



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO

Avaliação da capacidade de formação de biofilmes e de invasão de células intestinais em cultura tridimensional por *Listeria monocytogenes* em presença de *Lactobacillus sakei* 1 e inulina

Hevelin Regiane Augusto da Silva

**Ribeirão Preto
2021**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da capacidade de formação de biofilmes e de invasão de células intestinais em cultura tridimensional por *Listeria monocytogenes* em presença de *Lactobacillus sakei* 1 e inulina

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia.

Orientada: Hevelin Regiane Augusto da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em 31/01/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Silva, Hevelin Regiane Augusto da

Avaliação da capacidade de formação de biofilmes e de invasão de células intestinais em cultura tridimensional por *Listeria monocytogenes* em presença de *Lactobacillus sakei* 1 e inulina.

Ribeirão Preto, 2021.

75 p.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia.

Orientador: Elaine Cristina Pereira De Martinis.

1. Virulência.
2. Probiótico.
3. Prebiótico.
4. Cultura Tridimensional.
5. Biorreator STLV.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Hevelin Regiane Augusto da Silva.

Título do trabalho: Avaliação da capacidade de formação de biofilme e de invasão de células intestinais em cultura tridimensional por *Listeria monocytogenes* em presença de *Lactobacillus sakei* 1 e inulina.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia.

Orientador(a): Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho: ao meu Deus de amor o autor da minha vida, ao meu marido Ton Costa por todo amor e apoio, e aos meus pais Rosangela e Ivan por todo amor e carinho e por sempre estarem presentes para me ajudar durante a jornada da vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me iluminar e guiar meus caminhos com seu amor incondicional.

À minha orientadora Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis pela confiança, paciência, ensinamentos, e conselhos preciosos, um exemplo de profissional.

Ao meu marido Ton Costa pelo seu carinho, amor, paciência, dedicação à nossa família, por toda ajuda durante estes anos, sempre me motivando e acreditando em meu potencial e nos meus sonhos.

Aos meus pais Rosangela e Ivan por todo amor, e carinho e dedicação a nossa família, sempre dispostos a me ajudar, nunca mediram esforços para que eu conseguisse subir os degraus da educação e da vida.

Às minhas irmãs Helen e Daiane e aos meus cunhados Cristiano e Bruno por todo carinho, apoio e companheirismo.

Às minhas sobrinhas Sara, Rebeca e Sofia que me trazem alegria e esperança.

A toda minha família por todo carinho e apoio e em especial aos meus avós Maria e Messias por suas orações, ao meu avô Luiz por seus conselhos, e aos meus tios Gilvana, Irenilton, José Luiz e Vânia por todo apoio.

A todos meus amigos que estiveram presentes durante esta caminhada.

À Profa. Dra. Lizziane Kretli Winkelströter Eller por acreditar em mim e me proporcionar a minha primeira experiência com Microbiologia de Alimentos, além de se tornar uma amiga sempre me ensinando e me aconselhando da melhor maneira.

À Dra. Marita Gimenez Pereira por toda ajuda, paciência e conselhos e principalmente por todo ensinamento durante estes anos de trabalho.

Aos meus colegas de laboratório Otávio, Marita, Laís, Sofia e Humberto pela convivência agradável e meu agradecimento especial aos técnicos do laboratório Jefferson Codognotto e Marília Ishizawa por me ajudarem, me apoiarem, me aconselharem, vocês são pessoas maravilhosas.

À técnica da FCFRP-USP Livia Marangoni e a Dra. Patrícia Alves de Castro Silva por sempre serem prestativas e atenciosas.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, seus funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e a autora agradece especialmente pela concessão da bolsa de mestrado (Processo nº 88887.320788/2019-00).

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Os sonhos não determinam o lugar onde iremos chegar, mas produzem a força necessária para tirar-nos do lugar em que estamos”

Augusto Cury

RESUMO

SILVA, Hevelin Regiane Augusto da. **Avaliação da capacidade de formação de biofilmes e de invasão de células intestinais em cultura tridimensional por *Listeria monocytogenes* em presença de *Lactobacillus sakei* 1 e inulina.** 2021. 93 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Listeria monocytogenes é uma bactéria transmitida principalmente via alimentos, o controle de *L. monocytogenes* é difícil, pois esta bactéria apresenta vários fatores de virulência, como formação de biofilmes, adesão e invasão celular. Um avanço em estudos para a verificação dos fatores de virulência em bactérias patogênicas é através do cultivo de células tridimensional (3D) por biorreator - the “Slow Turning Lateral Device” (STLV). O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antilisteriano de combinações de *L. sakei* 1, uma bactéria láctica (BAL) e de seu sobrenadante livre de células (SLC), bem como do prebiótico inulina, a fim de antagonizar a adesão e invasão de *L. monocytogenes* em células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) obtidas através de biorreator STLV, bem como inibir a formação de biofilmes em superfície abiótica. O ensaio de biofilme foi realizado em microplacas através da coloração com cristal violeta 0,1% (p/v), as células Caco-2 obtidas através do biorreator STLV, foram utilizadas nos ensaios de adesão e invasão, e para avaliar os possíveis danos celulares do SLC, BAL e prebiótico através dos ensaios de avaliação da atividade metabólica com Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólio (MTT) e do ensaio de citotoxicidade através de 0,4% de azul de tripano. Os resultados demonstraram que a formação de biofilme por *L. monocytogenes* foi inibida pelo uso de SLC contendo bacteriocina, e inulina, e a condição que apresentou a menor formação de biofilme foi apresentada com a combinação sinérgica destes compostos apresentando uma absorbância de $0,124 \pm 0,023$. A adesão/invasão de *L. monocytogenes* foi significativamente menor na presença da bacteriocina pelo uso do SLC de *L. sakei* 1, e em co-cultura com *L. sakei* 1, sendo que houve maior antagonismo quando estes compostos foram adicionados em combinação com inulina ($p < 0,05$), sendo que a adesão de *L. monocytogenes* apresentou uma porcentagem de $41,56\% \pm 8,4$ e ao utilizar a combinação de co-cultura com a inulina a adesão de *L. monocytogenes* às células foi de $17,46\% \pm 1,31$ e no ensaio de invasão nestas mesmas condições $47,55\% \pm 6,06$ e $20,21\% \pm 3,41$ respectivamente. Também ao ser analisado os danos celulares destes compostos, todas as condições apresentaram um número de células viáveis e metabolicamente ativas superiores a 45%, sendo que quando adicionado o SLC de *L. sakei* 1 com prebiótico inulina os danos celulares apresentados eram menores e sempre superiores a 61%. Neste trabalho ficou evidenciado como o uso da inulina e do SLC de *L. sakei* 1, e da BAL *L. sakei* 1 apresenta capacidade de modular a formação de biofilmes, adesão, invasão celular da bactéria *L. monocytogenes*, e como estes compostos apresentam potencial simbiótico por apresentar mecanismos sinérgicos.

