



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

IURI PRATES SOUSA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BACTERIOCINOGÊNICO DE
***Lactiplantibacillus plantarum* SOBRE A FORMA**
VEGETATIVA E EM BIOFILME DE *Staphylococcus aureus*

ILHÉUS-BA

2025

IURI PRATES SOUSA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BACTERIOCINOGÊNICO DE
Lactiplantibacillus plantarum SOBRE A FORMA
VEGETATIVA E EM BIOFILME DE *Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre/Doutor em Ciência Animal. Linha de Pesquisa: Clínica e Sanidade Animal. Sub-área da Dissertação: Microbiologia. Orientador: Prof. Dr. Lucas José Luduverio Pizauro.

ILHÉUS-BA

2025

IURI PRATES SOUSA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BACTERIOCINOGENÉTICO DE
Lactiplantibacillus plantarum SOBRE A FORMA
VEGETATIVA E EM BIOFILME DE *Staphylococcus aureus***

Ilhéus - Bahia, 07/02/2025

Lucas José Luduverio Pizauro - Doutor
UESC/DCAA
(Orientador)

Poliana de Castro Melo - Doutora
UESC/DCAA
(Coorientadora)

Camila Chioda Almeida - Doutora
Autônoma

Marita Vedovelli Cardozo - Doutora
FCAV/UNESP

ILHÉUS-BA

2025

À minha esposa, aos meus pais, orientador, familiares e amigos. Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus minha fonte de vida e de resiliência, a minha esposa Francisnaide pela cooperação e paciência, aos meus pais pelo incentivo, aos meus sogros pelo apoio, ao meu orientador por tantos ensinamentos e colaboração, a minha coorientadora Poliana pela parceria, a professora Aline Conceição pelo significativo auxílio e aprendizado fornecido, a UESC por disponibilizar a estrutura e equipamentos necessários, aos familiares e amigos que me acompanharam nessa jornada. A todos, meu muito obrigado!

“A tarefa de viver é dura, mas fascinante.”

Ariano Suassuna

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BACTERIOCINOGÊNICO E INIBITÓRIO DE *Lactiplantibacillus plantarum* SOBRE A FORMA VEGETATIVA E EM BIOFILME DE *Staphylococcus aureus*

RESUMO

Os lactobacilos, mas especificamente o *L. plantarum*, possui capacidade de inibir bactérias patogênicas. Portanto objetivou-se avaliar o potencial bacteriocinogênico e inibitório de isolados de *L. plantarum* obtidos da fermentação do cacau, em formas vegetativas e em biofilmes de *S. aureus* oriundos de mastite bovina (SAB) e ovina (SAO), bem como *S. aureus* ATCC 25923 (SAA) e *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), sendo identificado no estudo de (SAM). Foram utilizados dois isolados de *L. plantarum*, a cepa 81 e 286. A atividade inibitória do sobrenadante foi avaliada através da concentração inibitória mínima (CIM), nas concentrações de 200 mg/ml, 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12,5 mg/ml afim de definir a concentração inibitória mínima (CIM). Avaliou-se também a ação inibitória com pH inicial de 4,3 e com pH fisiológico de 7,3. Em seguida, avaliou-se o sobrenadante tamponado esterilizado (127°C por 15min). O ensaio de biofilme foi realizado em três etapas: avaliação do grau de crescimento do biofilme dos *S. aureus* (SAB, SAO, SAM e SAA), análise do desenvolvimento do biofilme em plasmas distintos (humano, bovino, equino e ovino), investigação do poder inibitório dos sobrenadantes. Ambas as cepas 81 e 286 de *L. plantarum* demonstraram atividade inibitória tanto contra a forma vegetativa quanto contra o biofilme de *S. aureus* provenientes de mastite bovina e ovina, incluindo cepas resistentes à meticilina (SARM) e a ATCC 25923. Assim, conclui-se que, na concentração de 200 mg/ml, após tamponamento e esterilização, o sobrenadante ainda foi capaz de inibir *in vitro* as formas vegetativas dos *S. aureus* estudados e a formação de biofilme. Esses resultados abrem caminho para investigações futuras que possam avaliar o efeito dessas cepas em condições *in vivo*.

Palavras-chave: bacteriocina; espectrofotômetro; infecção; probiótico; resistência.

EVALUATION OF THE BACTERIOGINOGENIC AND INHIBITORY POTENTIAL OF *Lactiplantibacillus plantarum* ON THE VEGETATIVE FORM AND BIOFILM OF *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Lactobacilli, specifically *Lactobacillus plantarum* (*L. plantarum*), have the ability to inhibit pathogenic bacteria. This study aimed to evaluate the bacteriocinogenic and inhibitory potential of *L. plantarum* isolates obtained from cocoa fermentation against vegetative forms and biofilms of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) from bovine mastitis (SAB), ovine mastitis (SAO), methicillin-resistant strains (MRSA), and the ATCC 25923 strain (SAA). Two isolates, strains 81 and 286, were used. The inhibitory activity of the supernatant was assessed through minimum inhibitory concentration (MIC) tests at concentrations of 200 mg/ml, 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, and 12.5 mg/ml. The inhibitory action was also tested at an initial pH of 4.3 and a physiological pH of 7.3, followed by sterilization (127°C for 15 minutes). Biofilm assays were conducted in three stages: Evaluation of biofilm growth by *S. aureus* strains (SAB, SAO, MRSA, and SAA). Analysis of biofilm development in different plasmas (human, bovine, equine, and ovine). Investigation of the inhibitory power of supernatants. Both *L. plantarum* strains 81 and 286 demonstrated inhibitory activity against vegetative forms and biofilms of *S. aureus*, including methicillin-resistant strains and ATCC 25923. At a concentration of 200 mg/ml, even after buffering and sterilization, the supernatant inhibited vegetative forms of *S. aureus* and biofilm formation *in vitro*. These findings pave the way for future research to evaluate the effects of these strains under *in vivo* conditions.

Keywords: bacteriocin; infection; probiotic; resistance; spectrophotometer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Avaliação da inibição da Cepa 81 de <i>L. plantarum</i> em relação ao <i>S. aureus</i> , de acordo com a concentração.....	28
Figura 2 – Avaliação da inibição da Cepa 286 de <i>L. plantarum</i> em relação ao <i>S. aureus</i> , de acordo com a concentração.....	29
Figura 3 – A cepa 286, com considerável poder inibitório.....	30
Figura 4 – Contagem em log de UFC/ml.....	31
Figura 5 – Contagem em log de UFC/ml da interação do sobrenadante 286 com os diferentes <i>S. aureus</i>	32
Figura 6 – Contagem em log de UFC/ml da interação do sobrenadante 81 com os diferentes <i>S. aureus</i>	33
Figura 7 – Análise da formação de biofilme no plasma humano por densidade óptica.....	34
Figura 8 – Formação de biofilme e interação com os sobrenadantes no plasma humano.....	36
Figura 9 – Formação de biofilme e interação com os sobrenadantes no plasma bovino.....	36
Figura 10 – Análise da formação de biofilme e inibição pelos sobrenadantes no plasma humano com as classificações de produção de biofilme.....	37
Figura 11 – Análise da formação de biofilme e inibição pelos sobrenadantes no plasma bovino com as classificações de produção de biofilme.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais tipos de plantaricinas descritas.....	19
Tabela 2 – Log das Médias e Desvio Padrão de UFC/ml das colônias	30
Tabela 3 – Formação de biofilme nos diferentes plasmas	34
Tabela 4 – Formação e inibição de biofilme em plasma humano	35
Tabela 5 – Formação e inibição de biofilme em plasma bovino	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO GERAL	14
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4 REVISÃO DE LITERATURA	15
4.1 Probióticos	15
4.2 Lactobacilos	16
4.3 <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	17
4.3 Mastite.....	19
4.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	21
5 MATERIAL E MÉTODOS	22
5.1 Cepas bacterianas e condições de cultura	22
5.2 Liofilização e diluição do <i>L. plantarum</i>	22
5.3 Elaboração dos grupos controle.....	23
5.4 Micro diluição e inoculação.....	23
5.5 Tamponamento do pH e teste de estabilidade térmica	24
5.6 Avaliação da Formação de biofilme.....	24
5.6.1 Desenvolvimento dos biofilmes no plasma humano	24
5.6.2. Análise inibitória, utilizando os sobrenadantes 81 e 286 de <i>L. plantarum</i> em relação aos <i>S. aureus</i>	25
5.7 Análise estatística	27
6 RESULTADOS	28
6.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	28
6.2 Produção e inibição de biofilme	33
7 DISCUSSÃO	39
8 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

No ano de 2023, o Brasil obteve uma produção total superior a 35 milhões de litros de leite, resultando em uma injeção econômica que supera 80 milhões de reais. (IBGE, 2022). O Brasil ocupa a sexta colocação na produção mundial leiteira, ficando atrás da Índia, União Europeia, Estados Unidos, China e Rússia, respectivamente, tendo uma representação de 4% do total produzido (USDA, 2023). Com base nesses dados, o Brasil se destaca entre os países com alta produção de leite e é considerado um dos mais competitivos no setor pecuário leiteiro mundial, sendo esse destaque, resultado de baixos custos de produção, além de mão de obra relativamente barata e investimento em melhorias genéticas e alimentares. (SOUZA; BERTONCELLO, 2021) Além disso, o país tem uma grande extensão de fronteiras agrícolas, totalizando 90 milhões de hectares, que possibilitam a expansão do setor, para quem sabe obter uma melhor colocação no cenário internacional. (SOUZA; BERTONCELLO, 2021).

Neste contexto, a saúde da glândula mamária tem uma importância fundamental para aspectos qualitativos e quantitativos do leite, podendo estes serem alterados quando da ocorrência da mastite, caracterizada como uma inflamação da glândula mamária, e que é uma das principais doenças de impacto econômico e sanitário na produção leiteira, além de apresentar uma etiologia multifatorial. (RUEGG, 2017) Neste cenário, o *Staphylococcus aureus*, é um dos principais agentes causadores da mastite, este fato está associado a presença de diversos fatores de virulência que auxiliam este agente na instalação da doença, além de possuir capacidade de formação de biofilmes bacterianos que o auxilia na evasão do sistema imune, persistência no hospedeiro e ambiente e na resistência aos antimicrobianos (ARCHER et al., 2011; VOELK et al., 2014).

Atualmente, existe uma grande pressão para a busca por métodos alternativos para o controle e tratamento da mastite, a fim de evitar e amenizar os efeitos causados pela resistência bacteriana, fruto do uso indiscriminado de antibióticos. Este fato, contribui para a busca do controle microbiano através do uso de outros microrganismos benéficos aos animais, denominados probióticos, que apresentam efeitos terapêuticos interessantes. (YU et al., 2022) De maneira mais detalhada, esses microrganismos conseguem contribuir com o aumento de condições favoráveis a saúde, tornando o organismo preparado a combater diversos patógenos, através principalmente da competição com bactérias patogênicas que possam infectar o organismo. (HUANG; LU; LIAO, 2020; MENEZES et al., 2020; SOCCOL et al., 2015).

No que diz respeito a probióticos, os lactobacilos não podem deixar de serem citados, uma vez que, por serem os pioneiros a serem utilizados nesta função, além de serem amplamente utilizados até os dias atuais, os credenciam a serem sempre mencionados quando se discute sobre este tema. Os lactobacilos também se apresentam em destaque, quando se trata de fontes para realizar seu isolamento, já que eles podem ser oriundos de plantas, solo, órgãos de seres vivos, bebidas e alimentos. (HERBEL et al., 2013). Considerando as mudanças genotípicas, fenotípicas e ecológicas do gênero ao longo dos anos, viu-se a necessidade de uma nova organização taxonômica, o que foi refletido na nomenclatura. Nesse contexto, partir de 2020, algumas espécies do gênero lactobacilos, tiveram seu nome alterado, como foi o caso do *Lactobacillus plantarum*, que teve sua nomenclatura alterada para *Lactiplantibacillus plantarum*. (ANVISA, 2021; ZHENG et al., 2020).

Assim, este estudo objetiva avaliar o potencial inibitório de *Lactiplantibacillus plantarum* oriundo da fermentação do cacau, em forma vegetativa e biofilme de *S. aureus* advindos de mastites bovina e ovina, bem como a cepa de referência ATCC (25923) e a SARM (*S. aureus* resistente a metilicina).

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial bacteriocinogênico e inibitório de duas cepas de *L. plantarum* obtidos da fermentação do cacau, em formas vegetativas e em biofilmes de *S. aureus*.

3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito inibitório de isolados de *L. plantarum* diretamente sobre *S. aureus* por co-cultura, teste de sobrenadante e linha de inibição.

- Avaliar o efeito dos isolados de *L. plantarum* “in vitro” em *S. aureus* em biofilmes e na forma não aderida.

- Avaliar a concentração inibitória mínima dos sobrenadantes de *L. plantarum*, contra *S. aureus* de mastite bovina e ovina, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. aureus* resistente a metilicina.

