

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Patrícia Alves Paiva de Oliveira

Métodos de obtenção e efeitos de metabólitos de *Lactococcus lactis* sobre  
bactérias residentes do trato gastrointestinal

Montes Claros

2018

Patrícia Alves Paiva de Oliveira

Métodos de obtenção e efeitos de metabólitos de *Lactococcus lactis* sobre bactérias residentes do trato gastrointestinal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências em Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros-Unimontes, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças.

Orientadores: Profa. Dra. Mariléia Chaves Andrade  
Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Avelino Mota Nobre

Montes Claros

2018

Oliveira, Patrícia Alves Paiva de.

O48m Métodos de obtenção e efeitos de metabólitos de *Lactococcus lactis* sobre bactérias residentes do trato gastrointestinal [manuscrito] / Patrícia Alves Paiva de Oliveira. – 2018.

57 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Montes Claros - Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/PPGCS, 2018.

Orientadora: Profa. Dra. Mariléia Chaves Andrade.

Coorientador: Prof. Dr. Sérgio Avelino Mota Nobre.

1. *Lactococcus lactis*. 2. Inibição do crescimento. 3. Técnicas *in vitro*. I. Andrade, Mariléia Chaves. II. Nobre, Sérgio Avelino Mota. III. Universidade Estadual de Montes Claros. IV. Título.

## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS

Reitor: João dos Reis Canela

Vice-reitor: Antônio Alvimar Souza

Pró-reitor de Pesquisa: Virgílio Mesquita Gomes

Coordenadoria de Acompanhamento de Projetos: Karen Torres Lafetá

Coordenadoria de Iniciação Científica: Sônia Ribeiro Arrudas

Coordenadoria de Inovação Tecnológica: Dario Alves de Oliveira

Pró-reitor de Pós-graduação: Professor Hercílio Martelli Júnior

Coordenadoria de Pós-graduação Stricto-sensu: Maria de Fátima Rocha Maia

### PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Coordenadora: Dra. Marise Fagundes Silveira

Subcoordenador: Dr. Luiz Fernando Rezende



MESTRANDO(A): PATRÍCIA ALVES PAIVA DE OLIVEIRA.

TÍTULO DO TRABALHO: "Métodos de obtenção e efeitos de metabólitos de *Lactococcus lactis* sobre bactérias residentes no trato gastrointestinal".

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Mecanismos e Aspectos Clínicos das Doenças.

LINHA DE PESQUISA: Etiopatogenia e Fisiopatologia das Doenças.

BANCA (TITULARES)

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARILÉIA CHAVES ANDRADE, ORIENTADOR/PRESIDENTE

PROF. DR. MAURO APARECIDO DE SOUSA XAVIER

PROF. DR. JOÃO MARCUS DE OLIVEIRA ANDRADE

ASSINATURAS

BANCA (SUPLENTES)

PROF. DR. SÉRGIO AVELINO MOTA NOBRE

ASSINATURAS

APROVADA

REPROVADA

Hospital Universitário Clemente Farias – HUCF

<http://www.unimontes.br> / [ppgcs@unimontes.br](mailto:ppgcs@unimontes.br)

Telefone: (0xx38) 3224-8372 / Fax: (0xx38) 3224-8372

Av. Cula Mangabeira, 562, Santo Expedito, Montes Claros – MG, Brasil – Cep: 39401-001

Dedico esta dissertação à instituição que é a base da minha vida: minha família.  
Em especial, à minha mãe Maria Aparecida (*in memoriam*) que sempre me incentivou e  
acreditou em meu potencial, fazendo de tudo para que eu chegasse até aqui.

Gratidão!!!

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida e pela paz nos momentos em que me encontrei incapaz de prosseguir. Aos meus pais, irmãos, demais familiares e amigos que sempre me incentivaram e vibraram comigo cada uma das minhas conquistas.

Ao meu esposo Edvaldo e meus filhos: Bruna, Fernando, Lara, Gustavo e Ísis o tempo de nossa convivência destinado a realização desta pós-graduação só fez fortalecer o nosso amor e aumentar a vontade de estar cada minuto junto de vocês.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Marileia Chaves Andrade, pela oportunidade, paciência e carinho com que me recebeu em cada encontro. O seu olhar sempre me transmitiu serenidade e certeza da vitória.

Ao coorientador Prof. Dr. Sérgio Avelino Mota Nobre gratidão por todo aprendizado, alegria e generosidade a mim dispensados.

Aos estudantes de iniciação científica e colegas de laboratório por toda ajuda e companheirismo. Muito obrigada!

À Profa. Elytânia Menezes, pela atenção e disponibilidade em emprestar equipamentos do seu laboratório para uso em alguns procedimentos.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite e pelo tempo dispensado à leitura desta dissertação.

À Dra. Marise Fagundes coordenadora do PPGCS, obrigada por tudo. Você é um anjo enviado por Deus a este mundo. Eterna gratidão!

À secretária do PPGCS Du Carmo pela ajuda, paciência e carinho com que sempre me recebeu. Obrigada Du!

À técnica do LEBM Ronize, pela sua dedicação, companheirismo, e por ser tão prestativa me auxiliando nos procedimentos. Meu muito obrigada a você e minha gratidão. Sua contribuição foi muito importante para este trabalho.

Aos colegas que vivenciaram comigo o cursar das disciplinas obrigatórias.

À querida Bárbara que acompanhou esses últimos meses de conclusão do mestrado. Obrigada por me encorajar sempre. Gratidão!

À querida eterna professora Orlene Dias pela sua valiosa amizade.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Finalmente, obrigada a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização desta etapa em minha vida. Gratidão!

## RESUMO

Este estudo teve por objetivo obter metabólitos secundários de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e avaliar sua eficácia na inibição do crescimento bacteriano *in vitro*. Plaqueou-se 10 µL de suspensão bacteriana de *L. lactis* em concentração de 10<sup>3</sup> células, que foram semeadas sobre ágar M17. As placas foram incubadas a 30°C por 20 horas. Realizou-se a leitura do número de células em cada intervalo de hora e identificou-se o tempo correspondente a fase estacionária. Cultivou-se *L. lactis* em meio M17 a 30°C por 16 horas e extraiu-se os metabólitos secundários. Foram inoculados em placa de microtitulação de 96 poços 90 µL do extrato metabólico juntamente com 10 µL de caldo Muller Hinton com microrganismos-teste: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter sakazakii*, *Lactococcus lactis* e *Salmonella enteritidis*, obedecendo às normas do *The Clinical and Laboratory Standards Institute*. Os metabólitos secundários foram extraídos por meio da centrifugação a 6000 rpm por 10 minutos. Os metabólitos apresentaram ação inibitória em diferentes intensidades sobre o crescimento dos microrganismos-testes. Ambos microrganismos *Escherichia coli* e *Enterobacter sakazakii* apresentaram índice de inibição 37% e *Salmonella enteritidis* 93%. *Lactococcus lactis* e *Enterococcus faecalis* apresentaram índice de promoção do crescimento de 30% e 20%. Conclui-se que o extrato obtido estimulou o crescimento das bactérias *Enterococcus faecalis* e *Lactococcus lactis*, sugerindo a presença de substâncias que favorecem a sobrevivência desses microrganismos, e inibiu o crescimento de *Escherichia coli*, *Enterobacter sakazakii* e *Salmonella enteritidis*.

Palavras-chave: *Lactococcus lactis*. Inibição do crescimento. Técnicas *in vitro*.

## ABSTRACT

This study aimed to obtain secondary metabolites of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and evaluate its efficacy in inhibiting bacterial growth in vitro. 10 µl of *L. lactis* bacterial suspension was plated at 10<sup>3</sup> cells concentration, which were seeded onto M17 agar. Plates were incubated at 30 ° C for 20 hours. The cell number was read at each hour interval and the time corresponding to the stationary phase was identified. *L. lactis* was cultured in M17 medium at 30°C for 16 hours and the secondary metabolites were extracted. 90 µl of the metabolic extract was inoculated together with 10 µL of Muller Hinton broth with test microorganisms: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter sakazakii*, *Lactococcus lactis* and *Salmonella enteritidis*, according to the standards of The Clinical and Laboratory Standards Institute. The secondary metabolites were extracted by centrifugation at 6000 rpm for 10 minutes. The metabolites showed inhibitory action at different intensities on the growth of the test microorganisms. Both microorganisms *Escherichia coli* and *Enterobacter sakazakii* presented inhibition index 37% and *Salmonella enteritidis* 93%. *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* showed growth promotion index of 30% and 20%. It is concluded that the extract obtained stimulated the growth of the bacteria *Enterococcus faecalis* and *Lactococcus lactis*, suggesting the presence of substances that favor the survival of these microorganisms, and inhibited the growth of *Escherichia coli*, *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella enteritidis*.

Key words: *Lactococcus lactis*. Inhibition of growth. In vitro techniques.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Interações microbianas no trato gastrointestinal .....	8
1.2 Microrganismos entéricos.....	9
1.2.1. <i>Escherichia coli</i> .....	9
1.2.2. <i>Enterococcus faecalis</i> .....	10
1.2.3 <i>Enterobacter sakazakii</i> .....	10
1.2.4 <i>Salmonella enteritidis</i> .....	11
1.3 Bactérias do ácido lático.....	12
1.4 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> .....	12
1.4.1 Modulação da inflamação por <i>L. lactis</i> .....	13
1.4.2 Metabolismo bacteriano de <i>Lactococcus lactis</i> .....	13
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral .....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 PRODUTO CIENTÍFICO .....	17
3.1 Produção de metabólitos secundários de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> e avaliação da sua eficácia na inibição do crescimento bacteriano <i>in vitro</i> .....	17
4 CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS .....	42
ANEXO A – Normas para publicação do periódico <i>Brazilian Journal of Microbiology</i> , qualis Interdisciplinar B1. ....	46

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Interações microbianas no trato gastrointestinal

A saúde gastrointestinal desempenha um importante papel na saúde geral do corpo. Qualquer evento que possa causar agravos ao trato gastrointestinal (TGI) humano, pode ter consequências muito além dos intestinos, e o TGI por ser a primeira linha de contato com qualquer substância ingerida sofre sérios danos (1).

O TGI humano interage com o hospedeiro, com os fatores ambientais e antígenos do corpo humano. Em uma vida útil média, aproximadamente 60 toneladas de alimentos passam pelo trato gastrointestinal humano, junto com uma grande diversidade de microrganismos do meio ambiente que podem oferecer ameaças à sua integridade intestinal (2).

Por meio de diversas funções fisiológicas, a microbiota fortalece a integridade intestinal (3), fornece energia (4), protege contra patógenos (5) e regula a imunidade do hospedeiro (6). No entanto, quando esses mecanismos são interrompidos a partir de alterações na microbiota intestinal, ocorre a disbiose, processo caracterizado por um desequilíbrio nas comunidades microbianas. A partir de métodos cada vez mais eficazes que caracterizam perfil microbiano em desenvolvimento, torna-se ainda mais evidente o papel que os microrganismos desempenham em diversas doenças intestinais e extra-intestinais (7,8).

O TGI é colonizado por diversos tipos de microrganismos que residem em diversos microambientes (9), e, apesar de serem relatados na literatura mais de 50 filos bacterianos, os *Bacteroidetes* e os *Firmicutes*, compõem mais de 90% das categorias filogenéticas conhecidas e dominam a microbiota distal do intestino (10).

O corpo humano adulto comporta dez vezes mais células microbianas do que células humanas, segundo informações do projeto microbioma humano, com alta densidade de microrganismos presentes, em sua maioria, no TGI ( $10^{11}$  a  $10^{12}$  microrganismos/mL de conteúdo luminal) (11). Ao longo da vida a microbiota intestinal evoluiu e exerce influência (9), por meio de atividades metabólicas coletivas e interações com o hospedeiro, na fisiologia

normal e também na susceptibilidade à doença (12). Apesar de estudos indicarem que as mudanças na composição da microbiota estão associadas a diversas doenças, a definição de microbiota intestinal saudável ainda não foi estabelecida e a composição e atividades que essas bactérias desempenham têm sido intensamente estudados nos últimos anos (13).

Os microrganismos que compõem a microbiota intestinal, ou microrganismos entéricos, podem ser divididos em promotores de saúde e patogênicos, nos primeiros como exemplo têm-se as Bifidobactérias, Lactobacilos e Lactococcus, e no segundo pode-se citar a família das enterobactérias (14). A família *Enterobacteriaceae* é constituída por numerosos gêneros de bacilos Gram-negativos, que incluem vários patógenos potenciais como *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia* (15).

Devido a quantidade de microrganismos, é imprescindível o conhecimento da abundância e da diversidade para o melhor entendimento do impacto desses microrganismos intestinais sobre a saúde humana (16), uma vez que o desequilíbrio dessa relação pode estar associado a vários quadros patológicos no organismo.

Abaixo, uma breve descrição, ressaltando características gerais das bactérias utilizadas neste estudo.

## 1.2 Microrganismos entéricos

### 1.2.1. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* é uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*, Gram-negativa, não esporulada, anaeróbica facultativa, fermentativa, sendo a maioria das cepas possuidoras de flagelo peritríquios, crescendo em temperaturas de 18 a 44° C, sendo 37°C a temperatura ideal, e pertencente à microbiota entérica de mamíferos e aves. Mesmo sendo comensal, em casos de alteração do *status* imunológico e desequilíbrio microbiano, cepas não patogênicas da *E. coli* podem causar infecções (17). Alguns estudos descrevem que cepas comensais

podem ter genes de virulência com potencial de causar doenças em animais (18), e a presença de um ou mais genes de virulência pode determinar se um isolado é patogênico ou não (19).

### 1.2.2. *Enterococcus faecalis*

O *Enterococcus faecalis* é uma bactéria facultativa anaeróbia, não possui esporos, é Gram-positiva, e possui como principal mecanismo de patogenicidade a sua grande resistência natural à vários antimicrobianos. Essa resistência pode ser explicada pela habilidade de sobreviver por longos períodos sem nutrientes (20). Possuem o formato esférico, forma de cocos, podem ser encontradas em pares ou em pequenas cadeias, são na maioria anaeróbios facultativos, sendo algumas espécies aeróbias (21).

As bactérias do gênero *Enterococcus* são responsáveis por inúmeras infecções hospitalares (22), e dentre todas as espécies, a *E. faecalis* é a causadora da maioria das infecções em humanos (23). Essa habilidade em causar infecções está relacionada a fatores de virulência intrínsecos, que permite que elas sobrevivam na área hospitalar e às formas de defesa do hospedeiro (24). Outro fator que torna a *E. faecalis* tão virulenta é o mecanismo de resistência a maioria dos antibióticos normalmente utilizados, pois adquirem genes de resistência a esses medicamentos (25).