Palavras-chave: Virulência. Probiótico. Prebiótico. Cultura tridimensional. Biorreator STLV.

ABSTRACT

SILVA, Hevelin Regiane Augusto da. **Evaluation of the ability to form biofilms and invade intestinal cells in three-dimensional culture by *Listeria monocytogenes* in the presence of *Lactobacillus sakei* 1 and inulin.** 2021.93 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Listeria monocytogenes is a bacterium transmitted mainly via food, the control of *L. monocytogenes* is difficult, as this bacterium has several virulence factors, such as biofilm formation, cell adhesion and invasion. An advance in studies for the verification of virulence factors in pathogenic bacteria is through the cultivation of three-dimensional (3D) cells, by bioreactor -the “Slow Turning Lateral Device” (STLV). The objective of this work was to evaluate the antilisterian potential of combinations of *L. sakei* 1 a Lactic acid bacterium (LAB) and its cell-free supernatant (CFS), as well as the prebiotic inulin, in order to antagonize the adhesion and invasion of *L. monocytogenes* in human colon adenocarcinoma cells (Caco-2) obtained thorough STLV bioreactor, as well as inhibit the formation of biofilms on abiotic surface. The biofilm assay was performed in microplates by staining with 0.1% crystal violet (w/v) the Caco-2 cells obtained through the STLV bioreactor, were used in the adhesion and invasion assays, and to evaluate the possible damages cells of CFS, LAB and prebiotic through the assay of evaluation of the metabolic activity with Thiazolyl Tetrazolium Blue Bromide (MTT) and the cytotoxicity assay through 0.4% of trypan blue. The results showed that biofilm formation by *L. monocytogenes* was inhibited by the use of CFS containing bacteriocin, and inulin, and the condition that presented the lowest biofilm formation was presented with the synergistic combination of these compounds with an absorbance of 0.124 ± 0.023 , *L. monocytogenes* adhesion/invasion was significantly lower in the presence of bacteriocin by using of CFS from *L. sakei* 1, and in co-culture with *L. sakei* 1, with greater antagonism when these compounds were added in combination with inulin ($P < 0.05$), and the adhesion of *L. monocytogenes* presented a percentage of $41.56\% \pm 8.4$ and when using combination of co-culture with inulin, the adhesion of *L. monocytogenes* to the cells was $17.46\% \pm 1.31$ and in the invasion assay under the same conditions $47.55\% \pm 6.06$ and $20.21\% \pm 3.41$ respectively. Also when analyzing the cellular damage of these compounds, all showed a number of viable cells and metabolically active greater than 45% and when CFS and *L. sakei* 1 with prebiotic inulin was added, the cellular damage presented was always lower than 61%. In this work, it was evidenced how the use of inulin and CFS from *L. sakei* 1 and LAB *L. sakei* 1 have the ability to modulate biofilm formation, adhesion, cell invasion of *L. monocytogenes*, and how these compounds have potential symbiotic by presenting synergistic mechanisms.

Keywords: Virulence. Probiotic. Prebiotic. Three-dimensional culture. STLV bioreactor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do processo patológico da infecção por <i>L. monocytogenes</i>	3
Figura 2. Representação esquemática da formação de biofilme bacteriano.	5
Figura 3. Representação esquemática da formação de cultura celular 3D utilizando biorreatores de microgravidade utilizando esferoides	9
Figura 4. Representação Gráfica dos ensaios realizados no presente trabalho. SLC = Sobrenadante Livre de Células de <i>Lactobacillus sakei</i> 1 (para detalhes, consultar o item 4.3)	13
Figura 5. Representação gráfica dos ensaios de diluição crítica e concentração inibitória mínima (MIC) realizados no presente trabalho	25
Figura 6. Quantificação da capacidade de formação de biofilme por <i>L. monocytogenes</i> em presença de SLC de <i>L. sakei</i> 1, do prebiótico inulina e de suas combinações, por meio de ensaio espectrofotométrico (595nm)	26
Figura 7. Microfotografia obtidas com Microscopia de Varredura a Laser Confocal microscopia confocal a laser, de culturas de células Caco-2 crescidas em e biorreator STLV Synthecon [®] , EUA e coradas com reagentes fluorescentes em microscópio Leica TCS SP8 (Leica, EUA), com aumento de 63x	27
Figura 8. Microfotografias obtidas com Microscopia de Varredura a Laser Confocal de culturas celulares Caco-2 crescidas em e biorreator STLV Synthecon [®] , EUA em microscópio Leica TCS SP8 (Leica, EUA), com aumento de 20x em planos diferentes	28
Figura 9. Porcentagem de adesão de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 em células Caco-2 3D: na presença ou ausência de inulina; SLC de <i>L. sakei</i> 1; inulina e SLC de <i>L. sakei</i> 1; Co-cultura com <i>L. sakei</i> 1; co-cultura de <i>L. sakei</i> 1 com inulina. Está mostrado também o resultado de adesão para a BAL <i>L. sakei</i> 1	29
Figura 10. Perfil de invasão de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115 em células Caco-2 3D, e quando cultivada com inulina, SLC de <i>L. sakei</i> 1, inulina e SLC de <i>L. sakei</i> 1, Co-cultura de <i>L. sakei</i> 1 (7 log UFC/mL) e com Co-cultura de <i>L. sakei</i> 1 com inulina e perfil de invasão de <i>L. sakei</i> 1	30
Figura 11. Perfil de atividade metabólica em células Caco-2 em cultivo tridimensional, medida com base no teste de MTT, na presença de diferentes concentrações de SLC de <i>L. sakei</i> 1 0,5x (50 UA/mL), 1x (100 UA/mL), 2x (200 UA/mL), 10x (1000 UA/mL), na em combinação ou não com o prebiótico inulina, e em co-inoculação com <i>L. sakei</i> 1 (7 log UFC/mL) e/ou inulina	32
Figura 12. Quantificação de células Caco-2 3D viáveis, na presença ou ausência do prebiótico inulina 1% (p/v), e de diferentes concentrações de SLC de <i>L. sakei</i> 1 0,5x (50 UA/mL), 1x (100 UA/mL), 2x (200 UA/mL), 10x (1000 UA/mL). Também foi avaliado perfil de citotoxicidade na presença da bactéria <i>L. sakei</i> 1 (7 log UFC/mL) e/ou com inulina	3