- Avaliar o efeito de diferentes plasmas (bovino, ovino, equino e humano), na formação de biofilme dos *S. aureus* e *Escherichia coli*.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Probióticos

Muito se discute sobre as vantagens da utilização de probióticos de maneira geral. Essa informação se deve, principalmente pelo fato de que, estes microrganismos, conferem uma melhora na saúde e conseqüentemente, torna o organismo apto a combater diversos patógenos, uma vez que, seu consumo e utilização em quantidades adequadas, atribuem ao seu hospedeiro diversos efeitos benéficos. Huang et al. (2020). As condições benéficas atribuídas ao hospedeiro, mediante administração de probióticos, vem sendo relatadas na literatura, trazendo aspectos importantes no que se refere a diminuição na incidência de algumas patologias, por combaterem potenciais patógenos quando fornecido de maneira preventiva, mas também como atenuante da sintomatologia em alguns casos, já que diminui os efeitos nocivos causados pela intensa resposta inflamatória Yu et al. (2022). Todavia, estes microrganismos vivos, que são fornecidos ao seu hospedeiro, precisam ter alguns critérios para serem considerados produtos com potencial para uso, devendo possuir total isenção de riscos para seu hospedeiro, ser resistente às condições gastrointestinais (acidez, bile e enzimas digestivas), deve ser capaz de produzir substâncias que inibem microrganismos patogênicos, poder de estimular o sistema imune do hospedeiro, ter capacidade de aderir aos tecidos e não serem sensíveis a antibióticos Menezes et al. (2020 e Soccol et al. (2015).

Em um estudo anterior, os autores avaliaram o mecanismo de controle do biofilme probiótico utilizando modelos matemáticos, neste estudo, foi observado os efeitos positivos do biofilme probiótico, sobre um biofilme formado por agentes patogênicos por meio de modificações ambientais, como aumento da concentração de ácido lático e pH. Eberl et al. (2010). Esse efeito no biofilme de microrganismos causadores de doenças, se mostra muito significativo, uma vez que, algumas bactérias, como o *Staphylococcus aureus*, utilizam deste mecanismo, para se proteger contra as células de defesa do indivíduo, bem como de terapêuticas implantadas Melo et al. (2016).

O uso intenso de antibióticos, a resistência aos antimicrobianos e a crescente preocupação com aspectos relacionados a saúde, despertam a busca por alternativas ao tratamento convencional. Nesse sentido, torna-se necessário o desenvolvimento de novas culturas probióticas, levando em consideração a diversidade de propriedades benéficas atribuídas as cepas. Melo et al. (2017 e Nader-Macías et al. (2008).

4.2 Lactobacilos

Os lactobacilos fazem parte de um gênero formado por bactérias em forma de bacilos, Gram positivos, oxidase negativos, imóveis, anaeróbios facultativos, incapazes de produzir esporos, são catalase negativos e toleram baixos níveis de pH, uma vez que, são capazes de fermentar hidratos de carbono, tendo como produto nesse processo, o ácido láctico Herbel et al. (2013). Estes microrganismos podem ser isolados naturalmente em uma variedade de locais, como plantas, solo, órgãos de seres vivos, bebidas e alimentos Cai et al. (2012 e Pál et al. (2012). Considerando a ampla variedade de fontes disponíveis para seu isolamento, a adequação para a realidade de cada região, é imprescindível para sua obtenção facilitada e de baixo custo.

No atual cenário econômico do Brasil, o litoral sul da Bahia se apresenta como um dos mais importantes na produção cacauceira nacional, levando em consideração, que se trata de uma região com significativa aptidão agrícola Nogueira et al. (2019). É sabido que, a amêndoa do cacau é a principal matéria prima para produção do chocolate e para obter este produto, é necessário a fermentação da polpa, processo com um significativo papel na qualidade do produto. Assim, a fermentação, a qual envolve a amêndoa e a polpa do cacau, é iniciada por microrganismos presentes no fruto, produtores de etanol em condições de baixa oxigenação, que será posteriormente oxidado por bactérias produtoras de ácido acético e por outras produtoras de ácido láctico, culminando no aumento da temperatura do processo (45–50 °C) Nogueira et al. (2019). Assim, a polpa do cacau, quando em processo fermentativo, possui uma alta população microbiana dominada no princípio, pelas leveduras, importantes para o fortalecimento das bactérias lácticas, sendo estas últimas, destacada pela espécie *Lactiplantibacillus plantarum* Lee et al. (2019 e Saito et al. (2014).

O primeiro gênero descoberto no grupo dos probióticos foram os Lactobacilos e este, até os dias atuais, é um dos probióticos mais utilizados. Alguns fatores contribuem para o desenvolvimento de cepas probióticas de origem local, como por exemplo: diferenças geográficas entre populações de modo a interferir em aspectos relacionados a nutrição e saúde, composição da microbiota gastrointestinal e valorização de cepas locais e tecnologias industriais. Assim, os lactobacilos encontrados na polpa do cacau, apresentaram resultados promissores no que diz respeito ao efeito anti-inflamatório, propriedades tecnológicas e inibição de bactérias patogênicas, apresentando potencial antimicrobiano quando expostos a bactérias na forma de biofilme e alguns microrganismos patogênicos de origem alimentar Melo et al. (2016 e Pereira et al. (2018 e Santos et al. (2016 e Sybesma et al. (2015).

4.3 *Lactiplantibacillus plantarum*

O *lactiplantibacillus plantarum*, anteriormente denominado *lactobacillus plantarum*, é utilizado nos processos fermentativos a milhares de anos, por se tratar de uma espécie capaz de produzir metabólitos antimicrobianos, tendo uma aplicação de suma importância na indústria de alimentos, já que permite prolongar a vida útil dos produtos. Shi et al. (2024). Contudo, sabe-se que a aplicação do *L. plantarum* não se restringe apenas a indústria alimentícia, uma vez que, são capazes de produzir também genes que induzem o efeito antioxidante, aumento na produção de imunoglobulinas e citocinas anti-inflamatórias, conforme estudo feito em cabras leiteiras. Zhang et al. (2024).

As fontes de isolamento podem ser as mais diversas, variando de alimentos fermentados, azeitonas, saliva humana, alcaparras, massa fermentada, vinho, microbiota intestinal e polpa fermentada do cacau. Prete et al. (2020 e Santos et al. (2016). O interesse e consequente descoberta do *L. plantarum* surgiu na década de 80, através de cientistas da Universidade de Lund na Suécia, que visavam aumentar a taxa de sobrevivência de pacientes em unidades de terapia intensiva com falência múltipla dos órgãos Nordström et al. (2021). Nesses pacientes, a ingestão de *L. plantarum* proporcionou melhoras consideráveis em quadros de síndrome do intestino irritável, doença inflamatória intestinal e deficiência de ferro. Nordström et al. (2021).

A inibição de bactérias patogênicas, é uma aplicação bastante promissora, levando em consideração os resultados obtidos em pesquisas relacionadas. Dentre outros patógenos, o *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA), ganha destaque por ser um agente de grande preocupação principalmente na saúde pública Wörmann et al. (2024). Nesse aspecto, o *L. plantarum* apresentou um grau satisfatório de efeito antimicrobiano com relação ao MRSA em fabricação de queijo de leite cru. Wörmann et al. (2024). A ação contra a formação de biofilmes, é outra prática propícia, tendo obtido resultados promissores quando utilizado o sobrenadante do *L. plantarum* em *Listeria monocytogenes*. Rouhi et al. (2024).

Existem bactérias capazes de produzir peptídeos, chamados bacteriocinas, além das substâncias inibidoras semelhantes à bacteriocina (SISB), cujas propriedades e funções demonstram potenciais para utilização desde a indústria farmacêutica até na produção e manipulação de produtos alimentícios, por serem seguras em termos de consumo humano ou animal e não apresentar efeito cancerígeno e alergênico Kareem et al. (2020). No setor de alimentos, as bacteriocinas atuam na prolongação do tempo de prateleira e na potencialização da segurança dos alimentos, uma vez que acabam interferindo negativamente na multiplicação de agentes bacterianos patogênicos Kareem et al. (2020). Em aspectos clínicos, as bacteriocinas

produzidas por essas bactérias, conseguem de maneira eficaz inibir agentes específicos, e por serem em alguns casos resistentes a antibióticos, conseguem atuar de maneira adjuvante no tratamento de infecções bacterianas Kareem et al. (2020). Ademais, bactérias lácticas, mais especificamente *L. plantarum*, são capazes de produzir no mínimo seis bacteriocinas promissoras, através da expressão dos genes PlnE e PlnF. Kareem et al. (2020). A literatura dispõe de algumas bacteriocinas específicas, produzidas por *L. plantarum*, como é o caso da Plantaricina FB-2 que, apresentou uma atividade inibitória eficaz contra *Staphylococcus aureus* ATCC6538, e pelo fato de não apresentar efeito hemolítico, este estudo validou sua segurança, na indústria alimentícia ou até como agente bacteriano. Li et al. (2023).

Em um estudo recente Contente et al. (2024), foi possível isolar genes que sintetizam seis bacteriocinas de classe 2, denominadas plantaricinas, que por sua vez, são bacteriocinas muito importantes na espécie *L. plantarum*, por serem responsáveis por grande parte da sua ação antimicrobiana. No entanto, deve-se atentar que as plantaricinas podem ter características e atividades distintas (Tabela 1). Essa informação é relevante, para escolha da bacteriocina, ou mais especificamente, das plantaricinas mais indicadas de acordo com o objetivo de aplicação. A bacteriocina ZBK1-5 por exemplo, apresenta características únicas quando comparada com outras plantaricinas, pelo fato de apresentar um alto efeito antimicrobiano em um curto espaço de tempo para liberação desses compostos, o que a habilita como uma boa opção probiótica. Choovet et al. (2024). Em outro exemplo, o uso da Plantaricina LD1, apresentou atividade antimicrobiana de forma direta no patógeno *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923, assim como também conseguiu intervir na formação do biofilme, cuja característica é bastante presente neste agente e com uma importância significativa na virulência. Yadav et al. (2024).

O uso de probióticos pode abranger diversas áreas, o que implica a necessidade de características e requisitos específicos para sua seleção. Os critérios de escolha baseiam-se principalmente em três aspectos fundamentais: resistência, segurança e eficácia. A resistência que se espera, irá depender da forma de administração utilizada, uma vez que, por exemplo, uma administração via oral, deverá fornecer condições favoráveis a ingestão do probiótico, como tolerância a pH e sais e biliare presentes no trato gastrointestinal. Gökmen et al. (2024). A segurança diz respeito a não nocividade do seu uso no hospedeiro, enquanto a efetividade, se relaciona diretamente com o grau de intervenção benéfica que o agente em questão é capaz de exercer Fonseca et al. (2021). A atividade inibitória contra agentes microbianos, se destaca como sendo uma das principais funções de um probiótico elegível para ser utilizado e, essa ação importantíssima nesse grupo, pode ser executada de maneiras distintas, desde a competição

direta com agentes patogênicos pelo sítio de ação, produção de bacteriocinas, até modulação do sistema imunológico Fonseca et al. (2021).

Tabela 1- Principais tipos de plantaricinas descritas

Nome da Plantaricina
Plantaricina A
Plantaricina E/F e J/K
Plantaricina C
Plantaricina W
Plantaricina S
Plantaricina 35d
Plantaricina MG
Plantaricina 423
Plantaricina 163
Plantaricina ST31
Plantaricina KW30
Plantaricina ST-28MS
Plantaricina Y
Plantaricina ZJ5
Plantaricina ST8SH
Plantaricina 163
Plantaricina JLA-9

Fonte: Isabella et al. (2020 e Kareem et al. (2020).

4.3 Mastite

Existe uma expectativa referente a produção leiteira brasileira, de crescimento nos próximos 10 anos a uma taxa entre 1,8% e 2,7%, significando um acréscimo na produção de 35,4 bilhões de litros em 2022 para 42,4 bilhões em 2032, podendo ser justificado pela melhor gestão e produtividade nas fazendas de bovinos leiteiros IBGE (2022). Nesse contexto, a mastite se apresenta como uma das principais doenças de caráter sanitário e econômico, sendo caracterizada por ser uma patologia que provoca uma resposta inflamatória da glândula

mamária quando exposto a algum microrganismo, substância química, variações de temperatura ou lesão da glândula mamária, sendo esperado uma perda de 25 a 42% por quarto mamário, em rebanhos leiteiros brasileiros acometidos com mastite subclínica Brito et al. (2021). Ademais, nos Estados Unidos, foi realizado uma estimativa de custos com relação a tratamentos contra mastite, chegando a 185 dólares americanos por vaca/ano, significando, em média, 10% do valor total de leite vendido pelos produtores Dutra et al. (2017 e EMBRAPA (2015).

