferentes monossacarídeos) conforme sua composição química. Os homopolissacarídeos apresentam a cadeia principal com graus variáveis de ramificações e sítios de ligação, os quais diferem entre as linhagens bacterianas. Já os heteropolissacarídeos geralmente contêm a combinação de D-glicose, D-galactose e L-ramnose, ou em alguns poucos casos N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina, fucose, ácido glucurônico e outros substituintes (fosfato, acetil e glicerol) (RUAS-MADIEDO e REYES-GAVILÁN, 2005; BALLUS et al., 2010). As principais linhagens de bactérias do grupo ácido lácticas capazes de produzir exopolissacarídeos pertencem aos gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. Também já se verificou que algumas linhagens do gênero *Bifidobacterium* podem produzir esses biopolímeros (BALLUS et al., 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

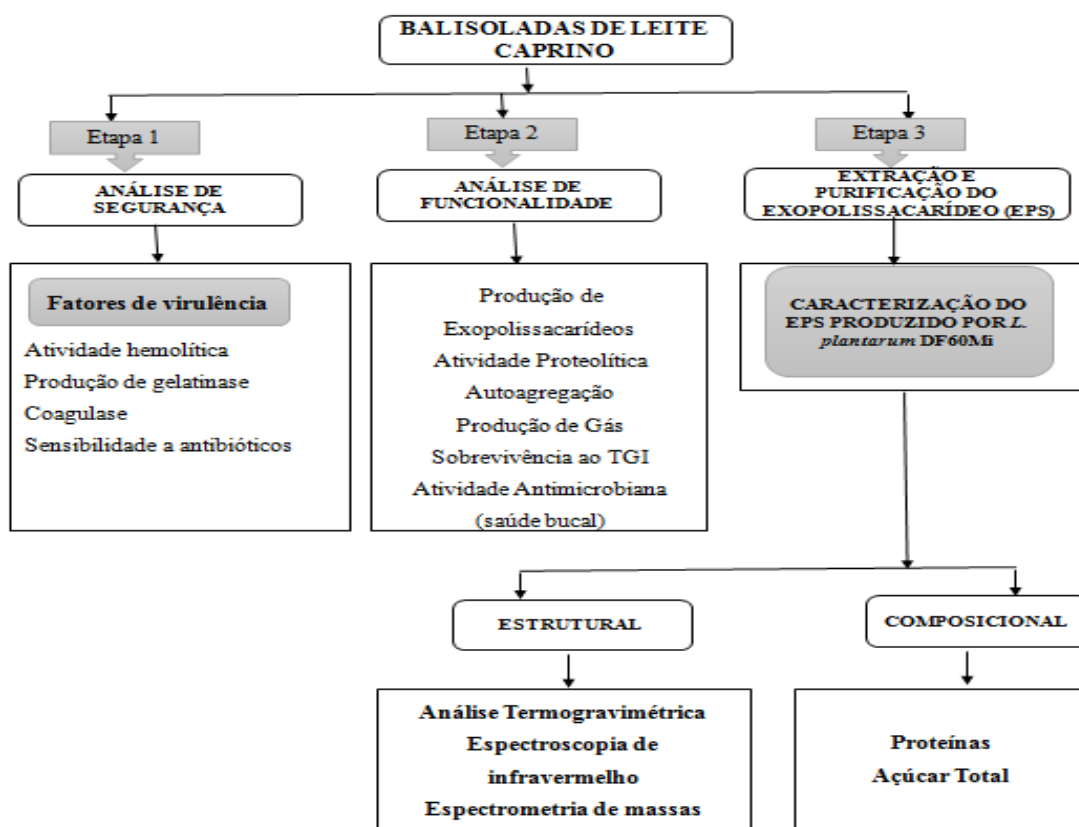
3.1 MICRO-ORGANISMOS

Os micro-organismos utilizados foram cepas de bactérias lácticas (BAL) isoladas de leite caprino com atividade antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*, identificadas como *Weissella cibaria* (LS1), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LS2, LS3 e DF04Mi) e *Lactobacillus plantarum* (DF60Mi), sendo as três primeiras isoladas por nosso grupo de pesquisa (De Lima et al., 2017) na região Nordeste do Brasil e as duas últimas isoladas por Furtado et al. (2014) na região Sudeste, com DF60Mi passando por confirmação de identidade molecular posteriormente (dados não publicados). Todas as cepas foram ativadas a 30 °C em 5 mL de caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Himedia, Índia) por 24 h para serem utilizadas nas demais análises.

3.2 FLUXOGRAMA DO EXPERIMENTO

Um fluxograma dos experimentos realizados foi criado como forma de visualizar melhor o desenvolvimento da pesquisa (Figura1).

Figura1. Fluxograma do experimento



3.2 ANÁLISES DE SEGURANÇA DE BAL

3.2.1 Atividade hemolítica

A avaliação da atividade hemolítica foi realizada em ágar Brain Heart Infusion (BHI) (Himedia, Índia) suplementado com 5 % (m/v) de sangue de carneiro desfibrinado. As BAL reativadas foram estriadas em placas contendo o meio e incubadas a 30 °C. Após 48 a 72 h, a reação hemolítica foi avaliada observando tanto a hidrólise parcial dos glóbulos vermelhos com a produção de uma zona verde (α -hemólise), bem como a hidrólise total de glóbulos vermelhos produzindo uma zona clara em torno das colônias bacterianas (β -hemólise) ou nenhuma reação (γ -hemólise). A atividade β -hemolítica foi confirmada utilizando-se a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 23235 como controle positivo (EATON; GASSON, 2001).

3.2.2 Produção de gelatinase

Após reativação das cepas as mesmas foram estriadas com auxílio de uma alça em tubos com gelatina nutriente (peptona 5 g/L, extrato de carne 3 g/L e gelatina 120 g/L) incubadas a 30 °C por 7-14 dias, sendo verificada a ocorrência de liquefação diariamente, para então serem refrigeradas a 4 °C por 1 h. A produção de gelatinase pelas cepas é indicada pela liquefação do meio e sua persistência após refrigeração (hidrólise da gelatina) (DELA CRUZ; TORRES, 2012).

3.2.3 Teste da coagulase

O teste da coagulase foi realizado em 0,3 mL das cepas incubadas em meio de cultura MRS (Himedia, Índia) durante 18 a 24 h a 30 °C, que foram transferidas para tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho reconstituído (Newprob, Brasil) e incubadas a 30 °C durante 6 h (DE ALMEIDA JÚNIOR, 2015).

3.2.4 Sensibilidade a antibióticos

A sensibilidade a antibióticos foi determinada por difusão de disco de acordo com protocolo adaptado de García-Hernández et al. (2016). Os seguintes antibióticos foram testados: ampicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), clindamicina (2 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), escolhidos de acordo com as recomendações propostas pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFESA, 2012). As culturas foram incubadas a 37 °C durante 18 a 24 h. Foram consideradas sensíveis as

BAL com zona de inibição ≥ 15 mm para gentamicina, ≥ 18 mm para cloranfenicol, ≥ 19 mm para tetraciclina e ≥ 14 mm para clindamicina e ampicilina. E muito sensíveis com zona de inibição ≥ 22 mm.

3.4 ANÁLISES DE FUNCIONALIDADE DE BAL

3.4.1 Produção e extração de exopolissacarídeos (EPS)

A produção de exopolissacarídeos pelas cepas de BAL foi realizada de acordo com o método de Angmo et al. (2016), com adaptações conforme segue. Preparou-se 500 μ L da cultura incubada anteriormente em MRS (Kasvi, Brasil) durante 24 h a 30 °C e adicionou-se em 50 mL do meio reconstituído (5 g de leite em pó desnatado com 1 g de glicose [LRG] ou com 1 g de sacarose [LRS]) incubando-se durante 18-24 h a 30 °C sob rotação a 150 rpm (incubadora de bancada com agitação, modelo Luca 223, Lucadema / Brasil). A cultura foi então centrifugada (Modelo: 5430R, Eppendorf, Alemanha) a 8000 $\times g$ durante 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi recolhido. Foi adicionado ao sobrenadante três vezes o volume de etanol 70 % (v/v) (Danquímica, Brasil), e incubou-se sob refrigeração a aproximadamente 4 °C por 15 h para precipitação do EPS. O EPS precipitado foi recolhido por centrifugação a 4000 $\times g$ durante 20 min e procedeu-se a secagem em estufa a 50 °C (Modelo Luca 223, Lucadema / Brasil).

3.4.2 Determinação da atividade proteolítica

Os isolados de BAL foram plaqueados em ágar-leite para avaliar sua atividade proteolítica. O meio foi preparado pela adição de 1 % de leite em pó desnatado ao meio Plate Count Agar (Himedia, Índia) (BEERENS et al., 1990). As placas foram incubadas a 7 °C por 10 dias e 37 °C por 48 h. As colônias transparentes formadoras de halo foram consideradas positivas para a atividade proteolítica.

3.4.3 Determinação da capacidade de autoagregação

A determinação da capacidade de autoagregação foi realizada de acordo com o método descrito por Xu et al. (2009) com modificações. Células bacterianas recém cultivadas foram centrifugadas a 6000 $\times g$ durante 10 minutos em temperatura ambiente

a 25 °C (Modelo: 5430R, Eppendorf, Alemanha). O sedimento celular foi lavado duas vezes com solução tampão de fosfato (PBS) [82,0 g de NaCl (Vetec, Brasil), 10,5 g de Na₂HPO₄ (Vetec, Brasil), 3,55 g de NaH₂PO₄ + H₂O (Vetec, Brasil) e completar para 1 L de água destilada] em pH 7,4, ressuscitado novamente em PBS até atingir a absorvância de $0,5 \pm 0,02$ a 600 nm (A 0 h). Em seguida, cada suspensão bacteriana (2 mL) foi agitada em agitador do tipo vórtex (Modelo: EEQ 9033, Edutech, Brasil) durante 10 s e incubada a 37 °C durante 2 h. Após a incubação, 1 mL do sobrenadante foi retirado para medir a absorvância a 600 nm (A 2 h). A porcentagem de autoagregação foi expressa como:

$$1 - (A \text{ 2 h} / A \text{ 0 h}) \times 100$$

3.4.4 Determinação da produção de Gás

A produção de gás a partir de glicose foi avaliada empregando caldo MRS acrescido 3% de glicose em tubos de ensaio contendo tubos de Durham invertidos de acordo com o método de Cai et al. (1999).

3.4.5 Determinação da viabilidade das cepas de BAL sob condições gastrointestinais simuladas

A determinação da viabilidade das cepas de BAL sob condições gastrointestinais simuladas seguiu as metodologias adotadas por Vinderola et al. (2008) e Buriti et al. (2010), com modificações. As cepas de BAL foram ativadas e re-cultivadas por dois dias consecutivos. O último repique foi realizado em tubo de centrífuga tipo falcon com 20 mL do mesmo meio. Após o período de incubação, os cultivos foram centrifugados a $2750 \times g$ por 15 min a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuscitado em 2 mL de água peptonada 0,1 % (m/v) (Himedia, Índia) padronizado em densidade óptica de 0,9 na absorvância de 625 nm e a viabilidade celular foi avaliada utilizando diluição decimal seriada e plaqueamento em superfície em meio de cultura ágar MRS (Himedia, Índia). Foram inoculados 5% (v/v) de cada cultura em 10 mL do suco gástrico (solução ácida com pH 3,35 - ajustado com HCl 1 M estéril - mais pepsina 3 g/L) e os frascos contendo essa solução inicial foram incubados a 37 °C por 2 h com agitação a 150 rpm (fase gástrica) (incubadora de bancada com agitação, modelo Luca 223, Lucadema / Brasil). Após este período, foi retirada uma alíquota de 1 mL

para avaliar a viabilidade celular e o pH da solução foi alterado para 5,2 (solução contendo 150 mL de NaOH 1M mais 14g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por litro). Os sais de bile (10 g/L) e pancreatina (1 g/L) foram adicionados e as soluções foram incubadas a 37 °C por 2 h sob agitação (fase entérica 1). Passando-se o período de incubação, novamente uma alíquota da solução foi retirada para avaliação da viabilidade celular conforme descrito anteriormente e o pH foi ajustado para a faixa de 6,7 a 7,1, ajustando-se também as concentrações de sais de bile e pancreatina de acordo com o novo volume obtido. A solução foi incubada nas mesmas condições iniciais, totalizando 6 h de incubação sob agitação (fase entérica 2) e a viabilidade celular foi novamente avaliada. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey.

3.4.6 Determinação da atividade antimicrobiana das cepas de BAL frente a micro-organismos de interesse na saúde bucal

Micro-organismos probióticos podem ter uma importante atividade anticariogênica devido à capacidade de inibição de micro-organismos causadores da cárie. Logo, alimentos probióticos podem ser uma opção para a saúde oral. A determinação da atividade antimicrobiana frente a bactérias cariogênicas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 14506, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 14506, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522, foi realizada através do teste “spot on the lawn” adaptado de Van Reenen et al. (1998). As cepas de *Weissella cibaria* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* foram ativadas em caldo MRS com incubação por 18 a 24 h a 37 °C. Paralelamente, as cepas cariogênicas foram reativadas em caldo BHI durante 18 a 24 h a 37 °C e posteriormente padronizadas com densidade óptica de 0,9. Foram preparadas placas de ágar BHI contendo cada uma das bactérias cariogênicas padronizadas a fim de atingirem viabilidade de 8 Log UFC/mL, que após solidificação receberam uma sobrecamada de 8 mL de MRS e, em seguida, uma gota de 20 µL de cada BAL, e foram incubadas a 37 °C por 24 h em aerobiose, exceto aquelas contendo *S. mutans*, que foram incubadas em anaerobiose. A inibição da multiplicação das bactérias cariogênicas foi observada através da formação de zonas de inibição (halos) ao redor da gota e seus diâmetros foram medidos com paquímetro em mm. Foram considerados com atividade antimicrobiana os halos com diâmetro ≥ 6 mm.

3.5 EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO (EPS)

3.5.1 Micro-organismo utilizado para extração de EPS

A cultura de *L. plantarum* DF60Mi isolada anteriormente, identificada pela fração 16S do rRNA e com atividade anti-*Listeria monocytogenes* relatada por Furtado et al., 2014, foi utilizada para extração de EPS, com base na determinação de produção de EPS descrita no item 3.4.1.

3.5.2 Purificação de EPS

A produção e extração de EPS foi realizada conforme descrito no item 3.4.1 e sua purificação seguiu-se com processo de diálise em temperatura ambiente (25°C) empregando membrana de celulose de 12-14 kDa (Sigma) durante 24 h, sendo realizadas três trocas de água destilada. O EPS purificado passou por novo processo de secagem em estufa, sob as mesmas condições citadas anteriormente e foi reservado para ser utilizado em determinações analíticas posteriores.

3.5.3 Caracterização Estrutural de EPS

3.5.3.1 *Análise Termogravimétrica*

O comportamento térmico do EPS foi estudado através da análise termogravimétrica usando o analisador térmico (Modelo TGA-60H, Shimadzu, Japão). Cada amostra de EPS contendo 20 mg, foi submetida a uma faixa de temperatura variando de 30 e 500 °C, em cadinho de alumina sob atmosfera de nitrogênio, a uma razão de aquecimento de 10 °C / minuto e determinou-se a perda de massa correspondente.

3.5.3.2 *Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)*

Os resultados de espectroscopia na região do infravermelho foram obtidos utilizando o espectrofotômetro Shimadzu (IR Prestige-21, EUA). As amostras secas e pulverizadas dos dois tipos de EPS (LRS e LRG) foram prensadas para formar pastilhas de cerca de 1 cm de diâmetro com uma composição de aproximadamente 1:100 (mg) de amostra e brometo de potássio (KBr), sendo realizada no modo de transmitância na região do infravermelho médio (4000 a 400 cm⁻¹) com uma resolução de 4 cm⁻¹.

3.5.3.3 *Análise dos carboidratos por espectrometria de massas*

As análises por espectrometria de massas foram realizadas no equipamento MALDI-TOF Autoflex Speed L (Bruker, Alemanha) utilizando o procedimento estabelecido para análise de oligossacarídeos do laboratório do Centro de Facilidades e Apoio à Pesquisa da Universidade de São Paulo (USP/São Paulo). O procedimento consistiu da mistura de 2 µL da amostra com 2µL de uma solução saturada de ácido 2,5 di-hidróxido benzóico em 0,1 % (v/v) de solução de ácido trifluoracético e acetonitrila na proporção de 70:30 (TA30) e finalmente 0,5 µL foi aplicado na placa Ground Steel (Bruker, Alemanha) para as amostras serem analisadas.

A aquisição dos resultados ocorreu no modo refletor, com polaridade positiva e os parâmetros apresentados na Quadro 1.

Quadro 1. Parâmetros utilizados para realização da análise da composição dos carboidratos por espectrometria de massas - MALDI TOF MS

No intervalo de 100 – 2500 Da
Ion Source 1 - 19.00 kV
Ion Source 2 - 16.80 kV
Lens - 7.9 kV
Reflector 21 kV
Reflector2 9.35kV
Pulsed Ion Extraction 130 ns
Mass Range 100 – 2500 Da / 500 – 2500 Da
Laser Frequency 500Hz
Detector Gain 5.6x

3.5.4 Caracterização Composicional de EPS

3.5.4.1 *Determinação da concentração de Proteínas*

A determinação da concentração de proteína das amostras foi realizada pelo método de Bradford (1976) que é baseado na ligação do corante (Coomassie Blue G-250) com a proteína, formando um complexo de cor azul.

3.5.4.2 *Quantificação de Açúcares Totais*

A quantificação de açúcares totais foi realizada pelo método fenol-sulfúrico, considerado padrão para esse tipo de determinação (DUBOIS et al., 1956).

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, E.; BAJAJ, P.; GURUPRASAD, C. N.; NAIK, S.; PRADEEP, A. R. Probiotics: A novel step towards oral health. **Aosr**, v. 1, n. 2, p.108-115, 2011.
- ANAL, A.K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 240-251, 2007.
- ANGMO, K.; KUMARI, A.; BHALLA, T. C. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. **Food Science and Technology**, v. 66, p.428-435, 2016.
- ARASU, M. V.; AL-DHABI, N. A.; ILAVENIL, S.; CHOI, K. C.; SRIGOPALRAM, S. In vitro importance of probiotic *Lactobacillus plantarum* related to medical field. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, p. 6-10, 2016.
- ARAUZ, L. J. **Produção de nisina em leite desnatado diluído por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 em biorreator**. Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2011.
- ASTERI, I. A.; KITTAI, N.; TSAKALIDOU, E.; The effect of wild lactic acid bacteria on the production of goat's milk soft cheese. **International Journal of Dairy Technology**. v. 63, p.234-242, 2010.
- AWAD, W.A.; GHAREEB, K.; BÖHM, J. Effect of addition of a probiotic micro-organism to broiler diet on intestinal mucosal architecture and electrophysiological parameters. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 94, p.486–494, 2010.
- AXELSSON, L. T. L. *Lactic acid bacteria: classification and physiology*. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. (eds.) **Lactic acid bacteria**. New York: Marcel Dekker, p. 1-66, 2004.
- AZAMBUJA, A. A. **Fermentação de *Lactobacillus plantarum* em soro de tofu para produção de exopolissacarídeos**. Trabalho de conclusão de curso – Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.
- BALLUS, C. A.; KLAJN, V. M.; CUNHA, M. F.; OLIVEIRA, M. L. D.; FIORENTINI, A. M. Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: Revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 85-96, 2010.
- BARBOSA, M. S.; TODOROV, S. D.; BELGUESMIA, Y.; CHOISET, Y.; RABESONA, H.; IVANOVA, I. V.; FRANCO, B. D. G. M. Purification and characterization of the bacteriocin produced by *L. actobacillus sakei* MBS a1 isolated from Brazilian salami. **Journal of applied microbiology**, v.116, n. 5, p. 1195-1208, 2014.
- BARBOSA, M.S.; TODOROV, S.D.; BELGUESMIA, Y.; CHOISET, Y.; RABESONA, H.; IVANOVA, I.V.; CHOBERT J.M.; HAERTL, T. FRANCO,

B.D.G.M. Purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* MBSa1 isolated from Brazilian salami. **Journal of Applied Microbiology**, v.116, n. 5, p. 1195–1208, 2014.

BARRETO, G. P. M.; SILVA, N.; SILVA, E. N.; BOTELHO, L.; YIM, D. K.; ALMEIDA, C. G.; SABA, G. L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 1, p. 119-126, 2003.

BEERENS, H.; LUQUET, F. M. **Guía practico para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos**. Acríbia Zaragoza, v. 1, 1990.