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições utilizadas nos ensaios de adesão e invasão celular	19
Tabela 2. Condições utilizadas nos ensaios de atividade metabólica celular e citotoxicidade	22
Tabela 3. Densidades óticas (DO) em 595nm do ensaio de avaliação da formação de biofilmes por <i>Listeria monocytogenes</i> (L.m) ATCC 19115, com adição de inulina, Sobrenadante Livre de Células (SLC) de <i>Lactobacillus sakei</i> 1 e combinações	71
Tabela 4. Porcentagens de adesão em células Caco-2 3D, do isolado de <i>L. monocytogenes</i> (L.m) ATCC 19115 na presença e ausência do prebiótico inulina (1% p/v) e de sobrenadante livre de células (SLC) de <i>Lactobacillus. sakei</i> 1 (<i>L. sakei</i> 1) e Co-cultura de <i>L. sakei</i> 1 estes também combinados com prebiótico inulina, e o perfil de adesão de <i>L. sakei</i> 1	72
Tabela 5. Porcentagens de invasão em células Caco-2 3D, do isolado de <i>L. monocytogenes</i> (L.m) ATCC 19115 na presença e ausência do prebiótico inulina (1% p/v) e de sobrenadante livre de células (SLC) de <i>Lactobacillus. sakei</i> 1 (<i>L. sakei</i> 1) e Co-cultura de <i>L. sakei</i> 1 estes também combinados com prebiótico inulina, e o perfil de invasão de <i>L. sakei</i> 1	73
Tabela 6. Porcentagens de atividade metabólica de células Caco-2 3D, na presença e ausência de 0,5x (50 UA/mL) de sobrenadante livre de células de <i>Lactobacillus sakei</i> 1 (SLC), 1x (100 UA/mL) de SLC, 2x (200 UA/mL) de SLC e 10x (1000 UA/mL) de SLC estes também combinados com prebiótico inulina (1% p/v) também na presença de <i>L. sakei</i> 1 e <i>L. sakei</i> 1 com prebiótico inulina, e apenas na presença de inulina (1% p/v)	74
Tabela 7. Porcentagens de células viáveis de células Caco-2 3D, na presença e ausência de 0,5x (50 UA/mL) de sobrenadante livre de células de <i>Lactobacillus sakei</i> 1 (SLC), 1x (100 UA/mL) de SLC, 2x (200 UA/mL) de SLC e 10x (1000 UA/mL) de SLC estes também combinados com prebiótico inulina (1% p/v) também na presença de <i>L. sakei</i> 1 e <i>L. sakei</i> 1 com prebiótico inulina, e apenas na presença de inulina (1% p/v).....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC: American Type Culture Collection

BAL: Bactérias Láticas

BHI: Caldo Infusão Cérebro Coração

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil

CO₂: Gás Carbônico

DAPI: 4,6-diamino-2-fenilindol

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidade ótica

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês "Ethylenediamine tetracetic acid"

EUA: Estados Unidos da América

FCFRP-USP: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo

IC₅₀: concentração inibitória média

LntA: Listeria nuclear proteína alvo A

LLO: Listeriolisina O

MET: Receptor do fator de crescimento de hepatócitos

MIC: Concentração inibitória mínima

MOI: Multiplicidade de infecção

MRS: Man Rogosa Sharpe

MTT: Brometo Tiazolil Azul de Tetrazólio

NaCl: Cloreto de sódio

NaOH: Hidróxido de sódio

PBS: Solução salina fosfatada tamponada, do inglês "Phosphate buffered saline"