Estudos já demonstraram que animais saudáveis podem ser colonizados por espécies do gênero *Enterococcus* e se tornarem reservatórios (26). McDonald e colaboradores em 1997 apoiaram a teoria que antibióticos promotores de crescimento dado para animais, exercia pressão seletiva para o desenvolvimento de genes de resistência nas espécies do gênero *Enterococcus* (27).

### 1.2.3 *Enterobacter sakazakii*

Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, *E. sakazakii* é Gram-negativa, possui forma de bastonete, não é pertencente à microbiota normal do trato gastrointestinal humano ou animal,

mas pode ser adquirida através da alimentação (28). É considerada oportunista pois pode causar meningite (29), principalmente em recém-nascidos em que a taxa de mortalidade varia de 40% a 80% (30). De acordo com a comissão internacional de pesquisas microbiológicas para alimentos, em 2002 essa bactéria foi classificada como perigosa para populações restritas, como recém-nascidos, idosos e pessoas com a saúde debilitada, por ameaçar a vida ou por possuir riscos de deixar sequelas crônicas (31).

*E. sakazakii* antes dos anos 80 era conhecido pelo nome de "*Enterobacter cloacae* pigmentado de amarelo", após os anos 80 foram notadas diferenças entre a *E. sakazakii* e *E. cloacae* com relação a hibridação Ácido Desoxirribonucleico (DNA), reações bioquímicas e produção de colônias pigmentadas de amarelo (32).

Essa bactéria pode ser isolada de diversos locais como sangue, pele, olhos, intestinos, garganta, como também pode ser isolada em materiais inorgânicos como silicone, látex, metais, dentre outros produtos. Ela pode ser encontrada também nos alimentos, como os infantis, sendo eles fórmulas de leite que são administradas em recém-nascidos (33).

#### 1.2.4 *Salmonella enteritidis*

As salmonelas são bactérias anaeróbicas Gram-negativas em forma de bastões geralmente de 2 a 5 microns de comprimento por 0,5-1,5 microns de largura e por flagelos peritricos móveis. *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e é um patógeno importante para humanos e animais (34).

O nicho principal de *Salmonella* é o trato intestinal de humanos e animais de fazenda. Também pode estar presente no trato intestinal de aves selvagens, répteis e ocasionalmente insetos. Os alimentos para animais, o solo e as matérias fecais são comumente identificados como fontes de contaminação por *Salmonella* nas fazendas (35). À medida que *Salmonella* coloniza o trato gastrointestinal, os organismos são excretados em fezes dos quais eles podem ser transmitidos por insetos e outros animais a um grande número de lugares, sendo geralmente encontrados em águas poluídas. *Salmonella* não se origina em água; portanto, sua

presença indica contaminação fecal. Humanos e animais que consomem água poluída podem derramar a bactéria através da matéria fecal, continuando o ciclo de contaminação (36).

### 1.3 Bactérias do ácido láctico

As bactérias do ácido láctico (BAL) constituem um grupo de bactérias gram positivas que produzem ácido láctico a partir da fermentação de carboidratos. Pertencentes ao filo *Firmicutes*, são encontradas no leite e contribuem na produção e aromatização de alimentos como queijos e iogurtes (37,38). Avaliadas como grande grupo de bactérias probióticas, as BAL são também encontradas no intestino humano associadas a efeitos benéficos para a saúde (39).

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiram os probióticos como microrganismos vivos que reparam a saúde de humanos e animais (40), e não só interferem no equilíbrio da microbiota intestinal, como também influenciam a patogênese de doenças que incidem sobre o trato intestinal (41).

A maioria das bactérias probióticas que compõem o grupo das BAL são os lactobacilos e as bifidobactérias, ambas reconhecidas como bactérias seguras, que exercem papel essencial na manutenção da microbiota intestinal (42).

Dentro do grupo das BAL destacam-se os lactobacilos, em especial o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* que será tratado neste estudo.

### 1.4 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

O microrganismo *Lactococcus lactis* é uma BAL, Gram positiva, catalase negativa, possui baixo conteúdo de guanina + citosina (G+C) em seu genoma, e é de grande importância na produção de alimentos fermentados (43).

Possui forma de cocos e são não esporulantes. Os *Lactococcus* são homofermentadores de glicose, que significa que o ácido láctico é o produto final e superior da fermentação. As bactérias desse gênero podem ser utilizadas como probióticos, pois são "geralmente reconhecidas como seguras" (GRAS - "generally recognized as safe") (44).

*Lactococcus lactis* são bactérias não invasivas e não patogênicas, e são utilizadas há milênios na preservação e produção de produtos fermentados. Esta espécie é bastante estudada, devido ao grande interesse industrial na produção de fermentados e por serem bons modelos para o estudo da fisiologia, do metabolismo, da genética e da biologia molecular das bactérias do ácido láctico (45).

#### 1.4.1 Modulação da inflamação por *L. lactis*

Estudos do nosso grupo (46,47) utilizando um modelo experimental de administração intragástrica aguda de alta dose de etanol (50%) em camundongos C57BL/6, para induzir gastrite alérgica, demonstraram os efeitos moduladores do tratamento oral com *Lactococcus lactis* sobre a inflamação alérgica e alterações na microbiota intestinal dos animais, observando, dentre os diversos benefícios do *Lactococcus lactis*, a reversão dos sinais clássicos de inflamação alérgica, a partir da redução de IL-4 nas mucosas gástrica e intestinal, e de IgE sérica (48,49).

#### 1.4.2 Metabolismo bacteriano de *Lactococcus lactis*

A via metabólica de *L. lactis* pode funcionar através de reações aeróbicas e anaeróbicas. Consiste em 621 reações e 509 metabólitos e requer minimamente glicose, arginina, metionina, glutamato e valina para o crescimento (50). O metabolismo principal de *L. lactis* é através da via anaeróbica, fermentação, que produz ácido láctico a partir dos carboidratos disponíveis e é utilizada para a produção industrial de alimentos. As fontes de carbono para *L. lactis* incluem frutose, galactose, glucosamina, glicose, lactose, maltose, manitol, manose, ribose, sacarose e trealose. No entanto, a taxa de crescimento da célula com a ingestão de cada

fonte de carbono é diferente. A taxa de crescimento em glicose, manose, galactose, sacarose, lactose e glucosamina são as mesmas, enquanto as taxas de crescimento de frutose e manitol são menores (50).

Sob uma reação anaeróbica, a glicólise quebra os carboidratos extracelulares ao piruvato, depois converte o piruvato em ácido láctico com a principal enzima LDH, lactato desidrogenase (51). O lactato irá guiar prótons com proteína de membrana criando o potencial de membrana necessário para a produção de energia (45). NADH, o cofator da lactato desidrogenase é regenerado em NAD + para ser reutilizado para glicólise. Este mecanismo permite que *L. lactis* sobreviva sem os genes para o ciclo cítrico e a gluconeogênese.

Além da via anaeróbia, *L. lactis* possui um sistema aeróbico para auxiliar no seu desenvolvimento. Normalmente, a absorção de oxigênio afetaria o processo de fermentação ou interferiria mesmo com substâncias reativas ao oxigênio. No entanto, sob baixo consumo de oxigênio, a via aeróbica é limitada devido à baixa taxa de reciclagem de NAD da NADH oxidase. Esses danos podem ser corrigidos quando as células são cultivadas com oxigênio. As células aumentam seu crescimento, resistência à oxidação e melhoram a sobrevivência a baixa temperatura. Além disso, recentemente descobriu-se que uma cadeia de transferência de elétrons funcional em *L. lactis* suporta o potencial da membrana. A presença de NADH desidrogenase ligada à membrana oxida NADH e aumenta o crescimento celular e a produção de proteínas e vitaminas (52).

É importante para fins de melhor compreensão diferenciar metabólitos primários de metabólitos secundários. Os metabólitos primários são produtos produzidos durante a fase de crescimento dos microrganismos. Os metabólitos produzidos, têm como principal objetivo a geração de energia para as células. Já o metabolismo secundário abrange a síntese de substâncias que não são efetivas ao crescimento celular, sendo designados metabólitos secundários que são sintetizados na fase final de crescimento ou durante a fase estacionária. Os metabólitos secundários podem ser utilizados para diversas aplicações, tais como: antimicrobianos, antitumorais, antiparasitários, entre outros usos (53).

Estudo realizado com o objetivo de testar metabólitos secretados por cepas de *Enterococcus* contra diferentes linhagens de células humanas cancerígenas identificou que os metabólitos testados tinham efeitos antiproliferativos contra as células cancerígenas, mas não exibiam

toxicidade celular sobre as células normais (54). Em outro estudo, os autores utilizaram componentes específicos do leite fermentado probiótico em camundongos e concluíram que as bactérias probióticas e seus metabólitos liberados durante o processo de fermentação poderiam prevenir a carcinogênese colorretal (55).

Comprovados os efeitos probióticos de metabólitos das bactérias ácido lácticas, este estudo justifica sua importância ao buscar compreender a importância dos metabólitos de *L. lactis* na inibição ou indução do crescimento *in vitro* de microrganismos prejudiciais à saúde humana.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Cultivar metabólitos de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e avaliar sua eficácia na inibição ou promoção do crescimento bacteriano *in vitro*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Identificar a concentração apropriada de inóculo de *L. lactis* pela análise comparativa entre métodos de contagem direta e em câmara de Neubauer;
- Avaliar a curva de crescimento de *L. lactis* para fins de obtenção apropriada dos metabólitos secundários;
- Testar métodos para extração dos metabólitos primários de *L. lactis*;
- Analisar o efeito do extrato metabólito secundário de *L. Lactis* na promoção ou inibição do crescimento, *in vitro*, de bactérias entéricas.

### 3 PRODUTO CIENTÍFICO

3.1 Produção de metabólitos secundários de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e avaliação da sua eficácia na inibição do crescimento bacteriano *in vitro*

#### **Métodos de obtenção e efeitos de metabólitos de *Lactococcus lactis* sobre bactérias residentes do trato gastrointestinal**

Patrícia Alves Paiva\*, Ronize Viviane Jorge Brito\*, Letícia Antunes Athayde\*, Sérgio Avelino Mota Nobre\*, Marileia Chaves Andrade\*

\*Universidade Estadual de Montes Claros

Autor correspondente: Marileia Chaves Andrade, PhD.

E-mail: [andrade.marileia@gmail.com](mailto:andrade.marileia@gmail.com)

#### **Resumo**

Este estudo teve por objetivo cultivar metabólitos secundários de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e avaliar sua eficácia na inibição do crescimento bacteriano *in vitro*. Plaqueou-se 10 µL de suspensão bacteriana de *L. lactis* em concentração de 10<sup>3</sup> células, que foram semeadas sobre ágar M17. As placas foram incubadas a 30°C por 20 horas. Realizou-se a leitura do número de células em cada intervalo de hora e identificou-se o tempo correspondente a fase estacionária. Cultivou-se *L. lactis* em meio M17 a 30°C por 16 horas e extraiu-se os metabólitos secundários. Os metabólitos foram extraídos por meio da centrifugação a 6000 rpm por 10 minutos. Foram inoculados em placa de microtitulação de 96 poços 90 µL do extrato metabólico juntamente com 10 µL de caldo Muller Hinton contendo os microrganismos-teste: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter sakazakii*, *Lactococcus lactis* e *Salmonella enteritidis*, obedecendo às normas do *The Clinical and Laboratory Standards Institute*. Os metabólitos apresentaram ação inibitória em diferentes intensidades sobre o crescimento dos microrganismos-testes. Os microrganismos *Escherichia coli* e *Enterobacter sakazakii* apresentaram índice de inibição 37% e *Salmonella enteritidis* 93%. *Lactococcus lactis* e *Enterococcus faecalis* apresentaram índice de promoção do crescimento de 30% e 20%, respectivamente. Conclui-se que o extrato obtido estimulou o

crescimento das bactérias *Enterococcus faecalis* e *Lactococcus lactis*, sugerindo a presença de substâncias que favorecem a sobrevivência desses microrganismos, e inibiu o crescimento de *Escherichia coli*, *Enterobacter sakazakii* e *Salmonella enteritidis*.

Palavras-chave: *Lactococcus lactis*. Inibição do crescimento. Técnicas *in vitro*.

## Introdução

As bactérias do ácido láctico (BAL) constituem um grupo de bactérias Gram positivas que produzem ácido láctico a partir da fermentação de carboidratos. Pertencentes ao filo *Firmicutes*, são encontradas no leite e contribuem na produção e aromatização de alimentos como queijos e iogurtes<sup>1,2</sup>. Avaliadas como grande grupo de bactérias probióticas, as BAL são também encontradas no intestino humano associadas a efeitos benéficos para a saúde<sup>3</sup>

Quando administrados em dosagens suficientes, os probióticos melhoram a saúde intestinal por meio de atividades benéficas ao trato gastrointestinal<sup>4</sup>. Se houver desequilíbrio na microbiota intestinal, desequilíbrio também denominado disbiose, podem surgir distúrbios clínicos que podem favorecer a produção de metabólitos carcinogênicos levando ao surgimento de doenças malignas<sup>5</sup>. Ao equilibrar a microbiota intestinal e modificar os fatores carcinogênicos, os probióticos reduzem o risco de desenvolvimento de algumas neoplasias, o crescimento de tumores e inibem a formação de lesões pré-cancerosas<sup>6-8</sup>.

Os probióticos mais famosos pertencem às bactérias do ácido láctico, no entanto, algumas leveduras desempenham atividades antiproliferativas de diversas formas como degradação de compostos carcinogênicos<sup>9-11</sup>, alterações na microbiota intestinal, produção de compostos antimutagênicos<sup>12</sup>, estimulando a apoptose<sup>13,14</sup>.

Bactérias lácticas produzem variados compostos antimicrobianos, tais como ácidos orgânicos (principalmente ácido láctico e ácido acético), peróxido de hidrogênio e peptídeos antimicrobianos, incluindo bacteriocinas<sup>15,16</sup>. Alguns estudos indicam que o uso de ácido láctico e outros extratos orgânicos podem ser úteis como adjuvantes para controlar patógenos de origem alimentar e aumentar a segurança alimentar<sup>17-20</sup>. Os metabólitos purificados podem ser mais aplicáveis, especialmente em ambientes ácidos, como o intestino, onde algumas espécies BAL podem ser incapazes de resistir. As formas alimentares (meio) devem ser tomadas em consideração na avaliação dos efeitos das substâncias<sup>21</sup>.

Alguns *Lactobacillus spp.* mostram forte atividade antagonica contra bactérias e fungos patogênicos<sup>22</sup>. A ação antimicrobiana das BAL está principalmente relacionada com a produção de ácidos orgânicos e diminuição do pH do ambiente<sup>15,23</sup>. No entanto, a capacidade de síntese de substâncias bactericidas tem impacto positivo sobre a atividade antagonica<sup>23,24</sup>.

A maioria das bactérias probióticas que compõem o grupo das BAL são os lactobacilos e as bifidobactérias, ambas reconhecidas como bactérias seguras, que exercem papel essencial na manutenção da microbiota intestinal<sup>25</sup>.