BEKHIT, M.; ARAB-TEHRANY, E.; KAHN, C. J.; CLEYMAND, F.; FLEUTOT, S., DESOBRY, S.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L. Bioactive Films Containing Alginate-Pectin Composite Microbeads with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: Physicochemical Characterization and Antilisterial Activity. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 2, p. 574, 2018.

BERGILLOS-MECA, T.; NAVARRO-ALARCÓN, M.; CABRERA-VIQUE, C.; ARTACHO, R.; OLALLA, M., GIMÉNEZ, R.; RUIZ-LÓPEZ, M. D. The probiotic bacterial strain *Lactobacillus fermentum* D3 increases in vitro the bioavailability of Ca, P, and Zn in fermented goat milk. **Biological trace element research**, v. 151, n. 2, p. 307-314, 2013.

BISCOLA, V. ; TODOROV, S.D.; CAPUANO, V.S.C.; ABRIOUEL, H.; GÁLVEZ, A.; Franco, B. D. G. M. Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product **Meat Science**, v. 93, p. 607–613, 2013.

BONIFAIT, L.; CHANDAD, F.; GRENIER, D. Probiotics for oral health: myth or reality? **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 75, n. 8, p. 1-6, 2009.

BOTELHO, L. G.; COELHO, K. S.; DE CASTILHO, N. P. A., DA CUNHA, A. F.; FALCÃO, J. P. M.; Nunes, M. F. Resistência in vitro de bactérias ácido lácticas isoladas de iogurtes brasileiros ao suco gástrico e sais biliares. **Anais Simpac**, v. 7, n. 1, 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probiótico, 2008. Brasília: **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução Da Diretoria Colegiada RDC Nº 241. 2018. Brasília: **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, 2018.

BURGAIN, J.; SCHER, J.; FRANCIUS, G.; BORGES, F.; CORGNEAUA, M.; REVOL-JUNELLES, A.M.; CAILLIEZ-GRIMAL, C.; GAIANI, C. Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 213, p. 21–35, 2014.

BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2, p. 121-129, 2010.

CAI, Y.; PUANGPEN, S.; SAMAN, P.; BENNO, Y. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and fresh water prawns. **Journal Applied Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 177-184, 1999.

CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, p.281-370, 2002.

CHEN, P. et al. Antidiabetic effect of *Lactobacillus casei* CCFM0412 on mice with type 2 diabetes induced by a high-fat diet and streptozotocin. **Nutrition**, v. 30, p. 1061–1068, 2014a.

COSTA, H. H. S., SOUZA, M. R., ACÚRCIO, L. B., CUNHA, A. F., RESENDE, M. F. S., & NUNES, Á. C. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from minas artisanal cheese from Serra da Canastra, MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 6, p. 1858-1866, 2013.

DE ALMEIDA JÚNIOR, W. L. G. et al. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. **Food control**, v. 53, p. 96-103, 2015.

DAS, D.; BARUAH, R.; GOYAL, A. A food additive with prebiotic properties of an α -d-glucan from *Lactobacillus plantarum* DM5. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 20-26, 2014.

DE SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 25, n. 4, p. 331-340, 2004.

DE VRIES, M. C.; VAUGHAN, E. E.; KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W. M. *Lactobacillus plantarum* - survival, functional and potential probiotic properties in the human gastrointestinal tract. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 16, n. 9, p. 1018-1028, 2006.

DEEGAN, L. H.; COTTER, P. D.; HILL C.; ROSS P. “Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension.” **International Dairy Journal**, v. 16, n. 9, p. 1058–1071, 2006.

DELA CRUZ, T. E.E.; TORRES, J. M. O. Gelatin hydrolysis test protocol. **American Society for Microbiology**. v. 1, n. 1, p. 1-10, 2012.

- DEVINE, D. A.; MARSH, P. D. Prospects for the development of probiotics and prebiotics for oral applications. **Journal Oral Microbiology**, v. 1, p. 1-11, 2009.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- DUCROTTE, P.; SAWANT, P.; JAYANTHI, V. Clinical trial: *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) improves symptoms of irritable bowel syndrome. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 30, p. 4012-4018, 2012.
- EATON, TRACY J.; GASSON, MICHAEL J. Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 4, p. 1628-1635, 2001.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) (2012). Scientific opinion. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. **EFSA Journal**, v. 10, n. 2740. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2740
- FAO/WHO (2002). FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- FDA (2010) Generally Recognized as Safe (GRAS) Notifications. Disponível em: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/Products/AnimalFoodFeeds/GenerallyRecognizedasSafeGRASNotifications/default.htm>. Acesso em: Jul. 2017.
- FERREIRA, F. A. B.; KUSSAKAWA, K. C. K. Uso de probióticos na alimentação de frangos de corte. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 38, p. 40-43, 2015.
- FOOD SAFETY AUTHORITY OF IRELAND. Probiotic Health Claims. *Food Safety Authority of Ireland* [online], http://www.fsai.ie/faqs/probiotic_health_claims.html (2013).
- FONTANA, C.; LI, S.; YANG, Z.; WIDMALM, G. Structural studies of the exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* C88 using NMR spectroscopy and the program CASPER. **Carbohydrate Research**, v. 402, p. 87-94, 2015.
- FREITAS, F; ALVES, V. D.; REIS, M. A. M. Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. **Trends in biotechnology**, v. 29, n. 8, p. 388-398, 2011.
- FURTADO, D. N.; TODOROV, S. D.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DF04Mi isolated from goat milk: characterization of the bacteriocin. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1541-1550, 2014.

GÁLVEZ, A.; ABRIOUEL, H.; LÓPEZ, R.L.; OMAR, N.B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food microbiology**, v. 120, n. 1-2, p. 51-70, 2007.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, Y.; PÉREZ-SÁNCHEZ, T.; BOUCOURT, R.; BALCÁZAR, J. L.; NICOLI, J. R.; MOREIRA-SILVA, J.; HALAIHEL, N. Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. **Research in Veterinary Science**, v. 108, p. 125-132, 2016.

GORENJAK, M.; GRADIŠNIK, L.; TRAPEČAR, M.; PISTELLO, M.; KOZMUS, C. P.; ŠKORJANC, D.; CENCIČ, A. Improvement of lipid profile by probiotic/protective cultures: study in a non-carcinogenic small intestinal cell model. **The new microbiologica**, v. 37, n. 1, p. 51-64, 2014.

GRANDI, A. Z. "**Produção de exopolissacarídeos por *Lactobacillus helveticus* autóctone isolado de soro-fermento natural.**" Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, 56-f, 2010.

HAENLEIN, G.F. Goat milk in human nutrition. **Small Ruminant Research**, v. 51, p. 155-163, 2004.

HERREROS, M. A.; SANDOVAL H.; GONZÁLEZ, L. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). **Journal Food Microbiology**, v. 22, n. 5, p. 455-459, 2005.

HIGASHIKAWA, F. et al. Improvement of constipation and liver function by plant-derived lactic acid bacteria: A double-blind, randomized trial. **Nutrition**, v. 26, p. 367–374, 2010.

HILL, C., GUARNER, F., REID, G., GIBSON, G. R., MERENSTEIN, D. J., POT, B.; CALDER, P. C. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506, 2014.

HU, X.; WANG, T.; LI, W.; JIN, F.; WANG, L. Effects of NS *Lactobacillus* strains on lipid metabolism of rats fed a high-cholesterol diet. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, n. 67, p. 1-12, 2013.

HLADÍKOVÁ, Z.; SMETANKOVÁ, J.; GREIF, G.; GREIFOVÁ, M. Antimicrobial activity of selected lactic acid cocci and production of organic acids. **Acta Chimica Slovaca**, v. 5, n. 1, p. 80-85, 2012.

JENSEN, H.; GRIMMER, S.; NATERSTAD, K.; AXELSSON, L. *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 153, n. 1-2, p. 216–222, 2012.

JUODEIKIENE, G.; ZADEIKE, D.; BARTKIENE, E.; KLUPSAITE, D. Application of acid tolerant *Pediococcus* strains for increasing the sustainability of lactic acid

production from cheese whey. **LWT-Food Science and Technology**, v. 72, p. 399-406, 2016.

KANDLER, O.; WEISS, N. Regular, nonsporing Gram-positive rods, in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, **Sneath, H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J. Eds., Williams & Wilkins, Baltimore**. v. 2, p. 1208-1234, 1986.

KHEADR, E.E. Impact of acid and oxgall on susceptibility of probiotic lactobacilli. **African Journal of Agricultural Research**, v.1, p.172-181, 2006.

KIM, B. et al. Protective effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG against dyslipidemia in highfat diet-induced obese mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.473, p. 530-536, 2016.

KLAENHAMMER, T.; ALTERMANN, E.; ARIGONI, F.; BOLOTIN, A.; BREIDT, F.; BROADBENT, J. Discovering lactic acid bacteria by genomics. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 82, p.29–58, 2002.

KLAENHAMMER, T.R. et al. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 1, n. 100, p. 1990-1995, 2003.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira Ciência Farmacêutica**, v. 44, n. 3, 2008.

LEE, J. et al. Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated *Lactobacillus* spp.: Immune modulation and longevity. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 148, n. 2, p. 80–86, 2011.

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

LI, X. et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM0236 on hyperglycemia and insulin resistance in high-fat and streptozotocin-induced type 2 diabetic mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, p. 1727–1736, 2016a.

LI, X. et al. *Lactobacillus plantarum* X1 with α -glucosidase inhibitory activity ameliorates Type 2 diabetes in mice. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 6, p. 63536–63547, 2016 b.

LIN, T.Y.; CHANG CHIEN, M. F. Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1419-1423, 2007.
LIU, D. T. C.; VICTOR, D. J.; AM, D. P. Role of probiotics and bacterial replacement therapy in periodontal disease management. **SRM Journal of Research in Dental Sciences**, v. 1, n. 1, p. 99, 2010.

MASCO, L.; HUYS, G.; DE BRANDT, E.; TEMMERMAN, R.; SWINGS, J. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p. 221-230, 2005.

MIERAU, I; KLEEREBEZEM, M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 68, n. 6, p. 705-717, 2005.

MOHANTY, R.; NAZARETH, B.; SHRIVASTAVA, N. The potential role of probiotics in periodontal health. **RSBO (Online)**, v. 9, n. 1, p. 85-88, 2012.

MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications. **Wiley-Blackwell**, v. 1, p. 417, 2010.

NAVARRO-ALARCÓN, M.; CABRERA-VIQUE, C.; RUIZ-LÓPEZ, M. D.; OLALLA, M.; ARTACHO, R.; GIMÉNEZ, R.; BERGILLOS, T. Levels of Se, Zn, Mg and Ca in commercial goat and cow milk fermented products: Relationship with their chemical composition and probiotic starter culture. **Food chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1126-1131, 2011.

NIETO-LOZANO, J. C.; REGUERA-USEROS, J. I.; PELÁEZ-MARTÍNEZ, M. C.; SACRISTÁN-PÉREZ-MINAYO, G.; GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, A. J.; HARDISSON DE LA TORRE, A. The effect of the pediocin Pa-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters. **Food Control**, v. 21, p. 679-685, 2010.

O'FLAHERTY, S.; BARRANGOU, R.; DUONG, T. Functional genomics of probiotic OELSCHLAEGER, T.A. Mechanisms of probiotic actions – a review. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 1, p. 57-62, 2010.

OLALLA, M.; RUIZ-LÓPEZ, M.; NAVARRO, M.; ARTACHO, R.; CABRERA, C.; GIMÉNEZ, R.; MINGORANCE, R. Nitrogen fractions of Andalusian goat milk compared to similar types of commercial milk. **Food Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 835-838, 2009.

OLIVEIRA, E. M. G.; GARCIA, E. F.; QUEIROGA, R. C. R. E.; SOUZA, E. L. Technological, physicochemical and sensory characteristics of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **Scientia Agricola**, v. 69, n. 6, p. 370-379, 2012.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; RIBEIRO, C. M.; GOMES, M. I. F. V. Potencial bioterapêutico dos probióticos nas parasitoses intestinais. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2670 – 2679, 2008.

OWAGA, E. E. et al. Oral toxicity evaluation of kefir-isolated *Lactobacillus kefirianofaciens* M1 in Sprague-Dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 70, p. 157–162, 2014.

PARK, Y.W.; JUÁREZ M.; RAMOS M; HAENLEIN G.F.W. Physico chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**. v. 68, p. 88-113, 2007.

PAULA, C. M. **Utilização de bactérias do grupo *Lactobacillus casei* no desenvolvimento de sorvete potencialmente probiótico de leite de cabra e polpa de cajá (*Spondias mombin*)**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

RAMOS, C. L.; THORSEN, L.; SCHWAN, R. F.; JESPERSEN, L. Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. **Food Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 22-29, 2013.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, United Kingdom, v. 43, p. 1–7, 2010.

REMUS, D. M.; BONGERS, R. S.; MEIJERINK, M.; FUSETTI, F.; POOLMAN, B.; DE VOS, P.; BRON, P. A Impact of *Lactobacillus plantarum* sortase on target protein sorting, gastrointestinal persistence, and host immune response modulation. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 3, p. 502-509, 2013.

RIBEIRO, A.C.; RIBEIRO, S.D.A. Specialty products made from goat milk. **Small Ruminant Research**, v. 89, p. 225-233, 2010.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 1-11, 2010.

RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T. A.; PEREIRA, C. I.; GOMES, A. M.; MALCATA, F. X.; FREITAS, A. C. The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 1, p. 100-108, 2011.

RUAS-MADIEDO, P.; ALTING, A.C.; ZOON, P. Effect of exopolysaccharides and proteolytic activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains on the viscosity and structure of fermented milks. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 2, p. 155-164, 2005.

RUAS-MADIEDO, P.; SANCHEZ, B.; HIDALGO-CANTABRANA, C.; MARGOLLES, A.; LAWS, A. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Handbook of Animal Based Fermented Food and Beverage Technology**, p. 125-151, 2012.

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

SCHWENDICKE, F.; KORTE, F.; DÖRFER, C. E.; KNEIST, S.; EL-SAYED, K. F.; PARIS, S. Inhibition of *Streptococcus mutans* Growth and Biofilm Formation by Probiotics in vitro. **Caries research**, v. 51, n. 2, p. 87-95, 2017.

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

SHIMADA, K.; FUJIKAWA, K.; YAHARA, K.; NAKAMURA, T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 40, n. 6, p. 945-948, 1992.

SILVA, L. A. **Seleção de bactérias lácticas com atividade anti-Listeria a partir de leite de cabra cru**. 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba.

SILVA, F. F. P. **Bactérias lácticas produtoras de folato e riboflavina: Isolamento e avaliação do seu potencial de aplicação na produção de produtos lácteos caprinos com alto teor de vitaminas**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SINGH, K.; KALLALI, B.; KUMAR, A.; THAKER, V. Probiotics: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. S287-S290, 2011.

SCHIAVAO-SOUZA, T. D.; YUHARA, T. T.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H.; GARCIA, S. Produção de exopolissacarídeos por bactérias probióticas: otimização do meio de cultura. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, n. 1, p. 27-34, 2007.

SCHWARZER, M. et al. *Lactobacillus plantarum* strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition. **Science**, v. 51, p. 854-857, 2016.

TROPICHEVA, R.; GEORGIEVA, R.; DANOVA, S. Adhesion ability of *Lactobacillus plantarum* AC131. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 25, n. 1, p. 121-124, 2011.

VARSHA, K. K.; NAMPOOTHIRI, K. M. Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures. **Food Control**, v. 69, p. 61-64, 2016.

VIJAYAKUMAR, M., ILAVENIL, S., KIM, D. H., ARASU, M. V., PRIYA, K., & CHOI, K. C. In-vitro assessment of the probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* KCC-24 isolated from Italian rye-grass (*Lolium multiflorum*) forage. **Anaerobe**, v. 32, p. 90-97, 2015.

VINDEROLA, C.G.; CAPELLINI, B.; VILLARREAL, F. Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. **Food Science and Technology**, v. 41, n. 1678-1688, 2008.

VODNAR, D. C.; PAUCEAN, A.; DULF, F. V.; SOCACIU, C. HPLC characterization of lactic acid formation and FTIR fingerprint of probiotic bacteria during fermentation processes. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 38, p. 109-113, 2010.

WANG, K.; LI, W.; RUI, X.; CHEN, X.; JIANG, M.; DONG, M. Structural characterization and bioactivity of released exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* 70810. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 67, p. 71-78, 2014.

WOLTER, A.; HAGER, A. S.; ZANNINI, E.; GALLE, S.; GÄNZLE, M. G.; WATERS, D. M.; ARENDT, E. K. Evaluation of exopolysaccharide producing

Weissella cibaria MG1 strain for the production of sourdough from various flours. **Food microbiology**, v. 37, p. 44-50, 2014.

YU, J.; WANG, W. H.; MENGHE, B. L. G.; JIRI, M. T.; WANG, H. M.; LIU, W.J.; BAO, Q. H.; LU, Q.; ZHANG, J. C.; WANG, F.; XU, H. Y.; SUN, T. S.; ZHANG, H. P. Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 7, p. 3229-3241, 2011.

ZVANYCH, R.; LUKENDA, N.; KIM, J. J.; LI, X.; PETROF, E. O.; KHAN, W. I.; MAGARVEY, N. A. Small molecule immunomodulins from cultures of the human microbiome member *Lactobacillus plantarum*. **The Journal of Antibiotics**, v. 67, n.1, p. 85-88, 2014.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta Tese estão apresentados em forma de Artigos Científicos submetidos em periódicos de impacto na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, exceto o artigo 3 que está em fase de tradução para submissão.

Artigo 1 (artigo de mini-revisão): PROPERTIES OF EXOPOLYSACCHARIDES PRODUCED BY *Lactobacillus plantarum*

(Periódico: Annals of Microbiology; Fator de impacto: 1.407; Qualis: A2).

Artigo 2: ASPECTOS DE SEGURANÇA E FUNCIONALIDADE DE BACTÉRIAS LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE DE CABRA

(Periódico: International Food Research Journal; Fator de impacto: 0,556; Qualis: B1).

Artigo 3: CARACTERIZAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR *Lactobacillus plantarum* DM60

(Periódico: A definir; Fator de impacto; Qualis:).

Artigo 1 (artigo de revisão): PROPERTIES OF EXOPOLYSACCHARIDES
PRODUCED BY *Lactobacillus plantarum*

**Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*: technological properties,
biological activity and potential application in the food industry**

¹SILVA, A. L., ¹LOPES NETO, J. H. P., ^{2*}CARDARELLI, H. R.

¹Postgraduate Program in Food Science and Technology, Department of Food Engineering, Federal University of Paraíba (UFPB), Cidade Universitária, João Pessoa-PB, Brazil, Postal 58051-900.

^{2*}Department of Food Technology, Center for Technology and Regional Development, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES) for the granted fellowships.

Abstract

Some lactic acid bacteria are capable of producing capsular or extracellular polysaccharides, with desirable technological properties and biological activities. Such polysaccharides produced by lactic acid bacteria are called exopolysaccharides and can be used to alter rheological properties, acting in processes involving viscosity, emulsification, and flocculation, among others. They may also be involved in prebiotic, probiotic, and biological activities, as well as having potential application in the food industry. In this article, we summarize some beneficial properties of exopolysaccharides (EPS) produced by *Lactobacillus plantarum* that have not been commercially explored, with particular attention to: 1) some rheological properties such as its application as a gelling agent, emulsifier or stabilizer for food products; 2) prebiotic properties mainly promoted by the glucan nature of the produced EPS which enhances probiotic properties of this LAB species; 3) some biological activities such as antioxidant, antibiofilm and antitumor activity, and their potential application in the food industry related to the improvement in texture of products and associated with fermented products where *L. plantarum* may be used as starter culture with this additional capability.

Keyword: EPS, lactic acid bacteria, potential activity, beneficial properties.

* Corresponding author E-mail: hrcarda@gmail.com

Introduction

Some species of lactic bacteria are able to synthesize and excrete extracellular polysaccharides, called exopolysaccharides (EPS). The production of exopolysaccharides (EPS) by lactic acid bacteria (LAB) has gained special interest over the last decade due to functional properties of these bio-polymers as well as their Generally Recognized as Safe (GRAS) status (Dertli et al. 2013; Dertli et al. 2016). Under specific growth conditions, *Lactobacillus* species generate a wide range and diversity of EPS structures that can be used as potential application in the food and pharmaceutical industry (Donot et al. 2012; Zanini et al. 2016).