PlcA: Fosfolipase A

PlcB: Fosfolipase B

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

RWV: Rotating Wall Vessel

SIRT2: Sirtuínadesacetilase 2

SLC: Sobrenadante Livre de Células

STLV: Slow Turning Lateral Device

UEA-FITC: Lectina de *Ulex europaeus* marcada com isotiocianato de fluoresceína

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

UK: Reino Unido

LISTA DE SÍMBOLOS

cm: Centímetros

3D: Tridimensional

2D: Monocamada

% (p/v): Porcentagem peso por volume

%: Porcentagem

nm: Nanômetros

X: Multiplicação

UFC/mL: Unidade formadora de colônia por mililitro

UA/mL: Unidade arbitrárias por mililitro

g: Grama

mL: Mililitros

°C: Graus Celsius

pH: Potencial Hidrogeniônico

kDA: Kilodaltons

μm: micrometros

g: Gravidade

M: Molar

mM: Milimolar

μl: Microlitro

h: Hora

min: Minutos

% (v/v): Porcentagem volume por volume

μg/mL: Microgramas por mililitros

mg/mL: Miligrama por mililitros

g/kg: Grama por kilo

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
LISTA DE SÍMBOLOS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.2 Patogenicidade	2
1.3 Biofilmes	4
1.4 <i>Lactobacillus sakei</i>	6
1.5 Prebióticos	7
1.6 Cultivo tridimensional de células eucarióticas	8
2. JUSTIFICATIVA	10
3. OBJETIVOS	12
3.1 Objetivo Geral	12
3.2 Objetivos Específicos	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1 Culturas bacterianas	13
4.2 Preparação do prebiótico	13
4.3 Preparação da bacteriocina semi-purificada	14
4.4 Avaliação da formação de biofilmes	15
4.5 Cultura tridimensional de células Caco-2	16
4.6 Microscopia confocal de células Caco-2 3D	17
4.7 Ensaio de adesão	18
4.8 Ensaio de invasão	20
4.9 Ensaio de atividade metabólica celular	21
4.9.1 Preparo do concentrado de SLC	21
4.9.2 Condições utilizadas no ensaio de atividade metabólica celular	21
4.10 Ensaio de citotoxicidade	23
4.11 Análises de dados	24
5. RESULTADOS	25
5.1 Ensaio de diluição crítica	25

5.2	Avaliação da formação de biofilmes	26
5.3	Microscopia confocal de células Caco-2 3D	26
5.4	Ensaio de adesão	28
5.5	Ensaio de invasão	29
5.6	Avaliação da atividade metabólica celular (viabilidade)	30
5.7	Avaliação de citotoxicidade	32
6.	DISCUSSÃO	34
7.	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	51
	APÊNDICE A - DENSIDADES ÓTICAS DO ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM MICROPLACAS PELO ENSAIO DO CRISTAL VIOLETA (ITEM 4.4)	71
	APÊNDICE B-RESULTADOS DO ENSAIO DE ADESÃO	72
	APÊNDICE C-RESULTADOS DO ENSAIO DE INVASÃO	73
	APÊNDICE D-RESULTADOS DO ENSAIO DE AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE METABÓLICA	74
	APÊNDICE E-RESULTADOS DO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CELULAR	75

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* apresenta 17 espécies, sendo que a espécie *Listeria monocytogenes* é patogênica para humanos e *Listeria ivanovii* patogênica para ruminantes, todas *Listeria* spp. são anaeróbias facultativas, Gram-positivas, e apresentam forma de bastonetes (RADOSHEVICH; COSSART, 2018). *L. monocytogenes* está amplamente distribuída no ambiente e também pode contaminar ração animal e produtos alimentares para consumo humano.

Os alimentos constituem a principal via de infecções humanas por *L. monocytogenes*, que são chamadas de listeriose (DUARTE *et al.*, 2019). *L. monocytogenes* é classificada em 13 sorotipos, com base em seus antígenos somáticos (O) e flagelares (H), mas, cerca de 90% dos casos de listeriose humana são causados por apenas três sorotipos: 1/2a, 1/2b e 4b (CHEN *et al.*, 2018; MCLAUCHLIN, 1990). Em indivíduos saudáveis, a infecção por *L. monocytogenes* causa uma gastroenterite leve ou pode ser até assintomática. Contudo, em grupos vulneráveis como mulheres grávidas, fetos, idosos e indivíduos imunocomprometidos, a taxa de letalidade pode chegar a 30% (FARBER; PETERKIN, 1991; OOI; LORBER, 2005; SCHUCHAT *et al.*, 1992; SIEGMAN-IGRA *et al.*, 2002). As principais formas de manifestação da listeriose em indivíduos vulneráveis são bacteremias, infecção do sistema nervoso central (meningite), além de infecções osteoarticulares e vasculares (TOURDJMAN; LAURENT; LECLERCQ, 2014).

L. monocytogenes é uma bactéria frequentemente encontrada no meio ambiente, e isso explica em parte, porque a ingestão de alimentos é a principal via de transmissão da listeriose humana (HAUBERT *et al.*, 2016). De acordo com dados de 2016 da FoodNet dos Estados Unidos (EUA), *L. monocytogenes* apresentou a menor incidência dentre as infecções bacterianas transmitidas por alimentos (0,26/100.000), mas, esta bactéria foi responsável pelas maiores taxas de hospitalização (97%) e óbitos (13,4%) (MARDER *et al.*, 2018). Atualmente a incidência de listeriose é estimada em 3-6 casos por 1 milhão da população mundial por ano (FAN *et al.*, 2019).

No Canadá, estima-se a ocorrência de 200 casos por ano e, em 2008, em decorrência de um grande surto, foram registrados 57 casos, relacionados ao consumo de carnes contaminadas, com taxa de letalidade de 42% (REIMER *et al.*, 2019). Na África do Sul ocorreu um surto causado por *L. monocytogenes*, de 2017 a 2018, sendo o maior surto de listeriose registrado no mundo, com 943 casos da doença invasiva e 176 mortes confirmadas.

A fonte de contaminação naquele país foi relacionada a produtos cárneos processados prontos para o consumo (CHERSICH *et al.*, 2018; MANGANYE *et al.*, 2018).

No Brasil não há notificação compulsória para os casos de listeriose e por este fato, provavelmente os casos são subnotificados, mas há algumas pesquisas sobre o relato de casos isolados relacionando as características das cepas de *L. monocytogenes* sem se estabelecer relação com a via de transmissão. No ano 2000, no hospital das clínicas de Porto Alegre foram coletadas 10 placentas de abortos ou partos prematuros e após análise histoquímica e microbiológica, foi verificado que 50% das amostras estavam contaminadas por *L. monocytogenes* (CRUZ; MARTINEZ; DESTRO, 2008; SCHWAB; EDELWEISS, 2003).

Outro estudo brasileiro, foi realizado de agosto de 2006 a junho de 2007, em um hospital do Rio de Janeiro, sendo identificados seis pacientes com infecção por *L. monocytogenes*, e todos eram imunocomprometidos, com idade média de 80 anos (MARTINS *et al.*, 2010). Também Blum-Menezes *et al.* (2013) relatam caso ocorrido em Pelotas no estado do Rio Grande do Sul, de deslocamento prematuro de placenta de mulher 21 anos na décima segunda semana de gestação, que através da análise do tecido placentário foi verificada contaminação por *L. monocytogenes*, porém por ausência de sinais prodrômicos o diagnóstico se apresentou inconclusivo.