A mastite pode ser conceituada como sendo, o processo inflamatório do úbere, caracterizado pelo aumento da permeabilidade da membrana que separa o leite e o sangue, sendo acompanhada por uma redução na produção de leite Walcher (2011). A etiologia desta patologia pode estar atrelada a uma variedade de 140 espécies de microrganismos, podendo ser classificados de acordo com sua principal fonte de contaminação e relevância no desenvolvimento da doença. Os patógenos contagiosos (*Corynebacterium bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Mycoplasma bovis*), os patógenos ambientais (*Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equinus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Citrobacter spp*, *Enterobacter spp*, e *Pseudomonas spp*), os patógenos secundários (*Staphylococcus* coagulase negativos) e alguns microrganismos incomuns mais que podem estar envolvidos (*Arcanobacterium pyogenes*, *Nocardia spp*, *Pasteurella spp*, *Mycobacterium bovis*, *Bacillus cereus*, *Serratia marcescens*, bactérias anaeróbias, fungos e leveduras Coelho et al. (2016).

De acordo com a característica atribuída ao desenvolvimento da doença, a mastite pode ser classificada como subclínica, clínica ou crônica. Na forma subclínica, a patologia se manifesta praticamente sem sinais aparentes, com ausência de inflamação e fibrose na glândula mamária, podendo ter uma queda na produção e sendo diagnosticada através da identificação de glóbulos brancos no leite, com o *Californian Mastitis Test* (CMT) ou pela contagem de células somáticas (CCS) Walcher (2011). A manifestação clínica da mastite na sua forma aguda por sua vez, se caracteriza por possuir todos os sinais clássicos possíveis (calor, rubor, edema, dor e perda da função), além de sinais clínicos concomitantes como diminuição do apetite, respiração ofegante, desidratação, apatia e alterações na composição e quantidade de leite produzido Walcher (2011). Em caso de não resolução na sua apresentação aguda, a doença pode evoluir para forma crônica, onde já não se observa mais sinais inflamatórios, tendo predominância neste momento do processo de fibrose intenso, com alterações no leite, culminando na perda definitiva do quarto mamário Walcher (2011).

4.4 *Staphylococcus aureus*

O *S. aureus* é um patógeno preocupante no controle da mastite, devido aos seus variados fatores de virulência, resistência a antimicrobianos e persistência no ambiente Voelk et al. (2014). Esta é uma bactéria gram positiva, anaeróbia facultativa, imóvel, não esporulada e coagulase positiva além de ser produtora de toxinas termotolerantes que podem contaminar diversos alimentos como o leite, o qual, mesmo pasteurizado pode levar a intoxicação, apresentando sinais clínicos de diarreia, vômito e febre. Ahmad-Mansour et al. (2021).

Ahmad-mansour *et al* (2021), discutiu sobre trabalhos que envolvem toxinas de *S. aureus*, abordando seus mecanismos de ação e patogênese, no intuito de embasar desenvolvimentos futuros de modelos terapêuticos. Além disso, este agente possui mecanismos capazes de anular respostas imunes do hospedeiro, formado por microcolônias complexas que são chamados biofilmes, este, pode ser definido como uma comunidade séssil derivada de micróbios, tipificada por células que estão ligadas a um substrato, interface ou umas às outras, além de estarem ligadas em uma matriz de substância polimérica extracelular exibindo um fenótipo alterado em relação ao crescimento, expressão gênica e produção de proteínas (ARCHER *et al.*, 2011, p445). Neste aspecto, dentre os estafilococos, o *S. aureus* ATCC 25923 apresenta maior predisposição a formação de biofilme Wicahyo et al. (2024).

Cepas de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum*, extraídas da fermentação do cacau, foram avaliadas quanto ao seu poder inibitório em relação a produção de biofilme de *Staphylococcus aureus*, encontrando resultados satisfatórios em ambas as cepas, no que se refere à potencial de inibição. Melo et al. (2016).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Cepas bacterianas e condições de cultura

Foram utilizados dois isolados provenientes do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Santa Cruz que foram previamente caracterizados e identificados por Santos et al. (2016). Foram utilizadas cepas de *S. aureus* previamente identificadas de casos de mastite bovina e ovina e mantidas sob refrigeração em caldo Triptona de Soja (TSB) com 20% de glicerol a -20°C Melo et al. (2013). Adicionalmente foi utilizada uma cepa de SARM gentilmente cedida pela Profa. Dra. Luciana Debortoli de Carvalho e identificados pelo kit Vitek2.

As cepas de *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* de mastite bovina, ovina e *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (SARM) mantidas sob refrigeração a -20 °C foram recultivados em ágar Manitol Salgado (MAS) e ágar sangue, deixando-o em aerobiose, em 37°C, por 24 horas. Em seguida, foram testadas pelo método de gram para confirmação morfotintorial e ausência de contaminação. Somente foram utilizadas placas com boa formação de colônias β-hemolíticas concavas, com coloração esbranquiçada ou amarelada e alteração de coloração do meio para amarelo em MAS e a presença de cocos gram positivos em formato de cacho de uva. Foram consideradas sem contaminação aquelas com a presença exclusiva de colônias de *S. aureus*.

Para o cultivo dos isolados de *Lactiplantibacillus platarum*, cepas 286 e 81, gentilmente cedidas em parcerias com o Departamento de Ciências Biológicas da UESC que compuseram o trabalho de Santos (2016) foi utilizados ágar e caldo MRS. Após crescimento, foi realizado averiguação morfotintorial e foram considerados sem contaminação aqueles com a presença de pequenas colônias de coloração branca, concavas e que se apresentaram como bacilos gram positivos em coloração. Adicionalmente, os isolados foram identificados em gênero e espécie pela técnica de 16S RNA.

5.2 Liofilização e diluição do *L. plantarum*

Para obtenção do sobrenadante liofilizado, foi adicionado uma alçada 10ul de colônia bacteriana de cada isolado de *L. plantarum* em quatro tubos Falcon com 20 ml de caldo MRS e incubados, durante a noite, a 37°C em aerobiose. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 4°C por 15 minutos a 4000g. O sobrenadante resultante foi filtrado em filtro microbiológico de

0,22 microns para remoção de eventuais células bacterianas em suspensão. Em seguida foi congelado e liofilizado por 72h.

Para a pesagem e posterior diluição em meio BHI, se desenvolveu da seguinte forma: Através da balança de precisão foi aferido 1g do sobrenadante liofilizado das cepas 286 e 81. Posteriormente esse conteúdo de 1 grama, contido em tubo Falcon de 50 ml, foi acrescido 5 ml de caldo BHI, sendo devidamente homogeneizado, formando uma solução com concentração de 200 mg/ml de sobrenadante em caldo BHI. Em seguida foram realizadas diluições seriadas pela metade de cada concentração em eppendorfs de 2 ml contendo 1ml de caldo BHI cada. Assim, o primeiro eppendorf, em ambas as cepas avaliadas, continha concentração de 200 mg/ml, seguido por outro de 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml e 12,5 mg/ml, respectivamente.

5.3 Elaboração dos grupos controle

Foram elaborados no mesmo período, os grupos controle do experimento. Estes podem ser divididos em três grupos a seguir: o controle de crescimento, controle de inibição e controle do meio. O controle de crescimento (CC) consiste em caldo BHI, acrescido do meio BHI contendo *S. aureus* ATCC 25923 (escala Mcfarland 0,5). O controle de inibição (CI), por sua vez, possui em sua composição, 12 mg/ml de clorafenicol, adicionado do meio BHI contendo *S. aureus* (escala Mcfarland 0,5). O controle do meio (CM) contém apenas o caldo BHI, a fim de verificar a esterilidade da solução e do procedimento.

5.4 Micro diluição e inoculação

Diante dos tratamentos e controles devidamente elaborados, a microdiluição de acordo com o CLSI (2022) foi realizada com o intuito de verificar até qual concentração o sobrenadante possui efeito inibitório. Assim, em uma placa de teste de ELISA, foram dispostos poços contendo as devidas concentrações (200 mg/ml, 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12,5 mg/ml), bem como os controles mencionados anteriormente (CC, CI, CM). Para melhor identificação e visualização dos resultados, as placas dos testes de ELISA foram diferenciadas de acordo com sua cepa correspondente e padronizadas até o equivalente a escala de 0,50 MacFarland.

Após a realização das micro diluições, as placas de teste de ELISA, permaneceram por 24 horas, em 37°C, para inoculação em placa. Posterior a incubação das amostras, estas foram inoculadas em ágar Mueller Hinton, seguindo a mesma sequência e organização da placa de teste Elisa. Em cada quadrante foram inoculados 5 microlitros de cada amostra. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa, a 37°C, por 24 horas, em aerobiose, a leitura dos resultados

foi feita através de observação e posterior contagem das colônias, até o limite máximo de 30 e aplicando-se a fórmula abaixo.

$$\frac{UFC}{ml} = \text{Número de colinas} \times 200 \times \text{Diluição}$$

5.5 Tamponamento do pH e teste de estabilidade térmica

Para avaliar se a inibição na dose de 50 mg/ml do sobrenadante estaria inibindo pela influência de pH ou pela produção de bacteriocinas, também chamadas de substâncias inibitórias semelhantes a bacteriocina (SISB). Foi feita a avaliação do pH, através do uso do pHmetro, onde se observou tanto na amostra 81 como na 286, um pH em torno de 4,30. Dessa forma, para remover o efeito inibitório do sobrenadante por acidez do meio, foi realizado a correção do pH pela adição de hidróxido de sódio (NaOH) vagarosamente ao sobrenadante até este atingir o pH em torno de 7,3. Em seguida, novamente foi realizada a MIC e o sobrenadante tamponado na concentração de 200mg/ml foi submetido a esterilização (127°C por 15min) para testar a estabilidade térmica dos SISB.

5.6 Avaliação da Formação de biofilme

No intuito de verificar o grau de inibição no biofilme de *S. aureus*, foi utilizada a técnica conforme Grossman et al. (2021), com algumas modificações. Para um melhor entendimento e execução da técnica, esta foi dividida em três partes ao longo do experimento, a primeira etapa consistiu em avaliar o grau de crescimento do biofilme dos *S. aureus*. Posteriormente foi avaliado então, o desenvolvimento do biofilme em plasmas distintos (plasma humano, plasma bovino, plasma equino e plasma ovino). Por último, foi feita então a análise inibitória, utilizando os sobrenadantes 81 e 286 de *L. plantarum* em relação aos *S. aureus*.

5.6.1 Desenvolvimento dos biofilmes no plasma humano

Os SAB, SAO, SAM e SAA foram reativadas em caldo BHI incubados a 37°C por 24h. Em seguida, foram semeadas em placas com Ágar Trypticaseína de Soja (TSA) e incubação a 37°C durante 24h para obter colônias isoladas. Foram considerados os SAB, SAO e SAM, como tratamentos, SAA como controle positivo e a tripticaseína de soja (TSB) como controle de controle do meio (CM). Em seguida, as colônias isoladas foram cultivadas, em uma incubadora *shaker*, em caldo tripticaseína de soja (TSB), por 18h a 37°C, na velocidade de 218 RPM.

Simultaneamente foi preparada microplacas, com 100 µL de solução de plasma humano a 20% (em NaCl 0,9%) e armazenados à -20°C por 24h.

Após 18h de incubação, os cultivos foram ajustados a densidade óptica (DO) de 0,05 em comprimento de onda de 600 nanômetros. Após esse processo, as placas contendo plasma humano a 20%, foram retiradas e deixadas em temperatura ambiente por 30 minutos para descongelar, após o descongelamento, o plasma contido na placa foi descartado. Em seguida, foi acrescentado 100µL de TSB com 3% de NaCl e 0,5% de dextrose em cada orifício da placa, em triplicata, para em seguida, ser adicionando 100µL do inóculo nos poços. Nos controles, foram utilizados 200µL de TSB com 3% de NaCl e 0,5% de dextrose e 100µL do inóculo das respectivas bactérias em junção a 100µL de TSB com 3% de NaCl e 0,5% de dextrose e incubadas a 37°C por 24h. Após cultivo, durante a noite, foi descartado o conteúdo dos poços, lavados três vezes com NaCl 0,9%. Após a remoção do NaCl 0,9%, foi, acrescentando 100µL de metanol em cada poço para promover a fixação. Após 1 minuto, descartou-se o metanol e deixou-se secar por 15 minutos. Após a secagem, foi acrescentado 100µL de cristal violeta a 0,5% em cada um dos poços para corar as amostras, após 30 minutos, descartou-se o cristal violeta e novamente foram lavados os poços com 200µL de NaCl 0,9% por 3 vezes, removendo o excesso no final. Finalmente, acrescentou-se 100µL de etanol em cada poço, aguardando 45 minutos em temperatura ambiente. Simultaneamente foi preparada uma nova placa com 50µL de etanol por poço. Em seguida, foram transferidos 50µL da placa anterior, resultando em um volume de 100µL e uma diluição de 1:2. Para leitura como “branco”, foram utilizados três poços com 100µL de etanol puro. Para concluir foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 570nm de comprimento de onda. O mesmo procedimento foi realizado, avaliando-se os plasmas de bovino, ovino e equino, todos a 20% em substituição do plasma humano a 20%.