EPS are divided by their structure into two groups: heteropolysaccharides and homopolysaccharides. The group of homopolysaccharides is mainly extracellularly synthesized from an existing sucrose molecule, which acts as a donor of the corresponding monosaccharide by the action of an extracellular enzyme belonging to the glycosyl hydrolase (GH) family, using sucrose as the glycosyl (fructose or glucose) donor (Van Hijum et al. 2004, 2006; Leemhuis et al. 2013; Zanini et al. 2016). Heteropolysaccharide (HePS) synthesis requires that the precursor repeating units are formed intracellularly, and isoprenoid-glycosyl-carried lipids are involved in the process. The repeating units are translocated across the membrane and subsequently polymerized extracellularly. Additionally, the biosynthesis and secretion of the LAB HePS occur at different growth phases, and the amount and the type are regulated by fermentation conditions (De Vuyst and Degeest 1999; Zanini et al. 2016).

EPS provide some important rheological characteristics such as texture and body of certain foodstuffs. These physical properties are not only influenced by the amount of bio-polymer but also its structure, considering size and frequency of branching and molecular mass (Duboc and Mollet 2001; Ruas-Madiedo et al. 2002), in addition to the interactions between polysaccharides (De Vuyst and Degeest 1999). EPS are also known to display several health-promoting effects such as anti-tumor, antioxidant, immune modulating, prebiotic and probiotic properties, and hence are considered valuable ingredients in the food industry (Das et al. 2014). *Lb. plantarum* has been reported as a producer of exopolysaccharides with various properties and activities essential for commercialization by the food, cosmetic or pharmaceutical industries (Das et al. 2014; Oh and Jung 2015; Fontana et al. 2015; Zhang et al. 2016). This study aimed to report a short review of the main biological properties and activities presented by *Lb. plantarum*.

Composition of *Lactobacillus plantarum* EPS

The analytical methodologies for EPS composition produced by *Lb. plantarum* have been described as hydrolysis and derivatization of the resultant monosaccharides, followed by chromatographic methods (Zhang et al. 2016). There are many reports in the literature on *Lb. plantarum* produced exopolysaccharides containing portions of galactose, glucose and mannose. Monosaccharide compositional analysis by HPLC has revealed the presence of independent peaks in *Lb. plantarum* NTMI05 and NTMI20, confirming the presence of galactose (Imran et al. 2016). Compositional analysis of *Lb. plantarum* YW32 EPS by GC-MS has shown that it is composed of different sugar monomers such as mannose, fructose, galactose and glucose, suggesting that it is a heteropolysaccharide. In fact, several *Lb. plantarum* strains have also been previously shown to produce different heteropolysaccharides. For example, EPS produced by *Lb. plantarum* NTU 102 containing fructose, arabinose, galactose, glucose, mannose and maltose in a different polarity ratio, and three monomers such as mannose, glucose and galactose were found in the EPS produced by *Lb. plantarum* KF5 (Wang et al. 2010; Liu et al. 2011; Wang et al. 2015).

Carbohydrates represent about 90 to 96% of the EPS composition produced by *Lb. plantarum* (Imran et al. 2016; Wang et al. 2014). Other components may be related in their composition as well, but at very low levels, as evidenced in some studies. The presence of about 1.88% sulfated groups, protein and nucleic acids have been analyzed and generally undetected, as well as uronic acid (Zhang et al. 2016; Wang et al. 2014).

Rheological Properties

Among the rheological properties of EPS, the solubility, water holding capacity, emulsification, viscosity and flocculation properties are the most used for industrial application of these polysaccharides. Solubility and water retention capacity are properties associated with the porous matrix structure formed by polysaccharide chains which may contain large amounts of water via hydrogen bonds, as already reported by Zhu et al. (2014). The good solubility of some EPS depends to a large extent on their molecular weight and the percentage of branching (Tsusaki et al. 2009). Due to their good solubility and water retention capacity, some EPS such as D-glucan DM5 can be used as emulsifiers or stabilizers for food products (Das et al. 2014). The same authors reported *Lb. plantarum* DM5 produced D-glucan containing 86.5% α -(1 $\rightarrow$ 6) and 13.5% branched linkages α -(1 $\rightarrow$ 3) and exhibited a non-toxic

biocompatible nature with unique rheological properties, thus facilitating its potential use as a gelling agent in the food industry.

Some EPSs have shown a trend of flocculation activity (Wang et al. 2008), which is interesting because they are considered natural flocculants and potential substitutes for chemical synthesized flocculants (which are difficult to degrade and harmful to humans). Viscosity is another crucial property to produce the desired attributes. Lactic acid bacteria addition into foods has been proposed to increase viscosity, given its ability to produce biopolymers *in situ* (Ryan et al. 2015). Russo et al. (2016) reported that *Lb. plantarum* strains were used for oat fermentation, and produced EPS Lp90 that favored rheological characteristics of the product, although it was apparently lost during storage. The textural and microstructural impact of EPS produced by *Lb. plantarum* isolated from camel milk on low-fat akawi cheese was also reported (Ayyash et al. 2018). Cheeses containing two different EPS positively altered the parameters of hardness and chewiness after 7 days of refrigerated storage, with smaller pores in the microstructure, and modified water retention capacity, which influenced the rheologic parameters.

Thus, it can be seen that the EPS produced by *Lb. plantarum* have been largely studied recently (Das et al. 2014; Oh and Jung 2015; Wang et al. 2015; Russo et al. 2016), proving their potential application given their demonstrated rheological properties.

Prebiotic Properties

Strains of lactic acid bacteria (LAB) and EPS producers including *Lb. plantarum* have been reported as having prebiotic and probiotic effects. Concerning prebiotic action, it was noticed that EPS could be used by certain probiotic strains which possess the enzymes necessary to degrade EPS (Tsuda and Miyamoto 2010). Prebiotic activity is “the ability of a given substrate to support the growth of an organism relative to other organisms and relative to growth on a non-prebiotic substrate, such as glucose” (Huebner et al. 2007). Das et al. (2014) demonstrated stimulation on the growth of *Lb. plantarum* DM5 in the presence of glucan-DM5, which is produced by the strain and inulin, achieving higher prebiotic scores. Conversely, non-probiotic strains such as *E.coli* and *E. aerogenes* did not succeed in growing. Moreover, EPS from *Lb. plantarum* demonstrated significant resistance to hydrolysis by gastric juice and intestinal digestion. Regarding all the above-mentioned benefits, EPS produced by *Lb. plantarum* could be considered as having potential prebiotic effects.

Probiotic survival can be influenced by the EPS produced by lactic acid bacteria (LAB) during the gastrointestinal transit (Caggianiello et al. 2016). Some studies have affirmed to have enhanced the growth and stress tolerance of probiotic *Lactobacilli* with the addition of microbial polysaccharides such as glucans. However, positive effects of the presence of EPS on some *Lactobacillus* strains survival have not been noticed in the human digestive tract. This might be due to the compositions and particular chemical structures of the tested microbial EPS, which are related to strain specificity and ability (Russo et al. 2012; De Palencia et al. 2009; Looijesteijn et al. 2001; Caggianiello et al. 2016).

Bacterial probiotic potential is related to its effectiveness against harsh gastrointestinal conditions through adhering to the gut mucosa, fighting pathogens by production of antimicrobial compounds and/or provoking beneficial effects on human health (Servin 2004). Moreover, bacteria should be resistant to bile, low pH, antibiotics and possess antimicrobial activity (Lee and Salminen 2009; Krruszezwska et al. 2002). Likewise, *Lb. plantarum* has proved to have some probiotic properties. According to Ren et al. (2014), *Lb. plantarum* (1557) isolated from vegetables showed good acid tolerance, survival at bile concentration (0.3 – 1%), adhesion properties, good cholesterol removal rates (58%), the highest sodium nitrite depletion rates, antibacterial and exceptional antioxidative activities, in addition to considerable EPS production. It has already been stated that probiotic survival could depend on the EPS produced by the probiotic strain, and therefore *Lb. plantarum* has this combined ability also associated to EPS production to be converted into probiotic and prebiotic ingredients. Recently, the functional properties of exopolysaccharide produced by *Lb. plantarum* CIDCA 8327 isolated from Kefir was reported (Gangoiti et al. 2017) and indicated as being promising for the development of functional foods.

Biological Activity

Antioxidant activity

EPS obtained from the cell-free supernatant of LAB exhibit antioxidant activities (Kodali and Sen 2008; Liu et al. 2011; Oh and Jung 2015). EPS produced by *Lb. plantarum* C88 was confirmed to be involved in the antioxidant activity of this strain since the purified EPS exhibited strong *in vitro* radical scavenging activity and antioxidant activity against H₂O₂-induced injury in Caco-2 cells (Fontana et al. 2015; Zhang et al. 2013).

Imran et al. (2016) used different reaction mechanisms to evaluate EPS antioxidant activities, including DPPH free radical scavenging activity and reducing power assay. The authors reported the highest scavenging activity of EPS was observed at a 500 µg/mL concentration of the EPS from *Lb. plantarum* NTMI05 and NTMI20 with 96.62% and 91.86%, respectively. The antioxidant activity may be due to the presence of hydroxyl group and other functional groups in EPS of both strains which can donate electrons to reduce the radicals to a more stable form, or to react with the free radicals to terminate the radical chain reaction (Shen et al. 2013). Dilna et al. (2015) also reported that 2 (two) mg/mL of *Lb. plantarum* RJF4 EPS exhibited 23.63% DPPH radical removal activity. Wang et al. (2014) evaluated antioxidant properties of r-EPS1 and r-EPS2 produced by *Lb. plantarum* 70810. In general, r-EPS2 presented higher antioxidant activities than r-EPS1, which was probably attributed to the presence of sulfated groups in r-EPS2. Hydroxyl scavenging activities were 69.81% for EPS2 at the highest concentration (4.0 mg/mL), while r-EPS1 and r-EPS2 (4.0 mg/ml) also showed good radical DPPH scavenging activities (27.98% and 48.43%, respectively). These results imply that r-EPS of *Lb. plantarum* 70810 may be good hydrogen or electron donors. In addition, absorbances of reducing power test were 0.359 and 0.423 for r-EPS1 and r-EPS2 (4.0 mg/mL), respectively. These results demonstrate there might be a correlation between radical scavenging activity and reducing power.

Anti-tumor activity

Studies report that the composition of monosaccharides and glycosidic linkage play a role in the anti-tumor activities of monosaccharides (Zhang et al. 2007). EPS from LAB have been found to have significant antioxidant and anti-tumor activities, and they have drawn attention recently. In assays performed by Wang et al. (2014), the inhibitory effects of the purified fractions of r-EPS (secreted into the surrounding medium released exopolysaccharides) produced by *Lb. plantarum* added to Caco-2 human colon carcinin, BGC-823 gastric cancer and colon cancer HT-29 cells *in vitro* were evaluated using the Tetrazolium dye uptake assay (mitochondrial metabolic activity) (MTT) assay in 96-well plates. The results revealed inhibition ratios of r-EPS1 and r-EPS2 at different concentrations for 24 hours against Caco-2, BGC-823 and HT-29 cells. Both r-EPS1 and r-EPS2 exhibited inhibitory effects on the proliferation of these tumor cells and inhibition activities increased along with increasing concentrations of exopolysaccharides. At the highest concentration (600 µg/mL), the inhibition ratios against Caco-2 were $25.94 \pm 1.98\%$ and $35.04 \pm 0.87\%$ for r-EPS1 and r-EPS2, respectively. Apparently, r-EPS2 had

higher inhibitory effects on growth in the investigated tumor cells than r-EPS1. This is justified by the presence of sulfated group and beta-glycosidic bond composition in r-EPS2.

Liu et al. (2009) also reported that sulfated polysaccharides had higher anti-tumor activity than non-sulfated polysaccharides. In the study of anti-tumor activity performed by Wang et al. (2015), EPS produced by *Lb. plantarum* YW32 exerted inhibitory activities on HT-29 cells in concentration dependence modes. After 72 hours of treatment, a stronger inhibitory rate (39.24%) of EPS was observed at a concentration of 600 µg/ml. The anti-tumor activity of *Lb. plantarum* YW32 EPS was related to its relatively strong scavenging abilities in relation to hydroxyl and superoxide radicals, suggesting that the *Lb. plantarum* YW32 EPS may be a potentially natural food for colon cancer therapy. Anti-proliferative activities on HT-29 cells have also been reported with other EPS from *L. acidophilus* (Kim et al. 2010) and *L. casei* (Liu et al. 2011). Differences in the anti-tumor activities of these EPS may be related to their different phytochemical characteristics, including their specific conformation, expanded chain, molecular weight and composition of monosaccharides (Wu et al. 2014).

Antibiofilm Activity

Some bacterial pathogens demonstrate the ability to form biofilms, causing food spoilage. Some *Lactobacillus* have been described as having antimicrobial activity against several biofilm forming bacteria (Zang et al. 2013; Li et al. 2014; Wang et al. 2015). EPS may possibly mediate antimicrobial activity by modifying the surfaces of bacterial cells by inhibiting the initial binding of bacterial cells to the surface, or by acting as signaling molecules that regulate the gene expression involved in biofilm formation (Kim et al. 2009; Rendueles et al. 2013).

Lb. plantarum YW32 EPS was tested in the formation of biofilms of four pathogens: *Escherichia coli* O157, *Shigella flexneri* CMCC (B), *Staphylococcus aureus* AC1 and *Salmonella typhimurium* S50333, where an increase in biofilm inhibition as the concentration of EPS increased from 0.2 to 5.0 mg/ml was observed. EPS showed higher inhibition of *Staphylococcus aureus* AC1 (45.13%), *Shigella flexneri* CMCC (B) (44.67%) and *Salmonella typhimurium* S50333 (44.04%) biofilm formation when compared to *Escherichia coli* O157 (only 12.71%). These results indicate that EPS of *Lb. plantarum* YW32 has a broad spectrum of antibiofilm activity, which would be advantageous for application in the food industry as food grade adjuvants to control microbial biofilm formation. Bacterial EPS, including *Lb. plantarum* YW32 EPS, had the ability to repress the biofilm formed by both Gram-negative and

Gram-positive pathogens. However, the molecular mechanism mediated the antibiofilm activity of the *Lb. plantarum* YW32 EPS does not appear to be due to the bactericidal effect since none of the EPS had biocidal activity (Wang et al. 2015).

Potential application of EPS in the food industry

The industrial applications of microbial exopolysaccharides are a topic of growing interest that has been extensively reviewed by Zannini et al. (2016). EPS from LAB, mainly heteropolysaccharides (HePS), have been widely used in the dairy industry, and mainly when they are produced *in situ* during fermentation to improve emulsifying and thickening properties for syneresis reduction and firmness increase (Zisu et al. 2005; Dabour et al. 2006; Ale et al. 2016). The availability of LAB starter cultures which produce exopolysaccharides *in situ* during fermentation could be a suitable alternative for products whose polysaccharide addition requires a specification as food additives, which is a condition that is not very much appreciated by consumers (Lahtinen et al. 2011). There is also increasing evidence that EPS exert a positive impact on human health. The low yield of HePS generally prevents its commercial use, in contrast to homopolysaccharides (HoPS) such as dextran from other microbial sources (Fanning et al. 2012; Ale et al. 2016). Currently, the highest production of microbial exopolysaccharides is attributed to *Xanthomonas campestris*, which produces 30–50 g/L of xanthan gum, an extracellular heteropolysaccharide used as a food additive and rheology modifier, and whose industrial use is considered convenient. Although the EPS yield produced by LAB is much lower, the *in situ* applications in the manufacturing sector may be sustainable (Harutoshi 2013). There is a wide range of EPS producing bacteria with interesting industrial applications, but only xanthan and gellan are authorized for use as additives in food products in the USA and Europe (Donot et al. 2012).

Lb. plantarum (Ismail et al. 2010) and *Lb. plantarum* MTCC 9510 (Ismail et al. 2014) are cited as promising exopolysaccharides for the food industry. The main characteristics are related to an improvement in the texture of products, with the last EPS reported as having non-Newtonian pseudoplastic behavior and avoiding syneresis in products. However, it should be ensured that EPS do not pose any risk in order to be applied in the food industry. Sasikumar et al. (2017) investigated the cellular cytotoxicity of EPS produced by *Lb. plantarum* BR2 and the results revealed that EPS is non-toxic to normal cells. From this result, the author reports that the studied EPS can be very useful for application in

the food industry in order to provide products with defined consistency and for the purpose of health promotion (functional).

Lb. plantarum KX041 (Wang et al. 2017) is a novel exopolysaccharide promisingly served as natural alternative for commercial additives. Moreover, the use of EPS produced by *Lb. plantarum* (YW11) was reported by Wang et al. (2015) as technically viable because the substance showed higher viscosity in skim milk and pH around 4, both parameters are favorable for addition in dairy products. Ayyash et al. (2018) showed a promising production of EPS *Lb. plantarum* isolated from camel milk, and that the strain exhibited comparable EPS production capabilities for a commercial crop of EPS production, in addition to being used as a starter culture for cheese production. According to Freitas et al. (2017), the industrial development of microbial EPS processes and commercialization of the biopolymers require better understanding of their structural configurations and physico-chemical properties, which is scarce or unavailable for many of the reported polymers. The fermentation stage of most EPS production processes is still poorly monitored in real time, and/or poorly integrated with the unit operations downstream. Many microbial EPS hold great potential for development due to their novel and distinct properties compared to polysaccharides obtained from other natural sources. However, in order for their industrialization and commercialization to become attractive it is necessary to put more effort not only into the fermentation stage to increase the productivity and lower production costs, but mainly into polymer characterization and the proof-of-concept of their application in high value pharmaceutical, food and cosmetic areas, where product quality and functional properties are far more relevant than production cost. Hence, the greatest potential for development of novel microbial EPS is in those high-value market niches.

Conclusion

EPS produced by *Lb. plantarum* have several important and desirable properties. Some of these properties still require more in-depth studies aimed at strain specific *Lb. plantarum*, particularly when it comes to their possible industrial application in foods. The rheological and prebiotic properties are the main characteristics demonstrated by EPS produced by this microorganism. However, based on what has been reported in the most recent research and what has been cited in this study, there are very promising EPS with several applications, including health regarding antitumor and antioxidant activities and prebiotic effects.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- Ale EC, Perezlindo MJ, Pavón Y, Peralta GH, Costa S, Sabbag N, Bergamini C, Reinheimer JA, Binetti AG (2016) Technological, rheological and sensory characterizations of a yogurt containing an exopolysaccharide extract from *Lactobacillus fermentum* Lf2, a new food additive. *Food Research International*, 90: 259-267.
- Ayyash M, Abu-Jdayil B, Hamed F, Shaker R (2018) Rheological, textural, microstructural and sensory impact of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus plantarum* isolated from camel milk on low-fat akawi cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 87: 423-431.
- Caggianiello G, Kleerebezem M, Spano G (2016) Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: from health-promoting benefits to stress tolerance mechanisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(9): 3877-3886.
- Dabour N, Kheadr E, Benhamou N, Fliss I, LaPointe G (2006) Improvement of texture and structure of reduced-fat Cheddar cheese by exopolysaccharide-producing lactococci. *Journal of Dairy Science*, 89(1): 95-110.
- Das D, Baruah R, Goyal A (2014) A food additive with prebiotic properties of an α -D-glucan from *Lactobacillus plantarum* DM5. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69: 20-26.
- De Palencia PF, Werning ML, Sierra-Filardi E, Dueñas MT, Irastorza A, Corbí AL, López P (2009) Probiotic properties of the 2-substituted (1, 3)- β -D-glucan-producing bacterium *Pediococcus parvulus* 2.6. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(14): 4887-4891.
- De Vuyst L, Degeest B (1999) Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(2): 153-177.
- Dertli E, Colquhoun IJ, Gunning AP, Bongaerts RJ, Le Gall G, Bonev BB, Mayer MJ, Narbad A (2013) Structure and biosynthesis of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus johnsonii* FI9785. *Journal of Biological Chemistry*, 288(44): 31938-31951.