No Brasil a Instrução Normativa 60/2019, que é um complemento da RDC 331/2019 da ANVISA que estabelece padrões microbiológicos para alimentos e sua aplicação, determina ausência de *L. monocytogenes* em produtos prontos para o consumo destinados a lactentes ou para fins especiais, enquanto que é tolerado até 10^2 *L. monocytogenes*/g ou ml de alimentos prontos para o consumo, excetuando-se alimentos que não apresentam potencial para suportar o desenvolvimento da bactéria durante sua vida útil (BRASIL, 2019a; BRASIL, 2019b).

1.2 Patogenicidade

L. monocytogenes é uma bactéria capaz de multiplicar-se em temperaturas de refrigeração de 4°C (PIRONE-DAVIES *et al.*, 2018; ROGALLA; BOMAR, 2021), o que dificulta o seu controle em alimentos. Existem outras características que tornam mais complexo o controle eficiente de *L. monocytogenes* em indústrias de alimentos, pois a bactéria sobrevive em altas concentrações salinas (até 13,9%) e condições ácidas, com pH até 4,1 (PIRONE-DAVIES *et al.*, 2018). *L. monocytogenes* apresenta capacidade de formação de biofilmes, o que contribui para aumentar sua capacidade de sobrevivência em ambientes estressantes (ROGALLA; BOMAR, 2021).

Após a ingestão de um alimento contaminado por *L. monocytogenes*, para que a bactéria consiga estabelecer um quadro de infecção, está enfrenta algumas condições adversas, como a alta acidez estomacal (cerca de pH 2), conseguindo chegar até o epitélio intestinal, onde deve sobreviver na presença de sais biliares. A bactéria é capaz de atravessar a barreira epitelial, chegando até à lâmina própria, de onde, em seguida, por meio do sangue e da linfa, chega aos órgãos alvos fígado e baço, podendo atravessar a barreira hematoencefálica em hospedeiros imunocomprometidos e também a barreira feto placentária, em gestantes (GAHAN; HILL, 2005; LIU *et al.*, 2007; RADOSHEVICH; COSSART, 2018; SEVEAU; PIZARRO-CERDA; COSSART, 2007; SLEATOR; CLIFFORD; HILL, 2007).

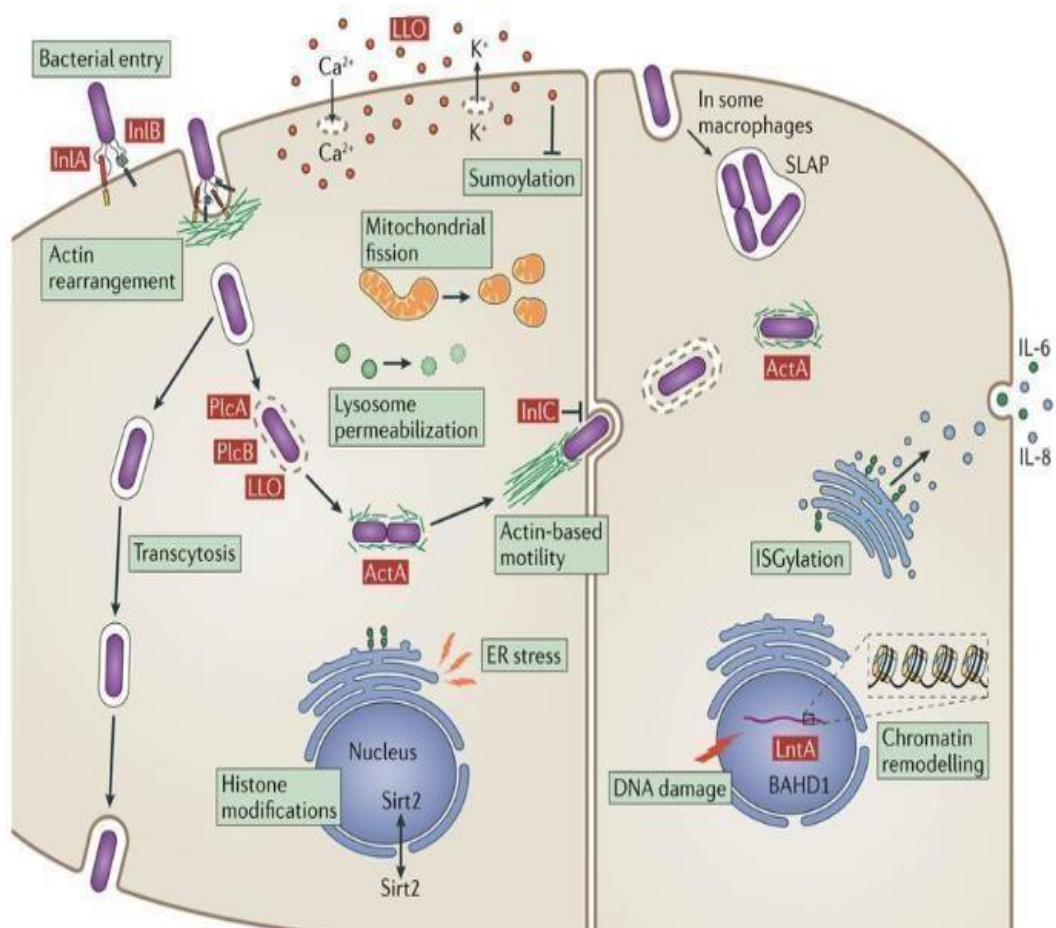
O acesso às vilosidades intestinais por *L. monocytogenes* ocorre pela ligação à E-caderina em células não fagocíticas (por ex., células calciformes) por meio da internalina-A (*InlA*), que leva à fosforilação da E-caderina e resulta na internalização da bactéria em células não fagocíticas, como os trofoblastos e células epiteliais intestinais. Além disso, *L. monocytogenes* se liga ao receptor do fator de crescimento de hepatócitos (Met) através da internalina-B (*InlB*), levando à fosforilação do receptor e sua internalização (RADOSHEVICH; COSSART, 2018).