5.6.2. Análise inibitória, utilizando os sobrenadantes 81 e 286 de *L. plantarum* em relação aos *S. aureus*

A reativação das bactérias se deu de maneira similar à etapa anterior. Ademais foram incluídos controles com antibióticos (cloranfenicol 0,5mg/ml e gentamicina 2mg/L), juntamente com *S. aureus* ATCC 25923. Com as colônias devidamente isoladas, estas foram inoculadas em caldo TSB, incubando por 18h em 37°C a 218 RPM em incubadora shaker. Simultaneamente foi preparada microplaca de poliestireno de 96 poços com fundo em U, com 100 µL de solução de plasma humano e bovino a 20% em NaCl 0,9% e armazenados à -20°C por 24h. Após a incubação de 18h, os tubos foram homogeneizados em um vórtex e ajustados

a uma DO de 0,05 em comprimento de onda de 600 nanômetros. Após esse processo, a placa foi retirada e deixada em temperatura ambiente por 30 minutos para descongelar, em seguida, após descongelamento e descarte do plasma, foi acrescido 100µL do sobrenadante de *L. plantarum* 81 e 286 em cada poço da placa em triplicata, adicionando 100µL do inóculo. Nos controles, foram utilizados 200µL de TSB com 3% de NaCl e 0,5% de dextrose (CM) e 100µL da respectiva bactéria em junção a 100µL de TSB 3% de NaCl e 0,5% de dextrose, para o controle de crescimento bacteriano (CC) sendo incubadas a 37°C por 24h. No outro dia, foi descartado o conteúdo dos poços, lavados três vezes com NaCl 0,9%. Após removido todo o NaCl 0,9% após a última lavagem, foi acrescentando 100µL de metanol em cada poço para promover a fixação. Após 1 minuto, descartou-se o metanol e deixou-se secar por 15 minutos. Após a secagem, foi acrescentado 100µL de cristal violeta a 0,5% em cada um dos poços para corar as amostras, após 30 minutos, descartou-se o cristal violeta e novamente foram lavados os poços com 200µL de NaCl 0,9% por três vezes, removendo o excesso no final. Com NaCl devidamente removido, acrescentou-se 100µL de etanol em cada orifício, aguardando 45 minutos em temperatura ambiente. Simultaneamente foi preparada uma nova placa com 50µL de etanol por orifício e após o tempo estipulado, foram transferidos 50µL da placa anterior, resultando em um volume de 100µL e uma diluição de 1:2. Para leitura como “branco”, foram utilizados três poços com 100µL de etanol puro. Para concluir foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 570nm de comprimento de onda.

Considerando que a biomassa do biofilme, é proporcional a densidade óptica, os dados fornecidos pelas placas através do espectrofotômetro, foram planilhados para posterior formação de informações importantes como valor de corte da DO, média do controle negativo e desvio padrão do controle negativo. Através dessas informações foi possível classificar as bactérias antes e após a exposição dos sobrenadantes, enquanto não produtora, fraca produtora, moderada produtora ou forte produtora de biofilme Harika et al. (2020). Para o cálculo, bem como os parâmetros para classificação a fórmula foi a seguinte:

$$DO_c = M_c + (3 \times SD_c)^*$$

$$\begin{aligned} DO_{570nm} < DO_c &= \text{Não produtor} \\ DO_c < DO_{570nm} < 2 \times DO_c &= \text{Produtor fraco} \\ 2 \times DO_c < DO_{570nm} \leq 4 \times DO_c &= \text{Produtor moderado} \\ 4 \times DO_c < DO_{570nm} &= \text{Forte produtor} \end{aligned}$$

*DO_c: valor de corte da DO, M_c: média do controle negativo, SD_c: desvio padrão do controle negativo.

5. 7 Análise estatística

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente ao acaso, sendo que a contagem foi transformada em escala logarítmica e, junto com a absorbância foram testadas quanto à normalidade e homoscedasticidade pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Cumpridos os pressupostos, foi realizada análise de variância (ANOVA) two-way e quando não cumpridos, pelo Kruskal Wallis. Para verificar diferenças entre as médias, utilizou-se o teste de Tukey para anova ou Wilcox para Kruskal Wallis Jackson (2000). Para todos os testes, foi adotado um nível de significância de 0,05. As análises foram realizadas com o software R versão 4.2.1

6 RESULTADOS

6.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Pôde-se observar um considerável grau de inibição, tanto na cepa 81 como na 286 de *L. plantarum*, até a concentração 50 mg/ml quando não tamponado e autoclavado. Ademais, foi possível visualizar, o funcionamento correto dos grupos controle, bem como, o crescimento significativo de *S. aureus* a partir da concentração de 25 mg/ml (Figuras 1 e 2).

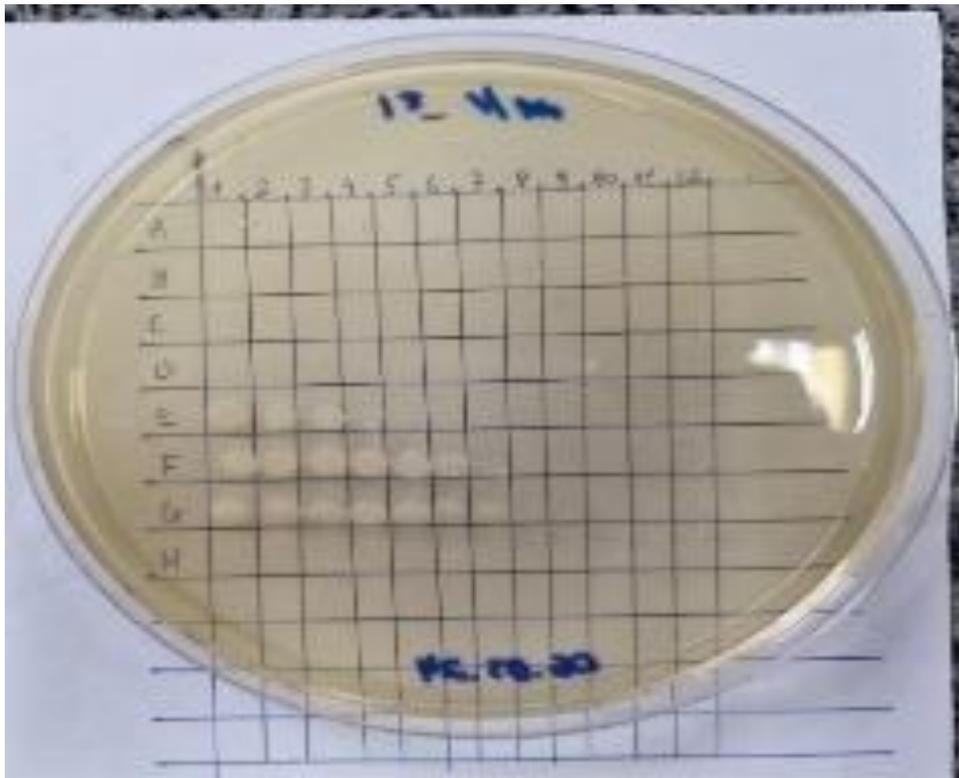


Figura 1 – Avaliação da inibição da Cepa 81 de *L. plantarum* em relação ao *S. aureus*, de acordo com a concentração. As colunas estão dispostas verticalmente de A a H, e horizontalmente de 1 a 12. A coluna A apresenta o CM; Da coluna B até a F foram adicionados 90 ml das concentrações dos tratamentos (200 mg/ml, 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12,5 mg/ml, respectivamente) acrescido de 10 ml do caldo BHI contendo *S. aureus* (Mcfarland 0,5). Na coluna G está o controle de crescimento (CC) e no H o controle de inibição (CI). Da coluna 1 a 12 foram diluídas todas as amostras de 10^{-1} a 10^{-12} .

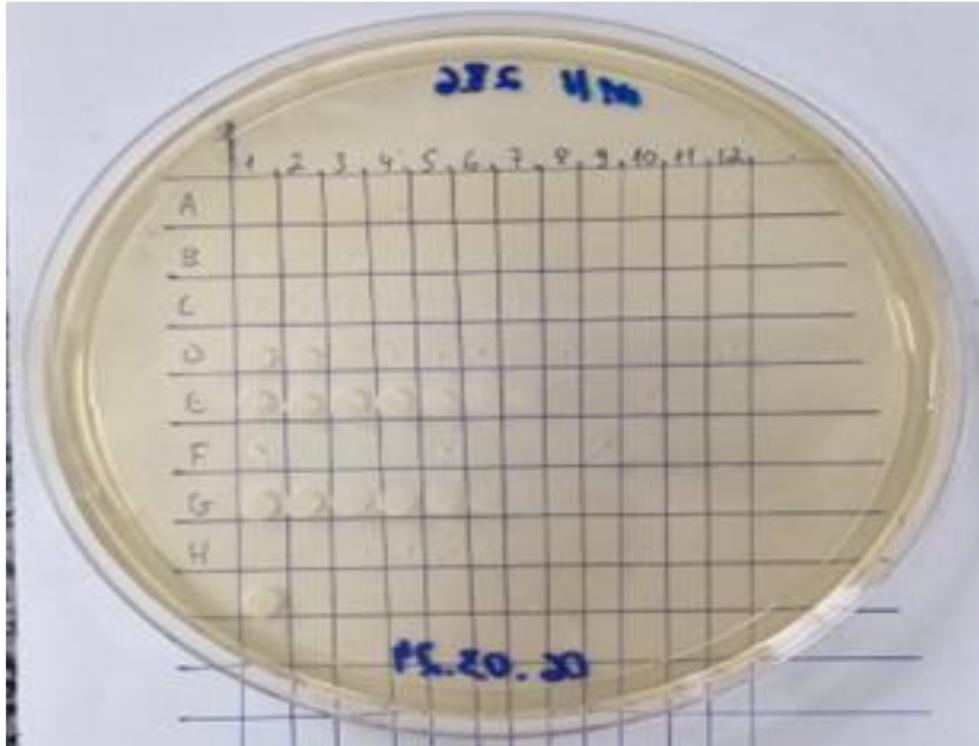


Figura 2 - Avaliação da inibição da Cepa 286 de *L. plantarum* em relação ao *S. aureus*, de acordo com a concentração. As colunas estão dispostas verticalmente de A a H, e horizontalmente de 1 a 12. Da coluna A até a E, foram adicionados 90 ml das concentrações dos tratamentos (200 mg/ml, 100 mg/ml, 50 mg/ml, 25 mg/ml, 12,5 mg/ml, respectivamente) acrescido de 10 ml do caldo BHI contendo *S. aureus* (Mcfarland 0,5). Na coluna F está o CI, na G o CC, e na H o CM. Da coluna 1 a 12 foram diluídas todas as amostras de 10^{-1} a 10^{-12} .

Quando os sobrenadantes foram devidamente tamponados (pH 7,30) e autoclavados, foi observado que efeito inibitório na concentração de concentração de 200mg/ml (Figura 3). A contagem das colônias através das médias e desvio padrão de UFC/ml definidas estão presentes na (Tabela 2).

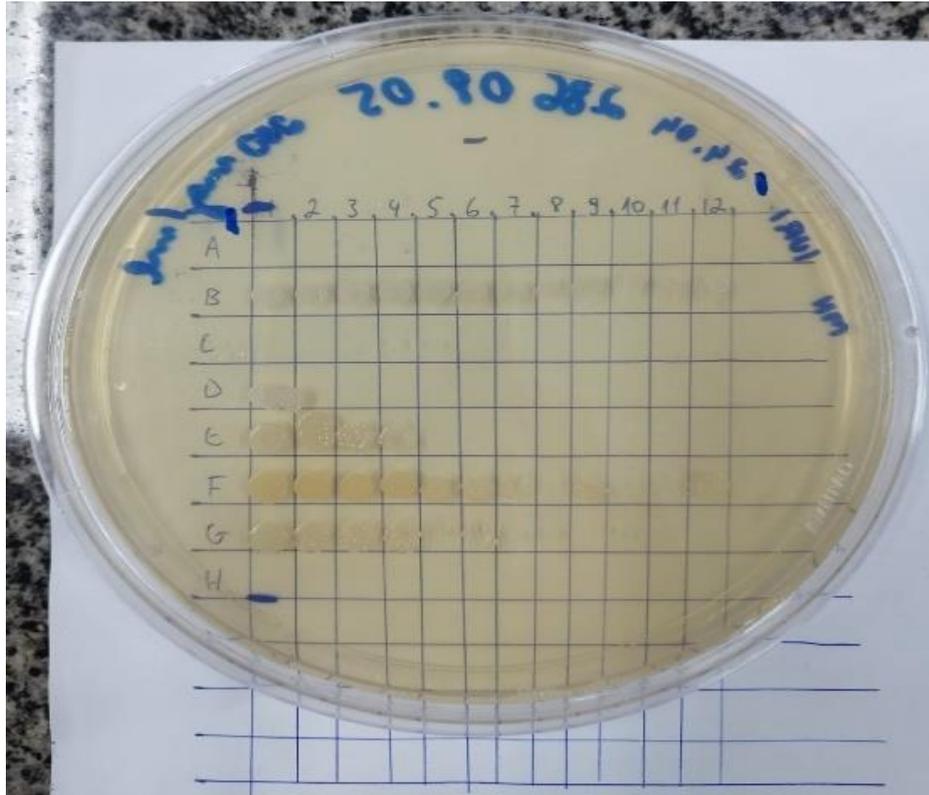


Figura 3 - A cepa 286, com considerável poder inibitório. Linha A: CM: Controle de meio; Linha B: CC: Controle de crescimento; Linha C: CI: Controle de inibição; Linha D: SAA: *S. aureus* ATCC 25923; Linha E: SAB: *S. aureus* bovino; Linha F: SAO: *S. aureus* ovino; Linha G: SAM: *S. aureus* SARM.