- Dertli E, Toker OS, Durak MZ, Yilmaz MT, Tatlısu NB, Sagdic O, Cankurt H (2016) Development of a fermented ice-cream as influenced by in situ exopolysaccharide production: rheological, molecular, microstructural and sensory characterization. *Carbohydrate Polymers*, 136: 427-440.
- Dilna SV, Surya H, Aswathy RG, Varsha KK, Sakthikumar DN, Pandey A, Nampoothiri KM (2015) Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF 4. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2): 1179-1186.
- Donot F, Fontana A, Baccou JC, Schorr-Galindo S (2012) Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2): 951-962.
- Duboc P, Mollet B (2001) Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11(9): 759-768.
- Fanning S, Hall LJ, Cronin M, Zomer A, MacSharry J, Goulding D, Motherway MO, Shanahan F, Nally K, Dougan G, Sinderen D (2012) Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(6): 2108–2113.
- Fontana C, Li S, Yang Z, Widmalm G (2015) Structural studies of the exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* C88 using NMR spectroscopy and the program CASPER. *Carbohydrate Research*, 402: 87-94.
- Freitas F, Torres CA, Reis MA (2017) Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. *Bioresource Technology*, 245: 1674-1683.
- Gangoiti MV, Puertas AI, Hamet MF, Peruzzo PJ, Llamas MG, Medrano M, Pietro A, Dueñas MT, Abraham AG (2017) *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327: An α -glucan producing-strain isolated from kefir grains. *Carbohydrate Polymers*, 170: 52-59.
- Harutoshi T (2013) Exopolysaccharides of lactic acid bacteria for food and colon health applications. In *Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. Tokyo: InTech
- Huebner J, Wehling RL., Hutkins RW (2007) Functional activity of commercial prebiotics. *International Dairy Journal*, 17(7): 770-775.
- Imran MYM, Reehana N, Jayaraj KA, Ahamed AAP, Dhanasekaran D, Thajuddin N, Alharbi NS, Muralitharan G (2016) Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* NTMI05 and NTMI20. *International Journal of Biological Macromolecules*, 93: 731-745.

- Ismail B, Nampoothiri KM (2010) Production, purification and structural characterization of an exopolysaccharide produced by a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510. *Archives of Microbiology*, 192(12): 1049-1057.
- Ismail B, Nampoothiri KM (2014) Molecular characterization of an exopolysaccharide from a probiotic *Lactobacillus plantarum* MTCC 9510 and its efficacy to improve the texture of starchy food. *Journal of food science and technology*, 51(12): 4012-4018.
- Kim Y, Kim SH (2009) Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(2): 324-329.
- Kim Y, Oh S, Yun HS, Kim SH (2010) Cell-bound exopolysaccharide from probiotic bacteria induces autophagic cell death of tumour cells. *Letters in Applied Microbiology*, 51(2): 123-130.
- Kodali VP, Sen R (2008) Antioxidant and free radical scavenging activities of an exopolysaccharide from a probiotic bacterium. *Biotechnology Journal*, 3(2): 245-251.
- Lahtinen S, Ouwehand AC, Salminen S, von Wright A (Eds.) (2011) *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. New York: CRC Press.
- Lee YK, Salminen S (2009) *Handbook of probiotics and prebiotics*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Leemhuis H, Pijning T, Dobruchowska JM, Van Leeuwen SS, Kralj S, Dijkstra BW, Dijkhuizen L (2013) Glucanases: three-dimensional structures, reactions, mechanism, α -glucan analysis and their implications in biotechnology and food applications. *Journal of Biotechnology*, 163(2): 250-272.
- Li W, Ji J, Rui X, Yu J, Tang W, Chen X, Jiang M, Dong M (2014) Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus helveticus* MB2-1 and its functional characteristics in vitro. *LWT-Food Science and Technology*, 59(2): 732-739.
- Liu CF, Tseng KC, Chiang SS, Lee BH, Hsu WH, Pan TM (2011) Immunomodulatory and antioxidant potential of *Lactobacillus* exopolysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(12): 2284-2291.
- Liu J, Luo J, Ye H, Sun Y, Lu Z, Zeng X (2009) Production, characterization and antioxidant activities in vitro of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Carbohydrate Polymers*, 78(2): 275-281.

- Looijesteijn PJ, Trapet L, de Vries E, Abee T, Hugenholtz J (2001) Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology*, 64(1): 71-80.
- Oh YJ, Jung DS (2015) Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* and *Pediococcus* strains isolated from Omegisool, a traditionally fermented millet alcoholic beverage in Korea. *LWT-Food Science and Technology*, 63(1): 437-444.
- Ren D, Li C, Qin Y, Yin R, Du S, Ye F, Liu C, Liu H, Wang M, Li Y, Sun Y, Li X, Tian M, Jin N (2014) In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe*, 30: 1-10.
- Rendueles O, Kaplan JB, Ghigo JM (2013) Antibiofilm polysaccharides. *Environmental Microbiology*, 15(2): 334-346.
- Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P (2002) An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12(2): 163-171.
- Russo P, de Chiara MLV, Capozzi V, Arena MP, Amodio ML, Rascón A, Dueñas MT, López P, Spano G (2016) *Lactobacillus plantarum* strains for multifunctional oat-based foods. *LWT-Food Science and Technology*, 68: 288-294.
- Russo P, López P, Capozzi V, De Palencia PF, Dueñas MT, Spano G, Fiocco D (2012) Beta-glucans improve growth, viability and colonization of probiotic microorganisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(5): 6026-6039
- Ryan PM, Ross RP, Fitzgerald GF, Caplice NM, Stanton C (2015) Sugar-coated: exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food & Function*, 6(3): 679-693.
- Sasikumar K, Vaikkath DK, Devendra L, Nampoothiri KM (2017) An exopolysaccharide (EPS) from a *Lactobacillus plantarum* BR2 with potential benefits for making functional foods. *Bioresource Technology*, 241:1152-1156.
- Servin AL (2004) Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(4): 405-440.
- Shen JW, Shi CW, Xu CP (2013) Exopolysaccharides from *Pleurotus pulmonarius*: fermentation optimization, characterization and antioxidant activity. *Food Technology and Biotechnology*, 51(4): 520.
- Tsuda H, Miyamoto T (2010) Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus plantarum* and the prebiotic activity of the exopolysaccharide. *Food Science and Technology Research*, 16(1): 87-92.

- Tsusaki K, Watanabe H, Nishimoto T, Yamamoto T, Kubota M, Chaen H, Fukuda S (2009) Structure of a novel highly branched α -glucan enzymatically produced from maltodextrin. *Carbohydrate Research*, 344(16): 2151-2156.
- Van Hijum SAFT, Szalowska E, Van Der Maarel MJEC, Dijkhuizen L (2004) Biochemical and molecular characterization of a levansucrase from *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology*, 150(3): 621-630.
- Van Hijum SA, Kralj S, Ozimek LK, Dijkhuizen L, Van Geel-Schutten IG (2006) Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1): 157-176.
- WANG J; ZHAO X; TIAN Z; YANG Y; YANG Z (2015) Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, v. 125, p. 16-25.
- Wang J, Zhao X, Yang Y, Zhao A, Yang Z (2015) Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74: 119-126.
- Wang K, Li W, Rui X, Chen X, Jiang M, Dong M (2014) Structural characterization and bioactivity of released exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* 70810. *International Journal of Biological Macromolecules*, 67: 71-78.
- Wang X, Shao C, Liu L, Guo X, Xu Y, Lü X (2017) Optimization, partial characterization and antioxidant activity of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* KX041. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103: 1173-1184.
- Wang Y, Ahmed Z, Feng W, Li C, Song S (2008) Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(3): 283-288.
- Wang Y, Li C, Liu P, Ahmed Z, Xiao P, Bai X (2010) Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. *Carbohydrate Polymers*, 82(3): 895-903.
- Wu Z, Lu J, Wang X, Hu B, Ye H, Fan J, Abid M, Zeng X (2014) Optimization for production of exopolysaccharides with antitumor activity in vitro from *Paecilomyces hepiali*. *Carbohydrate Polymers*, 99: 226-234.

- Zannini E, Waters DM, Coffey A, Arendt EK (2016) Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3): 1121-1135.
- Zhang L, Liu C, Li D, Zhao Y, Zhang X, Zeng X, Yang Z, Li S (2013) Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54: 270-275.
- Zhang M, Cui SW, Cheung PCK, Wang Q (2007) Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science & Technology*, 18(1): 4-19.
- Zhang Z, Liu Z, Tao X, Wei H (2016) Characterization and sulfated modification of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and its biological activities. *Carbohydrate Polymers*, 153: 25-33.
- Zhu X, Zhao Y, Sun Y, Gu Q (2014) Purification and characterisation of plantaricin ZJ008, a novel bacteriocin against *Staphylococcus* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ008. *Food Chemistry*, 165: 216-223.
- Zisu B, Shah NP (2005) Textural and functional changes in low-fat Mozzarella cheeses in relation to proteolysis and microstructure as influenced by the use of fat replacers, pre-acidification and EPS starter. *International Dairy Journal*, 15(6): 957-972.

**Artigo 2: ASPECTOS DE SEGURANÇA E FUNCIONALIDADE DE BACTÉRIAS
LÁTICAS ISOLADAS DE LEITE DE CABRA**

Aspectos de Segurança e Funcionalidade Probiótica de Bactérias Láticas Isoladas de Leite de Cabra

LILIANE ANDRADE DA SILVA¹, JOSÉ HONÓRIO PEREIRA LOPES NETO¹,
HAÍSSA ROBERTA CARDARELLI^{2*}

¹Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

²Departamento de Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

* Autor correspondente: Departamento de Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional, Universidade Federal da Paraíba, Avenida dos Escoteiros, s/n, Mangabeira VII, Distrito de Mangabeira, João Pessoa, Paraíba, 58055-000, Brasil

Tel: +55 83 32167947, E-mail: hrcarda@gmail.com

Resumo

Bactérias lácticas (BAL) são tradicionalmente empregadas na indústria de alimentos. BAL isoladas de leite de cabra podem também apresentar potencial probiótico, sendo fundamental estudar aspectos de segurança e funcionalidade desejáveis para sua utilização na conservação de alimentos. O objetivo deste estudo foi verificar o potencial probiótico de bactérias lácticas isoladas de leite caprino. A presença de fatores de virulência relacionados à segurança (atividade hemolítica, produção de gelatinase, coagulase e sensibilidade a antibióticos) bem como a funcionalidade (produção de exopolissacarídeos - EPS, atividade proteolítica, autoagregação, produção de gás, sobrevivência ao trato gastrointestinal simulado e atividade antimicrobiana frente bactérias que prejudicam a saúde bucal) foram determinados. Os isolados de BAL selecionados são seguros diante dos parâmetros avaliados e possuem características de possíveis candidatos a probióticos. *Lactobacillus plantarum* (DF60Mi) e *Lactococcus lactis* (DF04Mi), especialmente, possuem potencial para serem adicionados a alimentos por apresentarem melhor resistência às condições gastrointestinais simuladas. Além disso, são isolados com atividade antimicrobiana já comprovada frente a *Listeria monocytogenes*, importante patógeno de origem alimentar. DF60Mi foi capaz de produzir EPS. Os isolados LS2 e DF4Mi, ambos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, demonstraram atividade antimicrobiana frente a *S. mutans* ATCC 25175, micro-organismo recorrente em patologias bucais, principalmente a cárie. Assim, este estudo fornece subsídios para exploração futura das potencialidades desses isolados de BAL tanto para o desenvolvimento de novos alimentos funcionais quanto para aplicação na área de saúde bucal.

Palavras-chave: Micro-organismos, potencialidade, conservação, alimentos funcionais, saúde.

1 Introdução

Aspectos de segurança de micro-organismos, mesmo pertencentes a um grupo de bactérias que é geralmente reconhecido como seguro (Generally Recognized As Safe - GRAS) (Joint FAO / WHO, 2002) como são as bactérias lácticas (BAL), envolvem a determinação do seu potencial de virulência. Dentre os determinantes de virulência associados à patogenicidade destacam-se a resistência a antibióticos, e a produção de proteínas extracelulares como a hemolisina e a gelatinase, além de proteínas de superfície e substâncias de agregação (Johansson e Rasmussen, 2013; Yogurtcu e Tuncer, 2013).

Bactérias lácticas quando aplicadas em alimentos, proporcionam efeitos benéficos para os consumidores através de suas propriedades funcionais e tecnológicas e podem ser consideradas probióticas. Probióticos são "micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro" (Hill *et al.* 2014). Produtos alimentares que contêm probióticos são considerados alimentos funcionais e podem apresentar ação anti-hipertensiva e anticancerígena; propriedades hipoglicêmicas; bem como efeitos imunomoduladores (Khan, 2014), o que tem resultado em muito interesse por parte de setores industriais ligados à saúde. Vários critérios são utilizados para considerar novos isolados de BAL como potencialmente probióticos, incluindo sua tolerância a condições ácidas e bile, não serem hemolíticos, possuírem propriedades antimicrobianas e serem capazes de sobreviver durante os processos de fermentação (Vijaya Kumar *et al.*, 2015). Além disso, as BAL probióticas podem ser capazes de produzir EPS e geralmente são requeridos devido aos efeitos fisiológicos para o indivíduo, contribuindo na formação de agregados celulares bacterianos e no reconhecimento e adesão à superfície, facilitando a colonização em vários ecossistemas (Schiavao-Souza *et al.*, 2007). Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a potencialidade probiótica de BAL isoladas de leite caprino quanto a aspectos de segurança e funcionalidade.

2 Material e métodos

2.1 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados foram isolados de bactérias lácticas (BAL) isoladas de leite caprino com atividade antimicrobiana frente a *L. monocytogenes*, identificadas como *Weissella cibaria* (LS1), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LS2, LS3 e DF04Mi) e *Lactobacillus plantarum* (DF60Mi), sendo as três primeiras isoladas por

nosso grupo de pesquisa (De Lima *et al.*, 2017) na região Nordeste do Brasil e as duas últimas isoladas por Furtado *et al.* (2014) na região Sudeste, com DF60Mi passando por confirmação de identidade molecular posteriormente (dados não publicados). Todos os isolados foram ativadas a 30 °C em 5 mL de caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Himedia, Índia) por 24 h para serem utilizadas nas demais análises.

2.2 Análises de segurança de BAL

2.2.1 Atividade hemolítica

A avaliação da atividade hemolítica foi realizada em ágar Brain Heart Infusion (BHI) (Himedia, Índia) suplementado com 5 % (m/v) de sangue de carneiro desfibrinado. As BAL reativadas foram estriadas em placas contendo o meio e incubadas a 30 °C. Após 48 a 72 h, a reação hemolítica foi avaliada observando tanto a hidrólise parcial dos glóbulos vermelhos com a produção de uma zona verde (α -hemólise), bem como a hidrólise total de glóbulos vermelhos produzindo uma zona clara em torno das colônias bacterianas (β -hemólise) ou nenhuma reação (γ -hemólise). A atividade β -hemolítica foi confirmada utilizando-se a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 23235 como controle positivo (Eaton e Gasson, 2001).

2.2.2 Produção de gelatinase

Após reativação dos isolados as mesmas foram estriadas com auxílio de uma alça em tubos com gelatina nutriente (peptona 5 g/L, extrato de carne 3 g/L e gelatina 120 g/L) incubadas a 30 °C por 7-14 dias, sendo verificada a ocorrência de liquefação diariamente, para então serem refrigeradas a 4 °C por 1 h. A produção de gelatinase pelos isolados é indicada pela liquefação do meio e sua persistência após refrigeração (hidrólise da gelatina) (Dela Cruz e Torres, 2012).

2.2.3 Teste da coagulase

O teste da coagulase foi realizado em 0,3 mL dos isolados incubadas em meio de cultura MRS (Himedia, Índia) durante 18 a 24 h a 30 °C, que foram transferidas para tubos estéreis contendo 0,3 mL de plasma de coelho reconstituído (Newprob, Brasil) e incubadas a 30 °C durante 6 h (De Almeida Júnior, 2015).

2.2.4 Sensibilidade a antibióticos

A sensibilidade a antibióticos foi determinada por difusão de disco de acordo com protocolo adaptado de García-Hernández *et al.* (2016). Os seguintes antibióticos

foram testados: ampicilina (10 µg), cloranfenicol (30 µg), clindamicina (2 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), escolhidos de acordo com as recomendações propostas pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (Efesa, 2012). As culturas foram incubadas a 37 °C durante 18 a 24 h. Presença ou ausência de zonas de inibição foi definida como sensibilidade ou resistência, respectivamente. Foram consideradas sensíveis as BAL com zona de inibição ≥ 15 mm para gentamicina, ≥ 18 mm para cloranfenicol, ≥ 19 mm para tetraciclina e ≥ 14 mm para clindamicina e ampicilina. E muito sensíveis com zona de inibição ≥ 22 mm.

2.3 Análises de Funcionalidade de BAL

2.3.1 Determinação da produção de exopolissacarídeos (EPS)

A produção de exopolissacarídeos pelos isolados de BAL foi realizada de acordo com o método de Angmo et al. (2016), com adaptações conforme segue. Preparou-se 1 % (v/v) da cultura incubada anteriormente em MRS (Kasvi, Brasil) durante 24 h a 30 °C e adicionou-se em 50 mL do meio reconstituído (5 g de leite em pó desnatado com 1 g de glicose [LRG] ou com 1 g de sacarose [LRS]) incubando-se durante 18-24 h a 30 °C sob rotação a 150 rpm (incubadora de bancada com agitação, modelo Luca 223, Lucadema / Brasil). A cultura foi então centrifugada (Modelo: 5430R, Eppendorf, Alemanha) a 8000 x g durante 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi recolhido. Foi adicionado ao sobrenadante três vezes o volume de etanol 70 % (v/v) (Danquímica, Brasil), e incubou-se sob refrigeração a aproximadamente 4 °C por 15 h para precipitação do EPS. O EPS precipitado foi recolhido por centrifugação a 4000 x g durante 20 min e procedeu-se a secagem em estufa a 50 °C (Modelo Luca 223, Lucadema / Brasil).

2.3.2 Determinação da atividade proteolítica

Os isolados de BAL foram plaqueados em ágar-leite para avaliar sua atividade proteolítica. O meio foi preparado pela adição de 1% de leite em pó desnatado ao meio Plate Count Agar (Himedia, Índia) (Beerens *et al.*, 1990). As placas foram incubadas a 7 °C por 10 dias e 37 °C por 48 h. As colônias transparentes formadoras de halo foram consideradas positivas para a atividade proteolítica.

2.3.3 Determinação da capacidade de autoagregação

A determinação da capacidade de autoagregação foi realizada de acordo com o método descrito por Xu *et al.* (2009) com modificações. Células bacterianas recém cultivadas foram centrifugadas a $6000 \times g$ durante 10 minutos em temperatura ambiente a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Modelo: 5430R, Eppendorf, Alemanha). O sedimento celular foi lavado duas vezes com solução tampão de fosfato (PBS) [82,0 g de NaCl (Vetec, Brasil), 10,5 g de Na_2HPO_4 (Vetec, Brasil), 3,55 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}$ (Vetec, Brasil) e completar para 1 L de água destilada] em pH 7,4, ressuspensionado novamente em PBS até atingir a absorbância de $0,5 \pm 0,02$ a 600 nm (A 0 h). Em seguida, cada suspensão bacteriana (2 mL) foi agitada em agitador do tipo vórtex (Modelo: EEQ 9033, Edutec, Brasil) durante 10 s e incubada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 h. Após a incubação, 1 mL do sobrenadante foi retirado para medir a absorbância a 600 nm (A 2 h). A porcentagem de autoagregação foi expressa como:

$$1 - (A\ 2\ h / A\ 0\ h) \times 100$$

2.3.4 Determinação da produção de Gás

A produção de gás a partir de glicose foi avaliada empregando caldo MRS acrescentado 3% de glicose em tubos de ensaio contendo tubos de Durham invertidos de acordo com o método de Cai *et al.* (1999).

2.3.5 Determinação da viabilidade dos isolados de BAL sob condições gastrointestinais simuladas

A determinação da viabilidade dos isolados de BAL sob condições gastrointestinais simuladas seguiu as metodologias adotadas por Vinderola *et al.* (2008) e Buriti *et al.* (2010), com modificações. Os isolados de BAL foram ativados e re-cultivados por dois dias consecutivos. O último repique foi realizado em tubo de centrífuga tipo falcon com 20 mL do mesmo meio. Após o período de incubação, os cultivos foram centrifugados a $2750 \times g$ por 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspensionado em 2 mL de água peptonada 0,1% (m/v) (Himedia, Índia) padronizado em densidade óptica de 0,9 na absorbância de 625 nm e a viabilidade celular foi avaliada utilizando diluição decimal seriada e plaqueamento em superfície em meio de cultura ágar MRS (Himedia, Índia). Foram inoculados 5%

(v/v) de cada cultura em 10 mL do suco gástrico (solução ácida com pH 3,35 - ajustado com HCl 1M estéril - mais pepsina 3 g/L) e os frascos contendo essa solução inicial foram incubados a 37 °C por 2 h com agitação a 150 rpm (fase gástrica) (incubadora de bancada com agitação, modelo Luca 223, Lucadema / Brasil). Após este período, foi retirada uma alíquota de 1 mL para avaliar a viabilidade celular e o pH da solução foi alterado para 5,2 (solução contendo 150 mL de NaOH 1 M mais 14g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por litro). Os sais de bile (10 g/L) e pancreatina (1 g/L) foram adicionados e as soluções foram incubadas a 37 °C por 2 h sob agitação (fase entérica 1). Passando-se o período de incubação, novamente uma alíquota da solução foi retirada para avaliação da viabilidade celular conforme descrito anteriormente e o pH foi ajustado para a faixa de 6,7 a 7,1, ajustando-se também as concentrações de sais de bile e pancreatina de acordo com o novo volume obtido. A solução foi novamente incubada nas mesmas condições iniciais, totalizando 6 h de incubação sob agitação (fase entérica 2) e a viabilidade celular foi novamente avaliada. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram analisados por ANOVA e teste de Tukey.