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiram os probióticos como microrganismos vivos que reparam a saúde de humanos e animais<sup>26</sup>, e não só interferem no equilíbrio da microbiota intestinal, como também influenciam a patogênese de doenças que incidem sobre o trato intestinal<sup>27</sup>.

Dentro do grupo das BAL destacam-se os lactobacilos, em especial o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* que será tratado neste estudo.

Estudos prévios<sup>28,29</sup> utilizaram um modelo experimental de administração intragástrica aguda de alta dose de etanol (50%) em camundongos C57BL/6, demonstrou alterações imunológicas alérgicas induzidas pelo álcool. Outro estudo avaliou os efeitos moduladores do tratamento oral com *Lactococcus lactis* sobre a inflamação alérgica e alteração da microbiota intestinal desencadeados pela ingestão aguda de etanol em camundongos, e identificou entre diversos benefícios que o *L. lactis* reverteu sinais clássicos de inflamação alérgica a partir da redução de citocinas nas mucosas gástrica e intestinal<sup>30</sup>.

Para este estudo utilizou-se os metabólitos secundários. Os metabólitos secundários são eliminados ao final da fase estacionária de crescimento como forma de sobrevivência para o microrganismo. A partir da centrifugação coletou-se esses metabólitos que foram testados contra cinco enterobactérias.

Compreender a importância dos metabólitos de *Lactococcus lactis* na inibição ou indução do crescimento, *in vitro*, de microrganismos potencialmente patogênicos à saúde humana, abre um campo importante de investigações com possíveis aplicabilidades clínicas.

## **Materiais e métodos**

### ***Estirpe bacteriana e condições de crescimento***

Utilizou-se a espécie *Lactococcus lactis* NCDO2118, linhagem *L. lactis* subsp. *lactis*, que é uma linhagem selvagem de *L. lactis* pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM) – UFMG.

Foram utilizados neste estudo cinco microrganismos entéricos humanos: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Enterococcus faecalis* (ATCC 90), *Enterobacter sakazakii* (não tem

referência), *Salmonella enteritidis* (não tem referência) e *Lactococcus lactis* NCDO2118. As cepas de origem desses microrganismos encontravam-se em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  no Laboratório de Epidemiologia e Biocontrole de Microrganismos da Universidade Estadual de Montes Claros.

### ***Padronização quantitativa de L. lactis em cultura***

A partir de uma cultura de *L. lactis* crescida durante 24 horas em meio M17, foi retirada toda massa celular, que então foi dispersa em 1 mL de solução salina estéril (0,85% p/v). Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  dessa suspensão foi lida em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro®) em comprimento de onda de 540 nm. Posteriormente à leitura, foi realizada a contagem em Câmara de Neubauer e, em seguida, uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  foi plaqueada em ágar M17 e incubada a  $30^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Essa suspensão inicial sofreu diluição decimal seriada até  $10^{-5}$ , e, para cada diluição procedeu-se a mesma ordem de procedimentos: leitura em comprimento de onda de 540 nm, contagem em Câmara de Neubauer e plaqueamento em ágar M17. Com o objetivo de proporcionar oportunidades de contagem direta, cada uma dessas diluições sofreu nova diluição decimal seriada até  $10^{-6}$ . Foram plaqueadas alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  de cada uma das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$  em ágar M17 a  $30^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Foram escolhidas essas três diluições para se obter uma quantificação do crescimento dessas células, ou seja, a escolha dessas diluições permitiu identificar a melhor diluição a ser considerada na contagem. Todo procedimento foi realizado em duplicata, devido à limitação de reagentes (FIGURA 1).

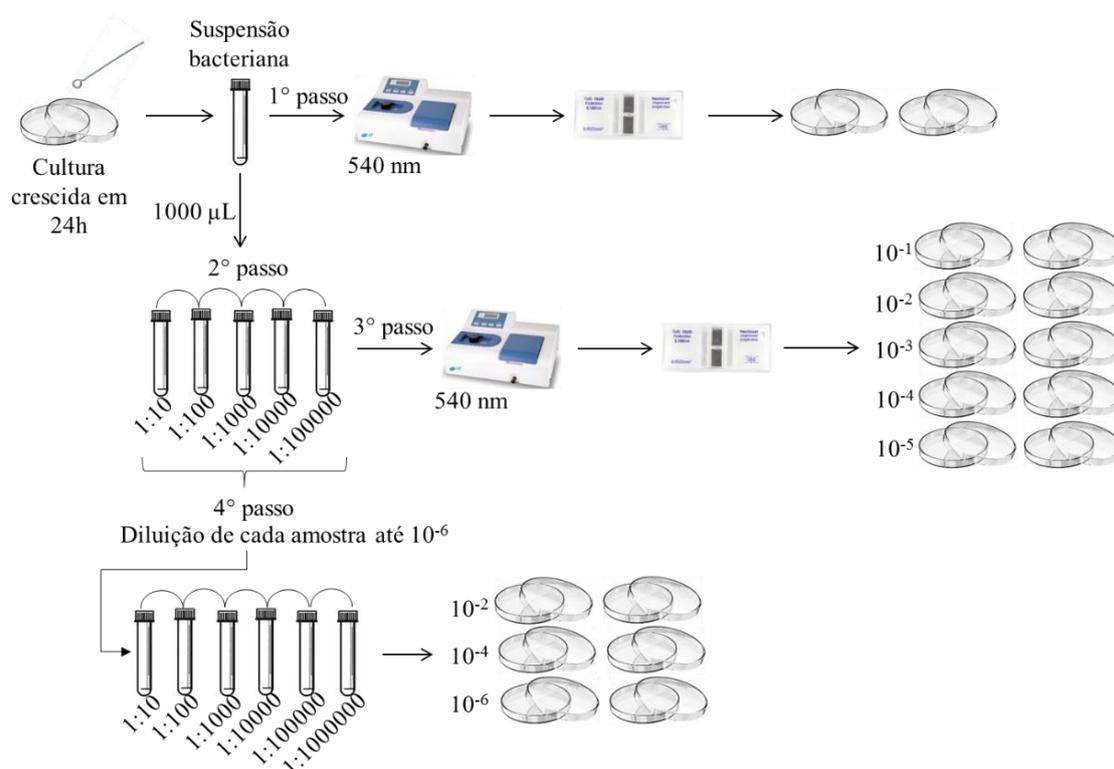


Figura 1- Padronização quantitativa de *L. lactis* em cultura.

### ***Avaliação da curva de crescimento de L. lactis em cultura***

Após verificada a correlação entre os métodos de contagem, procedeu-se a construção da curva de crescimento a fim de determinar o término da fase estacionária de *L. lactis*.

O inóculo de 5 mL foi padronizado a partir do padrão correspondente ao valor de 0,5 da escala McFarland, o qual corresponde a 0,5 mL da solução de BaCl<sub>2</sub> 0,048 mol/L e 99,5 mL da solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% (v/v), resultando em uma suspensão contendo aproximadamente 1 a 2 x 10<sup>8</sup> células/mL de bactéria<sup>31</sup>.

Para preparo do inóculo adicionou-se com uma alça de platina estéril toda massa celular crescida durante 24 horas, a partir de uma alíquota de 50 µL de *L. lactis* em um tubo de ensaio contendo solução salina estéril e agitou-se a solução em agitador (IKA®). Para ajustar a densidade óptica da suspensão de células do inóculo à da suspensão de McFarland foi utilizado o método de comparação visual, em iluminação ambiente adequada, utilizando tubo de ensaios de mesmo diâmetro que o usado para suspensão padrão.

Após o preparo da suspensão contendo aproximadamente 1 a 2 x 10<sup>8</sup> células/mL de *L. lactis*, realizou-se diluição decimal seriada até 10<sup>3</sup> células.

Utilizando-se uma pipeta com ponteiros estéreis e descartáveis, realizou-se a inoculação das placas. A fim de verificar o tempo correspondente à fase estacionária, preparou-se placas correspondentes ao tempo de 20 horas. Foi depositado um inóculo de 10  $\mu$ L de suspensão bacteriana contendo aproximadamente  $10^3$  células de *L. lactis* em cada placa, que foi semeada imediatamente sobre a superfície do meio ágar M17, com o auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram posteriormente incubadas em estufa (Fanem®) à 30° C. A cada intervalo de uma hora as placas correspondentes foram avaliadas quanto ao crescimento de colônias. Essas colônias crescidas foram alçadas e dispersas em salina estéril (0,85% p/v), contadas em Câmara de Neubauer e diluídas até  $10^1$ . Foram plaqueadas as concentrações  $10^3$ ,  $10^2$  e  $10^1$ . Esse procedimento foi realizado em triplicata (FIGURA 2). Foram calculadas as concentrações de origem,  $\log_{10}$ , média e desvio padrão das amostras. Os dados foram lançados em planilha e os gráficos construídos no Microsoft Excel 2016®.

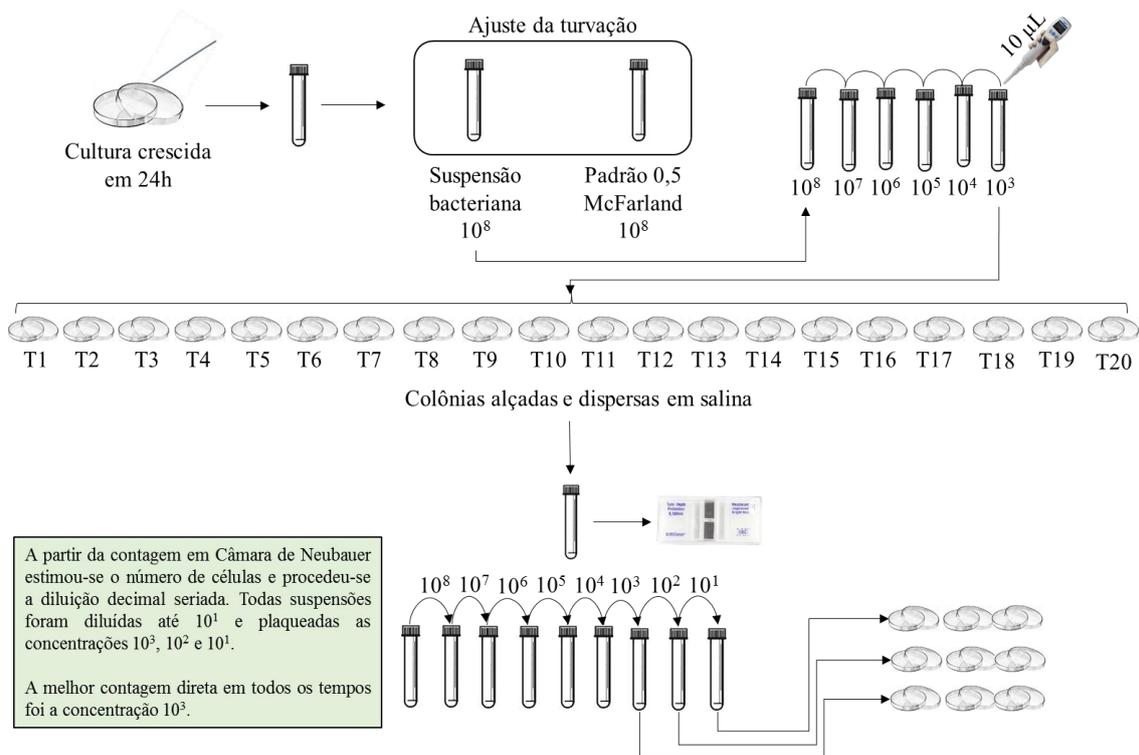


Figura 2 – Ajuste do inóculo e curva de crescimento de *L. lactis*.

### Obtenção dos metabólitos de *L. lactis*

A curva de crescimento em ágar M17 mostrou que após 16 horas *L. lactis* atingiu sua fase estacionária, produzindo os metabólitos secundários necessários à sua sobrevivência. Para obtenção desses metabólitos foram inoculados 50  $\mu$ l de *L. lactis* em 15 placas de petri

contendo ágar M17 por 16 horas a 30°C em estufa (Fanem®). Como demonstrado na Figura 2, toda massa celular crescida foi coletada por meio de alça de platina estéril e dispersa em tubo de ensaio contendo 1 mL de ADE. Posteriormente, para a completa remoção dos metabólitos produzidos, principalmente os metabólitos que adentraram superficialmente ao meio de crescimento, a placa foi lavada com mais 2 mL de ADE. Esse procedimento foi realizado de modo individual com uma placa por vez. Todo o material coletado foi transferido para tubo de centrifugação tipo Falcon estéril. A suspensão bacteriana, de 13,01 gramas, foi centrifugada em centrífuga (Modelo SP-700/6000 - SPLABOR) a 6.000 rpm por 10 minutos para separação das fases sobrenadante e *pellet* celular. A suspensão celular sobrenadante, de 12,48 gramas, foi recolhida, filtrada em membrana millipore 0,22 mm e armazenada em freezer a -20°C. O *pellet* celular correspondente a 0,53 gramas foi diluído com 1 mL de água destilada estéril para concentração de 25% e foi submetido ao processo de lise física (FIGURA 3).

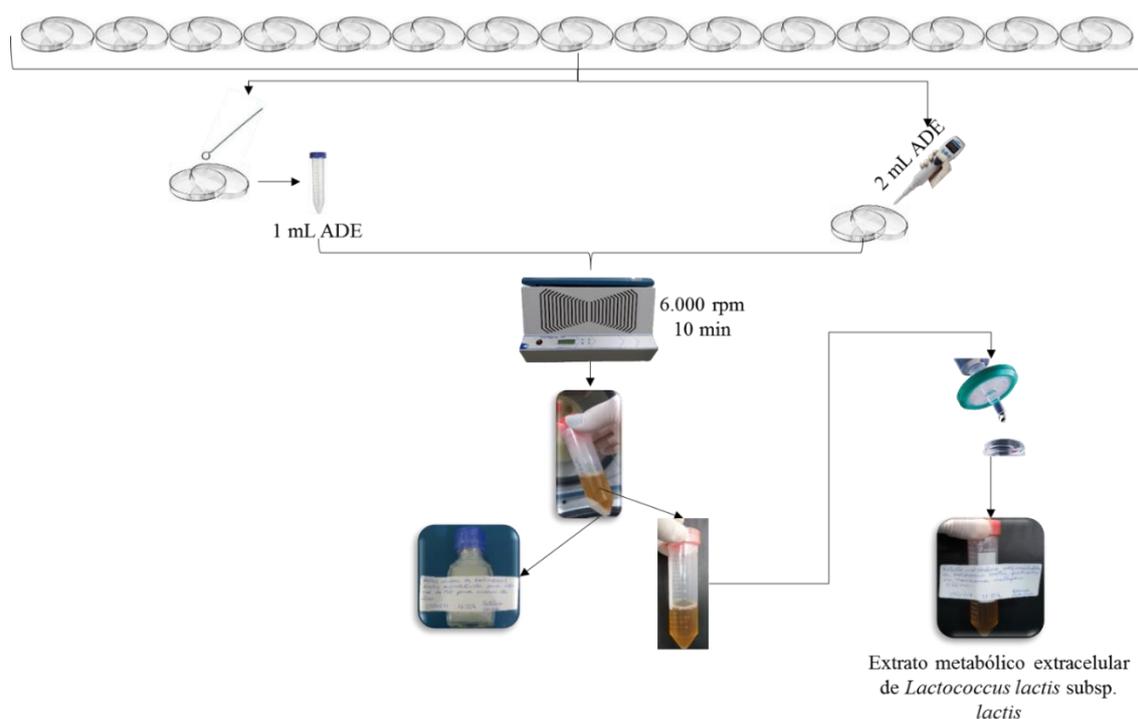


Figura 3 – Estratégia utilizada para extração de metabólitos.