Tabela 2 Log das Médias e Desvio Padrão de UFC/ml das colônias

Microrganismo	Sobrenadante	
	81	286
CM	36,3±0,00 ^{Aa}	36,3±0 ^{ACa}
SAA	15,6±0,00 ^{Aa}	0±0 ^{ABa}
SAB	36,3±0,00 ^{Aa}	20,6±2,19 ^{ACa}
SAM	35,8±0,50 ^{Aa}	9,30±9,30 ^{ACa}
SAO	27,5±7,25 ^{Aa}	8,75±8,75 ^{ACa}

CM: Controle de meio; SAA: *S. aureus* ATCC 25923; SAB: *S. aureus* bovino; SAO: *S. aureus* ovino; SAM: *S. aureus* SARM. Letras maiúscula iguais não diferem pelo teste de Kruskal Wallis nas colunas, letras minúsculas iguais não diferem entre si nas linha pelo teste de Tukey.

Foi possível observar que o isolado 286 apresentou grau de inibição maior do que o 81, mesmo não sendo considerado estatisticamente significativo no teste do Kruskal Wallis (Figura 4).

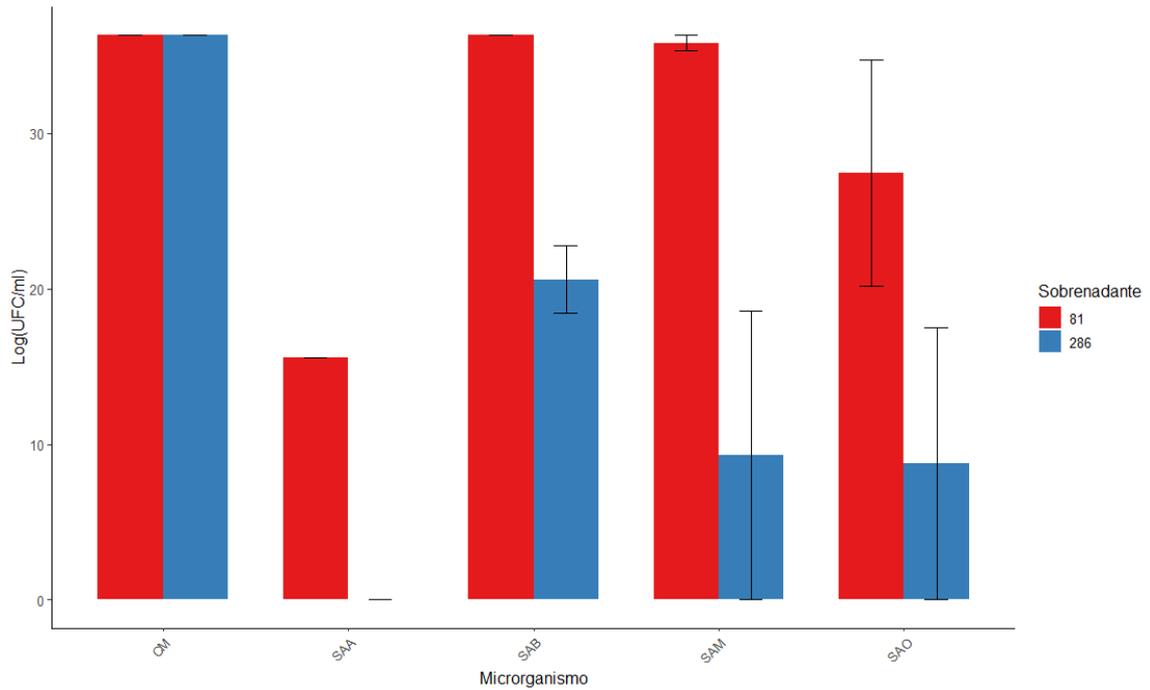


Figura 4 – Contagem em log de UFC/ml. CM: Controle de meio; SAA: *S. aureus* ATCC 25923; SAB: *S. aureus* bovino; SAO: *S. aureus* ovino; SAM: *S. aureus* SARM. A coluna vermelha representa a ação do sobrenadante do *L. plantarum* 81 nos *S. aureus* e a coluna azul representa a interação do sobrenadante 286.

Quando considerados os sobrenadantes isoladamente, o 286 apresentou redução das contagens quando utilizado a concentração de 200mg/ml autoclavado e tamponado, sendo significativa para o *S. aureus* ATCC e o CM pelo teste de Tukey. Foi observado redução nas contagens dos outros *S. aureus* embora não significativos (Figura 5).

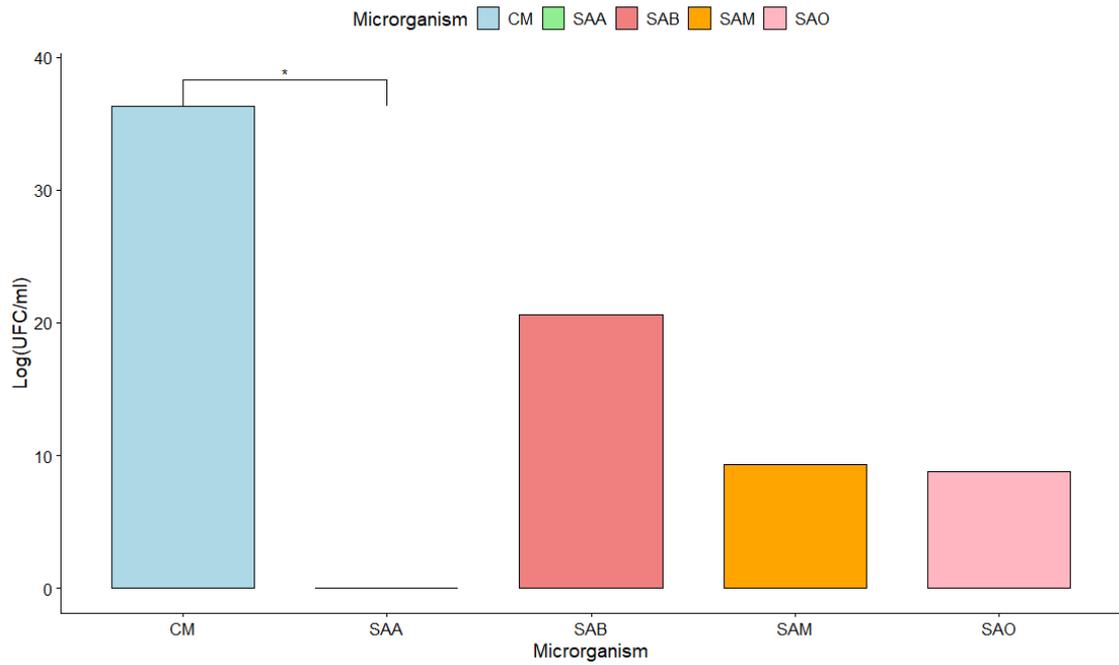


Figura 5 - Contagem em log de UFC/ml da interação do sobrenadante 286 com os diferentes *S. aureus*. CM: Controle de meio; SAA: *S. aureus* ATCC 25923; SAB: *S. aureus* bovino; SAO: *S. aureus* ovino; SAM: *S. aureus* SARM.

O sobrenadante do isolado 81 não foi capaz de reduzir significativamente as contagens dos *S. aureus* na concentração de 200mg/ml autoclavado e tamponado (Figura 6).

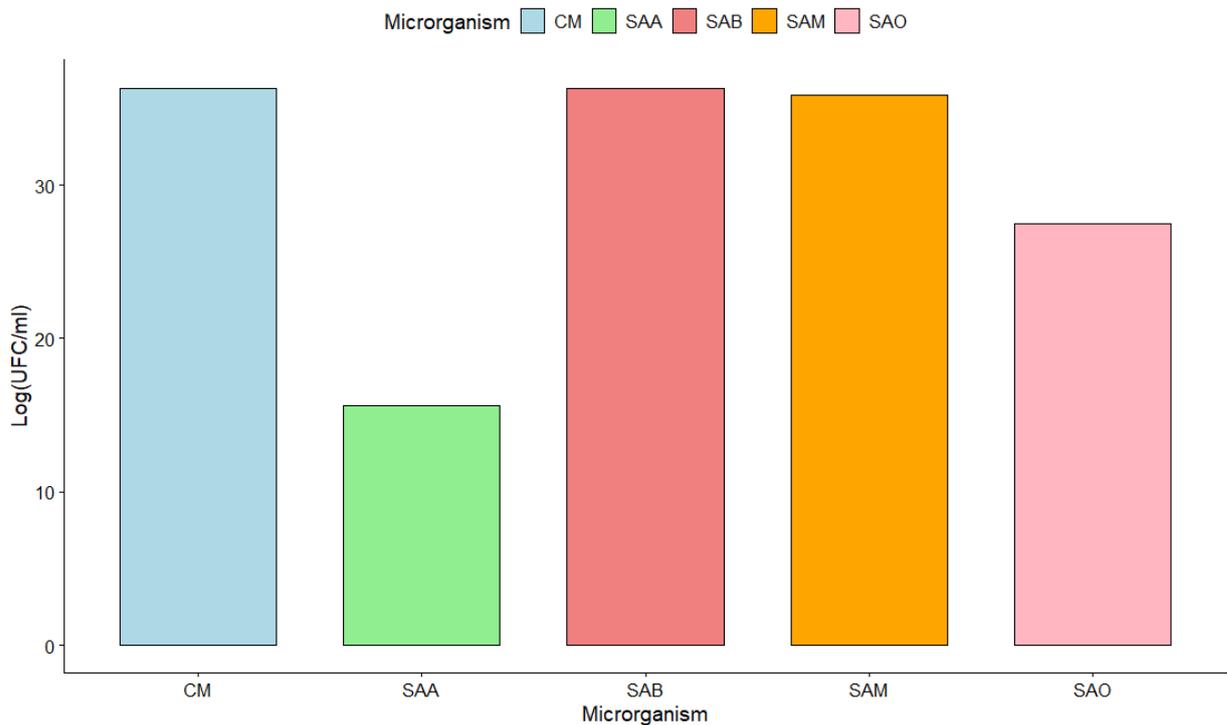


Figura 6 - Contagem em log de UFC/ml da interação do sobrenadante 81 com os diferentes *S. aureus*. CM: Controle de meio; SAA: *S. aureus* ATCC 25923; SAB: *S. aureus* bovino; SAO: *S. aureus* ovino; SAM: *S. aureus* SARM.

6.2 Produção e inibição de biofilme

No que se refere ao desenvolvimento dos biofilmes no plasma humano (Figura 7), foi possível obter as médias de crescimento, onde pode-se observar que o controle do meio (CM) apresentou uma densidade óptica (DO) de 0,080, o *S. aureus* ATCC (SAA), 0,100, o *S. aureus* bovino, superior a 0,140, o *S. aureus* ovino, superior a 0,080, enquanto o *S. aureus* resistente a metilicina (SARM), foi superior a 0,040. Dessa forma, foi possível observar que o *S. aureus* ATCC 25923 foi o melhor produtor de biofilme, principalmente em plasma equino e bovino, embora não significativo. Ademais, foi possível observar que a inibição dos sobrenadantes em relação ao *S. aureus* ATCC também foi mais intensa em ambos sobrenadantes.

Tabela 3 Formação de biofilme nos diferentes plasmas

Microrganismo	Plasma			
	Bovino	Equino	Humano	Ovino
CM	0,07±0,00	0,06±0,00	0,06±0,00	0,06±0,00
CM-PLASMA	0,06±0,00	0,06±0,00	0,08±0,00	0,05±0,00
E.coli	0,06±0,00	0,06±0,00	0,07±0,00	0,07±0,00
SAA	0,31±0,10	0,24±0,02	0,10±0,01	0,13±0,01
SAB	0,08±0,01	0,10±0,00	0,09±0,00	0,09±0,00
SAO	0,07±0,01	0,09±0,00	0,09±0,01	0,08±0,00
SAM	0,08±0,00	0,11±0,00	0,10±0,00	0,09±0,00

Desenvolvimento dos biofilmes no plasma humano, bovino, ovino e equino. CM: Controle de meio; SAA: *S. aureus* ATCC 25923; SAB: *S. aureus* bovino; SAO: *S. aureus* ovino; SAM: *S. aureus* SARM.