Após entrar na célula hospedeira não fagocítica, a bactéria fica confinada em um vacúolo, mas por meio de fatores de virulência, consegue realizar o escape dos vacúolos e polimerizar actina da célula do hospedeiro, o que possibilita sua disseminação para células adjacentes como representado na figura 1 (RADOSHEVICH; COSSART, 2018). A proteína ActA presente na superfície celular de *L. monocytogenes* está relacionada à capacidade da bactéria se mover no citoplasma da célula hospedeira e também se movimentar entre as células, disseminando-se hematologicamente (ROGALLA; BOMAR, 2021).

O processo de invasão às células hospedeiras é mediado por vários fatores de virulência, tais como a listeriolisina O (LLO), fosfolipase A (PlcA) e fosfolipase B (PlcB), que são responsáveis por seu escape vacuolar. Além disso, a LLO também participa em processos de modificação de histonas, fissão mitocondrial e estresse do retículo endoplasmático. Outros fatores de virulência são LntA (Listeria nuclear proteína alvo A) e a SIRT2 (sirtuínadesacetilase 2), que causam depressão de genes estimulados por interferon e alterações no empacotamento de cromatina que culminam em alteração da expressão gênica do hospedeiro (RADOSHEVICH; COSSART, 2018).

Figura 1. Representação do processo patológico da infecção por *L. monocytogenes*. (Figura reproduzida com permissão, do artigo “*Listeria monocytogenes*: towards a complete

picture of its physiology and pathogenesis” - Radoshevich e Cossart (2018) -Nature ReviewsMicrobiology).



Fonte: Radoshevich e Cossart (2018).

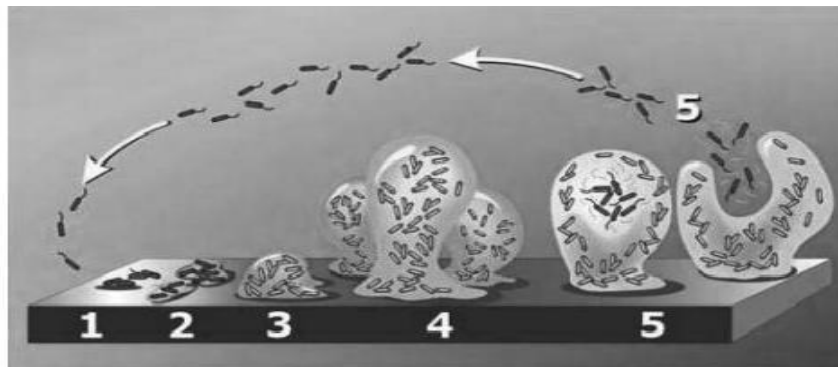
1.3 Biofilmes

Um biofilme pode ser definido como uma comunidade de células microbianas que estão embebidas em uma matriz de exopolissacarídeos, sendo que a matriz é produzida pelos próprios micro-organismos que vivem na comunidade, aderidos em superfícies abióticas ou bióticas (BEYENAL; BABAUTA, 2013; SOLANO; ECHEVERZ; LASA, 2014).

A produção de matriz pelas bactérias capazes de formar biofilmes é mediada por mecanismo de *quorum sensing* (QS), formado por moléculas auto indutoras que são também responsáveis por alterações na expressão de genes e pela regulação metabólica (DEL CARU *et al.*, 2016; FLEMMING, 2016).

A formação de biofilme microbiano ocorre em cinco etapas principais, como representado na figura 2, sendo a etapa primária reversível e dependente de fatores físico-químicos (Figura 2). Na adesão inicial com a superfície abiótica ou biótica (1), se houver condições favoráveis, ocorre a produção de exopolissacarídeos (2), chegando até à etapa secundária, que é irreversível, posteriormente ocorre o crescimento (3), maturação (4) e dispersão (5) do biofilme (BURMØLLE *et al.*, 2014; RABIN *et al.*, 2015; SOLANO; ECHEVERZ; LASA, 2014).

Figura 2. Representação esquemática da formação de biofilme bacteriano. Etapa 1: aderência à superfície abiótica ou biótica; Etapa 2: produção de exopolissacarídeos; Etapa 3: início do desenvolvimento do biofilme; Etapa 4: maturação do biofilme; Etapa 5: dispersão das células do biofilme. (Figura reproduzida com permissão, do artigo “Biofilms as complex differentiated communities” - Stoodley *et al.* (2003) -Annual Review of Microbiology).



Fonte: Stoodley *et al.* (2003).

Muitas cepas de *L. monocytogenes* apresentam capacidade de formar biofilmes em diferentes superfícies, em temperaturas que são utilizadas no processamento industrial de alimentos, e essas estruturas estão geralmente relacionadas a uma maior persistência da bactéria no ambiente, além de apresentar maior resistência ao sistema imune e aos antimicrobianos, dificultando o tratamento de infecções da saúde humana (COLAGIORGI *et al.*, 2017; SAMROT *et al.*, 2021; TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013; VISHWAKARMA, 2019).

Dessa forma, os biofilmes bacterianos representam uma grande preocupação e há grande interesse no desenvolvimento de estratégias para a inibição de micro-organismos em biofilmes. Dentre os modos de controle de biofilmes, tem sido proposto: aplicação de compostos naturais e sintéticos, tratamento enzimático para destruição da matriz, exclusão competitiva e produção de agentes antimicrobianos, entre outros (FANG; PARK; HONG, 2020;

OLOKETUYI; KHAN, 2017).

1.4 *Lactobacillus sakei*

Bactérias lácticas (BAL) são cocos ou bastonetes Gram-positivos, catalase negativos, não formadoras de esporos e que geralmente crescem sob condições microaerófilas ou estritamente anaeróbias, e apresentam resistência a baixos valores de pH, os gêneros de BAL são *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*. Essas bactérias são amplamente utilizadas para conservação na indústria de alimentos, destacando-se os gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc* (KLEIN *et al.*, 1998; MOKOENA, 2017). O gênero *Lactobacillus* é um dos mais importantes do grupo das BAL apresentando 261 espécies e recentemente reclassificado, com base em aspectos fenotípicos, ecológicos e genotípicos (ZHENG *et al.*, 2020).