### **Análise da viabilidade celular**

Para verificar a viabilidade dos componentes celulares antes do processo de lise, uma alíquota de 100 µL foi retirada e diluída até  $10^{-10}$  em água destilada estéril. Foram plaqueadas

alíquotas de 10 µL das diluições  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-10}$ , em placas de Petri contendo ágar M17. As placas foram incubadas em estufa Fanem<sup>®</sup> por 24 horas a 30°C. Optou-se por utilizar as diluições  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-10}$ , pelo fato de terem sido inoculadas  $10^3$  células de *L. lactis* e seu crescimento ter sido muito bom; portanto, quanto mais diluída a amostra mais fácil se torna a contagem, e o uso de três diluições possibilita melhor estimativa do número de células da amostra de origem.

### ***Extração de metabólitos de L. lactis***

Para extração dos metabólitos primários de *L. lactis* foram utilizados três métodos: homogeneização em banho ultrassônico, banho em nitrogênio líquido e centrifugação.

Uma alíquota de 250 µL de suspensão de *L. lactis* a 25% foi utilizada para homogeneização em banho ultrassônico. A homogeneização foi realizada em lavadora ultrassônica (Unique<sup>®</sup>) em frequência de 37 kHz, com auxílio do homogeneizador de amostras (Omni Tissue Master<sup>®</sup>). Foram realizados cinco ciclos de 30 segundos, com intervalo de 30 segundos em gelo entre um ciclo e outro. Após, realizou-se diluição decimal seriada até  $10^{-6}$  e foram plaqueados 10 µL da amostra de origem e das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$  em ágar M17 a 30° por 24 horas. Optou-se por essas diluições a fim de se observar o crescimento de *L. lactis* em várias concentrações e estimar a concentração de origem antes da lise com maior fidedignidade.

Uma alíquota de 250 µL de suspensão de *L. lactis* a 25% foi utilizada para o procedimento com o nitrogênio líquido. O banho em nitrogênio líquido foi realizado adicionando-se o nitrogênio líquido sobre as células de *L. lactis* dentro de um béquer de vidro até o completo congelamento das células. As células sofreram o descongelamento em temperatura ambiente. Após, realizou-se diluição decimal seriada até  $10^{-6}$  e foram plaqueados 10 µL da amostra de origem e das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$  em ágar M17 a 30° por 24 horas.

Em seguida, foi utilizada a centrifugação em centrífuga (Spinlab SL-5GR<sup>®</sup>) a 4°C e 15.000 rpm por 20 minutos. Após, realizou-se diluição decimal seriada até  $10^{-6}$  e foram plaqueados 10 µL da amostra de origem e das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$  em ágar M17 a 30° por 24 horas.

### ***Ensaio, in vitro, da ação de metabólitos de L. lactis na inibição ou promoção do crescimento de bactérias***

Foram cultivados em ágar nutriente, por 24 horas a 37° C, os microrganismos *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter sakazakii* e *Salmonella enteritidis*, enquanto o *Lactococcus lactis* foi cultivado em ágar M17 por 24 horas a 30°C.

Para o preparo da suspensão bacteriana de cada microrganismo-teste, adotou-se o padrão 0,5 da escala McFarland que fornece concentração de aproximadamente 10<sup>8</sup> células/mL. Toda massa celular crescida foi transferida para um tubo contendo 1 mL de caldo Muller Hinton e agitou-se a solução em agitador vórtex (IKA®). Para ajustar a densidade óptica da suspensão de células do inóculo à da suspensão de McFarland foi utilizado o método de comparação visual, em iluminação ambiente adequada, utilizando tubo de ensaios de mesmo diâmetro que o usado para suspensão padrão.

Após o preparo da suspensão contendo aproximadamente 1 a 2 x 10<sup>8</sup> células/mL de *L. lactis*, retirou-se uma alíquota de 100 µL que realizou-se diluição decimal seriada até 10<sup>4</sup> células/mL. Uma alíquota de 10 µL dessa diluição foi contada em Câmara de Neubauer para confirmação do valor de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

A microplaca de poliestireno de 96 poços (Kasvi®), foi dividida em quatro campos: primeiro campo composto por 90 µL de extrato metabólico secundário de *L. lactis* e 10 µL de caldo Muller Hinton com microrganismo-teste na concentração de 10<sup>4</sup> células/mL; segundo campo com 90 µL de água destilada estéril e 10 µL de Caldo Muller Hinton com microrganismo-teste na concentração de 10<sup>4</sup> células/mL; terceiro campo controle de esterilidade do extrato, e quarto campo controle de esterilidade do caldo. A placa foi incubada em estufa Fanem® a 37°C por 24 horas. Após, foram realizadas leituras de absorbância em quatro comprimentos de onda: 405 nm, 450 nm, 492 nm e 630 nm. Utilizou-se quatro comprimentos de onda por acreditar-se que os microrganismos em estudo são muito distintos e, portanto, podem se comportar de modo diferente em determinados comprimentos de onda. Os quatro comprimentos de onda permitiram comparar esse crescimento entre si. Após a leitura, foram retirados 10 µL de cada poço que foram diluídos até 10<sup>-6</sup>. Foram plaqueadas alíquotas de 10 µL das diluições 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-6</sup> em ágar Muller Hinton. Essa diluição foi necessária para possibilitar contagem direta após a incubação a 37° C por 24 horas. O procedimento foi realizado em triplicata.

### **Análise estatística**

Foram elencadas neste estudo as variáveis dependentes:  $\text{Log}_{10}$  e absorvância e calculados o  $\text{Log}_{10}$ , Média, Desvio padrão e o Intervalo de Confiança. Adotou-se margem de 5% de erro. Os resultados dos ensaios foram submetidos à análise estatística pelo teste de Tukey e ANOVA one-way.

## **Resultados e discussão**

### ***Padronização do inóculo de *L. lactis* através da análise comparativa entre métodos de contagem direta e contagem em Câmara de Neubauer***

A contagem em Câmara de Neubauer é um método bastante utilizado em análises laboratoriais devido sua praticidade e baixo custo. A tabela 1 apresenta os resultados obtidos a partir da correlação entre o método de contagem direta e a contagem em Câmara de Neubauer. Observa-se que os valores das concentrações iniciais se mostraram bastante aproximados. Como esperado, os dois métodos apresentaram a mesma tendência. No entanto, as amostras mais diluídas apresentaram decaimento maior na contagem direta, o que pode sugerir erro analítico, uma vez que a contagem em Câmara de Neubauer células viáveis e não viáveis são contadas.

Em estudo realizado com amostras de sangue de 120 pacientes, as plaquetas foram contadas manualmente e, de forma independente, em uma câmara de contagem de Neubauer por três técnicos. Os resultados mostraram que o uso correto da câmara de Neubauer apresentou uma precisão satisfatória nas contagens acima de 4.000 plaquetas/ $\mu\text{l}$ . Portanto, faz-se importante o apoio de mais de um operador para se realizar a contagem, o que pode contribuir para maior fidedignidade do resultado<sup>32</sup>.

Ainda, com o objetivo de controlar a qualidade dos dados, utilizou-se a espectrofotometria como apoio. As amostras foram lidas em comprimento de onda de 540 nm, e observou-se que à medida em que a amostra foi diluída a absorvância diminuiu. Outros estudos associaram a leitura de absorvância com o método de contagem direta para maior exatidão na construção da curva de crescimento de determinados microrganismos<sup>33-35</sup>.

Os métodos de leitura de absorvância e contagem do número de células apresentam vantagens e desvantagens. A leitura de absorvância é um método de baixo custo e possibilita a quantificação de amostras grandes, porém não distingue células vivas e mortas. A contagem do número de células também é um método de baixo custo, porém trata-se de um trabalho

exaustivo e subjetivo. Dessa forma, a combinação desses dois métodos aumenta a precisão dos resultados e a praticidade, pois envolve menor gasto de tempo<sup>36</sup>.

Já outro estudo realizado com o objetivo de comparar métodos manuais e automáticos para contagem de células, evidenciou que as contagens automáticas apresentaram valores superiores aos encontrados nas contagens diretas<sup>37</sup>, o que pode sugerir que o método manual é mais fidedigno em detrimento ao método automático.

Tabela 1- Correlação entre método de contagem de UFC, método de contagem de células e absorvância.

<b>Amostras</b>	<b>Log<sub>10</sub> Contagem Direta</b>	<b>Log<sub>10</sub> Câmara de Neubauer</b>	<b>Densidade Óptica (540 nm)</b>
Origem	10,58	-	2,820
0,1	8,49	8,32	1,057
0,01	7,47	7,28	0,138
0,001	6,46	7,05	0,020
0,0001	5,18	6,75	0,002
0,00001	4,26	6,51	0,000

Para verificar se os dados quantitativos obtidos pelos dois métodos se assemelhavam, optou-se por um estudo de correlação. A figura 4 apresenta a linearidade avaliada por meio do cálculo do quadrado do coeficiente de correlação, a partir da correlação gráfica entre o Log<sub>10</sub> do número de UFC.mL<sup>-1</sup> e o Log<sub>10</sub> do número de bactérias.mL<sup>-1</sup>. O coeficiente de 0,96 denota uma alta correlação entre ambos os métodos, validando a contagem em Neubauer como um método rápido e assertivo, uma vez que em aproximadamente 96% das contagens realizadas na Câmara de Neubauer, os valores foram semelhantes aos encontrados na contagem direta. Pode-se então afirmar que o método de contagem em Câmara de Neubauer foi eficiente para se estimar o número de células presentes em determinada amostra. Dessa forma, pode-se utilizar esse método para alcançar dados confiáveis e rápidos.

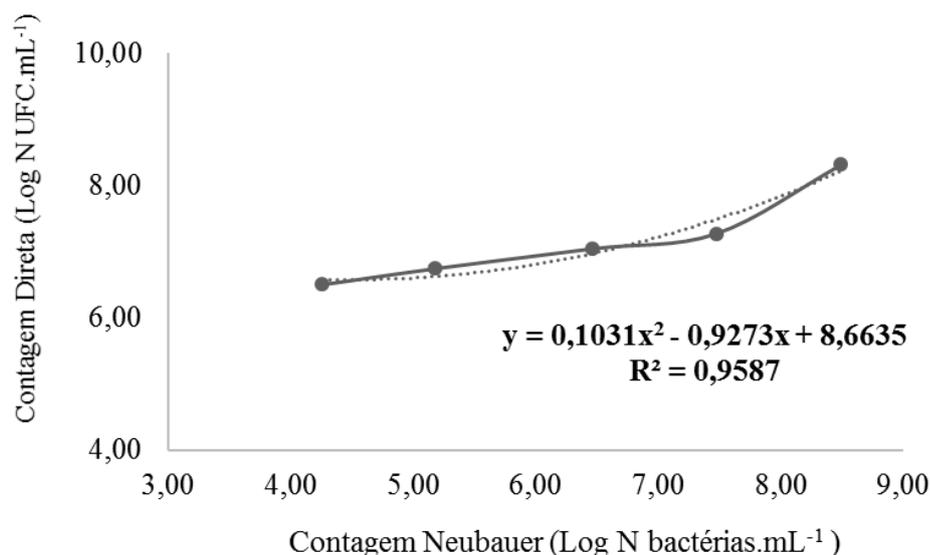


Figura 4 – Coeficiente de correlação e equação da reta entre métodos de contagem do número de células e absorvância.

#### ***Avaliação da curva de crescimento de *L. lactis* para obtenção apropriada dos metabólitos***

Para construção da curva de crescimento de *L. lactis* em momento posterior, a correlação entre os métodos manuais de contagem fez-se importante. Buscou-se basicamente determinar o grau de correlação quantitativa entre os métodos manuais, com o objetivo de identificar se a contagem em câmara de Neubauer seria método eficaz de resultado mais rápido frente a contagem direta, cuja resposta leva 24 horas. Foram realizadas contagens em Câmara de Neubauer e contagem direta em placas de petri.

Os metabólitos secundários são substâncias extracelulares secretadas no meio de cultura, durante o crescimento e diferenciação de um organismo vivo e têm sido isolados e caracterizados principalmente para fins industriais<sup>38</sup>.

Na maioria das fermentações, a obtenção do produto desejado está diretamente relacionada a diversos parâmetros. Um dos mais pesquisados é o número de células, portanto o estudo da concentração do inóculo é fundamental. O crescimento de culturas bacterianas compreende uma sequência de fases caracterizadas por variações nas taxas de crescimento celular<sup>39,40</sup>.

As curvas de crescimento microbiano e os modelos matemáticos podem fornecer informações úteis para entender o comportamento do microrganismo e selecionar as condições de crescimento ótimas. A importância do meio de cultivo é fundamental em trabalhos em que estão envolvidos microrganismos e produtos gerados por eles, como é o

caso de *L. lactis*. Além do ágar M17, o ágar MRS também é relatado como meio adequado para promoção do crescimento de *L. lactis*<sup>41</sup>. Optou-se por utilizar nesse estudo o (Difco™®) M17 Agar suplementado com 10% de lactose, por ser um meio amplamente utilizado para crescimento de lactobacilos. A escolha por usar o ágar ao invés do caldo, se deu com o objetivo de que houvesse a menor interferência possível do meio de cultivo sobre a resposta dos microrganismos ao extrato metabólico. Experiências prévias de pesquisadores do grupo sinalizam que o caldo, por possibilitar maior superfície de contato entre o microrganismo e os nutrientes promove o arraste de substâncias que podem interferir nos testes.

Neste estudo, adotou-se a temperatura de 30°C por ser a temperatura ideal recomendada pelo fabricante do meio de cultivo utilizado. Além do meio de cultivo e tempo de crescimento, a temperatura é um dos fatores muito estudados, pois é relatado que quando *L. lactis* é exposto a altas temperaturas de fermentação, apresenta acidificação mais rápida e forma menor concentração de produtos secundários<sup>42</sup>. Estudo que relacionou o efeito da temperatura sobre o crescimento e formação de produtos de *L. lactis*, avaliou o crescimento em duas temperaturas distintas. Quando cultivado em condições padrão a 30°C, toda a maltose produzida foi consumida em 8 horas e convertida em ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético e etanol. Quando a temperatura foi elevada para 37°C, o processo de fermentação resultou em uma menor quantidade de massa celular e menos formação de subprodutos<sup>43</sup>.