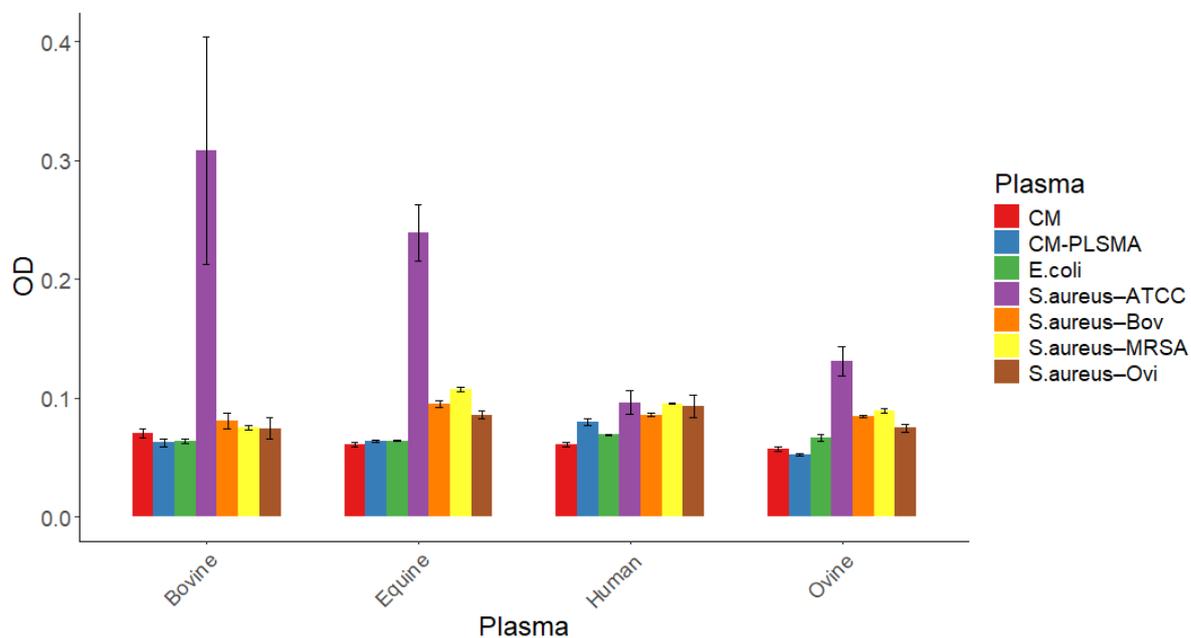


Figura 7 – Análise da formação de biofilme no plasma humano por densidade óptica. CM: Controle de meio; SAA: *S. aureus* ATCC 25923; SAB: *S. aureus* bovino; SAO: *S. aureus* ovino; SAM: *S. aureus* SARM.

Dando sequência ao ensaio de biofilme o desenvolvimento dos biofilmes no plasma humano, bovino, ovino e equino foram avaliados (Tabela 3). Confirmou-se que a *E. coli* não é uma boa formadora de biofilme pois apresentou OD similar ao controle do meio e controle do meio com plasma. Os *S. aureus* de mastite bovina, ovina e SARM formaram pouco biofilme, enquanto SAA, se manteve consideravelmente superior.

Foi feita uma análise diante do sobrenadante da cepa 81 e 286 de *L. plantarum*, em relação ao plasma humano e bovino (FIGURAS 8 e 9), (TABELAS 4 e 5), nos *S. aureus* analisados, bem como de *E. coli* ATCC 25922, que neste estudo foi considerado como controle negativo, por ser uma cepa não produtora de biofilme Harika et al. (2020). Adicionalmente os tratamentos foram classificados de acordo com a produção de biofilme (FIGURAS 10 e 11). Neste aspecto, estes então foram comparados quanto ao seu crescimento no plasma bovino e humano, além da inibição pelos sobrenadantes das cepas 81 e 286 nestes mesmos plasmas. Adicionalmente foi observado que houve uma queda na classificação de fraco produtor para não produtor de biofilme, quando os *S. aureus* foram expostos aos sobrenadantes.

Tabela 4 Formação e inibição de biofilme em plasma humano

Microrganismo	Biofilme		
	Formação	S81	S286
<i>E.coli</i>	0,07±0,00	0,04±0,02	0,04±0,03
<i>S.aureus</i> –ATCC	0,10±0,02	0,02±0,01	0,02±0,00
<i>S.aureus</i> –Bovino	0,09±0,00	0,02±0,01	0,02±0,01
<i>S.aureus</i> –SARM	0,10±0,00	0,02±0,01	0,02±0,00
<i>S.aureus</i> –Ovino	0,09±0,02	0,02±0,01	0,02±0,00

S81: Sobrenadante de *L. plantarum* 81. S286: Sobrenadante de *L. plantarum* 286.

Tabela 5 Formação e inibição de biofilme em plasma Bovino

Microrganismo	Biofilme		
	Formação	S81	S286
<i>E.coli</i>	0,06±0,00	0,04±0,04	0,05±0,01
<i>S.aureus</i> –ATCC	0,31±0,17	0,03±0,02	0,03±0,01
<i>S.aureus</i> –Bovino	0,08±0,01	0,05±0,02	0,03±0,01
<i>S.aureus</i> –SARM	0,08±0,00	0,02±0,02	0,03±0,01

S.aureus-Ovino $0,07 \pm 0,02$ $0,03 \pm 0,03$ $0,02 \pm 0,02$

S81: Sobrenadante de *L. plantarum* 81. S286: Sobrenadante de *L. plantarum* 286.

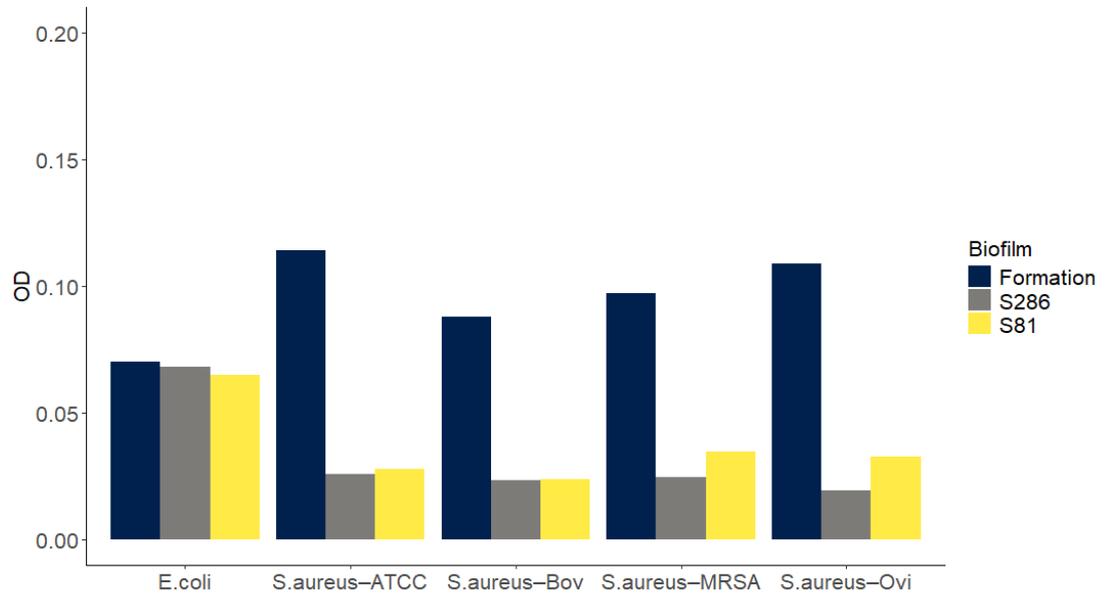


Figura 8 - Formação de biofilme e interação com os sobrenadantes no plasma humano.

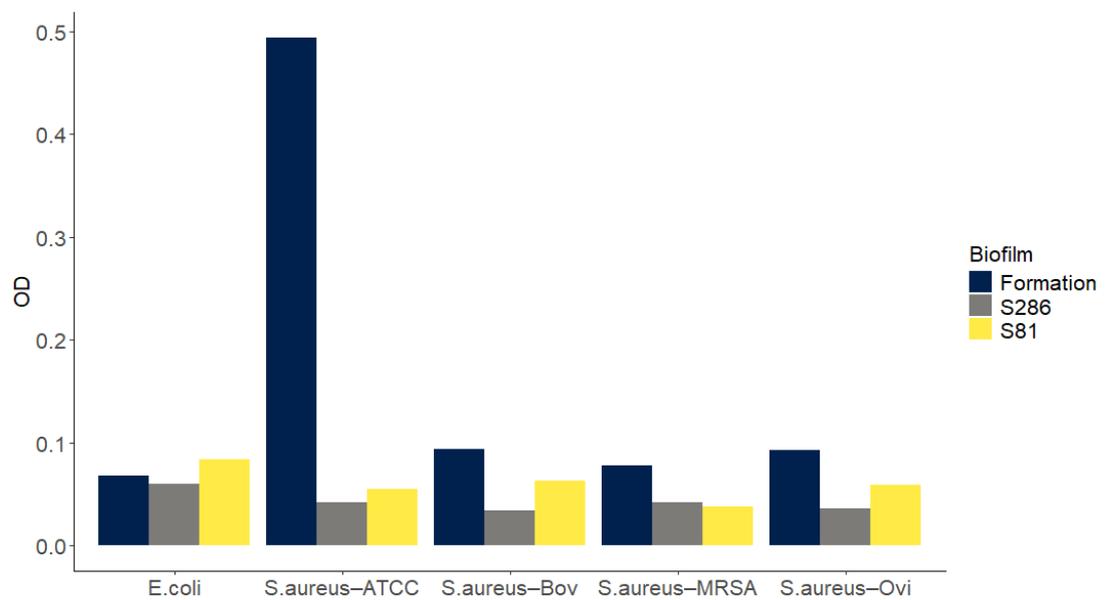


Figura 9 - Formação de biofilme e interação com os sobrenadantes no plasma bovino.

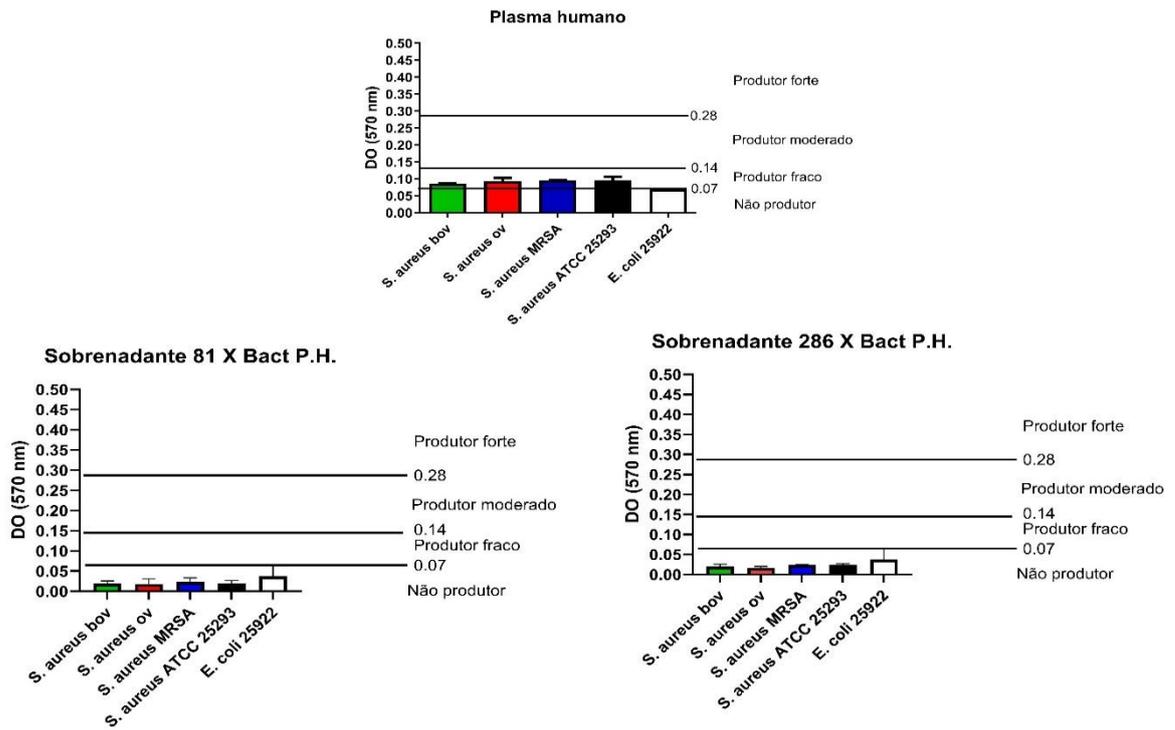


Figura 10 – Análise da formação de biofilme e inibição pelos sobrenadantes no plasma humano com as classificações de produção de biofilme.