2.3.6 Determinação da atividade antimicrobiana dos isolados de BAL frente a micro-organismos de interesse na saúde bucal

Micro-organismos probióticos podem ter uma importante atividade anticariogênica devido à capacidade de inibição de micro-organismos causadores da cárie. Logo, alimentos probióticos podem ser uma opção para a saúde oral. A determinação da atividade antimicrobiana frente a bactérias cariogênicas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 14506, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 14506, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522, foi realizada através do teste “spot on the lawn” adaptado de Van Reenen *et al.* (1998). Os isolados de *Weissella cibaria* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* foram ativadas em caldo MRS com incubação por 18 a 24 h a 37 °C. Paralelamente, as cepas cariogênicas foram reativadas em caldo BHI durante 18 a 24 h a 37°C e posteriormente padronizadas com densidade óptica de 0,9. Foram preparadas placas de ágar BHI contendo cada uma das bactérias cariogênicas padronizadas a fim de atingirem viabilidade de 8 Log UFC/mL, que após solidificação receberam uma sobrecamada de 8 mL de MRS e, posteriormente, uma gota de 20 µL de cada BAL, e foram incubadas a 37 °C por 24 h em aerobiose, exceto aquelas contendo *S. mutans* que foram incubadas em anaerobiose. A inibição da

multiplicação das bactérias cariogênicas foi observada através da formação de zonas de inibição (halos) ao redor da gota e seus diâmetros foram medidos com paquímetro em mm. Foram considerados com atividade antimicrobiana os halos com diâmetro ≥ 6 mm.

3 Resultados e Discussão

3.1 Determinação dos fatores de virulência

Todos os isolados de BAL avaliados atenderam ao requisito de segurança pela ausência de atividade β -hemolítica conforme previamente reportado por Angmo *et al.* (2016). Além disso, os isolados também não produziram as enzimas gelatinase e coagulase relacionadas à virulência. *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. e *Weissella* spp. não foram reportadas previamente como produtoras de β -hemólise. Saelim *et al.* (2017) não encontraram nenhum tipo de atividade hemolítica, seja alfa ou beta, em *L. plantarum* S0/7, tão pouco em nove cepas de *Weissella* (Jeong e Lee, 2015). A utilização de *L. plantarum* em produtos com alegações probióticas está amplamente disseminada em âmbito comercial, como exemplo, Syntol AMD, Pro-Bio, Probiotic 10. Isto se deve ao fato da atividade hemolítica ser considerada requisito para classificação de bactérias como GRAS conforme EFSA (European Food Safety Authority) (Lee *et al.*, 2014).

A avaliação da sensibilidade a antibióticos de isolados de BAL candidatos para uso probiótico é essencial, pois podem ser hospedeiros de genes de resistência a antibióticos e possibilitar sua transferência para bactérias patogênicas (Danielsen e Wind, 2003; De Almeida Júnior *et al.*, 2015). Todos os isolados de BAL avaliados neste estudo foram considerados sensíveis aos antibióticos ampicilina, gentamicina, cloranfenicol, tetraciclina e clindamicina (Tabela 1). De fato, vários estudos demonstraram que as BAL são frequentemente sensíveis a diversos antibióticos (Angmo *et al.*, 2016; García-Hernández *et al.*, 2016; Andrade *et al.*, 2014). Ren *et al.* (2013) observaram sensibilidade de cepas de *Lactobacillus* spp. a tetraciclina, clindamicina, estreptomicina, ampicilina, gentamicina, cloranfenicol, eritromicina e penicilina. Costa *et al.* (2013) também relataram a sensibilidade de BAL (*Weissella paramesenteroides* e quatro espécies de *Lactobacillus* - *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* e *L. hilgardii*) frente à tetraciclina. Cepas de *Weissella* spp. foram susceptíveis a ampicilina, cloranfenicol, eritromicina e tetraciclina (Jeong e Jee, 2015). Entretanto, há relatos de que cepas *Lactobacillus* spp. podem ser comumente

resistentes antibióticos como o cloranfenicol (Argyri, *et al.*, 2013; Belletti *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2014). Além disso, registrou-se a resistência de isolados desse mesmo gênero frente a gentamicina, tetraciclina e ampicilina (Argyri *et al.*, 2013).

3.2 Produção de EPS e atividade proteolítica

A cepa DF60Mi foi o único isolado capaz de produzir esse metabólito secundário, no entanto nenhum dos isolados apresentou atividade proteolítica. As bactérias lácticas normalmente não são proteolíticas, mas agem como tal quando tem limitado teor de nutrientes ou baixo poder de síntese de aminoácidos, sendo necessário um suprimento extra (Tavares *et al.*, 2009). Apesar dessas bactérias não serem fortemente proteolíticas, a atividade proteolítica é essencial para favorecer a multiplicação das BAL no leite e permitir o desenvolvimento do *flavor* em derivados lácteos (Lopez-Kleine e Monnet, 2011; De Almeida Júnior *et al.*, 2015). Por outro lado, embora não se tenha observado a presença de atividade proteolítica em nenhum dos isolados estudados, de acordo com Fujimoto (2011) esta não é uma atividade desejável para aplicação desses micro-organismos em alguns queijos, a exemplo do queijo de coalho, pois atua na fragilização da rede proteica do queijo, contribuindo para o aumento da capacidade de derretimento do mesmo, o que se constitui em uma característica indesejável para esse tipo de queijo.

A produção de EPS pode apresentar importância significativa dentre os micro-organismos candidatos a probióticos (Schiavao-Souza *et al.*, 2007; Angmo *et al.*, 2016; Abushelaibi *et al.*, 2017). Patel *et al.* (2014) reportaram dezessete isolados candidatos a probióticos como produtores de EPS e dotados de atividade antagonística frente micro-organismos Gram positivos e patógenos Gram negativos, dentre eles espécies como *Lactobacillus plantarum* 86 e *Weissella cibaria* 92, pertencentes às mesmas espécies que os isolados testados DF60Mi e LS1, respectivamente, os quais também apresentaram atividade anti-*Listeria monocytogenes* previamente identificada (resultados não apresentados).

3.3 Capacidade de Autoagregação

Outro ponto importante é a autoagregação de BAL. A autoagregação de micro-organismos está relacionada com a capacidade de adesão ao epitélio intestinal, sendo então, um importante requisito para que os mesmos possam integrar-se à microbiota intestinal, e conseqüentemente sejam capazes de proteger o trato gastrointestinal do

hospedeiro por competição com patógenos e ação imunomoduladora. Portanto, a capacidade de autoagregação pode ser utilizada como um dos parâmetros para selecionar uma bactéria com potencial probiótico (Xu *et al.*, 2010).

Os cinco isolados testados apresentaram percentuais elevados de autoagregação, variando de $84,24 \pm 3,77$ % a $93,38 \pm 0,06$ % (Tabela 2). Resultados semelhantes foram observados para *Lactobacillus* spp com propriedades benéficas e características probióticas (Todorov *et al.*, 2008; Todorov *et al.*, 2011). Contrariamente, Espeche *et al.* (2012) relataram baixos percentuais (0-14 %) de autoagregação em 43 isolados de BAL de leite cru.

3.4 Produção de Gás

Quanto a produção de gás, nenhum dos isolados estudados apresentou capacidade de produção de gás a partir da glicose, apresentando, portanto, metabolismo homofermentativo. Algumas espécies homofermentativas obrigatórias já foram testadas para serem utilizadas como probióticos em humanos: *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovarus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* (Ferreira, 2012). Contrariamente, De Almeida Júnior *et al.* (2015) encontraram 12 % dos isolados de BAL com capacidade de produção de gás. A produção de gás por BAL pode ser tecnologicamente necessária em alguns produtos como o kefir e alguns queijos com olhaduras (Leite *et al.*, 2013; Pedersen *et al.*, 2013) ou indesejável em outros (Franciosi *et al.*, 2009). Assim, os isolados estudados poderão vir a ser empregados como probióticos em co-cultura com outras cepas de interesse na fabricação de diversos produtos lácteos.

3.5 Viabilidade de cepas de BAL sob condições gastrointestinais simuladas

É extremamente importante que bactérias com potencial probiótico sejam capazes de tolerar estresses ácidos e biliares, visto que a capacidade do probiótico sobreviver, em números adequados, após estar sujeito à acidez gástrica (pH baixo) e condição intestinal (sais biliares), é importante para aplicação na indústria de alimentos (Chalas *et al.*, 2016).

A viabilidade inicial dos cinco isolados de BAL apresentou comportamento semelhante (Figura 1), decrescendo após 2 h de incubação a 37 °C sob condição ácida (fase gástrica). Os isolados LS2, LS3 e DF04Mi, apresentaram maior resistência à condição severa de acidez quando comparados com os demais. A viabilidade celular diminuiu ao longo das 6 h de incubação. Os isolados DF04Mi e DF60Mi apresentaram maior resistência após 4 h e 6 h de incubação sob as mesmas condições de

temperatura e agitação, quando comparados com LS1, LS2 e LS3. As tolerâncias ácidas e biliares de todos os isolados variaram ($P < 0,01$). Tal fato pode estar ligado à necessidade de tensão de oxigênio de cada espécie, conforme já relatado por Montville e Matthews, (2013). Dubey e Jeevaratnam, (2015) e Das *et al.* (2016) estudaram bactérias lácticas para caracterização probiótica que apresentaram resistências ao ambiente ácido significativas e semelhantes aos resultados encontrados neste estudo. Por outro lado, Angmo *et al.* (2016) relataram variabilidade significativa quanto à sobrevivência de bactérias lácticas expostas ao suco gástrico em condições simuladas *in vitro*, mas de pouco ou nenhum impacto na viabilidade da maioria das cepas estudadas, sendo *L. casei* a mais tolerante dentre todas as BAL isoladas.

Abuhelabi *et al.* (2017) observaram que isolados de BAL selecionados de leite de camela apresentaram características probióticas, em especial *L. plantarum* KX881779 e *Lactococcus lactis* KX881782 com grande potencial para serem utilizados em alimentos. Os resultados foram equivalentes ao identificado neste estudo, em que os melhores potenciais probióticos foram os isolados DF60Mi e DF04Mi, ambos das espécies *L. plantarum* spp. e *Lactococcus lactis* spp., respectivamente.

3.6 Atividade antimicrobiana frente a micro-organismos de interesse na saúde bucal

Dentre os isolados testados, identificou-se que tanto LS2 quanto DF04Mi, ambos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, apresentaram atividade antimicrobiana frente a *S. mutans* (Tabela 3), apresentando halos com diâmetro de 10 mm e 13 mm, respectivamente. Schwendicke *et al.* (2017), reportaram algumas bactérias lácticas probióticas com atividade antimicrobiana e inibição da formação de biofilme formado por *S. mutans*. Entretanto, outros estudos tanto *in vitro* como clínicos têm produzido resultados ambíguos em relação aos benefícios ou riscos associados à prevenção de cárie via utilização de bactérias lácticas probióticas. Enquanto alguns estudos relataram redução da viabilidade de bactérias cariogênicas após testes com bactérias probióticas (Laleman *et al.*, 2014; Gruner *et al.*, 2016), outros não confirmam tais efeitos (KELLER *et al.*, 2012; Martinen *et al.* 2012; Taipale *et al.*, 2012). Isso provavelmente ocorre devido ao desconhecimento dos mecanismos exatos de interferência das bactérias lácticas probióticas no processo de formação da cárie (Lang *et al.*, 2010). Assim, outros estudos clínicos devem ser desenvolvidos para avaliar com segurança que as bactérias testadas tenham realmente atividade inibitória frente à cárie produzida por *S. mutans*.

4. Conclusão

Os isolados selecionados do leite de cabra apresentaram características potencialmente probióticas de acordo com os resultados de segurança e funcionalidade relatados. *L. plantarum* (DF60Mi) e *Lactococcus lactis* (DF04Mi), particularmente, possuem potencial para serem possivelmente utilizados em alimentos devido à resistência gástrica e entérica apresentada em condições do TGI simuladas, além de não apresentarem características de virulência como os demais micro-organismos estudados. LS2 e DF04Mi, ambos *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, merecem destaque por demonstrarem atividade antimicrobiana frente a *S. mutans*, micro-organismo recorrente em patologias bucais, principalmente a cárie, podendo serem estudados posteriormente quanto aos benefícios que podem promover à saúde bucal. Novos estudos se fazem necessários para explorar o uso dessas bactérias isoladas de leite caprino de duas regiões do Brasil potencialmente probióticas, na fermentação de alimentos.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Agência Federal de Apoio e Avaliação da Formação de Pós-Graduação (CAPES) pelas bolsas concedidas, ao Professor Dr. Fábio Correia Sampaio e equipe do Laboratório de Biologia Bucal, à Professora Doutora Bernadette D.G. M. Franco e Danielle Nader Furtado pelo auxílio nos estudos da ação antimicrobiana na saúde bucal e uso dos isolados de BAL (DF04Mi e DF60Mi), respectivamente.

Referências

- Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N. P., & Ayyash, M. 2017. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT-Food Science and Technology*, 79: 316-325.
- Andrade, C. R. G., Souza, M. R., Penna, C. F. A. M., Acurcio, L. B., Sant'Anna, F. M., Castro, R. D., Oliveira, D. L. S. 2014. Propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra-MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66(5): 1592-1600.
- Angmo, K., Kumari, A., Bhalla, T. C. 2016. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT-food Science and Technology*, 66: 428-435.
- Argyri, A. A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., Tassou, C. C. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food microbiology*, 33(2): 282-291.

Beerens, H., Luquet, F. M., Oria Almudí, R. M. 1990. Guía práctica para el análisis microbiológico de la leche y los productos lácteos/Guide pratique d'analyse microbiologique des laits des produits laitiers.

Belletti, N., Gatti, M., Bottari, B., Neviani, E., Tabanelli, G., Gardini, F. 2009. Antibiotic resistance of *Lactobacilli* isolated from two Italian hard cheeses. *Journal of food protection*, 72(10): 2162-2169.

Buriti, F. C., Castro, I. A., Saad, S. M. 2010. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2-3): 121-129.

Cai, Y., Suyanandana, P., Saman, P., Benno, Y. 1999. Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. *The Journal of general and applied microbiology*, 45(4): 177-184.

Camargo, C. H., Bruder-Nascimento, A., Lee, S. H. I., Fernandes Júnior, A., Kaneno, R., Rall, V. L. M. 2014. Prevalence and phenotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated from food in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1): 111-115.

Chalas, R., Janczarek, M., Bachanek, T., Mazur, E., Cieszko-Buk, M., Szymanska, J. 2016. Characteristics of oral probiotics—a review. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 29(1): 8-10.

Costa, H. H. S., Souza, M. R., Acúrcio, L. B., Cunha, A. F., Resende, M. F. S., Nunes, Á. C. 2013. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from minas artisanal cheese from Serra da Canastra, MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65(6): 1858-1866.

Danielsen, M., Wind, A. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International journal of food microbiology*, 82(1): 1-11.

Das, P., Khowala, S., Biswas, S. 2016. In vitro probiotic characterization of *Lactobacillus casei* isolated from marine samples. *LWT-Food Science and Technology*, 73: 383-390.

de Almeida Júnior, W. L. G., da Silva Ferrari, Í., de Souza, J. V., da Silva, C. D. A., da Costa, M. M., Dias, F. S. 2015. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. *Food control*, 53: 96-103.

De Lima, E. D. L. C., de Moura Fernandes, J., Cardarelli, H. R. 2017. Optimized fermentation of goat cheese whey with *Lactococcus lactis* for production of antilisterial bacteriocin-like substances. *LWT-Food Science and Technology*, 84: 710-716.

Dela Cruz, T. E. E., Torres, J. M. O. 2012. Gelatin hydrolysis test protocol.

Dubey, A. K., Jeevaratnam, K. 2015. Probiotic Screening of *Lactobacilli* Isolates from Uttapam Batter Fermented Supplementing with Piper betle L. Leaves. *Advances in Microbiology*, 5(13): 858.

Eaton, T. J., Gasson, M. J. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and environmental microbiology*, 67(4): 1628-1635.

Espeche, M. C., Pellegrino, M., Frola, I., Larriestra, A., Bogni, C., Nader-Macías, M. F. 2012. Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. *Anaerobe*, 18(1): 103-109.

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, 10(6): 2740.

FAO/WHO. 2002. FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Geneva, Swittherland: World Health Organization.

Ferreira, C. L. D. L. F. 2012. Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção. Editora Rubio.

Franciosi, E., Settanni, L., Cavazza, A., Poznanski, E. 2009. Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cows' milk. *International dairy journal*, 19(1): 3-11.

Fujimoto, G. 2011. Estudo de fatores de virulência e propriedades tecnológicas de culturas de *Enterococcus* spp isoladas de queijo de coalho.

Furtado, D. N., Todorov, S. D., Landgraf, M., Destro, M. T., Franco, B. D. 2014. Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DF04Mi isolated from goat milk: characterization of the bacteriocin. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(4): 1541-1550.

García-Hernández, Y., Pérez-Sánchez, T., Boucourt, R., Balcázar, J. L., Nicoli, J. R., Moreira-Silva, J., Halaihel, N. 2016. Isolation, characterization and evaluation of probiotic lactic acid bacteria for potential use in animal production. *Research in veterinary science*, 108:125-132.

Gruner, D., Paris, S., Schwendicke, F. 2016. Probiotics for managing caries and periodontitis: Systematic review and meta-analysis. *Journal of dentistry*, 48: 16-25..

Gútiéz, L., Gómez-Sala, B., Recio, I., del Campo, R., Cintas, L. M., Herranz, C., Hernández, P. E. 2013. *Enterococcus faecalis* strains from food, environmental, and clinical origin produce ACE-inhibitory peptides and other bioactive peptides during growth in bovine skim milk. *International journal of food microbiology*, 166(1): 93-101.

Jeong, D. W., Lee, J. H. 2015. Antibiotic resistance, hemolysis and biogenic amine production assessments of *Leuconostoc* and *Weissella* isolates for kimchi starter development. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2): 1078-1084.

Keller, M. K., Hasslöf, P., Dahlén, G., Stecksén-Blicks, C., Twetman, S. 2012. Probiotic supplements (*Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and ATCC PTA 5289) do not affect regrowth of mutans streptococci after full-mouth disinfection with chlorhexidine: a randomized controlled multicenter trial. *Caries research*, 46(2): 140-146.

Khan, U. S. 2014. Probiotics in dairy foods: a review. *Nutrition & Food Science*, 44(1): 71-88.

Laleman, I., Dettailleur, V., Slot, D. E., Slomka, V., Quirynen, M., Teughels, W. 2014. Probiotics reduce mutans streptococci counts in humans: a systematic review and meta-analysis. *Clinical oral investigations*, 18(6): 1539-1552.

Lang, C., Böttner, M., Holz, C., Veen, M., Ryser, M., Reindl, A., Tanzer, J. M. 2010. Specific *Lactobacillus/mutans streptococcus* co-aggregation. *Journal of dental research*, 89(2): 175-179.

Lee, N. K., Kim, S. Y., Han, K. J., Eom, S. J., Paik, H. D. 2014. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with anti-allergic effects from kimchi for yogurt starters. *LWT-Food Science and Technology*, 58(1): 130-134.

Leite, A. M. O., Leite, D. C. A., Del Aguila, E. M., Alvares, T. S., Peixoto, R. S., Miguel, M. A. L., Paschoalin, V. M. F. 2013. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. *Journal of dairy science*, 96(7): 4149-4159.

Liu, J., Luo, J., Ye, H., Sun, Y., Lu, Z., Zeng, X. 2009. Production, characterization and antioxidant activities in vitro of exopolysaccharides from endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. *Carbohydrate polymers*, 78(2): 275-281.

Lopez-Kleine, L., Monnet, V. 2011. *Lactic Acid Bacteria| Proteolytic Systems*.

Martinen, A., Haukioja, A., Karjalainen, S., Nylund, L., Satokari, R., Öhman, C., Söderling, E. 2012. Short-term consumption of probiotic *Lactobacilli* has no effect on acid production of supragingival plaque. *Clinical oral investigations*, 16(3): 797-803.