BAL são reconhecidas pela ampla produção de substâncias antimicrobianas como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, que são peptídeos antimicrobianos, com potencial para utilização na indústria de alimentos como agentes conservadores, sendo especialmente atraentes quando apresentam estabilidade em diferentes temperaturas (HOR *et al.*, 2019; MERLICH *et al.*, 2019; MOKOENA, 2017; PEREZ; ZENDO; SONOMOTO, 2014).

As bacteriocinas das BALs são classificadas em três grupos. A classe I tem três subgrupos, sendo Ia os lantibióticos, que apresentam lantionina e β -metil lantionina; Ib lantibióticos carbocíclicos e Ic sactibióticos (contêm enxofre em carbono alfa). Por outro lado, as bacteriocinas da classe II são pequenas (<10 kDA), relativamente estáveis ao calor e não apresentam lantionina. Já a classe II também apresenta subgrupos sendo eles: classe IIa, questão bacteriocinas classificadas de acordo com sua similaridade de sequência de aminoácidos na parte N-terminal e sua atividade antilisteriana; classe IIb formada por bacteriocinas complexas que necessitam de dois peptídeos distintos para que tenham atividade; classe IIc que compreende peptídeos com tiol ativado e classe IId, que engloba bacteriocinas não modificadas, lineares, sem sequência líder, não semelhantes à pediocina. Há ainda a classe III de bacteriocinas, composta por grandes moléculas (>30 kDA) termolábeis (KUMARIYA *et al.*, 2019; OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015; SCHULZ; PEREIRA; BONELLI, 2003).

Lactobacillus sakei é uma BAL, que pode ser isolada de carnes, produtos cárneos, pescados e produtos alimentares fermentados. Esta espécie pode também contribuir para o desenvolvimento de propriedades sensoriais de alimentos, despertando o interesse da indústria,

sendo utilizada com frequência em fermentações (CHAMPOMIER-VERGÈS *et al.*, 2001; SCHUSTER; VOGEL; EHRMANN, 2019).

L. sakei 1 é uma BAL isolada de linguiça de porco, e a bacteriocina produzida por estacepa é uma sakacina, pertencente à classe IIa. As bacteriocinas desta classe são peptídeo bactericidas que atuam na permeabilidade de membranas, causando assim um desequilíbrio iônico (D'ANGELIS *et al.*, 2009; DE MARTINIS *et al.*, 2001; ENNAHAR *et al.*, 2000). Vários estudos já relataram a atividade antilisteriana da bactéria *L. sakei* 1 relacionada à sua produção de bacteriocinas, também já foi demonstrado através de testes em *in vitro* que *L. sakei* 1 apresenta capacidade de sobreviver em pH 3,0, e apresenta tolerância na presença de sais biliares, o que indica seu potencial probiótico (ALVES *et al.*, 2006; ALVES; LAVRADOR; DE MARTINIS, 2003; DE MARTINIS; SANTAROSA; FREITAS, 2003; GOMES *et al.*, 2012).

1.5 Prebióticos

Prebióticos são definidos como ingredientes alimentares que não sofrem o processo fisiológico de digestão, e assim estimulam o desenvolvimento seletivo de bactérias no cólon, conferindo bem-estar, saúde e condições benéficas ao hospedeiro (ROBERFROID, 2007). Os frutanos do tipo inulina são prebióticos formados por muitas unidades de frutose ligadas por ligações β , e estão presentes em diversas plantas, vegetais e frutas como cereais, alho-poró, cebola, banana e chicória (DRABIŃSKA; ROSELL; KRUPA-KOZAK, 2019; FAN; CAO; ZHANG, 2016).

É estimado que o consumo médio diário da inulina na Europa é entre 3-10 gramas/dia e nos EUA entre 1-4 gramas, mas não há dados sobre o consumo desse prebiótico no Brasil. A chicória é a fonte principal da obtenção de inulina na indústria, sendo este prebiótico cada vez mais utilizado nos alimentos por apresentar propriedades nutricionais, tecnológicas e benéficas ao organismo humano (AHMED; RASHID, 2017; COUSSEMENT, 1999; FAN; CAO; ZHANG, 2016; KELLY, 2009).

A inulina é muito conhecida por sua atividade prebiótica, causando aumento da população de bactérias do gênero *Bifidobacterium* no intestino humano. Bifidobactérias são consideradas colonizadoras primárias do intestino, ainda na primeira infância, e podem conferir proteção contra alguns micro-organismos oportunistas pela produção de substâncias antimicrobianas específicas e também grandes quantidade de ácido lático. O abaixamento do pH do cólon limita a multiplicação de patógenos no intestino (CLAUS, 2017).

Também se acredita que prebióticos impeçam a ligação dos patógenos aos receptores

de glicano na célula hospedeira impedindo sua entrada, proporcionando assim a proteção contra infecções (CHEN *et al.*, 2017). E ao utilizar um prebiótico com um probiótico este é denominado como simbiótico, que é uma mistura de probióticos e prebióticos, onde os componentes prebióticos apresentam a capacidade de estimular o crescimento, o metabolismo de bactérias probióticas, melhorando assim o mecanismo de ação das substâncias probióticas, uma interação simbiótica fornece um ambiente menos vantajoso para patógenos (OLIVEIRA *et al.*, 2009; OLVEIRA; GONZÁLEZ-MOLERO, 2016; WALSH *et al.*, 2010).

1.6 Cultivo Tridimensional de células eucarióticas

O cultivo celular é uma ferramenta importante para estudos de várias áreas, incluindo a avaliação da atividade de prebióticos e BALs, com ensaios relacionados a fermentação, invasão celular até mesmo estudos de imunomodulação (ASHAOLU, 2020; CHEN *et al.*, 2017; MATHUR; BERESFORD; COTTER, 2020; RADTKE; HERBST-KRALOVETZ, 2012).