A curva de crescimento foi realizada para determinação das fases e do tempo de crescimento de *L. lactis* em ágar M17. Esta curva revelou-se o ponto de apoio durante os ensaios por permitir estimar o número de UFC em determinada concentração da amostra.

A fase estacionária de um microrganismo é atingida quando esse esgota os nutrientes necessários ao seu crescimento. A carência de nutrientes leva os microrganismos a situações de estresse, tais como, altas concentrações de ácidos orgânicos, estresse osmótico e oxidativo, e mudanças de pH, dependendo das condições específicas que os levaram à fase estacionária. É nessa fase que metabólitos secundários, antibióticos e toxinas são sintetizados<sup>44</sup>.

A Figura 5 apresenta a intensidade de crescimento de *L. lactis* em função do tempo de cultivo em ágar M17. Após decorridas 16 horas de incubação, *L. lactis* atingiu seu pico máximo de crescimento e entrou em fase estacionária, produzindo metabólitos necessários à sua sobrevivência. A fase estacionária finalizou com 17 horas, iniciando a partir daí queda brusca no número de células de *L. lactis*, devido esgotamento de nutrientes do meio de cultura e aumento dos produtos tóxicos provenientes do próprio metabolismo bacteriano.

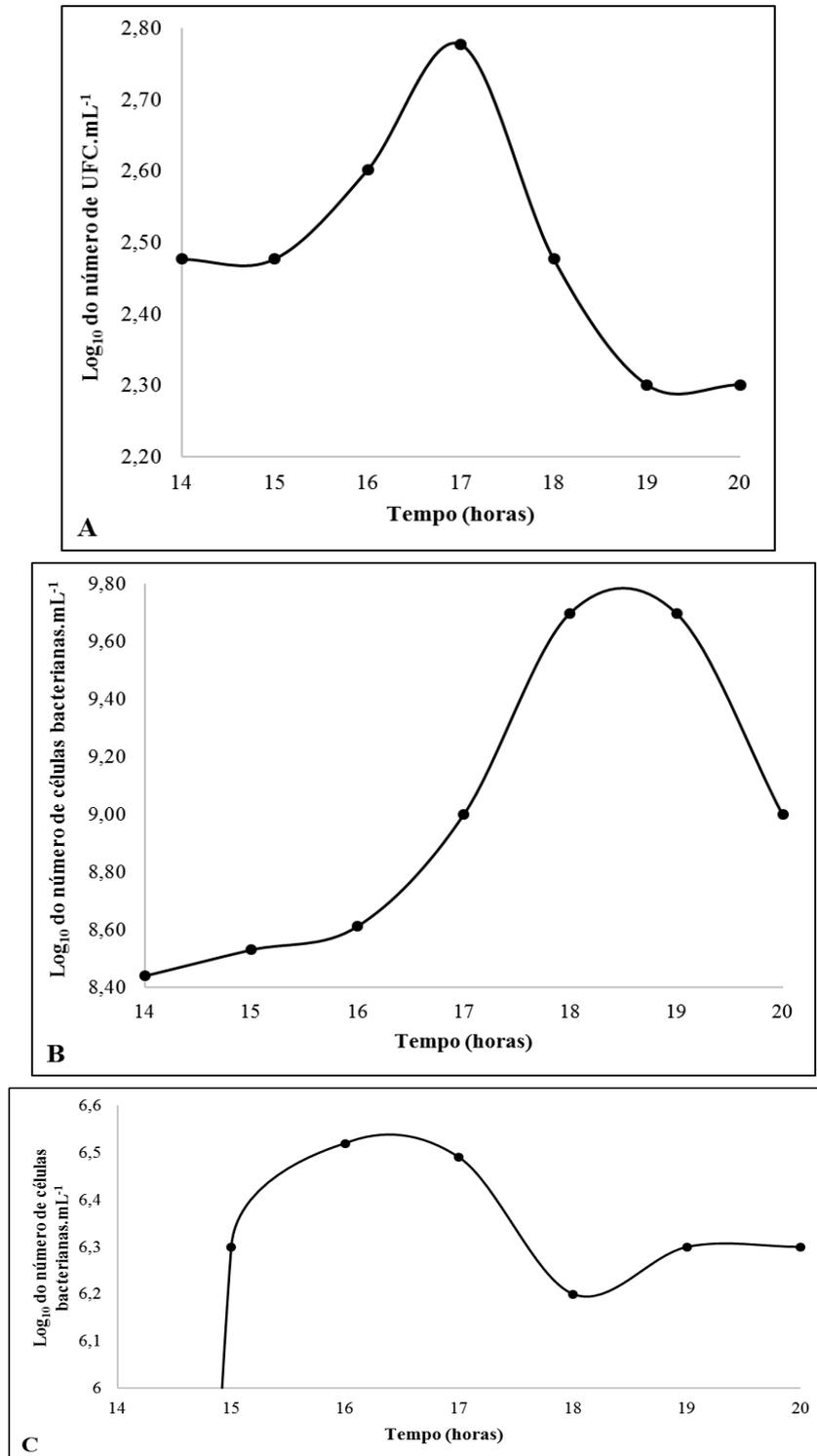


Figura 5 – Intensidade de crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (NCDO2118) em função do tempo de cultivo em Ágar M17. (A) Log<sub>10</sub> do número de UFC.mL<sup>-1</sup>; (B) Log<sub>10</sub> do número de células bacterianas. mL<sup>-1</sup> estimados em Câmara de Neubauer e (C) Log<sub>10</sub> do número de células bacterianas. mL<sup>-1</sup>, estimadas por contagem direta das colônias dissociadas em ágar M17.

#### *Avaliação dos métodos utilizados para lise celular física de L. lactis*

A Figura 6 apresenta as estratégias utilizadas para lise de *L. lactis* e obtenção de metabólitos primários. Os métodos utilizados para romper a parede celular de *L. lactis* não se mostraram eficientes conforme nos mostra a figura 6.

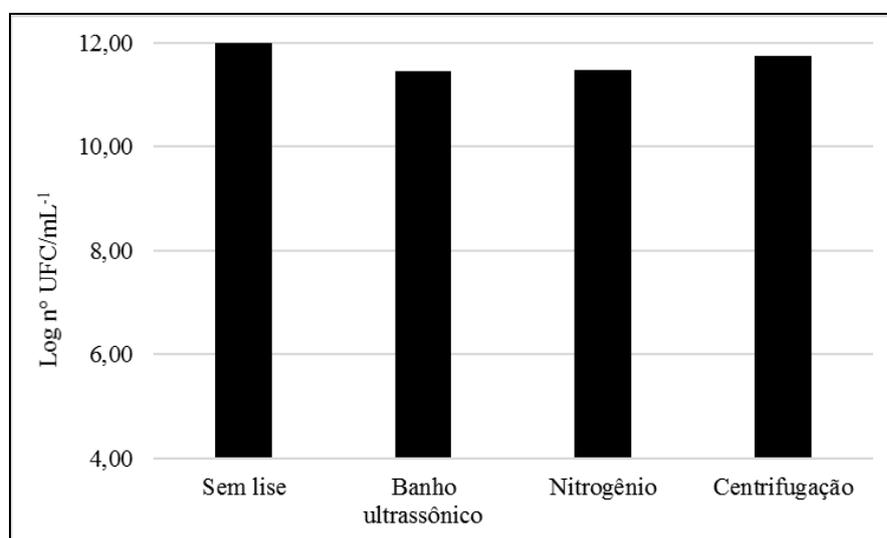


Figura 6- Estratégia utilizada para extração de metabólitos primários de *L. lactis*. Homogeneização em banho ultrassônico, banho em nitrogênio líquido e centrifugação.

Os métodos de ruptura celular são geralmente distribuídos em três categorias: químicos, físicos e mecânicos. Os métodos químicos são aqueles que dependem de alterações químicas, por exemplo, a hidrólise enzimática da parede celular. Já os métodos físicos baseiam-se em alterações na parede celular ou estrutura da membrana sem causar modificação química e sem aplicação de energia, por exemplo, desestabilização das membranas celulares por dissolução de solventes<sup>45</sup>.

A facilidade de interrupção mecânica das células depende da complexidade e composição do seu envelope celular. A parede celular das bactérias Gram-negativas pode ser facilmente rompida usando métodos mecânicos quando comparada com a parede celular das bactérias Gram-positivas. Similarmente, a composição da parede celular de leveduras e fungos filamentosos é mais complexa do que a bactéria; portanto, a ruptura de sua parede celular requer forças mecânicas mais fortes<sup>46</sup>.

Os métodos não mecânicos de ruptura de células são geralmente preferidos para a extração dos metabólitos primários de microrganismos. Neste caso, agentes químicos ou físicos são usados para tornar o envelope celular permeável para que os metabólitos primários possam ser liberados no meio citoplasmático. Diferentes agentes de interrupção, tais como, enzimáticos, físicos e químicos, podem ser utilizados para a extração de amostras primárias.

Neste estudo, optou-se por utilizar apenas meios físicos para romper a parede celular de *L. lactis*, por acreditar-se que o uso de solventes e enzimas poderia interferir na composição dos metabólitos primários e que essa interferência poderia causar viés de confusão ao se analisar os efeitos desses metabólitos sobre os microrganismos-teste.

Os efeitos da alta pressão sobre a viabilidade, estrutura, lise e atividade da hidrolase da parede celular de duas subespécies de *L. lactis*, cepas de *cremoris* observou que suspensões de células tratadas com pressão foram lisadas mais rapidamente do que os controles não tratados com pressão ao longo do tempo<sup>47</sup>.

A membrana bacteriana precisa ser forte para que as células sejam capazes de suportar alta pressão de turgescência. A membrana rígida e espessa é vantajosa na fase estacionária quando as células bacterianas são expostas a diferentes condições de estresse, por exemplo, exaustão e acidificação do meio<sup>48</sup>. No entanto, durante o crescimento exponencial, a membrana deve ser flexível para permitir a rápida divisão e ampliação celular.

Alguns estudos utilizaram a centrifugação para lisar *L. lactis*, no entanto, usaram outros métodos como apoio, por exemplo o uso de enzimas<sup>49</sup>. Devido enzimas alteraram os compostos intracelulares, esse método não seria viável para o objetivo desse estudo, pois seria viés na interpretação dos resultados, visto que o ideal é o mínimo possível de interferência de agentes externos sobre os metabólitos.

Alguns métodos são relatados na literatura como métodos eficientes para lisar a parede celular de *L. lactis*, dentre eles destacam-se os homogeneizadores de alta pressão, a sonicação e a prensa francesa<sup>45</sup>. O fabricante French® Pressure Cell Press recomenda o uso da prensa francesa em uma pressão de 35.000 psi (2,3 kbar) para romper a parede celular de *Lactococcus*.

Como observado na Figura 6, nenhum dos métodos utilizados foram suficientes para lisar *L. lactis*. Portanto, não foi possível obter acesso ao metabólito primário de *L. lactis*. Dessa forma, para este estudo utilizou-se apenas os produtos oriundos do metabolismo secundário.

### ***Efeito in vitro do extrato metabólito secundário de L. Lactis na inibição ou promoção do crescimento de microrganismos entéricos***

A Figura 7 apresenta os resultados da interação entre extrato metabólico secundário, coletado no sobrenadante de cultura de *L. lactis*, e os microrganismos-teste.

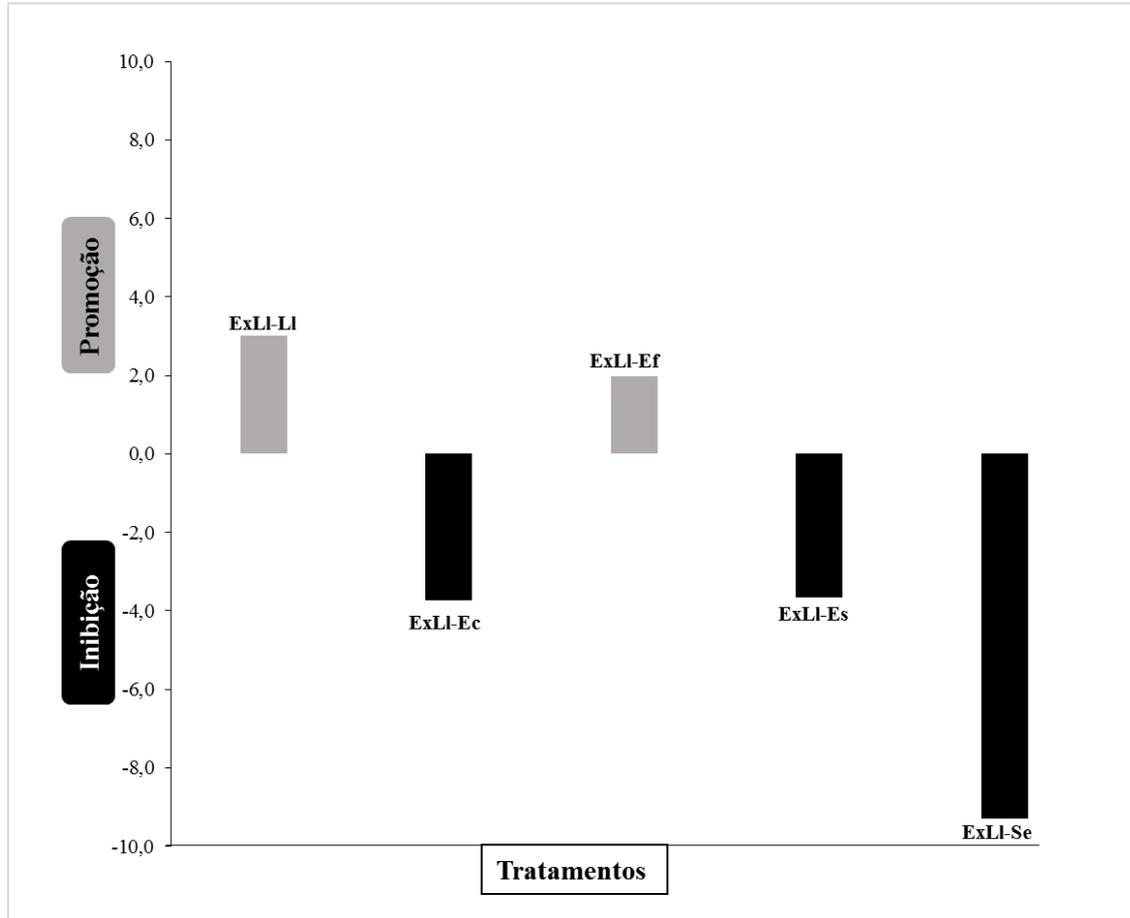


Figura 7- Análise comparativa do efeito do extrato metabólito secundário de *L. Lactis* no crescimento, *in vitro*, de microrganismos entéricos. ExLi (Extrato metabólico secundário de *L. lactis*); Li (*L. lactis*); Ec (*Escherichia coli*); Ef (*Enterococcus faecalis*); Es (*Enterobacter sakazakii*); Se (*Salmonella enteritidis*). \*Médias dos tratamentos.