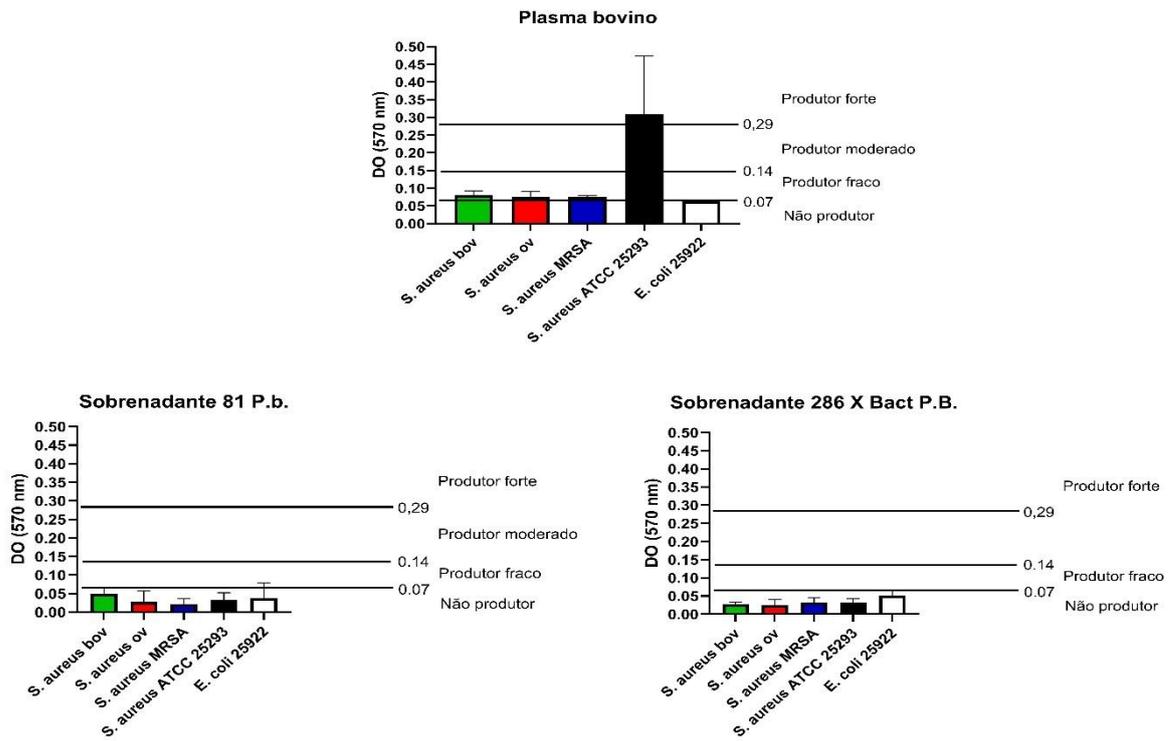


Figura 11 – Análise da formação de biofilme e inibição pelos sobrenadantes no plasma humano com as classificações de produção de biofilme.

7 DISCUSSÃO

Foi possível observar que a concentração inibitória mínima dos sobrenadantes de 50mg/ml é capaz de inibir totalmente as colônias de *S. aureus*, considerando o sobrenadante, em seu estado bruto, sem averiguação e conseqüente correção do pH, assim como não esterilizado por autoclavagem. Estes dados corroboram, de maneira geral, com outros estudos que averiguaram a capacidade inibitória de *L. plantarum*. BOUZAIENE *et al.*, (2024), tiveram como resultado ação antibacteriana, antioxidante, prebiótica e antienzimática de exopolissacarídeos produzidos por *L. plantarum*. MELO *et al.*, (2016) e SANTOS *et al.*, (2016) obtiveram uma resposta inibitória do biofilme e forma vegetativa de *S. aureus*, por lactobacilos extraídos do cacau. PISANO *et al.*, (2022), encontraram resultados promissores referentes a inibição de bactérias patogênicas em queijos por lactobacilos. ZHA *et al.*, (2024), identificou resultados promissores em atividade antifúngica do *L. plantarum*.

Dando seqüência a avaliação inibitória, utilizou-se o sobrenadante das cepas 81 e 286 de *Lactiplantibacillus plantarum*, na concentração de 100 mg/ml de BHI, com pH em torno de 7,3, nos exemplares de *S. aureus*. Como resultado, obtivemos o não sucesso da inibição nessa concentração, sugerindo o aumento da concentração para 200 mg/ml, onde foi possível nessa nova concentração, obter em duplicata, sucesso na inibição.

Assim, considera-se que de forma preliminar, que os isolados avaliados neste estudo de *L. plantarum* produzem substâncias inibitórias semelhantes a bacteriocina, que possuem atividade inibitória, termotolerantes, com ação em *S. aureus* de mastite bovina e ovina, assim como ATCC 25923 e resistentes a meticilina, na concentração de 200 mg/ml. Esta informação pode ser descrita, em suma, como conclusão das etapas da avaliação inibitória na fase vegetativa de *S. aureus* que, o sobrenadante sem correção de pH (pH ácido), consegue inibir na concentração de 50 mg/ml, enquanto que com a devida correção do pH para o fisiológico (7,3) e autoclavado, obteve inibição na concentração de 200 mg/ml nas cepas 81 e 286. Isso em parte, pode ser atribuído pela ausência do efeito acidificante do meio contendo o sobrenadante em relação ao *S. aureus*, já que, como é sabido, o estresse ácido ameaça a atividade e estabilidade de enzimas essenciais bacterianas, além de interferir na respiração por conta da alteração no transporte de elétrons, além de significar possíveis causas de desnaturação proteica. (ZHOU 2020). Ademais, mediante os resultados apresentados, pode-se confirmar que em termos de inibição, a cepa 286 se mostrou mais eficaz do que a 81.

O presente estudo avaliou inicialmente, o desenvolvimento dos *S. aureus*, no plasma humano. Foi possível observar neste meio, um crescimento mais elevado do *S. aureus* bovino,

sendo inovadora essa informação, principalmente por superior ao *S. aureus* ATCC 25923, que é um potencial formador de biofilme Hiltunen et al. (2019). Após essa etapa, foi verificado quais seriam os plasmas aptos a participarem do restante do experimento. Seriam considerados aptos aqueles plasmas que tivessem um grau satisfatório de crescimento de biofilme. Nesse aspecto, o plasma bovino e o humano tiveram um melhor desempenho e regularidade, em detrimento do plasma ovino e equino, diante das distintas bactérias. Uma ressalva se deu por conta do plasma equino que, apesar de se comportar, muitas vezes, até melhor que o bovino, não permaneceu no estudo por não ter exemplares de *S. aureus* de mastite equina no estudo, contudo pelo fato de se ter um crescimento nesta espécie, abre-se um leque de possíveis investigações futuras. A partir deste ponto, foi possível então adicionar a cepa 81 e 286 de *L. plantarum* nestas bactérias presentes nos diferentes plasmas, para avaliar o grau de inibição destes produtos.

Neste cenário foi possível observar um baixo crescimento do biofilme de *E. coli* ATCC 25922, o que é esperado por se tratar de uma produtora de fraca a moderada formadora de biofilme, isso ocorreu tanto no plasma bovino como no humano. O sobrenadante da cepa 81 obteve maior grau de inibição do que o 286 no plasma bovino, enquanto no plasma humano as inibições se encontraram equiparadas. Com relação ao *S. aureus* ATCC 25923, no plasma bovino, houve uma significativa formação de biofilme, o que é esperado e bastante considerável neste exemplar, além de intensa atividade inibitória de ambos sobrenadantes, enquanto no plasma humano, o crescimento foi mais discreto, tendo sua influência ligada aos sobrenadantes diretamente proporcional, com um ligeiro predomínio de inibição da cepa 81. O *S. aureus* bovino, apresentou formação de biofilme pouco maior que o da *E. coli*, assim como o *S. aureus* ovino e SARM que apresentaram características similares nos diferentes plasmas em termos de crescimento de biofilme. No plasma bovino, a cepa 286 apresentou vantagem em relação a 81, no que se refere a inibição do *S. aureus* bovino, enquanto no plasma humano o poder inibitório foi similar nas cepas. Ademais, no plasma humano, ambas cepas tiveram maior grau de inibição no *S. aureus* bovino. O *S. aureus* SARM apresentou maior grau de inibição da cepa 81, no plasma bovino, estando iguais os efeitos das cepas no plasma humano. O *S. aureus* ovino, teve uma ligeira vantagem do 286 no plasma bovino, estando equiparado com o 81 no plasma humano. Todas estas informações obtidas a partir destes ensaios, podem ser entendidas em suma, que de maneira geral, no plasma humano, houve uma tendência a se igualar o efeito inibitório dos tratamentos, enquanto no plasma bovino, houveram discretas predominâncias, ora do exemplar 81, ora do exemplar 286, variando seu efeito de acordo com a bactéria

analisada. Com isso, surge uma questão que poderá ser destrinchada em futuros estudos, com relação aos componentes do plasma, bem como, seus efeitos e potencialidades no sobrenadante do *L. plantarum*.

Estes dados indicam que os sobrenadantes apresentaram significativa ação inibitória no biofilme dos estafilococos, trazendo informações relevantes para a pesquisa, principalmente por se tratar do próprio plasma bovino no estudo, o que não foi avaliado em outros estudos que avaliaram a inibição de biofilmes. Tyagi et al. (2024) e Wicahyo et al. (2024). A influência do plasma bovino nesse caso, se tornou pioneira, uma vez que, na literatura só temos a disposição, pesquisas que avaliem o crescimento e posterior inibição de biofilmes relacionados ao plasma humano. Na FIGURA 10, pode-se observar a formação de biofilme, com posterior comparação com os sobrenadantes. A imagem superior retrata os diferentes estafilococos e *E. coli*, interagindo com o plasma humano somente. Considerando a DO de 570 nanômetros (nm), foi definida uma escala variando de 0,0 a 0,5 nm, onde através destes dados foi possível classificar os microrganismos com relação ao desenvolvimento de biofilme. De maneira geral, todos *S. aureus*, inclusive o ATCC 25923 (controle positivo), foram classificados como fracos produtores de biofilme, enquanto a *E. coli* (controle negativo), foi classificada como não produtora de biofilme. Essa classificação depende de um cálculo prévio que estimou a DO de corte de 0,0711, para ser considerado produtor fraco uma DO de até 0,1421307683, produtor moderado de até 0,2842615366 e produtor forte mais de 0,284 nm. A exposição dos sobrenadantes seguiu os mesmos valores, podendo ser perceptível a mudança de categoria dos estafilococos, sendo reduzidos de fracos produtores para não produtores. Harika et al. (2020).

Dando seguimento nas análises, a FIGURA 11 serve para visualizar a interação das mesmas bactérias mencionadas anteriormente, inclusive com os mesmos controles, contudo inseridas agora no plasma bovino. Seguindo o mesmo cálculo anterior, foram definidos novos parâmetros, que se apresentaram similares, com uma diferença apenas no limite máximo para ser considerado produtor moderado, que variou de 0,28, na análise anterior, para 0,29 na atual. A partir disso, o cenário da maioria das bactérias foi parecido com a do plasma humano, porém com um acentuado crescimento da ATCC 25923, que um crescimento considerado de forte produção. Nessa perspectiva, com adição dos sobrenadantes, todas bactérias foram rebaixadas para não produtoras, o que se tornou especial neste plasma, pela considerável inibição do controle positivo, que de forte produtor se tornou não produtor de biofilme.

Por conta do seu poder de dispersão, similar ao que acontece em infecções *in vivo*, o plasma é um elemento determinante neste experimento, por ser alvo do *S. aureus* para

crescimento e formação da matriz que compõe o biofilme. Essa informação é importante pelo fato de que, de maneira *in vitro*, simular o plasma mais próximo de condições *in vivo*, se tratando de bovinos, bem como um agente patogênico potencial, especialmente em casos de mastite bovina, podem elucidar um possível cenário prático, servindo para validar o uso dos sobrenadantes como substâncias inibidoras de *S. aureus* causadores de mastite.