Montville, T. J., Matthews, K. R. 2013. Physiology, growth, and inhibition of microbes in foods. In *Food Microbiology American Society of Microbiology*, 13-18.

Moraes, P. M., Perin, L. M., Todorov, S. D., Silva, A., Franco, B. D. G. M., Nero, L. A. 2012. Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 113(6): 1564-1564.

Patel, A., Prajapati, J. B., Holst, O., Ljungh, A. 2014. Determining probiotic potential of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from vegetables and traditional Indian fermented food products. *Food Bioscience*, 5: 27-33.

Pedersen, T. B., Ristagno, D., McSweeney, P. L. H., Vogensen, F. K., & Ardö, Y. 2013. Potential impact on cheese flavour of heterofermentative bacteria from starter cultures. *International Dairy Journal*, 33(2): 112-119.

Ren, D., Li, C., Qin, Y., Yin, R., Du, S., Ye, F., Sun, Y. 2014. In vitro evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. *Anaerobe*, 30: 1-10.

Saelim, K., Jampaphaeng, K., Maneerat, S. 2017. Functional properties of *Lactobacillus plantarum* S0/7 isolated fermented stinky bean (Sa Taw Dong) and its use as a starter culture. *Journal of Functional Foods*, 38: 370-377.

Sah, B. N. P., Vasiljevic, T., McKechnie, S., Donkor, O. N. 2014. Effect of probiotics on antioxidant and antimutagenic activities of crude peptide extract from yogurt. *Food chemistry*, 156: 264-270..

Schiavao-Souza, T. D., Yuhara, T. T., Castro-Gómez, R. J. H., Garcia, S. 2007. Produção de exopolissacarídeos por bactérias probióticas: otimização do meio de cultura. *Brazilian Journal of Food Technology*, 10(1): 27-34.

Schwendicke, F., Korte, F., Dörfer, C. E., Kneist, S., El-Sayed, K. F., Paris, S. 2017. Inhibition of *Streptococcus mutans* growth and biofilm formation by probiotics In Vitro. *Caries research*, 51(2): 87-95.

Taipale, T., Pienihäkkinen, K., Salminen, S., Jokela, J., Söderling, E. 2012. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 administration in early childhood: a randomized clinical trial of effects on oral colonization by mutans streptococci and the probiotic. *Caries research*, 46(1): 69-77.

Tavares, V. B., Pinto, J. C., Evangelista, A. R., Figueiredo, H. C. P., Ávila, C. L. D. S. 2009. Effects of different compaction degrees, inclusion of absorbent additive and wilting on the chemical composition of tanzania grass silages. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38(1): 40-49.

Todorov, S. D., Botes, M., Guigas, C., Schillinger, U., Wiid, I., Wachsman, M. B., Dicks, L. M. T. 2008. Boza, a natural source of probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 104(2): 465-477.

Todorov, S. D., Furtado, D. N., Saad, S. M. I., Tome, E., Franco, B. D. G. M. 2011. Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. *Journal of Applied Microbiology*, 110(4): 971-986.

Van Reenen (1998). Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 84(6): 1131-1137.

Vijaya K, B. V., Vijayendra, S. V. N., Reddy, O. V. S. 2015. Trends in dairy and non-dairy probiotic products-a review. *Journal of food science and technology*, 52(10): 6112-6124.

Vinderola, G., Capellini, B., Villarreal, F., Suárez, V., Quiberoni, A., Reinheimer, J. 2008. Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *LWT-Food Science and Technology*, 41(9): 1678-1688.

Wadström, T., Andersson, K., Sydow, M., Axelsson, L., Lindgren, S., Gullmar, B. 1987. Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *Journal of Applied Bacteriology*, 62(6): 513-520.

Xu, H., Jeong, H. S., Lee, H. Y., & Ahn, J. 2009. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Letters in applied microbiology*, 49(4): 434-442.

Xu, Z., Li, L., Shirtliff, M. E., Peters, B. M., Peng, Y., Alam, M. J., Shi, L. 2010. First report of class 2 integron in clinical *Enterococcus faecalis* and class 1 integron in *Enterococcus faecium* in South China. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 68(3): 315-317.

Tabela 1. Sensibilidade das cepas de BAL a antibióticos

CEPA	ANTIBIÓTICOS				
	AMP	GENT	CLO	TET	CLI
LS1	MS	S	S	S	S
LS2	MS	S	S	MS	S
LS3	MS	S	S	MS	S
DF04Mi	MS	S	S	S	S
DF60Mi	MS	S	MS	S	MS

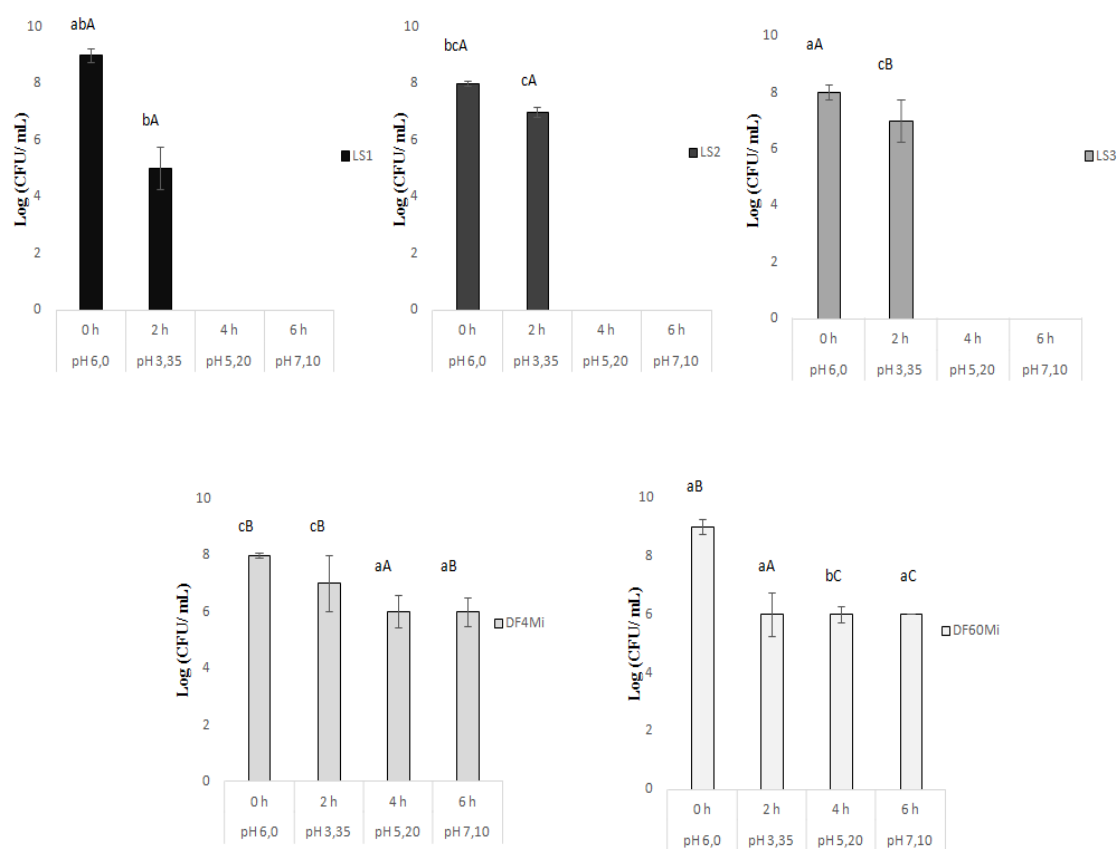
Fonte própria. AMP: ampicilina (10 µg); GENT: Gentamicina (10 µg); CLO: cloranfenicol (30 µg); TET: tetraciclina (30 µg) CLI: clindamicina (2 µg); S: sensível, zona de inibição ≥ 15 mm para GENT, ≥ 18 mm para CLO, ≥ 19 mm para TET, ≥ 14 mm para CLIN e AMP; MS: Muito sensível, com zona de inibição ≥ 22 mm.

Tabela 2. Capacidade de autoagregação de BAL

Cepa	Espécie	Autoagregação %
LS1	<i>Weissella cibaria</i>	91,47 ± 0,85
LS2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	89,68 ± 2,62
LS3	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	93,38 ± 0,06
DF04Mi	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	89,68 ± 3,39
DF60Mi	<i>Lactobacillus plantarum</i>	84,24 ± 3,77

Fonte própria. Porcentagem de autoagregação expresso em média ± desvio padrão, n=3.

Figura 1. Resistências de BAL a condições simuladas do trato gastrointestinal (TGI).



Fonte Própria. ^{a-b} Médias seguidas por diferentes letras minúsculas diferem estatisticamente ao longo do tempo para o mesmo isolado (teste Tukey, $P < 0,01$); ^{A-C} Médias seguidas por diferentes letras maiúsculas diferem estatisticamente entre os isolados para cada tempo (teste de Tukey, $P < 0,01$).

Tabela 3. Atividade antimicrobiana frente a micro-organismos de interesse na saúde bucal

Atividade Antimicrobiana						
Isolados	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. faecalis</i> ATCC 14506	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	<i>S. aureus</i> ATCC 14506	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 29522
LS1	-	-	-	-	-	-
LS2	-	-	+	-	-	-
LS3	-	-	-	-	-	-
DF04Mi	-	-	+	-	-	-
DF60Mi	-	-	-	-	-	-

Fonte própria. (-) sem inibição, (+) inibição positiva

Artigo 3: CARACTERIZAÇÃO DE EXOPOLISSACARÍDEO PRODUZIDO POR
Lactobacillus plantarum DF60Mi

Caracterização de Exopolissacarídeo produzido por *Lactobacillus plantarum* DF60Mi

**LILIANE ANDRADE DA SILVA¹, JOSÉ HONÓRIO PEREIRA LOPES NETO¹,
KEROLAYNE SANTOS LEITE², VILMA BARBOSA DA SILVA ARAÚJO¹,
EVANDRO FERREIRA DA SILVA³, SÓCRATES GOLZIO DOS SANTOS³,
BERNADETE DORA GOMBOSSY DE MELO FRANCO⁴, HAÍSSA ROBERTA
CARDARELLI⁵**

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.

²Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil

³Pós Graduação em Produtos Bioativos Naturais e Sintéticos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil

⁴Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, São Paulo, Brasil

⁵Departamento de Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil

* Autor correspondente: Departamento de Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional, Universidade Federal da Paraíba, Avenida dos Escoteiros, s/n, Mangabeira VII, Distrito de Mangabeira, João Pessoa, Paraíba, 58055-000, Brazil

Tel: +55 83 32167947, E-mail: hrcarda@gmail.com

Agradecimentos

Os autores agradecem à Agência Federal de Apoio e Avaliação da Formação de Pós-Graduação (CAPES) pelas bolsas concedidas. A Professora Doutora Marta Maria da Conceição e Danielle Nader Furtado pelo apoio com o desenvolvimento da pesquisa.

Resumo

Lactobacillus plantarum DF60Mi é uma cepa produtora de exopolissacarídeos (EPS) isolada de leite de cabra com propriedades promissoras para possível utilização na indústria de alimentos. O objetivo do presente estudo foi caracterizar a estrutura de EPS sintetizados por esta cepa cultivada em leite desnatado adicionado de glicose e outro com sacarose. *L. plantarum* produziu heteropolissacarídeo composto principalmente por glicose com resíduos de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucose e com peso molecular em torno de 10^4 Da em ambos os meios. Foi possível evidenciar perda de massa dos EPS associada à decomposição térmica na faixa de 250 a 390 °C. Os sinais obtidos pela análise de espectroscopia de infravermelho e os picos obtidos e identificados pela análise de espectrometria de massas são bastante semelhantes a aqueles obtidos para moléculas caracterizadas como glucanos. Além disso, há evidências da presença de um polissacarídeo com ligações alfa a partir da identificação das bandas 1077, 954 e 942 cm^{-1} na análise de espectroscopia de infravermelho, e, portanto, os dois extratos de EPS (LRS e LRG) são provavelmente heteropolissacarídeos α -D-glucanos.

Palavras-chave: EPS, leite de cabra, heteropolissacarídeo e α -D-glucanos.

1. Introdução

Algumas cepas de bactérias lácticas possuem a capacidade de produzir exopolissacarídeos (EPS). Tal funcionalidade tem representado grande interesse para a indústria de alimentos, pois essas moléculas que são secretadas para o meio físico, e que variam de acordo com a massa molecular, estrutura e composição, vêm apresentando papel importante no que diz respeito à reologia e textura de produtos fermentados. Além disso, alguns EPS podem promover atividade antimicrobiana e antioxidante, imunomoduladora antitumoral e efeitos prebióticos (KORAKLI et al., 2002; WERNING et al., 2012; HIDALGO-CANTABRANA et al., 2012; IBARBURU et al., 2015).

Os EPS são caracterizados como biopolímeros de grau alimentício obtidos de fontes naturais que podem permanecer ligados à superfície da célula (capsular) ou podem ser liberados para o meio de cultura. Geralmente são caracterizados como

polissacarídeos de alto peso molecular com funcionalidade relacionada a diferenças estruturais nas subunidades de açúcar. Tal característica é a razão da diversidade entre o EPS bacteriano e as novas estruturas de EPS produzidos por BAL (PATTEN e LAWS, 2015; GANGOITI et al., 2017).

EPS produzidos por BAL são de grande interesse para indústria de alimentos, pois várias espécies de BAL são reconhecidas como seguras por órgãos internacionais. Os EPS bacterianos são classificados como homopolissacarídeos (HoPSs), consistindo em apenas de um tipo de monossacarídeo e heteropolissacarídeos (HePSs) formados por dois ou mais tipos de monossacarídeos (De Vuyst e Degeest, 1999). São relatados HePSs compostos de diferentes tipos de monossacarídeos e seus derivados (glicose, galactose, ramnose, manose, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, ácido glucurônico), massa molecular e estrutura, cuja produção pode ser influenciada pelas condições da cultura microbiana produtora (DE VUYST et al., 2001; MOZZI et al., 2003 IBARBURU et al., 2015).

O gênero *Lactobacillus* representa o maior sub-grupo dentro do grupo das bactérias ácido láticas e constitui também a microbiota predominante em produtos fermentados (IBARBURU et al., 2015). *Lactobacillus plantarum* é um micro-organismo com potencial de produção de EPS que pode ser encontrado em uma ampla gama de habitats: alimentos, como laticínios e carnes; e plantas, e pode atingir altas densidades de células, que são desejáveis para aplicações industriais. Diferentes cepas de *L. plantarum* são capazes de produzir heteropolissacarídeos após a multiplicação em glicose (WANG et al., 2010; ZHANG et al., 2013; DILNA et al., 2015; ZHANG, LIU, TAO, & WEI, 2016). homopolissacarídeos quando a lactose é a única fonte de açúcar (WANG et al., 2014), ou glucanos quando a sacarose é o açúcar (DAS e GOYAL, 2014). Algumas cepas de *L. plantarum* produzem EPS benéficos para a saúde e pode-se mencionar atividade antioxidante (ZHANG et al., 2013), atividade antagonica contra a enterotoxina de *Bacillus cereus* (ZHANG et al., 2016), e atividade antitumoral (WANG et al., 2014). Este estudo teve como objeto caracterizar o EPS produzido por *Lactobacillus plantarum* DF60Mi, vislumbrando possível aplicação na indústria alimentar.

2. Materiais e Métodos

2.1 Micro-organismo

A cultura de *L. plantarum* DF60Mi isolada anteriormente, identificada pela fração 16S do rRNA e com atividade anti-*Listeria monocytogenes* relatada por Furtado et al., 2014, foi utilizada para a produção de EPS. O micro-organismo estocado em glicerol (20% v / v) foi reativado em caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS) durante 24 h a 30 °C.

2.2 Meio de produção do EPS e condições de cultivo

Adicionou-se 1 % (v/v) da cultura (incubada anteriormente em MRS durante 24 h a 30 °C) em 50 mL de meio reconstituído (5 g de leite em pó desnatado com 1 g de glicose [LRG] ou com 1 g de sacarose [LRS]) e incubou-se durante 18-24 h a 30 °C sob rotação de 150 rpm (Modelo Luca 223, Lucadema / Brasil).

2.3 Extração e purificação de EPS

O meio incubado foi centrifugado 8000 $\times g$ (Modelo: 5430R, Eppendorf, Hamburg, Germany) durante 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi recolhido. Adicionou-se três vezes do volume de etanol ao sobrenadante e manteve-se a incubação por 15 h a 4 °C para precipitação do EPS. O EPS precipitado foi recolhido por centrifugação a 4000 $\times g$ durante 20 min a 4 °C e procedeu-se a secagem em estufa a 50 °C (Modelo Luca 223, Lucadema / Brasil), para a evaporação do etanol em excesso. Seguiu-se o processo de diálise em temperatura ambiente (25°C) empregando membrana de celulose de 12-14 kDa (Sigma) durante 24 h, sendo realizadas três trocas de água destilada. O EPS purificado passou por novo processo de secagem em estufa, sob as mesmas condições citadas anteriormente e foi reservado para ser utilizado em determinações analíticas posteriores.

2.4 Caracterização Estrutural de EPS

2.4.1 Análise Termogravimétrica

O comportamento térmico do EPS foi estudado através da análise termogravimétrica usando o analisador térmico (Modelo TGA-60H, Shimadzu, Japão). Cada amostra de EPS contendo 20 mg, foi submetida a uma faixa de temperatura variando de 30 e 500 °C, em cadinho de alumina sob atmosfera de nitrogênio, a uma

razão de aquecimento de 10 °C / minuto e determinou-se a perda de massa correspondente.

2.4.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os resultados de espectroscopia na região do infravermelho foram obtidos utilizando o espectrofotômetro Shimadzu (IR Prestige-21, EUA). As amostras secas e pulverizadas dos extratos de EPS (LRS e LRG) foram prensadas para formar pastilhas de cerca de 1 cm de diâmetro com uma composição de aproximadamente 1:100 (mg) de amostra e brometo de potássio (KBr), sendo realizada no modo de transmitância na região do infravermelho médio (4000 a 400 cm^{-1}) com uma resolução de 4 cm^{-1} .

2.4.3 Análise de carboidratos por espectrometria de massas

As análises por espectrometria de massas foram realizadas no equipamento MALDI-TOF Autoflex Speed L (Bruker, Alemanha) utilizando o procedimento estabelecido para análise de oligossacarídeos do laboratório do Centro de Facilidades e Apoio à Pesquisa da Universidade de São Paulo (USP/São Paulo). O procedimento consistiu da mistura de 2 μL da amostra com 2 μL de uma solução saturada de ácido 2,5 di-hidróxido benzóico em 0,1 % (v/v) de solução de ácido trifluoracético e acetonitrila na proporção de 70:30 (TA30) e finalmente 0,5 μL foi aplicado na placa Ground Steel (Bruker, Alemanha) para as amostras serem analisadas.

A aquisição dos resultados ocorreu no modo refletor, com polaridade positiva e os parâmetros apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Parâmetros utilizados para realização da análise da composição dos carboidratos por espectrometria de massas - MALDI TOF MS

No intervalo de 100 – 2500 Da
Ion Source 1 - 19.00 kV
Ion Source 2 - 16.80 kV
Lens - 7.9 kV
Reflector 21 kV
Reflector2 9.35kV

Pulsed Ion Extraction 130 ns

Mass Range 100 – 2500 Da / 500 – 2500 Da

Laser Frequency 500Hz

Detector Gain 5.6x

2.5 Caracterização Composicional

2.5.1 Determinação da concentração de Proteínas

A determinação da concentração de proteína das amostras foi realizada pelo método de Bradford (1976) que é baseado na ligação do corante (Coomassie Blue G-250) com a proteína, formando um complexo de cor azul.

2.5.2 Quantificação de Açúcares Totais

A quantificação de açúcares totais foi realizada pelo método fenol-sulfúrico, considerado padrão para esse tipo de determinação (DUBOIS et al., 1956).

3 Resultados e discussão

3.1 Extração do EPS

Os EPS produzidos por *L. plantarum* DF60Mi empregando as duas fontes de carbono (glicose e sacarose), foram codificados como LRG e LRS, respectivamente. Os rendimentos dos extratos brutos (média $\pm$ desvio padrão, n=3) de ambos foram próximos após três processos de extração utilizando sempre as mesmas condições em cada ensaio, e foram de $16,95 \pm 0,54$ g e $18,93 \pm 0,41$ g para LRG e LRS, respectivamente. O rendimento de EPS pode variar de acordo com o micro-organismo que o produz, as fontes de carbono presentes no meio de cultivo e as condições de incubação adotadas no processo de fermentação (FALCK et al., 2013; IBARBURU et al., 2015).