Interessantemente, os metabólitos secundários de *L. lactis* apresentaram ação inibitória em diferentes intensidades sobre o crescimento dos microrganismos-testes. Os microrganismos *Escherichia coli* e *Enterobacter sakazakii* apresentaram índice de inibição 3,7 e *Salmonella enteritidis* 9,3, ou seja, a inibição do crescimento de *Salmonella* foi completa. *Lactococcus lactis* e *Enterococcus faecalis* apresentaram índice de promoção do crescimento de 3,0 e 2,0, o que sugere que o extrato metabólico de *L. lactis* possui substâncias que favorecem a sobrevivência de *L. lactis* e *E. faecalis*.

Algumas cepas probióticas como: *Bifidobacterium breve*, *L. acidophilus* e *Lactobacillus casei* (*L. casei*) reduzem a viabilidade do agente patogênico *Enterobacter sakazakii*, presentes nas fórmulas infantis produzidas comercialmente<sup>50</sup>.

Estudo que investigou os efeitos da fermentação de *L. lactis* sobre a motilidade de *Salmonella*, observou que o efeito inibitório na motilidade ocorreu por uma redução do pH intracelular da bactéria induzido pelo acetato, sugerindo que o *L. lactis* pode ser utilizado para

atenuar ação de bactérias patogênicas, uma vez que a motilidade bacteriana está fortemente associada à virulência<sup>51</sup>.

Estudo que determinou as atividades inibitórias de substâncias secretadas de espécies BAL selecionadas em co-cultura com *L. monocytogenes* ou *S. Enteritidis* concluiu que as espécies selecionadas para estudo reduziram as cargas de patógenos nos alimentos, especialmente para microrganismos que requerem altas doses infecciosas para estabelecer uma infecção<sup>52</sup>.

Estudo que avaliou as propriedades antimicrobianas de cepas de *Lactobacillus plantarum* isoladas de queijos e reconheceram a importância dessas cepas quanto à atividade antagonista verificou que *Lb. plantarum* inibiu o crescimento de *S. enteritidis*, observado após 24 horas de incubação<sup>53</sup>.

Outro estudo vem comprovar essa ação inibitória de produtos de bactérias pertencentes ao grupo BAL, como demonstrada a atividade antimicrobiana de *L. acidophilus* sobre *C. sakazakii*, ao se adicionar o lactobacilo à fórmulas infantis, apesar de não se saber ao certo qual metabólito promoveu essa inibição<sup>54</sup>.

As infecções por *E. sakazakii* em recém-nascidos, adultos e idosos podem apresentar diversos sintomas. Nos recém-nascidos, as infecções podem estar associadas à meningite, conjuntivites, enterocolite necrosante, bacteremia e/ou sepses. Das doenças gastrointestinais a mais frequente em recém-nascidos prematuros é a enterocolite necrosante<sup>55</sup>.

Em 2001, Van Acker e colaboradores relataram um surto de infecção por *E. sakazakii*, onde 12 crianças recém-nascidos em uma maternidade localizada na Bélgica, foram infectadas, sendo que duas delas foram ao óbito, este caso ficou conhecido como “Surto da Bélgica”<sup>56</sup>.

Em 2003, Barreira e colaboradores relataram um caso de infecção por *E. sakazakii* em bebê de 14 dias, no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em que a criança teve meningite devido a bactéria. Devido as complicações decorrentes da infecção como edema cerebral e hemorragia, a criança faleceu no 15º dia de internação<sup>57</sup>.

## Conclusão

O presente estudo mostrou que o extrato metabólico secundário de *L. lactis* inibiu significativamente as cepas de *E. coli*, *E. sakazakii* e *S. enteritidis*. Ao mesmo tempo que promoveu o crescimento das cepas *L. lactis* e *E. faecalis*. Assim, esses metabólitos podem ser

eficazes para definir estratégias futuras para o controle biológico de *E. coli*, *E. sakazakii*, *S. enteritidis*. Mais estudos são necessários para investigar os componentes metabólicos responsáveis pela atividade antimicrobiana.

## Referências

1. Marshall VM. Lactic acid bacteria: starters for flavour. *FEMS Microbiol Lett* banner. 1987;46(3):327–336. doi:10.1111/j.1574-6968.1987.tb02469.x.
2. Smit G, Smit BA, Engels WJM. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol Rev*. 2005;29(3):591–610. doi:10.1016/j.femsre.2005.04.002.
3. Hempel S, Newberry SJ, Maher AR, et al. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*. 2012;307(18):1959–1969. doi:10.1001/jama.2012.3507.
4. FAO/WHO. *Guidelines for the evaluation of probiotics in foods*. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. London, Ontario, Canada; 2002. [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf).
5. Serban DE. Gastrointestinal cancers: influence of gut microbiota, probiotics and prebiotics. *Cancer Lett*. 2014;345(2):258–270. doi:10.1016/j.canlet.2013.08.013.
6. Rowland IR, Rumney CJ, Coutts JT, Lievens LC. Effect of Bifidobacterium longum and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*. 1998;19(2):281–285.
7. Le Leu RK, Hu Y, Brown IL, Woodman RJ, Young GP. Synbiotic intervention of Bifidobacterium lactis and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats. *Carcinogenesis*. 2010;31(2):246–251. doi:10.1093/carcin/bgp197.
8. Chiu Y-H, Hsieh Y-J, Liao K-W, Peng K-C. Preferential promotion of apoptosis of monocytes by Lactobacillus casei rhamnosus soluble factors. *Clin Nutr*. 2010;29(1):131–140. doi:10.1016/j.clnu.2009.07.004.
9. Palma ML, Zamith-Miranda D, Martins FS, Bozza FA, Nimrichter L, Montero-Lomeli M et al. Probiotic Saccharomyces cerevisiae strains as biotherapeutic tools: is there room for improvement? *Microbiol Biotechnol Appl*. 2015;99:6563–6570.
10. da Silva JFM, Peluzio JM, Prado G, et al. Use of Probiotics to Control Aflatoxin

- Production in Peanut Grains. *Sci World J.* 2015;2015:959138.  
doi:10.1155/2015/959138.
11. Pontier-Bres R, Munro P, Boyer L, et al. *Saccharomyces boulardii* Modifies *Salmonella* Typhimurium Traffic and Host Immune Responses along the Intestinal Tract. Bereswill S, org. *PLoS One.* 2014;9(8):e103069.
  12. Kogan G, Pajtinka M, Babincova M, et al. Yeast cell wall polysaccharides as antioxidants and antimutagens: can they fight cancer? *Neoplasma.* 2008;55(5):387–393.
  13. Dos Reis SA, da Conceicao LL, Siqueira NP, Rosa DD, da Silva LL, Peluzio M do CG. Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. *Nutr Res.* 2017;37:1–19. doi:10.1016/j.nutres.2016.11.009.
  14. Moslehi-Jenabian S, Pedersen LL, Jespersen L. Beneficial effects of probiotic and food borne yeasts on human health. *Nutrients.* 2010;2(4):449–473. doi:10.3390/nu2040449.
  15. Cortes-Zavaleta O, Lopez-Malo A, Hernandez-Mendoza A, Garcia HS. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. *Int J Food Microbiol.* 2014;173:30–35. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.016.
  16. Neal-McKinney JM, Lu X, Duong T, et al. Production of organic acids by probiotic lactobacilli can be used to reduce pathogen load in poultry. *PLoS One.* 2012;7(9):e43928. doi:10.1371/journal.pone.0043928.
  17. VidyaLaxme B, Rovetto A, Grau R, Agrawal R. Synergistic effects of probiotic *Leuconostoc mesenteroides* and *Bacillus subtilis* in malted ragi (*Eleusine corocana*) food for antagonistic activity against *V. cholerae* and other beneficial properties. *J Food Sci Technol.* 2014;51(11):3072–3082. doi:10.1007/s13197-012-0834-5.
  18. Mahmoud BSM. Controlling *Vibrio vulnificus* and spoilage bacteria in fresh shucked oysters using natural antimicrobials. *Lett Appl Microbiol.* 2014;58(1):1–7. doi:10.1111/lam.12152.
  19. Shirazinejad A, Ismail N, Bhat R. Lactic Acid as a Potential Decontaminant of Selected Foodborne Pathogenic Bacteria in Shrimp (*Penaeus merguensis* de Man). *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7(12):1531–1536.
  20. Wang W, Li M, Fang W, Pradhan AK, Li Y. A predictive model for assessment of decontamination effects of lactic acid and chitosan used in combination on *Vibrio parahaemolyticus* in shrimps. *Int J Food Microbiol.* 2013;167(2):124–130. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.012.
  21. Schwartzman MS, Belessi X, Butler F, Skandamis P, Jordan K. Comparison of growth

- limits of *Listeria monocytogenes* in milk, broth and cheese. *J Appl Microbiol.* 2010;109(5):1790–1799. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04807.x.
22. Arena MP, Silvain A, Normanno G, et al. Use of *Lactobacillus plantarum* Strains as a Bio-Control Strategy against Food-Borne Pathogenic Microorganisms. *Front Microbiol.* 2016;7:464.
  23. Sip A, Więckowicz M, Olejnik-Schmidt A, Grajek W. Anti-*Listeria* activity of lactic acid bacteria isolated from golka, a regional cheese produced in Poland. *Food Control.* 2012;26(1):117–124.
  24. Rodriguez-Pazo N, Vazquez-Araujo L, Perez-Rodriguez N, Cortes-Dieiguez S, Dominguez JM. Cell-free supernatants obtained from fermentation of cheese whey hydrolyzates and phenylpyruvic acid by *Lactobacillus plantarum* as a source of antimicrobial compounds, bacteriocins, and natural aromas. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013;171(4):1042–1060. doi:10.1007/s12010-013-0408-7.
  25. Gharaei-Fathabad E EM. Isolation and Applications of one strain of *Lactobacillus paraplantarum* from tea leaves (*Camellia sinensis*). *Am J Food Technol.* 2011;6:429–434.
  26. 28 FAAOOTUN-FWHO-W /probiotic\_guidelines. pd. >. A em: Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. In: ; 2002. [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf).
  27. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* 1989;66(5):365–378.
  28. Andrade MC, Menezes JS, Cassali GD, Martins-Filho OA, Cara DC, Faria AMC. Alcohol-induced gastritis prevents oral tolerance induction in mice. *Clin Exp Immunol.* 2006;146(2):312–322.
  29. Andrade MC, Albernaz MJS, Araujo MSS, et al. Short-term administration of ethanol in mice deviates antigen presentation activity towards B cells. *Scand J Immunol.* 2009;70(3):226–237. doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02289.x.
  30. Athayde LA. Avaliação experimental dos efeitos moduladores do tratamento oral com *Lactococcus lactis* sobre a inflamação alérgica e alteração da microbiota intestinal desencadeados pela ingestão aguda de álcool. 2016.
  31. Nccls. *Padronização dos Testes de sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão*; Vol 23. 8. ed. (Wayne: NCCLS, org.); 2003.
  32. Hanseler E, Fehr J, Keller H. Estimation of the lower limits of manual and automated platelet counting. *Am J Clin Pathol.* 1996;105(6):782–787.

33. Augustin J-C, Brouillaud-Delattre A, Rosso L, Carlier V. Significance of Inoculum Size in the Lag Time of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66(4):1706–1710.
34. Breand S, Fardel G, Flandrois JP, Rosso L, Tomassone R. A model describing the relationship between lag time and mild temperature increase duration. *Int J Food Microbiol*. 1997;38(2–3):157–167.
35. Stephens PJ, Joynson JA, Davies KW, Holbrook R, Lappin-Scott HM, Humphrey TJ. The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat-injured *Salmonella* cells. *J Appl Microbiol*. 1997;83(4):445–455.
36. Wong PTS, Chau YK, Patel. D. The use of algal batch and continuous culture techniques in metal toxicity study. *J O Nriagu, ed Aquat Toxicol*. 1983:449–466.
37. Henneberg JR. Avaliação da análise microscópica tradicional e do analisador automatizado IQ 200® no exame de urina. *Dissertação*. 2014.
38. Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes Infect*. 2003;5(6):535–544.
39. Borzani, W. Almeida, EL. Aquarone E. *Biotechnologia: Engenharia Bioquímica*. (Blücher E, org.). São Paulo; 1975.
40. Shu CY ST. Effects of temperature on cell growth and *Xanthomonas*, *xanthana* production in batch cultures of *campestris*. *Biotechnol Bioeng*. 1990;35:454–468.
41. Cheigh C-I, Choi H-J, Park H, et al. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. *J Biotechnol*. 2002;95(3):225–235.
42. Adamberg K, Kask S, Laht TM, Paalme T. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *Int J Food Microbiol*. 2003;85(1–2):171–183.
43. Hahn-Hägerdal KHWJ van N. Effect of temperature and pH on growth and product formation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 growing on maltose. *B Appl Microbiol Biotechnol*. 1999;51(669).
44. Duquesne S, Destoumieux-Garzon D, Peduzzi J, Rebuffat S. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat Prod Rep*. 2007;24(4):708–734. doi:10.1039/b516237h.
45. de Carvalho JC, Medeiros ABP, Letti LAJ, Kirnev PCS, Soccol CR. 35 - Cell Disruption and Isolation of Intracellular Products BT - Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. In: Elsevier; 2017:807–822.

- doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00035-X>.
46. Villas-Boas SG, Roesener U, Hansen MAE, Smedsgaard J NJ. *Metabolomics Analysis: An Introduction*. In: JW E, org. *In: Sons.*. Hoboken, NJ, USA; 2007.
  47. Malone AS, Shellhammer TH, Courtney PD. Effects of high pressure on the viability, morphology, lysis, and cell wall hydrolase activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68(9):4357–4363.
  48. Rallu F, Gruss A, Maguin E. *Lactococcus lactis* and stress. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1996;70(2–4):243–251.
  49. Meijer W, van de Bunt B, Twigt M, de Jonge B, Smit G, Hugenholtz J. Lysis of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK110 and Its Nisin-Immune Transconjugant in Relation to Flavor Development in Cheese. *Appl Environ Microbiol*. 1998;64(5):1950–1953.
  50. Iversen C, Forsythe S. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci Technol*. 2003;14(11):443–454.
  51. Nakamura S., Morimoto Y. V. KS. 2015. A lactose fermentation product produced by *Lactococcus lactis* subs. *lactis*, acetate, inhibits the motility of flagellated pathogenic bacteria. *Microbiol*. 161:701–707.
  52. Mariam SH, Zegeye N, Aseffa A, Howe R. Diffusible substances from lactic acid bacterial cultures exert strong inhibitory effects on *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* in a co-culture model. *BMC Microbiol*. 2017;17(1):35. doi:10.1186/s12866-017-0944-3.
  53. Aleksandra Oldak, Dorota Zielińska, Anna Rzepkowska and DK-K. Comparison of Antibacterial Activity of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Two Different Kinds of Regional Cheeses from Poland: Oscypek and Korycinski Cheese. 2017.
  54. Charchoghlyan H, Kwon H, Hwang D-J, Lee JS, Lee J, Kim M. Inhibition of *Cronobacter sakazakii* by *Lactobacillus acidophilus* n.v. Er2 317/402. *Korean J Food Sci Anim Resour*. 2016;36(5):635–640. doi:10.5851/kosfa.2016.36.5.635.
  55. Patel S, Behara R, Swanson GR, Forsyth CB, Voigt RM, Keshavarzian A. Alcohol and the Intestine. *Biomolecules*. 2015;5(4):2573–2588. doi:10.3390/biom5042573.
  56. Van Acker J, de Smet F, Muyldermans G, Bougatef A, Naessens A, Lauwers S. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J Clin Microbiol*. 2001;39(1):293–297. doi:10.1128/JCM.39.1.293-297.2001.
  57. Barreira ER, Souza DC, Gois PF JF. Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-

nascidos: relato de caso. 2003;25:65-70.

#### 4 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que o extrato metabólico secundário de *L. lactis* inibiu estatisticamente as cepas de *E. coli*, *E. sakazakii* e *S. enteritidis*. Ao mesmo tempo, o extrato metabólico de *L. lactis* promoveu o crescimento considerável das cepas *L. lactis* e *E. faecalis*. Assim, esses metabólitos podem ser eficazes para definir estratégias futuras para o controle biológico de *E. coli*, *E. sakazakii*, *S. enteritidis*. Mais estudos são necessários para investigar os componentes metabólicos responsáveis pela atividade antimicrobiana.

## REFERÊNCIAS

1. Patel S, Behara R, Swanson GR, Forsyth CB, Voigt RM, Keshavarzian A. Alcohol and the Intestine. *Biomolecules*. 15 de dezembro de 2015;5(4):2573–88.
2. Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* [Internet]. janeiro de 1998;42(1):2–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1726957/>
3. Natividad JMM, Verdu EF. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacol Res*. março de 2013;69(1):42–51.
4. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud D-J, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res*. setembro de 2013;54(9):2325–40.
5. Baumler AJ, Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*. julho de 2016;535(7610):85–93.
6. Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL, Blumberg RS. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science*. abril de 2016;352(6285):539–44.
7. Chang C, Lin H. Dysbiosis in gastrointestinal disorders. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. fevereiro de 2016;30(1):3–15.
8. Schroeder BO, Backhed F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat Med*. outubro de 2016;22(10):1079–89.
9. Bull MJ, Plummer NT. Part 1: The Human Gut Microbiome in Health and Disease. *Integr Med A Clin J* [Internet]. dezembro de 2014;13(6):17–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4566439/>
10. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* [Internet]. 10 de junho de 2005;308(5728):1635–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1395357/>
11. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. julho de 2007;5(7):e177.
12. Lozupone CA, Stombaugh JI, Gordon JI, Jansson JK, Knight R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* [Internet]. 13 de setembro de 2012;489(7415):220–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3577372/>
13. Schippa S, Conte MP. Dysbiotic events in gut microbiota: impact on human health. *Nutrients*. dezembro de 2014;6(12):5786–805.
14. Santos TT, Varavallo MA. A importância de probiótico para o controle e/ou reestruturação da microbiota intestinal. *Rev Científica do ITPAC*. 2011;4(1):40–9.
15. Jarzab A, Gorska-Fraczek S, Rybka J, Witkowska D. [Enterobacteriaceae infection - diagnosis, antibiotic resistance and prevention]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. fevereiro de 2011;65:55–72.
16. Qin J, R L, J R, M A, K S B, Manichanh C et al. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464(7285):89–95.
17. DRASAR BS, HILL MJ. Human intestinal flora. Academic Press (London) Ltd., 24/28 Oval Road, London, N.W.I.; 1974. xii + 263 pp.
18. Kariyawasam S, Nolan LK. papA gene of avian pathogenic Escherichia coli. *Avian Dis*. dezembro de 2011;55(4):532–8.
19. Pitout JDD, Laupland KB, Church DL, Menard ML, Johnson JR. Virulence factors of Escherichia coli isolates that produce CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases.

- Antimicrob Agents Chemother. novembro de 2005;49(11):4667–70.
20. Cheng X, Guan S, Lu H, Zhao C, Chen X, Li N, et al. Evaluation of the bactericidal effect of Nd:YAG, Er:YAG, Er,Cr:YSGG laser radiation, and antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in experimentally infected root canals. *Lasers Surg Med.* dezembro de 2012;44(10):824–31.
  21. Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. Enterococcus faecalis– the root canal survivor and “star” in post-treatment disease. *Endod Top* [Internet]. 15 de junho de 2004;6(1):135–59. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2003.00040.x>
  22. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol.* novembro de 2008;29(11):996–1011.
  23. Sood S, Malhotra M, Das BK, Kapil A. Enterococcal infections & antimicrobial resistance. *Indian J Med Res.* agosto de 2008;128(2):111–21.
  24. Manson JM, Hancock LE, Gilmore MS. Mechanism of chromosomal transfer of Enterococcus faecalis pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* julho de 2010;107(27):12269–74.
  25. Hollenbeck BL, Rice LB. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence.* agosto de 2012;3(5):421–33.
  26. Aarestrup FM, UGent PB, Witte W. Nonhuman Reservoirs of Enterococci. In: In: GILMORE, M S The Enterococci - Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance Washington, DC: ASM Press. 2002.
  27. McDonald LC, Kuehnert MJ, Tenover FC, Jarvis WR. Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications. *Emerg Infect Dis.* 1997;3(3):311–7.
  28. Farber JM. Enterobacter sakazakii--new foods for thought? *Lancet* (London, England). janeiro de 2004;363(9402):5–6.
  29. Bar-Oz B, Preminger A, Peleg O, Block C, Arad I. Enterobacter sakazakii infection in the newborn. *Acta Paediatr.* março de 2001;90(3):356–8.
  30. Muytjens HL, Roelofs-Willemse H, Jaspas GH. Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* abril de 1988;26(4):743–6.
  31. FOODS ICOMSF. Microbiological Testing in Food Safety Management. In: Microbiological Testing in Food Safety Management. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2002.
  32. FARMER JJ, ASBURY MA, HICKMAN FW, BRENNER DONJ, GROUP THEES. Enterobacter sakazakii: A New Species of “Enterobacteriaceae” Isolated from Clinical Specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* [Internet]. 1980;30(3):569–84. Available at: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-30-3-569>
  33. ARSALAN A, ANWAR Z, AHAMED I, SHAD Z, AHAMED S. Cronobacter sakazakii: Of, An emerging contaminant in pediatric infant milk formula. *Int Res Jounal Pharmacy.* 2013;4(4).
  34. Gossner CM, Hello S Le, Jong B de, Rolfhamre P, Faensen D, Weill F-X, et al. Around the World in 1,475 *Salmonella* Geo-serotypes. *Emerg Infect Dis J* [Internet]. 2016;22(7):1298. Available at: <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/7/14-1678>
  35. Sanchez S, Hofacre CL, Lee MD, Maurer JJ, Doyle MP. Animal sources of salmonellosis in humans. *J Am Vet Med Assoc.* agosto de 2002;221(4):492–7.
  36. Ikumapayi UN, Antonio M, Sonne-Hansen J, Biney E, Enwere G, Okoko B, et al.

- Molecular epidemiology of community-acquired invasive non-typhoidal Salmonella among children aged 2-29 months in rural Gambia and discovery of a new serovar, Salmonella enterica Dingiri. *J Med Microbiol.* novembro de 2007;56(Pt 11):1479–84.
37. Marshall VM. Lactic acid bacteria: starters for flavour. *FEMS Microbiology Letters* banner. setembro de 1987;46(3):327–36.
  38. Smit G, Smit BA, Engels WJM. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS microbiology reviews.* agosto de 2005;29(3):591–610.
  39. Hempel S, Newberry SJ, Maher AR, Wang Z, Miles JN V, Shanman R, et al. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *JAMA.* maio de 2012;307(18):1959–69.
  40. 28 FAO/WHO-W /probiotic\_guidelines. pd. >. A em: Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. In 2002. Available at: [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf)
  41. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* maio de 1989;66(5):365–78.
  42. Gharaei-Fathabad E EM. Isolation and Applications of one strain of *Lactobacillus paraplantarum* from tea leaves (*Camellia sinensis*). *Am J Food Technol.* 2011;6:429–34.
  43. Wonyong K. The genus *Lactococcus* [Internet]. *Lactic Acid Bacteria.* 2014. (Wiley Online Books). Available at: <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch26>
  44. Bernardeau M, Vernoux JP, Henri-Dubernet S, Gueguen M. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int J Food Microbiol.* setembro de 2008;126(3):278–85.
  45. Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malarme K, Weissenbach J, et al. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res.* maio de 2001;11(5):731–53.
  46. Andrade MC, Menezes JS, Cassali GD, Martins-Filho OA, Cara DC, Faria AMC. Alcohol-induced gastritis prevents oral tolerance induction in mice. *Clin Exp Immunol.* 8 de novembro de 2006;146(2):312–22.
  47. Andrade MC, Albernaz MJS, Araujo MSS, Santos BP, Teixeira-Carvalho A, Faria AMC, et al. Short-term administration of ethanol in mice deviates antigen presentation activity towards B cells. *Scand J Immunol.* setembro de 2009;70(3):226–37.
  48. Alvarenga DM, Perez DA, Gomes-Santos AC, Miyoshi A, Azevedo V, Coelho-Dos-Reis JGA, et al. Previous Ingestion of *Lactococcus lactis* by Ethanol-Treated Mice Preserves Antigen Presentation Hierarchy in the Gut and Oral Tolerance Susceptibility. *Alcohol Clin Exp Res.* agosto de 2015;39(8):1453–64.
  49. Athayde LA. Avaliação experimental dos efeitos moduladores do tratamento oral com *Lactococcus lactis* sobre a inflamação alérgica e alteração da microbiota intestinal desencadeados pela ingestão aguda de álcool. Universidade Estadual de Montes Claros; 2016.
  50. Oliveira AP, Nielsen J, Forster J. Modeling *Lactococcus lactis* using a genome-scale flux model. *BMC Microbiol.* junho de 2005;5:39.
  51. Hols P, Kleerebezem M, Schanck AN, Ferain T, Hugenholtz J, Delcour J, et al. Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering. *Nat Biotechnol.* junho de 1999;17(6):588–92.
  52. Brooijmans RJW, Poolman B, Schuurman-Wolters GK, de Vos WM, Hugenholtz J. Generation of a membrane potential by *Lactococcus lactis* through aerobic electron transport. *J Bacteriol.* julho de 2007;189(14):5203–9.
  53. Vining, L. C. (1986) in *Biotechnology* (Rehm, H. J. and Reed, G., eds.), pp 21–29,

- VCH W. No Title.
54. Haghshenas B, Nami Y, Abdullah N, Radiah D, Rosli R, Khosroushahi AY. Anti-proliferative effects of Enterococcus strains isolated from fermented dairy products on different cancer cell lines. *J Funct Foods* [Internet]. 2014;11:363–74. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464614003089>
  55. Desrouillères K, Millette M, Vu KD, Touja R, Lacroix M. Cancer preventive effects of a specific probiotic fermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 on male F344 rats treated with 1,2-dimethylhydrazine. *J Funct Foods* [Internet]. 2015;17:816–27. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464615003291>

## ANEXO A – Normas para publicação do periódico *Brazilian Journal of Microbiology*, qualis Interdisciplinar B1.

25/03/2018

Braz. J. Microbiol. - Instruções aos autores



ISSN 1517-8382 versão impressa  
ISSN 1678-4405 versão online

### INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Escopo da revista](#)
- [Submissão de um artigo](#)
- [Publicação do artigo](#)
- [Preparo do artigo](#)

#### Escopo da revista

A partir do dia 01/01/2015 o Brazilian Journal of Microbiology (BJM) aceitará manuscritos que versem sobre genoma de microrganismo sequenciado recentemente. Eles serão publicados na seção "Genome Announcement". O objetivo desta seção é permitir que autores do sequenciamento informem aos leitores do BJM sobre um genoma que está disponível e qual seria o interesse para a comunidade científica. O publicação não impedirá a futura publicação de um artigo científico completo no BJM ou em outra revista.

Escopo da seção "Genome Announcement" no BJM:

- Os autores da publicação deverão ser os mesmos ou na sua maioria dos conteúdos no depósito da sequência do genoma;
- A sequência do genoma deve estar disponível para o público no DDBJ / EMBL / NCBI dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), no momento do envio do manuscrito para o BJM. O número de acesso válido no GenBank para o genoma, deve ser claramente indicado no manuscrito;
- As sequências completas de plasmídeos circulares serão aceitas sem lacunas;
- As sequências de nucleotídeos que se refere o "announcement", deve cobrir pelo menos 95% do tamanho do genoma esperado para o organismo;
- Serão considerados para publicação depósitos completos feitos no GenBank e gapped cromossomos (scaffolded) do genoma. Para tais depósitos é preferível ter uma anotação funcional.
- O manuscrito enviado para a seção "Genome Announcement" deve conter no máximo 500 palavras no corpo do texto e um resumo de 150 palavras;
- Os autores devem indicar claramente a origem da cepa microbiana, a importância de ter sequenciado o genoma e os benefícios que o campo da microbiologia.
- O texto deve conter a metodologia utilizada no sequenciamento, incluindo o número e tamanho das leituras geradas, métodos de montagem utilizado, as medidas tomadas para gerar os scaffolds e para fechar o genoma, quando aplicável. Além disso, informar quais métodos serão utilizados para anotação e curadoria se for o caso.

A revista *Brazilian Journal of Microbiology*, editada pela Sociedade Brasileira de Microbiologia, publica artigos originais, e trabalhos de revisão que cobrem todos os aspectos da Microbiologia. Não são cobradas taxas para publicação de artigos.

As seguintes categorias de artigos são aceitas para publicação no *Brazilian Journal of Microbiology*:

- **Artigos Originais:** reportam resultados científicos originais que ainda não tenham sido publicados em outro periódico;
- **Artigos de Revisão:** abordam temas ligados à microbiologia em geral e de amplo interesse da área.

Seu manuscrito deve ser escrito em inglês **claro e compreensível**.