8 CONCLUSÃO

As cepas 81 e 286 de *L. plantarum*, apresentaram efeito inibitório em relação a forma vegetativa e biofilme de *S. aureus* oriundos de mastite bovina e ovina, SARM e ATCC 25293. É válido ressaltar que para análise dos biofilmes, foi utilizado plasma humano e bovino, encontrando resultados similares em ambos, porém com uma resposta mais visível da inibição do ATCC 25293 por conta do intenso crescimento no plasma bovino. Adicionalmente, pode-se inferir que se obteve com a concentração de 200 mg/ml, um grau de inibição *in vitro* da forma vegetativa dos *S. aureus* estudados, quando expostos as cepas 81 e 286 de *L. plantarum* após a correção para o pH fisiológico e esterilização, permitindo assim, embasar futuros estudos que possam avaliar o seu efeito *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- AHMAD-MANSOUR, N.; LOUBET, P.; POUGET, C.; et al. Staphylococcus aureus toxins: An update on their pathogenic properties and potential treatments. **Toxins**, v. 13, n. 10, p. 1–22, 2021.
- ARCHER, N. K.; MAZAITIS, M. J.; COSTERTON, J. W.; et al. Staphylococcus aureus biofilms Properties, regulation and roles in human disease. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 445–459, 2011.
- BOUZAIENE, T.; MOHAMEDHEN VALL, M.; ZIADI, M.; et al. Exopolysaccharides from Lactiplantibacillus plantarum C7 Exhibited Antibacterial, Antioxidant, Anti-Enzymatic, and Prebiotic Activities. **Fermentation**, v. 10, n. 7, 2024.
- BRITO, M. A.; BRITO, J. R.; ARCURI, E. F.; et al. Mastite - Portal Embrapa. , 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/gado_de_leite/pre-producao/qualidade-e-seguranca/qualidade/mastite>. .
- CAI, Y.; PANG, H.; KITAHARA, M.; OHKUMA, M. Lactobacillus nasuensis sp. nov., A Lactic acid bacterium isolated from silage, and emended description of the genus Lactobacillus. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1140–1144, 2012.
- CHOOVET, N.; JIRAKANJANASIT, T.; SUBPHON, P.; et al. Antimicrobial activity, genome analysis, and gene cluster encoding the plantaricin production of Lactiplantibacillus plantarum ZBK1-5. **ScienceAsia**, v. 50, n. 2, p. 1–12, 2024.
- COELHO, K. O.; BRANDÃO, L. M.; BUENO, C. P.; MELO, C. S.; DA SILVEIRA NETO, O. J. Níveis de células somáticas sobre o perfil físico-químico do leite em pó integral. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 17, n. 4, p. 534–539, 2016.
- CONTENTE, D.; DÍAZ-FORMOSO, L.; FEITO, J.; et al. Genomic and Functional Evaluation of Two Lactocaseibacillus paracasei and Two Lactiplantibacillus plantarum Strains, Isolated from a Rearing Tank of Rotifers (Brachionus plicatilis), as Probiotics for Aquaculture. **Genes**, v. 15, n. 1, 2024.
- DUTRA, M. M.; ARAÚJO, G. H. M.; SILVA, R. R.; SOUSA, A.; CAMARGOS. Mastite. **Colloquium Agrariae**, v. 13, n. Especial 2, p. 315–321, 2017.
- EBERL, H. J.; KHASSEHKHAN, H.; DEMARET, L. A mixed-culture model of a probiotic biofilm control system. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, v. 11, n. 2, p. 99–118, 2010.
- EMBRAPA. Propagação e Plantio do Umbuzeiro (Spondias Tuberosa Arr. Cam) para a Agricultura Familiar do Semiárido Baiano. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, p. 23, 2015.
- FONSECA, H. C.; DE SOUSA MELO, D.; RAMOS, C. L.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Probiotic Properties of Lactobacilli and Their Ability to Inhibit the Adhesion of Enteropathogenic Bacteria to Caco-2 and HT-29 Cells. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 13, n. 1, p. 102–112, 2021. Probiotics and Antimicrobial Proteins.

GÖKMEN, G. G.; SARIYILDIZ, S.; CHOLAKOV, R.; et al. A novel *Lactiplantibacillus plantarum* strain: probiotic properties and optimization of the growth conditions by response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 1–18, 2024. Springer Netherlands. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-023-03862-3>>. .

GROSSMAN, A. B.; BURGIN, D.; RICE, K. C. *Staphylococcus aureus* Methods and Protocols. . p.69–78, 2021. Disponível em: <<http://www.springer.com/series/7651>>. .
HARIKA, K.; SHENOY, V.; NARASIMHASWAMY, N.; CHAWLA, K. Detection of biofilm production and its impact on antibiotic resistance profile of bacterial isolates from chronic wound infections. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 129–134, 2020.

HERBEL, S. R.; VAHJEN, W.; WIELER, L. H.; GUENTHER, S. Timely approaches to identify probiotic species of the genus *Lactobacillus*. **Gut Pathogens**, v. 5, n. 1, p. 1, 2013. Gut Pathogens. Disponível em: <Gut Pathogens>. .

HILTUNEN, A. K.; SAVIJOKI, K.; NYMAN, T. A.; et al. Structural and functional dynamics of *staphylococcus aureus* biofilms and biofilm matrix proteins on different clinical materials. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, 2019.

HUANG, F. C.; LU, Y. T.; LIAO, Y. H. Beneficial effect of probiotics on *Pseudomonas aeruginosa*–infected intestinal epithelial cells through inflammatory IL-8 and antimicrobial peptide human beta-defensin-2 modulation. **Innate Immunity**, v. 26, n. 7, p. 592–600, 2020. IBGE. Produção de Leite no Brasil | IBGE. , 2022. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/leite/br>>. .

ISABELLA, C. S.; RODRÍGUEZ, L.; ARTURO, D. bacteriocinas en el genoma de *Lactobacillus plantarum* . Bioinformatic analysis of the presence of bacteriocins in the *Lactobacillus plantarum* genome. , v. 9, 2020.

JACKSON, D. A. **Biostatistical Analysis . Jerrold H. Zar . 2000.**

KAREEM, A.; RAZAVI, R.; HADI, S. Plantaricin bacteriocins: As safe alternative antimicrobial peptides in food preservation—A review. **Journal of Food Safety**, v. 40, n. 1, p. 1–12, 2020.

LEE, A. H.; NEILSON, A. P.; O’KEEFE, S. F.; et al. A laboratory-scale model cocoa fermentation using dried, unfermented beans and artificial pulp can simulate the microbial and chemical changes of on-farm cocoa fermentation. **European Food Research and Technology**, v. 245, n. 2, p. 511–519, 2019. Springer Berlin Heidelberg. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00217-018-3171-8>>. .

LI, Y.; YU, S.; WENG, P.; WU, Z.; LIU, Y. Purification and antimicrobial mechanism of a novel bacteriocin produced by *Lactiplantibacillus plantarum* FB-2. **Lwt**, v. 185, n. July, 2023.
MELO, P. DE C.; MENEZES FERREIRA, L.; NADER FILHO, A.; et al. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 119–124, 2013.

MELO, T. A.; DOS SANTOS, T. F.; DE ALMEIDA, M. E.; et al. Inhibition of

Staphylococcus aureus biofilm by Lactobacillus isolated from fine cocoa. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2016. BMC Microbiology. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12866-016-0871-8>>. .

MELO, T. A.; DOS SANTOS, T. F.; PEREIRA, L. R.; et al. Functional Profile Evaluation of Lactobacillus fermentum TCUESC01: A New Potential Probiotic Strain Isolated during Cocoa Fermentation. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.

MENEZES, A. G. T.; RAMOS, C. L.; CENZI, G.; et al. Probiotic Potential, Antioxidant Activity, and Phytase Production of Indigenous Yeasts Isolated from Indigenous Fermented Foods. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 1, p. 280–288, 2020. Probiotics and Antimicrobial Proteins.

NADER-MACÍAS, M. E. F.; OTERO, M. C.; ESPECHE, M. C.; MALDONADO, N. C. Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 11, p. 1387–1395, 2008.

NOGUEIRA, R. F.; ROITMAN, I.; CARVALHO, F. A.; SOLDATI, G. T.; JACOBSON, T. K. B. Challenges for agroecological and organic management of Cabruca cocoa agroecosystems in three rural settlements in south Bahia, Brazil: perceptions from local actors. **Agroforestry Systems**, v. 93, n. 5, p. 1961–1972, 2019.

NORDSTRÖM, E. A.; TEIXEIRA, C.; MONTELIUS, C.; JEPSSON, B.; LARSSON, N. Lactiplantibacillus plantarum 299v (LP299V®): three decades of research. , v. 12, n. 5, p. 441–465, 2021.

PÁL, K.; SZÉN, O.; KISS, A.; NAÁR, Z. Comparison and evaluation of molecular methods used for identification and discrimination of lactic acid bacteria. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 9, p. 1931–1936, 2012.

PEREIRA, G. V. DE M.; COELHO, B. DE O.; JÚNIOR, A. I. M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SOCCOLY, C. R. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 8, p. 2060–2076, 2018. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.09.003>>. .

PISANO, M. B.; FADDA, M. E.; VIALE, S.; et al. Inhibitory Effect of Lactiplantibacillus plantarum and Lactococcus lactis Autochthonous Strains against Listeria monocytogenes in a Laboratory Cheese Model. **Foods**, v. 11, n. 5, 2022.

PRETE, R.; GARCIA-GONZALEZ, N.; DI MATTIA, C. D.; CORSETTI, A.; BATTISTA, N. Food-borne Lactiplantibacillus plantarum protect normal intestinal cells against inflammation by modulating reactive oxygen species and IL-23/IL-17 axis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020. Nature Publishing Group UK. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-73201-1>>. .

ROUHI, A.; FALAH, F.; AZGHANDI, M.; et al. Investigating the effect of Lactiplantibacillus plantarum TW57-4 in preventing biofilm formation and expression of virulence genes in Listeria monocytogenes ATCC 19115. **Lwt**, v. 191, n. November 2023, p. 115669, 2024. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115669>>. .

SAITO, V. S. T.; DOS SANTOS, T. F.; VINDEROLA, C. G.; et al. Viability and resistance of lactobacilli isolated from cocoa fermentation to simulated gastrointestinal digestive steps in soy yogurt. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 2, 2014.

SANTOS, T. T.; ORNELLAS, R. M. S.; ARCUCIO, L. B.; et al. Characterization of lactobacilli strains derived from cocoa fermentation in the south of Bahia for the development of probiotic cultures. **Lwt**, v. 73, p. 259–266, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.003>>. .

SHI, C.; CHEN, Y.; LI, C.; et al. Potential Application of *Lactiplantibacillus plantarum* in Food Bio-preservation—A Comprehensive Review with a Focus on the Antibacterial and Anti-Virulence Effects on Foodborne Pathogens. **Food Reviews International**, v. 00, n. 00, p. 1–27, 2024. Taylor & Francis. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/87559129.2024.2317283>>. .

SOCCOL, C. R.; PRADO, M. R. M.; GARCIA, L. M. B.; et al. Current Developments in Probiotics. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 07, n. 01, p. 11–20, 2015. SYBESMA, W.; KORT, R.; LEE, Y. K. Locally sourced probiotics, the next opportunity for developing countries? **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 197–200, 2015. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.01.002>>. .

TYAGI, A.; KUMAR, V.; JOSHI, N.; DHINGRA, H. K. Exploring the Antibacterial Potential of Bile Salts: Inhibition of Biofilm Formation and Cell Growth in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Microbiology Research**, v. 15, n. 3, p. 1269–1279, 2024.

VOELK, V.; GRABER, H. U.; VAN DEN BORNE, B. H. P.; et al. A longitudinal study investigating the prevalence of *Staphylococcus aureus* genotype B in seasonally communal dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 7, p. 4184–4192, 2014. WALCHER, U. Mastite Bovina 1.Pdf. , p. 1–22, 2011. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/72423/000851326.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. .

WICAHYO, S. M.; WARDANI, T. S.; ERIKANIA, S. Comparison of Antibiofilm Activities of Green Coffee Beans (*Coffea Canephora* P.) and Roasted Robusta Coffee (*Coffea Canephora* L.) Against *Staphylococcus* **Global Health Science Group**, v. 5, n. 1, p. 33–44, 2024. Disponível em: <<http://jurnal.globalhealthsciencegroup.com/index.php/PICNHS/article/view/2794>>. .

WÖRMANN, M. E.; PECH, J.; REICH, F.; et al. Growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* during raw milk soft cheese-production and the inhibitory effect of starter cultures. **Food Microbiology**, v. 119, n. November 2023, 2024.

YADAV, M. K.; BALDIA, A.; TIWARI, S. K. Plantaricin LD1 Inhibits the Growth and Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* in Milk . **Journal of Exploratory Research in Pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2024. Disponível em: <<https://www.doi.org/10.14218/JERP.2023.00011>>. .

YU, Q.; XU, C.; WANG, M.; et al. The preventive and therapeutic effects of probiotics on

mastitis: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 17, n. 9 September, p. 1–13, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0274467>>. .

ZHA, M.; LI, J.; ZHU, S.; et al. Selection and analysis of the characteristics of *Lactiplantibacillus plantarum* with antifungal activity. **Lwt**, v. 202, n. May, p. 116277, 2024. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116277>>. .

ZHANG, Y.; USMAN, S.; LI, Q.; et al. Effects of antioxidant-rich *Lactiplantibacillus plantarum* inoculated alfalfa silage on rumen fermentation, antioxidant and immunity status, and mammary gland gene expression in dairy goats. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 1–14, 2024. BioMed Central. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40104-023-00977-3>>. .