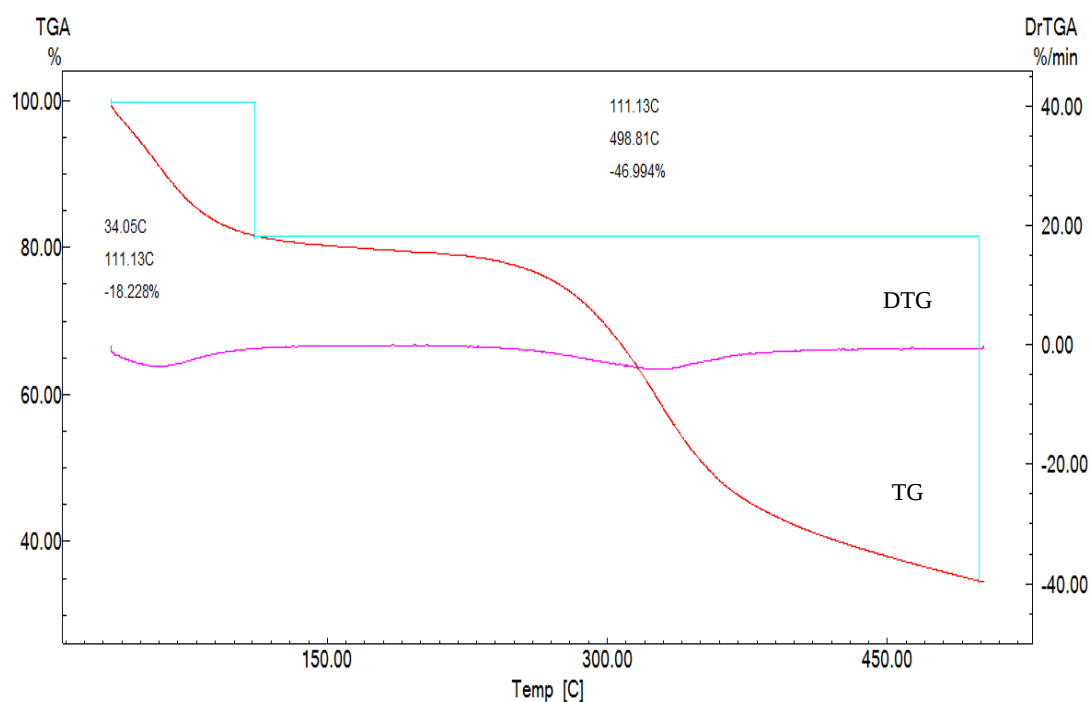
3.2 Caracterização Estrutural do EPS

A modificação química dos EPS pode ocorrer por ação do calor e usualmente ocorre em altas temperaturas (CUMPSTEY, 2013). Logo, o comportamento de decomposição do polissacarídeo é de grande importância para verificar a estabilidade

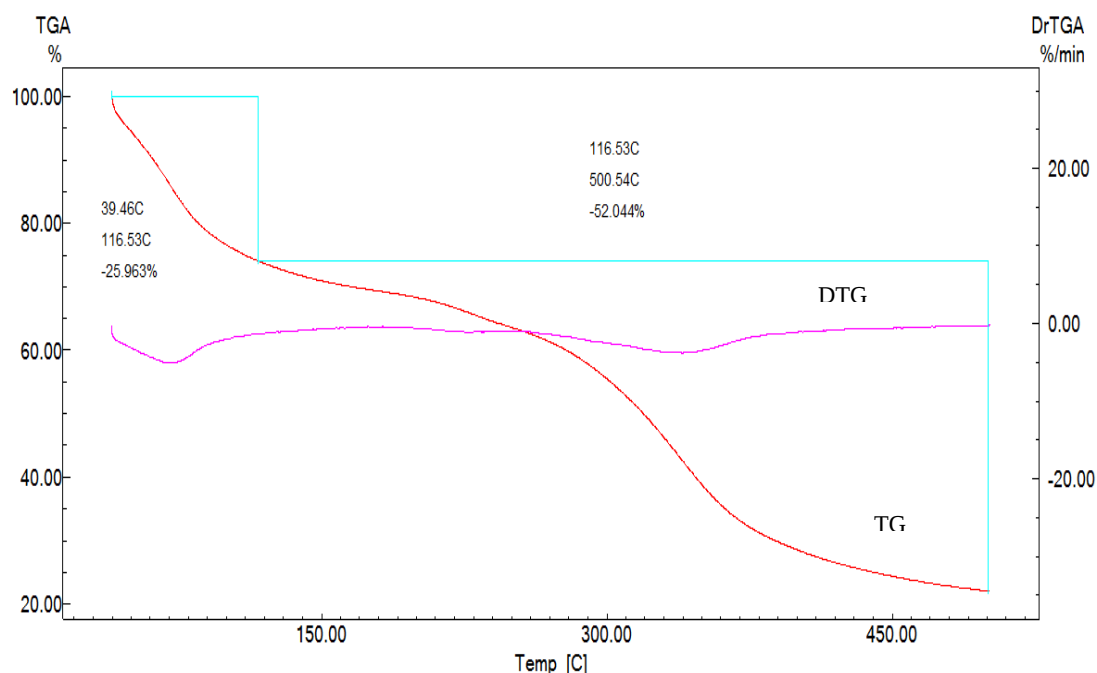
termoquímica do material em várias aplicações (MOTHÉ et al., 2008). A análise termogravimétrica envolve a determinação de mudanças de massa com variação de temperatura, sendo uma técnica altamente útil para analisar amostras que geram ou perdem massa após o aquecimento (ZHENG et al., 2014). A degradação térmica do EPS produzido com duas fontes de carbono citadas anteriormente foi incluída na Figura 1.

Figura. 1 Curvas Termogravimétricas dos EPS (TG DTG)

1 (a) Curva TG DTG EPS LRS



1 (b) Curva TG DTG EPS LRG

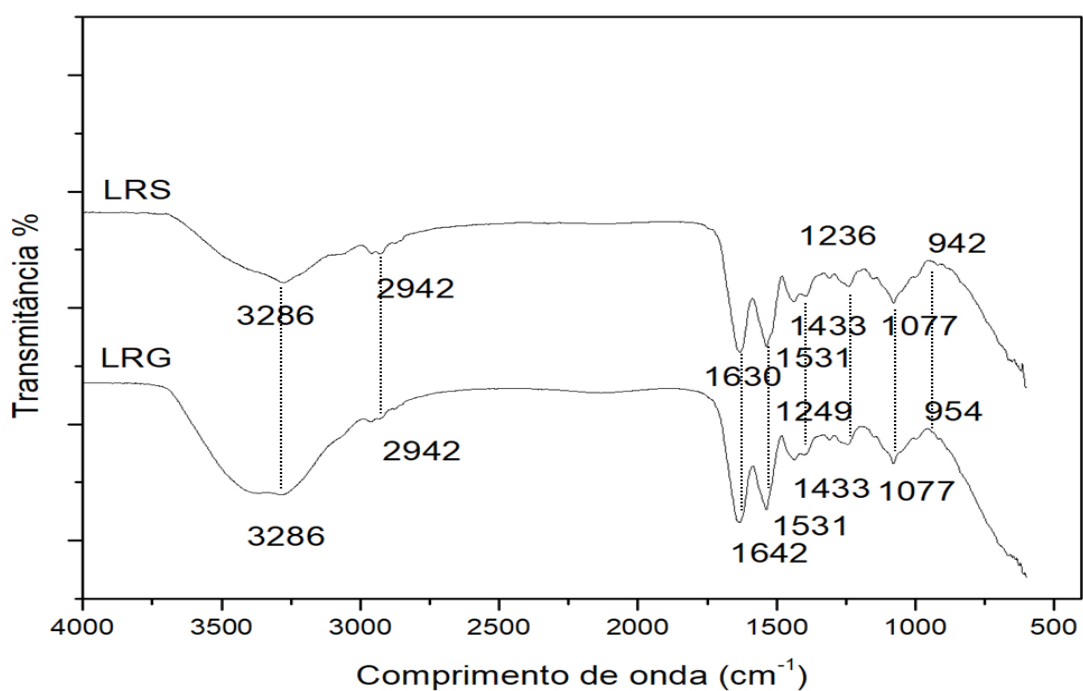


Foi possível observar através da análise termogravimétrica (Figuras 1a e 1b) a ocorrência de dois eventos de perda de massa. O primeiro ocorreu entre 30 e 120 °C com perda de massa que pode estar associada à quebra de ligações de hidrogênio e evaporação da água presente nos materiais. Considera-se que LRG perdeu mais água do que LRS. LRG após secagem apresentou aparência e forma de grumos o que possivelmente resultou na maior retenção de água na amostra, diferentemente de LRS que apresentou aparência de pó sob as mesmas condições de secagem. O segundo evento de perda de massa ocorreu na faixa de 250 a 390 °C e está associado à decomposição térmica dos EPS. A semelhança na degradação térmica pode estar associada ao tipo semelhante de polissacarídeo presente em maior quantidade em ambos. Wang et al. (2010) caracterizaram o EPS produzido por *L. plantarum* KF5 e detectaram a partir da análise termogravimétrica (TGA) que o polímero apresentou uma perda de massa inicial entre 40 e 100 °C, e relataram que este fato ocorre devido à perda de umidade que é gerada pelo aumento dos grupos carboxilas em polissacarídeos. O polímero produzido por *L. plantarum* KF5 se decompôs a partir de 100 °C em uma temperatura em torno de 279,59 °C. Resultados semelhantes também foram reportados por Zeng et al. (2014), confirmando que três frações de EPS obtidas possuíam uma alta estabilidade térmica e que a perda de massa significativa foi registrada em cada fração a cerca de 260 °C, com diminuição gradual para atingir um resíduo final de 17,7 %, 24,5

% e 24,9 %. Os mesmos autores ainda consideram que frações de EPS com comportamento de estabilidade e degradação térmica similar relacionam-se à composições de carboidratos similares e sugerem que o comportamento de degradação do EPS está bastante relacionado à sua estrutura.

Os ensaios espectroscópicos na região do infravermelho permitiram a identificação dos grupos funcionais característicos dos EPS estudados. Os resultados foram divididos em quatro regiões para facilitar a análise, quais sejam: R1 (4000 -2500 cm^{-1}), R2 (1700-1590 cm^{-1}), R3 (1530-1250 cm^{-1}), R4 (1000-950 cm^{-1}) (Figura 2).

Figura. 2 Espectroscopia na região do infravermelho dos EPS (LRS e LRG)



Pode-se notar em R1, para ambos EPS, a existência de uma banda claramente identificável e de maior absorção (3286 cm^{-1}), dentro da faixa de estiramento do grupo hidroxila, e outra banda (2942 cm^{-1}) atribuída ao estiramento de CH (GANGOITI et al., 2017). Notararigo et al. (2013), estudando espectros de infravermelho de quatro bactérias ácido lácticas diferentes utilizadas para a produção de β -glucanas, encontraram bandas similares às apresentadas pelos EPS produzidos por *L. plantarum* DF60Mi em R1. Polissacarídeos, contêm um número significativo de grupos hidroxilas, que apresentam uma ampla banda de absorção arredondada acima do comprimento de onda

3000 cm^{-1} . Esta absorção com a forma arredondada é típica dos grupamentos hidroxilas, e sua presença nos EPS estudados sugere que se trata de polissacarídeos (HOWE; ISHIDA; CLARK, 2002; NWODO; OKOH, 2012 b).

A análise da segunda região espectral (R2) apresenta bandas de 1630 e 1642 cm^{-1} que é a principal absorção no espectro dentro da faixa de estiramento do grupo que pode ser de monossacarídeos como anel da galactose e manose (1593 – 1662 cm^{-1}) (FREITAS et al., 2009). Nesta região, os picos encontrados também podem corresponder aos estiramentos CN e CO, que se ligam à ligação amida de amino açúcares na estrutura polissacarídica (Kovács, Nyerges e Izvekov, 2008), e podem estar relacionados ao menor conteúdo de proteína nos EPS (Qiao et al., 2009), sendo coerentes aos resultados reportados por Gangoiti et al. (2017) ao estudarem a produção de α -glucana por *L. plantarum* CIDCA 8327, e aos resultados de Li et al. (2014), que estudaram a produção de EPS por *Lactobacillus helveticus* MB2-1.

As bandas (1531 cm^{-1}) da terceira região (R3) são mais características de grupos carboxílicos. As ligações C=C de anéis aromáticos são geralmente mais fortes nessa faixa, acima de 1500 cm^{-1} . Os sinais 1433 cm^{-1} e 1249-1236 cm^{-1} são atribuídos ao alongamento de vibrações e deformações de CO e OH (LI et al., 2014).

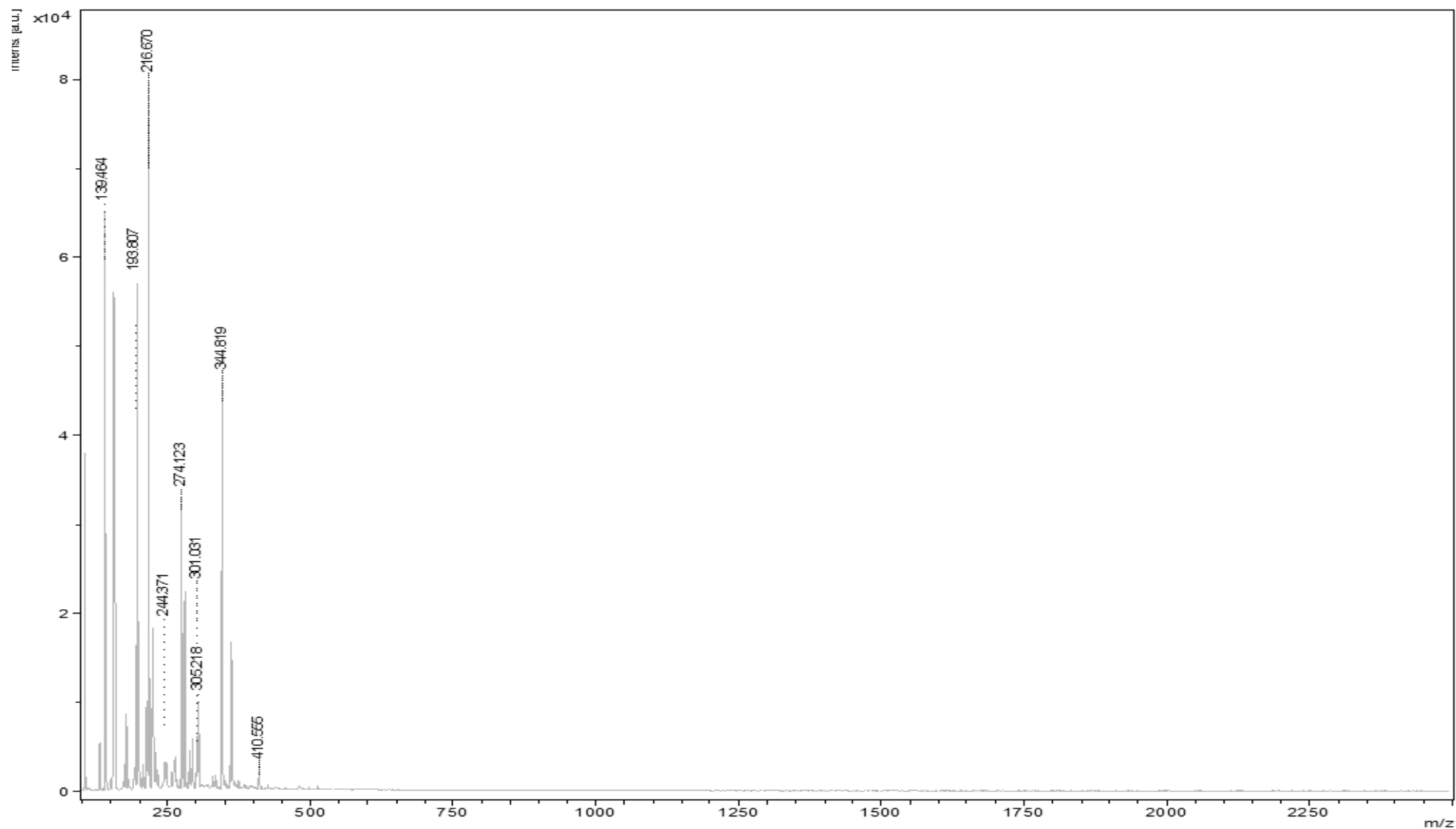
As bandas correspondentes a R4 (1077 cm^{-1}) estão dentro da faixa que pode representar o grupamento CO presente em açúcares e ácidos urônicos (1000-1125 cm^{-1}) (BRAMHACHARI; DUBEY, 2006), também correspondente à chamada região de impressão digital do polissacarídeo (1000-1200 cm^{-1}) (SHANG et al., 2013). CAO et al. (2011) também reportam que bandas na faixa 1000-1200 cm^{-1} representam carboidratos e são típicos de polissacarídeos. Os sinais 942 e 954 cm^{-1} correspondem a absorções na região anomérica e contém bandas fracas que informam sobre a configuração anomérica dos monossacarídeos (SYNYTSYA; NOVAK, 2014).

As bandas encontradas nas quatro regiões espectrais estão relacionadas às vibrações moleculares. Observa-se que os substratos (sacarose e glicose) utilizados na produção do EPS não influenciaram no comportamento das interações químicas das amostras, visto que os resultados para ambos foram bastante semelhantes. Todos os picos vibracionais dos EPS foram semelhantes aos obtidos para α -glucanos. As bandas de 1077, 954 e 942 cm^{-1} evidenciaram a presença de um polissacarídeo com ligações α na estrutura de ambos os EPS (KACURAKOVA et al., 2000; SYNYTSYA e NOVAK, 2014; GANGOITI et al., 2017).

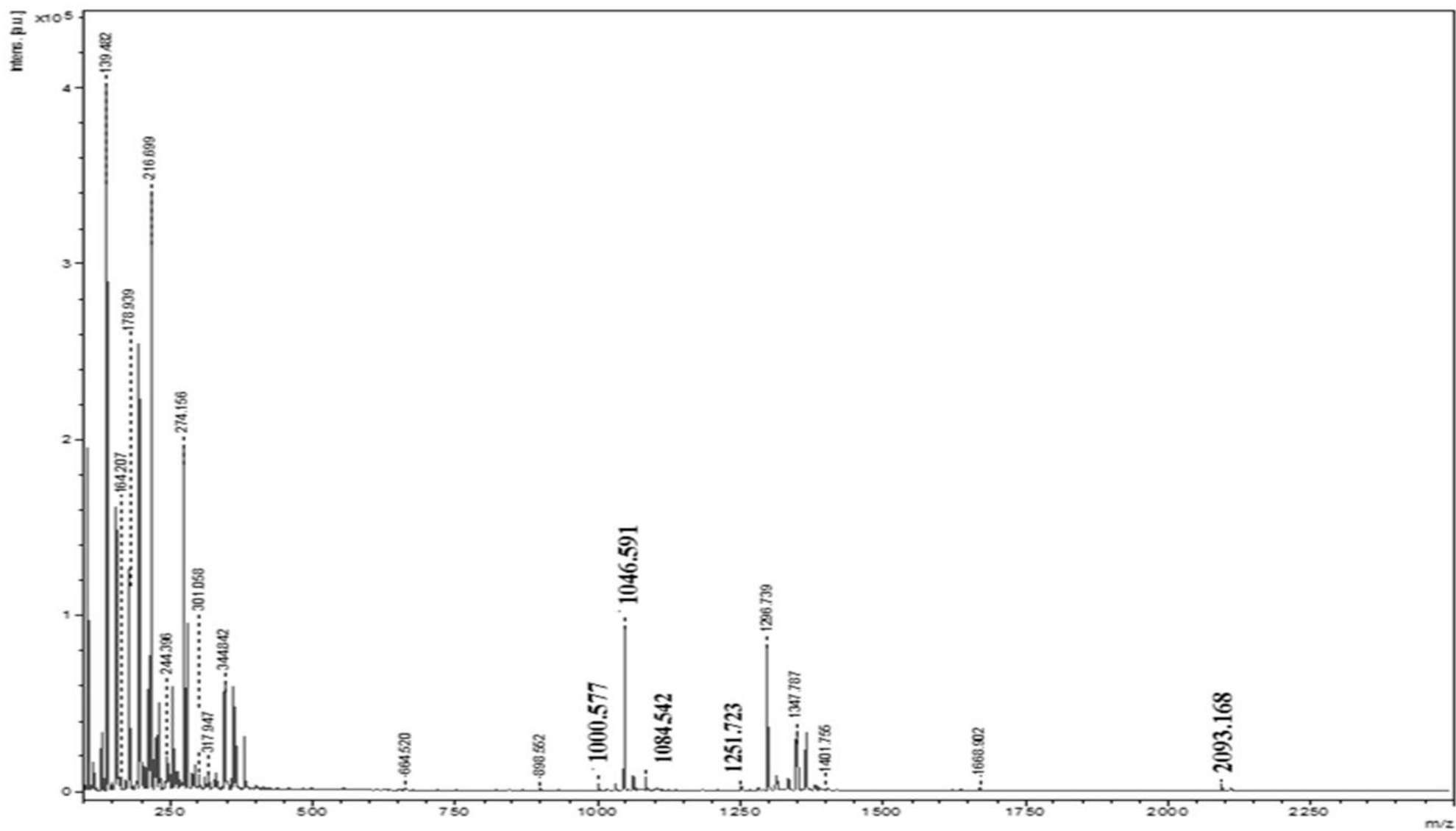
A mistura de polissacarídeos obtida foi analisada por MALDI TOF em modo refletivo positivo. O espectro obtido revelou a presença do sinal com m/z 1000,577 (Figura 3b e 3c). Conforme Chen et al. (2010), os valores encontrados são característicos de polímeros lineares, mais precisamente 2-amino-2-desoxi-glucose (GlcN) e com resíduos de 2-acetamido-2-desoxi-d-glucose (GlcNAc) conforme descrito na Tabela 2. A evidência de ligações amida havia sido previamente observada na análise de espectroscopia na região do infravermelho conforme reportado anteriormente. A presença de grupo Acetil, característico de alguns EPS, foi obtida em oligossacarídeos de um polímero linear de quitina e relacionada à potencial atividade anti-tumoral desse polímero por Zhu & Zhao (2000). Os mesmos autores realizaram pesquisas farmacológicas, porém, a função dos grupos Acetil não foi determinada. Sabe-se que quanto maior o grau de polimerização, ou seja, mais cadeias glicosídicas presentes (GP 6-8), maior a função anti-tumoral do polímero (KUROIWA et al., 2009; CHEN et al., 2010). O presente estudo registrou a ocorrência de cadeias glicosídicas apresentando graus de polimerização (GP) com variação semelhante e, considera-se possível que LRS e LRG apresentem a função anti-tumoral, que é característica de EPS produzido por *L. plantarum* reportada em estudos anteriores (ZHANG et al. 2007; WANG et al., 2014). Porém, estudos complementares se fazem necessários.