Se você tiver dúvidas sobre o nível de inglês do seu texto, você pode optar por ter o seu manuscrito editado profissionalmente por um nativo da língua inglesa ou por um serviço de editoração científica **antes da submissão** do seu manuscrito. Todos os serviços devem ser organizados e pagos pelo autor, e o uso de um desses serviços não garante a aceitação ou preferência para publicação do manuscrito. No caso de o autor ser um nativo da língua inglesa, por favor, substituir o certificado de Inglês por uma carta de justificativa.

É um prazer aceitar o seu trabalho para ser publicado na Revista Brasileira de Microbiologia. No entanto, só será publicada uma vez revisada a versão final do texto em Inglês. Por favor, envie o texto revisado e o certificado emitido pelo "American Journal Experts".

- American Journal Experts:  
<http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>

## SEÇÕES

### **Microbiologia Industrial: Fermentação Bacteriana**

- Biossíntese e bioconversão de produtos naturais, como: antibióticos; xenobióticos e macromoléculas produzidas por bactérias.
- Aspectos moleculares de biotecnologia bacteriana.

### **Fermentação Fúngica**

- Biossíntese e bioconversão de produtos naturais, como: antibióticos; xenobióticos e macromoléculas produzidas por fungos.
- Aspectos moleculares de biotecnologia fúngica.

**Microbiologia de Alimentos:  
Tecnologia de Alimentos**

- Aplicações de microrganismos (bactérias e fungos) na produção de alimentos.

**Segurança e Qualidade dos alimentos**

- Doenças de origem alimentar.
- Deterioração de alimentos.
- Ecologia microbiana em alimentos.

**Microbiologia Médica:  
Patogênese Bacteriana**

- Bases genéticas, bioquímicas e estruturais da patogênese bacteriana.

**Patogenicidade de Fungos**

- Bases genéticas, bioquímicas e estruturais da patogênese fúngica.

**Microbiologia Clínica:  
Bacteriologia**

- Estudos sobre bactérias de importância médica.

**Micologia**

- Estudos sobre fungos de importância médica.

**Virulogia**

- Estudos sobre vírus de importância médica.

**Microbiologia Ambiental:  
Ecologia Microbiana**

- Ecologia de grupos microbianos naturais; diversidade microbiana de ambientes naturais, como água, solo, sedimentos e organismos superiores.
- Interações microbianas.

**Biotecnologia**

- Aspectos ambientais de saúde pública.
- Biodegradação.
- Biorremediação.
- Considerações ambientais para microrganismos geneticamente modificados.

**Fisiologia de Fungos**

- Bioquímica de fungos, biofísica, metabolismo, estrutura celular, respostas a fatores de estresse, crescimento, diferenciação e outros processos relacionados.

#### **Fisiologia de Bactérias**

- Bioquímica de bactérias, biofísica, metabolismo, estrutura celular, respostas a fatores de estresse, crescimento, diferenciação e outros processos relacionados.

#### **Genética e Biologia Molecular de Fungos**

- Genética de fungos, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

#### **Genética e Biologia Molecular de Bactérias**

- Genética de bactérias, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

#### **Genética e Biologia Molecular de Vírus**

- Genética de vírus, biologia molecular, regulação gênica, replicação e reparo de DNA, proteomas e transcriptomas

#### **Microbiologia Veterinária**

- Doenças de animais
- Controle e/ou tratamento de animais
- Diagnóstico de patógenos de animais
- Patógenos veterinários ou zoonóticos

#### **Ensino de Microbiologia**

- Estratégias de ensino em microbiologia
- Novas ferramentas de ensino em microbiologia

### **Submissão de um artigo**

Um artigo para ser submetido ao *Brazilian Journal of Microbiology* não deve ter sido previamente publicado (exceto na forma de resumo) nem ter sido submetido em qualquer outro periódico.

As instruções para submissão *online* estão disponíveis neste site.

Todos os autores serão informados por mensagem eletrônica a respeito da submissão eletrônica. A mensagem também questionará se todos os autores concordam com a submissão. Ausência de resposta será considerada como concordância à submissão.

A responsabilidade pela exatidão do conteúdo do manuscrito é de inteira responsabilidade dos autores.

### Publicação do artigo

Os artigos são aceitos para publicação após terem sido revisados de forma crítica por pelo menos dois revisores, indicados pelos editores.

As sugestões e recomendações dos revisores e editores serão encaminhadas eletronicamente ao autor para correspondência, o qual deverá retornar o artigo revisado aos editores na data estipulada, pelo sistema *online*. O autor para correspondência deverá explicar ou comentar as alterações introduzidas no texto.

O autor para correspondência receberá uma mensagem eletrônica sempre que houver alteração do *status* do artigo.

Não é necessário ser associado da Sociedade Brasileira de Microbiologia para submeter artigo para publicação.

Todos os cientistas, brasileiros ou estrangeiros, são convidados a submeterem artigos para publicação.

### ÉTICA

O(s) autor(es) devem informar, no texto do artigo, se o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de sua Instituição, em consoante à Declaração de Helsinki (<http://www.ufrgs.br/HCPA/gppg/helsin5.htm>). Nos trabalhos experimentais que envolvem animais, as normas estabelecidas no "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*" (*Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D. C. 1996*), e os "*Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal* (COBEA - <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20Eticos>) devem ser respeitados.

### Preparo do artigo

O Artigo deverá ser submetido como **um único arquivo em WORD**. Este arquivo deve conter texto, figuras, tabelas, etc. Serão aceitas apenas submissões de artigos redigidos em inglês.

Para **artigos originais**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Autores e Afiliações
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave

- Introdução
- Material e Métodos
- Resultados
- Discussões
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **artigos de revisão**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Título resumido
- Resumo (200 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Texto
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Os artigos devem ser digitados com espaço duplo, margens de 3 cm e numerados seqüencialmente. As linhas das páginas do artigo devem ser numeradas. Os editores recomendam que antes da submissão o artigo seja lido de forma crítica por alguém fluente em língua inglesa. Os artigos escritos com inglês de baixa qualidade não serão aceitos.

*Artigos Originais e Artigos de revisão* deverão conter até, no máximo, 20 páginas, incluindo referências, tabelas e figuras.

Abreviaturas e símbolos devem seguir as recomendações da IUPAC-IUB *Commission (Commission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections)*. As unidades de medida devem seguir o Sistema Internacional de Unidades.

## **SUGESTÕES DE REVISORES**

Os autores poderão enviar sugestões de revisores para avaliação dos artigos. Deverão constar as seguintes informações: nome; e.mail e Instituição de Origem.

## **USO DE EXTRATOS DE PLANTAS EM EXPERIMENTOS MICROBIOLÓGICOS**

Artigos que apresentarem estudos com extratos de plantas, ou extratos de outras substâncias complexas, serão aceitos apenas após identificação dos compostos.

Os autores podem precisar, ou desejar, fazer uso de serviços de edição de línguas para melhorar a qualidade do inglês e, portanto, a qualidade final do texto. Este tipo de assistência é recomendada antes mesmo da submissão dos artigos ou, no caso de solicitação pelos revisores, antes do artigo ser definitivamente aceito para publicação. Autores que não são nativos de língua inglesa que desejem assistência na escrita em inglês podem considerar as seguintes sugestões:

- American Journal Experts: <http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>
- Joanne Roberts: [joroberts@uol.com.br](mailto:joroberts@uol.com.br)
- ATO Traduções: [www.atotraining.com.br](http://www.atotraining.com.br)
- Prof. Julian D. Gross, University of Oxford, Oxford Biomedical Editors: [julian.gross@pharm.ox.ac.uk](mailto:julian.gross@pharm.ox.ac.uk)
- BioMed Proofreading LLC: <http://www.biomedproofreading.com>

## ORGANIZAÇÃO

O **Título** deve ser conciso, não conter abreviações e indicar claramente o tema do artigo.

Expressões como "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, devem ser evitadas. Os cuidados na escolha das palavras do título são importantes, pois são usadas em sistemas eletrônicos de busca.

O **Resumo** deve resumir o conteúdo básico do artigo. Ele deve ser representativo do texto. Não deve conter referências, tabelas nem abreviações pouco usuais. São de grande importância, pois serão lidos por muitas pessoas que não têm acesso ao artigo completo.

A **Introdução** deve oferecer informações que possibilitem ao leitor avaliar adequadamente os resultados apresentados no artigo sem que obrigatoriamente tenha que recorrer à literatura corrente. No entanto, a introdução não deve ser uma extensa revisão de literatura. Deve informar claramente as justificativas e os objetivos do artigo.

Os **Materiais e Métodos** devem proporcionar informações suficientes para que outros pesquisadores possam reproduzir o trabalho. A repetição de detalhes de procedimentos que já tenham sido publicados em outros artigos deve ser evitada. Se um método publicado for modificado, tais modificações devem estar claras no artigo. Fontes de reagentes, meios de cultura e equipamentos (empresa, cidade, estado e País) devem ser mencionadas no texto. Nomes que são marcas registradas devem ser claramente indicados. Subtítulos podem deixar este tópico mais fácil de ler e entender.

Os **Resultados** devem, por meio de texto, tabela e/ou figuras dar os resultados dos experimentos. Se o item **Discussão** for incluído, evite interpretações extensas dos resultados, pois isto deverá ser feito na discussão. Se os **Resultados e Discussões** forem redigidos concomitantemente, então os resultados devem ser discutidos no local mais apropriado do texto. Tabelas e figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos. Todas as tabelas e figuras devem ser mencionadas no texto.

O local aproximado das tabelas e figuras no texto deve ser indicado.

O item **Discussão** deve discutir os resultados em função da literatura citada.

As **Referências** devem ser redigidas em ordem alfabética e começar pelo último nome do primeiro autor. Todos os autores devem ser citados. As citações no texto devem ser escritas pelo último nome do primeiro autor, seguido pelo ano de publicação. Como exemplo, tem-se: "... while Silva and Pereira (1987) observed that resistance depended on soil density" ou "It was observed that resistance depended on soil density (Silva and Pereira, 1987)." Para a citação de dois ou mais artigos do mesmo autor, liste em ordem cronológica sendo que os anos devem ser separados por vírgula (exemplo: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000; Hene 2010; Padonou et al., 2012). Os nomes dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o *BIOSIS*. Todas as referências incluídas na lista final devem ter sido citadas no texto e todas as referências mencionadas no texto devem aparecer na lista final.

Exemplos:

### a. Artigos de Periódicos

Brito DVD, Oliveira EJ, Darini ALC, Abdalla VOS, Gontijo-Filho PP (2006) Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. Braz J Microbiol 37:101-107.

- b. **Artigos ou Capítulos de Livro**  
Franco BDGM, Landgraf M, Destro MT, Gelli DS, (2003) Foodborne diseases in Southern South America. *In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). International Handbook of Foodborne Pathogens.* Marcel Dekker, New York, USA, 733-743.
- c. **Livros**  
Montville TJ, Matthews KR (2005) Food Microbiology - an introduction. ASM Press, Washington, D.C.
- d. **Patentes**  
Hussong RV, Marth EH, Vakaleris DG. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.
- e. **Teses e Dissertações**  
Santos MVB (2005) O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de *Paracoccidioides brasiliensis* na evolução da doença experimental. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).
- f. **Comunicações em Eventos (Simpósios, Conferências, etc)**  
Silveira TS, Martins JL, Abreu FA, Rosado AS, Lins UGC (2005) Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.
- g. **Publicações na Web**  
Abdullah MAF, Valaitis AP, Dean DH (2006) Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>
- h. **Webpage**  
U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

As citações do tipo "personal communication" ou "unpublished data" devem ser evitadas, embora se reconheçam que, eventualmente, elas possam ser usadas. Nestes casos, elas devem ser citadas no texto e não na lista final de referências. As referências que consistem de artigos que foram "aceitos para publicação" ou "no prelo" são aceitáveis. No entanto, as referências dos artigos que são "submetidos" ou "em preparação" não são aceitas.

**AGRADECIMENTOS:** Esta seção é opcional. Ela reconhece a assistência financeira e pessoal recebida para execução do trabalho.

**TABELAS:** devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. O título deve ser colocado acima da tabela e deve ser curto, porém representativo, com descrição completa da informação contida na tabela. Cabeçalhos e rodapés devem ser concisos, com colunas e linhas cuidadosamente centralizadas. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image\\_quality\\_table.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html))

**FIGURAS:** devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. Os dados que foram apresentados em tabelas não devem ser repetidos na forma de figuras. As legendas devem ser colocadas abaixo das figuras. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image\\_quality\\_table.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html))

**FOTOGRAFIAS:** Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image\\_quality\\_table.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html))

#### Conflitos de Interesses

É política do periódico *Brazilian Journal of Microbiology* que qualquer pessoa envolvida no processo de publicação (autores, revisores, membros do corpo editorial e assistentes) deve estar isenta de conflitos de interesses que possam influenciar negativamente o parecer, a objetividade e a lealdade a seus autores. O BJM reconhece que qualquer conflito de interesse detectado deve ser prontamente comunicado e rapidamente resolvido. Conflitos de interesses em publicações podem ser definidos como condições nas quais um indivíduo possui conflito ou competição de interesses que podem resultar em decisões editoriais tendenciosas. Os conflitos de interesses podem ser potenciais, percebidos ou factuais. Considerações pessoais, políticas, financeiras, acadêmicas ou religiosas podem afetar a objetividade de diferentes formas.

### DIREITOS AUTORAIS

Os autores dos manuscritos aprovados deverão encaminhar para *BJM* (Fax: 55 11-3037-7095; [bjm@sbmicrobiologia.org.br](mailto:bjm@sbmicrobiologia.org.br)), previamente à publicação, a declaração de transferência de direitos autorais, assinada por todos os co-autores (ver formulário abaixo) ou por pelo menos um dos autores que concorda em informar os outros autores.

#### Transferência de "Direitos Autorais"

"O(s) autor(es) abaixo assinado(s) afirmam que o artigo é original, que não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros, que não foi enviado para publicação em nenhuma outra revista e que não foi publicado anteriormente. O(s) autor(es) confirma(m) que a versão final do manuscrito foi revisada e aprovada por ele(s). Todos os manuscritos publicados tornam-se propriedade permanente do *Brazilian Journal of Microbiology* e não podem ser publicados sem o consentimento por escrito de seus Editores."

Artigo nº. \_\_\_\_\_

Título do Artigo:

" \_\_\_\_\_ "

Nome(s) do(s) Autor(es)

Assinatura(s)

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

[[Home](#)] [[Sobre esta revista](#)] [[Corpo editorial](#)] [[Assinaturas](#)]



Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

**SBM**  
**USP- ICB III - Dep. de Microbiologia**  
**Sociedade Brasileira de Microbiologia**

25/03/2018

Braz. J. Microbiol. - Instruções aos autores

**Av. Prof. Lineu Prestes, 2415**  
**Cidade Universitária**  
**05508-900 São Paulo SP - Brasil**  
**Ramal USP 7979**  
**Tel. / Fax: (55 11) 3813-9647 ou 3037-7095**



[bjm@sbmicrobiologia.org.br](mailto:bjm@sbmicrobiologia.org.br)