Figura 3. Espectros de massas por MALDI TOF MS dos EPS (LRS e LRG) e da Matrix para carboidratos 2,5-di-hydroxy-benzoic acid (DHB) com refletor positivo (RP)

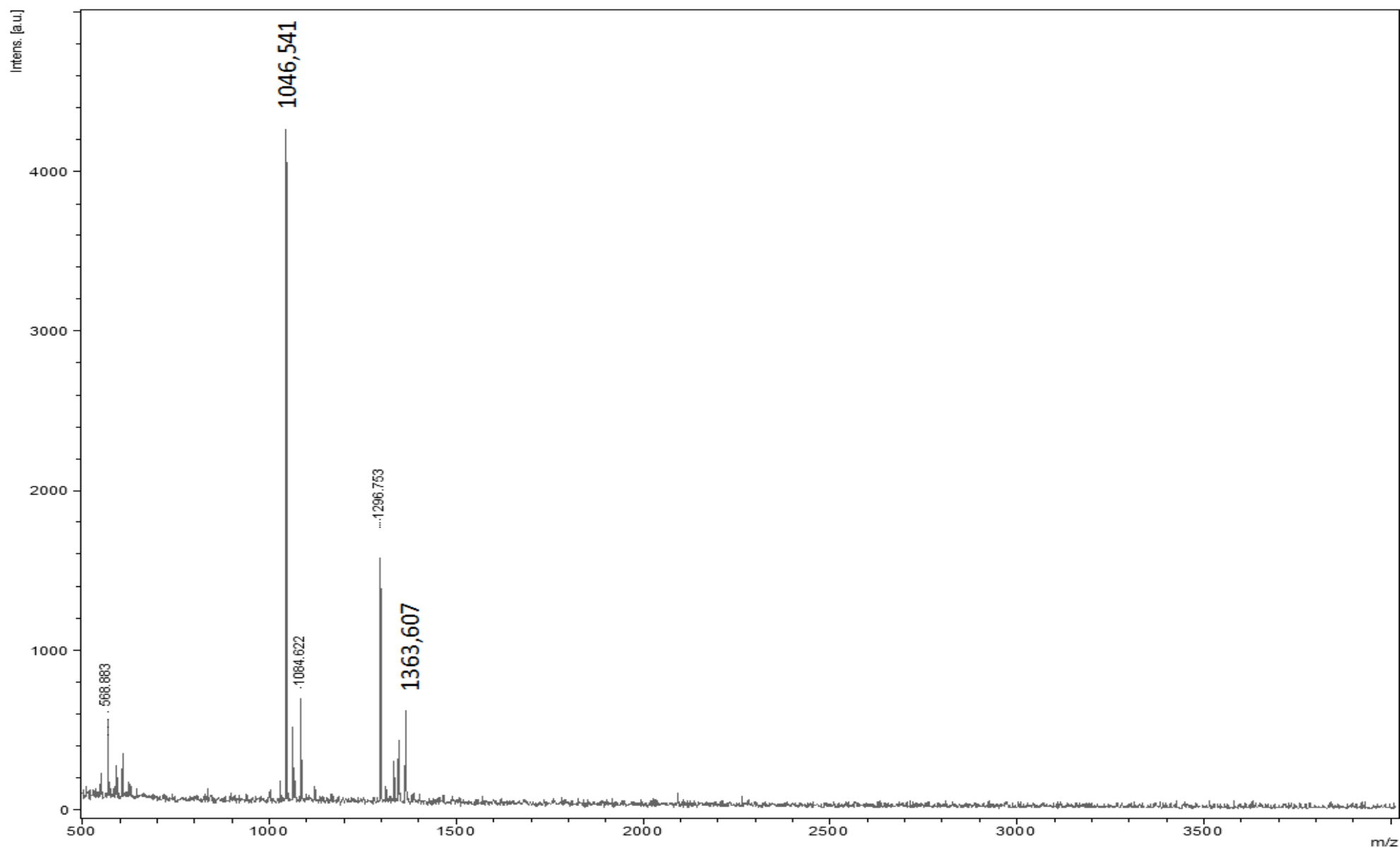
(3a) Espectro da Matrix DHB RP de 100 a 2500 Da



(3b) Espectro da Matrix DHB com EPS LRS RP de 100 a 2500 Da



(3c) Espectro da Matrix DHB com EPS LRS RP de 500 a 2500 Da



(3d) Espectro da Matrix DHB com EPS LRG RP de 100 a 2500 Da

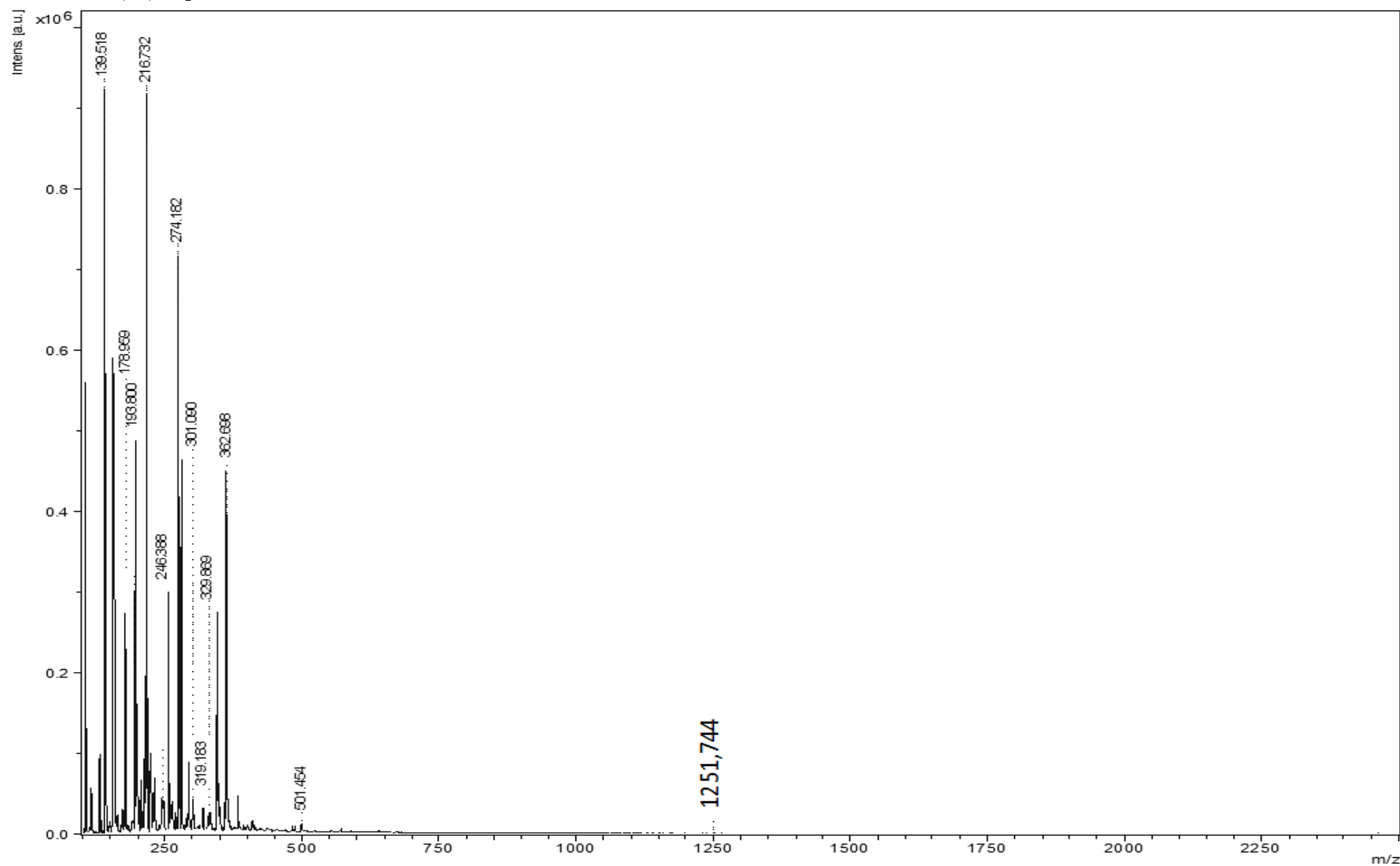


Tabela 2. Picos identificados por espectrometria de massas dos EPS (LRS e LRG)

EPS LRS	
m/z mensurado	Tipo
1000,577	$[M+NH_4]^+$
1046,591	$[M+NH_4]^+$
1084,542	$[M+NH_4]^+$
1251,723	$[M+Na]^+$
1363,607	$[M+NH_4]^+$
2093,163	$[M+NH_4]^+$
EPS LRG	
m/z mensurado	Tipo
1251,744	$[M+Na]^+$

Quando se correlacionam os resultados de espectrometria de massas com a espectroscopia de infravermelho, tem-se um indicativo de que os picos encontrados correspondem à glucana, visto que, este é um polissacarídeo de monômeros de D-glucose unidos por ligações glicosídicas. Esta indicação é evidenciada pelos sinais vibracionais obtidos para os EPS e os picos identificados pela espectrometria de massas bastante semelhantes aos obtidos para glucanas por outros autores (GANGOITI et al., 2017). Além disso, o indicativo de presença de um polissacarídeo com ligações alfa (α), supracitados nos resultados de espectroscopia de infravermelho, reforça a teoria de que os dois EPS (LRS e LRG) são heteropolissacarídeos α -D-glucanos.

3.3 Caracterização Composicional

A quantidade de proteína obtida dos extratos de EPS LRG e LRS (média $\pm$ desvio padrão, n=3), foi de $0,5 \pm 0,05$ e $0,02 \pm 0,03$ mg/mL de proteína, respectivamente. Estes resultados são coerentes com os relatos de Paiva et al. (2016) ao estudarem a produção de EPS por dois isolados de *Lactobacillus* sp.

Os teores de açúcares totais (média $\pm$ desvio padrão, n=3) foram de $99,8 \% \pm 0,1$ (LRG) e $83,3 \% \pm 0,6$ (LRS). Os teores de carboidratos totais encontrados por Imran et al. (2016) em EPS de *L. plantarum* NTMI05 foram de $95,45 \%$ e de $92,35 \%$ para *L. plantarum* NTMI20. Teores bem significativos de açúcares totais em EPS produzidos por *Lactobacillus helveticus* MB2-1 ($95,45\%$) e *Lactobacillus plantarum* YW11 ($92,35 \%$) são relatados na literatura (WANG et al., 2015; LI et al., 2015).

4 Conclusão

A cepa *L. plantarum* DF60Mi produz EPS em meio de cultivo com leite desnatado adicionado de glicose e também sacarose, sendo indicativo de heteropolissacarídeos compostos principalmente por glicose com resíduos de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucose, independente do açúcar utilizado para a fermentação. Os polímeros apresentaram boa resistência térmica, sendo decompostos após terem sido submetidos a temperaturas de 250 a 390 °C. A indicação de presença de um polissacarídeo com ligações α reforça a teoria de que os dois EPS, LRS e LRG, são α -D-glucanos com potencial aplicação na indústria de alimentos.

Referências

- BRADFORD, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254.
- BRAMHACHARI, P. V, & DUBEY, S. K. (2006). Isolation and characterization of exopolysaccharide produced by *Vibrio harveyi* strain VB23. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 571–577.
- CHEN, M. et al. (2010). Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) in preparation of chitosan oligosaccharides (COS) with degree of polymerization (DP) 5–12 containing well-distributed acetyl groups. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 290, n. 2-3, p. 94-99.
- CUMPSTEY, I. Chemical modification of polysaccharides. **ISRN organic chemistry**, v. 2013, 2013.
- DAS, D.; GOYAL, A. (2014). Characterization and biocompatibility of glucan: a safe food additive from probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 4, p. 683-690.
- DE VUYST, L. et al. (2011) Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 9, p. 687-707.
- DE VUYST, L.; DEGEEST, B.. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 23, n. 2, p. 153-177.
- DILNA, S. V. et al. (2015) Characterization of an exopolysaccharide with potential health-benefit properties from a probiotic *Lactobacillus plantarum* RJF4. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1179-1186.

DUBOIS, M. et al. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356.

FALCK, P. et al. (2013). Xylooligosaccharides from hardwood and cereal xylan produced by a thermostable xylanase as carbon sources for *Lactobacillus brevis* and *Bifidobacterium adolescentis*. **J. Agric. Food Chem.** 61, p. n. 7333–7340.

FREITAS, F. et al. (2009). Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas* strain grown on glycerol. **Bioresource technology**, v. 100, n. 2, p. 859-865.

FREITAS, F. et al. (2017). Engineering aspects of microbial exopolysaccharide production. **Bioresource technology**, v. 245, p. 1674-1683.

GANGOITI, M. V. et al. (2017). *Lactobacillus plantarum* CIDCA 8327: An α -glucan producing-strain isolated from kefir grains. **Carbohydrate polymers**, v. 170, p. 52-59.

HE, P. et al. (2012). Purification, characterization and bioactivity of an extracellular polysaccharide produced from *Phellinus igniarius*. **Annals of microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1697-1707.

HIDALGO-CANTABRANA, C. et al. (2012). Immune modulation capability of exopolysaccharides synthesised by lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 4, n. 4, p. 227-237.

HOWE, K. J. et al. (2002). Use of ATR/FTIR spectrometry to study fouling of microfiltration membranes by natural waters. **Desalination**, v. 147, n. 1-3, p. 251-255.

IBARBURU, I. et al. (2015). Production and partial characterization of exopolysaccharides produced by two *Lactobacillus suebicus* strains isolated from cider. **International journal of food microbiology**, v. 214, p. 54-62.

IMRAN, M. Y. M. et al. (2016). Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* NTMI05 and NTMI20. **International journal of biological macromolecules**, v. 93, p. 731-74.

KACURAKOVA, M. et al. (2000) FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. **Carbohydrate polymers**, v. 43, n. 2, p. 195-203.

KAGIMURA, F. Y. et al. (2015). Carboxymethylation of (1→6)- β -glucan (lasiodiplodan): Preparation, characterization and antioxidant evaluation. **Carbohydrate polymers**, v. 127, p. 390-399.

KARMEE, S. K. (2011). The synthesis, properties, and applications of ascorbyl esters. **Lipid Technology**, v. 23, n. 10, p. 227-229.

KORAKLI, M.; GÄNZLE, M. G.; VOGEL, R. F (2002). Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. **Journal of applied microbiology**, v. 92, n. 5, p. 958-965.

KUROIWA, T. et al. (2009). Selective and stable production of physiologically active chitosan oligosaccharides using an enzymatic membrane bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. 283-287.

LI, W. et al. (2015). Structural characterization and anticancer activity of cell-bound exopolysaccharide from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 13, p. 3454-3463.

MOTHÉ, C. G. et al. (2008). Antitumor activity of cashew gum from *Anacardium occidentale* L. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v. 19, n. 6, p. 50-52.

MOZZI, F. et al (2003). galactose 4-epimerase: a key enzyme in exopolysaccharide formation by *Lactobacillus casei* CRL 87 in controlled pH batch cultures. **Journal of applied microbiology**, v. 94, n. 2, p. 175-183.

NOTARARIGO, S. et al. (2013). Comparative analysis of production and purification of homo-and hetero-polysaccharides produced by lactic acid bacteria. **Carbohydrate polymers**, v. 93, n. 1, p. 57-64.

NWODO, U. U. et al. (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. **International journal of molecular sciences**, v. 13, n. 11, p. 14002-14015.

PATTEN, D. A.; LAWS, Andrew P. (2015). *Lactobacillus*-produced exopolysaccharides and their potential health benefits: a review. **Beneficial microbes**, v. 6, n. 4, p. 457-471.

PAULO, E. M. et al. (2012) Production, extraction and characterization of exopolysaccharides produced by the native *Leuconostoc pseudomesenteroides* R2 strain. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 2, p. 495-508.

SHANG, N. et al (2013). Structure characterization of an exopolysaccharide produced by *Bifidobacterium animalis* RH. **Carbohydrate polymers**, v. 91, n. 1, p. 128-134.

SHIMADA, K. et al. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 40, n. 6, p. 945-948.

SYNYTSYA, A.; NOVAK, M. (2014). Structural analysis of glucans. **Annals of translational medicine**, v. 2, n. 2.

WANG, J. et al. (2015) Characterization of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW11 isolated from Tibet Kefir. **Carbohydrate polymers**, v. 125, p. 16-25.

WANG, K. et al. (2014). Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. **International journal of biological macromolecules**, v. 63, p. 133-139.

WANG, Y. et al. (2010). Physical characterization of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* KF5 isolated from Tibet Kefir. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 895-903.

WERNING, M. L. et al. (2012). Biosynthesis, purification and biotechnological use of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. In: **Food additive**. InTech.

ZHANG, C. et al (2007). Study on anti-tumoractivity of polysaccharides of monocotyledons endophyte. **Journal of Mathematical Medicine**, v. 4, p. 527–529.

ZHANG, L. et al. (2013) Antioxidant activity of an exopolysaccharide isolated from *Lactobacillus plantarum* C88. **International journal of biological macromolecules**, v. 54, p. 270-275.

ZHANG, Z. et al. (2016). Characterization and sulfated modification of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and its biological activities. **Carbohydrate polymers**, v. 153, p. 25-33.

ZHENG, J. et al. (2014). Characterization and antioxidant activity for exopolysaccharide from submerged culture of *Boletus aereus*. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 6, p. 1047-1053.

ZHU, G. F., & ZHAO, L. H. (2000). The progress about study of N-acetylchitooligosaccharides and chito-oligosaccharides. **Chinical Journal Marine Drugs**, 1, 43-46.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As bactérias láticas isoladas de leite de cabra apresentaram características probióticas com potencial para serem utilizados industrialmente. Estudos posteriores são necessários para explorar seu uso na fermentação de alimentos e seus benefícios para a saúde, em especial na área clínica bucal.

A cepa *L. plantarum* DF60Mi produziu EPS, que apresentaram características de heteropolissacarídeos compostos principalmente por glicose com resíduos de 2-acetamido-2-desoxi-D-glucose. O fato de apresentarem-se como polímeros com boa resistência térmica, caracterizados como α -D-glucanos resulta em potencial interesse industrial.

Pesquisas futuras avaliando a utilização dos exopolissacarídeos produzidos por *L. plantarum* DF60Mi são sugeridas para elaboração de produtos prebióticos e posteriores avaliações tecnológicas para aplicação na indústria de alimentos.