Um avanço importante em de cultura de células é alcançado pela utilização de cultivo tridimensional (3D), que pode superar limitações apresentadas por modelos com células cultivadas em monocamadas (2D) (ANABAZHAGAN *et al.*, 2017; RAVI *et al.*, 2015).

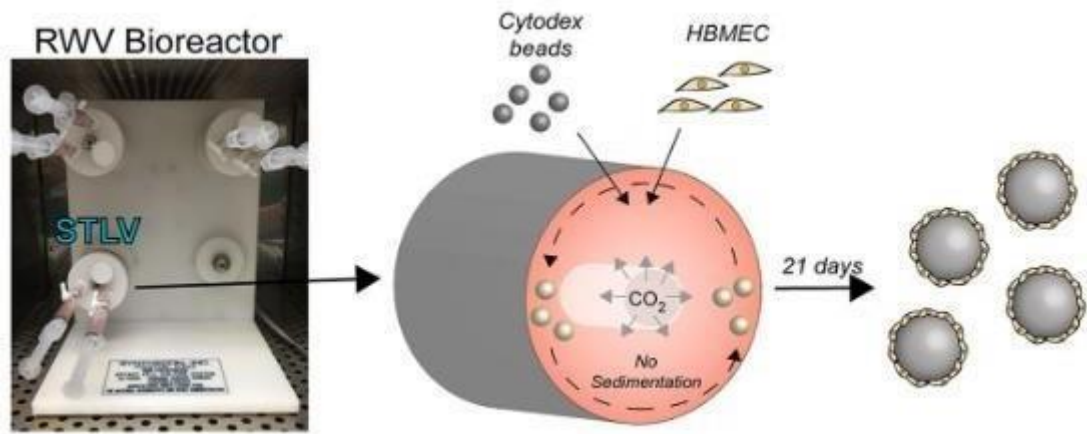
De fato, modelos em 3D apresentam um comportamento mais próximo ao que é observado *in vivo*. Em formato 2D, as células são forçadas a se adaptarem em uma estrutura rígida e plana, alterando assim a fisiologia do epitélio e não mimetizando com precisão as interações célula-célula *in vivo* e seu microambiente (RAVI *et al.*, 2015; SUSEWIND *et al.*, 2015).

Na cultura 3D também é encontrada maior e melhor expressão da organização de junções oclusivas, proteínas da borda em escova, mucina, padrões de expressão gênica e síntese de proteínas, com grande similaridade ao encontrado em *in vivo* (LEI *et al.*, 2011).

Para obtenção de estruturas 3D altamente diferenciadas, uma das técnicas mais vantajosas baseia-se no cultivo celular em microgravidade utilizando esferoides, com o emprego de biorreatores modelo “Rotating Wall Vessel” (RWV) e “Slow Turning Lateral Device” (STLV), os quais diferem apenas pela sua fonte de aeração (RADTKE; HERBST-KRALOVETZ, 2012). Para o desenvolvimento das estruturas em 3D as células são adicionadas ao biorreator com esferas porosas de dextrano que são revestidas de colágeno, e a partir do movimento realizado pelo biorreator as células ficam em queda livre, tendo as esferas como um suporte para seu crescimento, e o microambiente ali existente proporciona o crescimento tridimensional celular como representado pela figura 3 (RADTKE; HERBST-KRALOVETZ, 2012; UNSWORTH; LELKES, 1998).

Figura 3. Representação esquemática da formação de cultura celular 3D utilizando

biorreatores de microgravidade utilizando esferoides (Figura reproduzida com permissão, do artigo “A Three-Dimensional Cell Culture Model to Study Enterovirus infection of polarized intestinal epithelial cells” - Drummond, Nickerson e Coyne (2016) -mSphere).



Fonte: Drummond, Nickerson e Coyne (2016).

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente há uma grande preocupação com a inocuidade de alimentos, e a contaminação por *L. monocytogenes* é a principal fonte de transmissão da listeriose humana, sendo estimado que 90% dos casos da doença são causados pela ingestão de alimentos contaminados, causando prejuízos bilionários (BRAGA *et al.*, 2017; OMOLO *et al.*, 2014; ZOELLNER *et al.*, 2019).

O controle da contaminação por *L. monocytogenes* é difícil, pois a bactéria é capaz de formar biofilmes, o que promove sua proteção. Além disso, tem capacidade de sobreviver e até multiplicar-se em temperaturas de refrigeração por longos períodos, em uma ampla faixa de pH, expressando fatores de virulência importantes para o desenvolvimento do quadro infeccioso com extensa proliferação e invasão celular (BRAGA *et al.*, 2017; LEONG; ALVAREZ-ORDÓÑEZ; JORDAN, 2014; RADOSHEVICH; COSSART, 2018).

Por apresentar altas taxas de letalidade e grandes prejuízos econômicos, *L. monocytogenes*, é considerado um patógeno que merece grande atenção para garantia da inocuidade de alimentos (WALLACE; RINEHART; SUN, 2018).

Acredita-se que prebióticos possam evitar a associação de patógenos a receptores de glicano em células eucarióticas dificultando o processo de invasão, e também alterando vias de sinalização (AIGAL; CLAUDINON; RÖMER, 2015; ANGELONI *et al.*, 2005; GIBSON; MCCARTNEY; RASTALL, 2005; NEWBURG; RUIZ-PALACIOS; MORROW, 2005). Neste sentido, foi descrito por Chen *et al.* (2017), que oligossacarídeos do leite humano são capazes de reduzir a invasão de células Caco-2 por *L. monocytogenes*. Além disso, os dados reportados por Coppa *et al.* (2006) para outros patógenos (*Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* e *Salmonella Fyris*) também indicaram uma menor adesão bacteriana a células Caco-2 crescidas em 2D na presença de fruto-oligossacarídeos.

A inulina é um dos prebióticos mais conhecidos e utilizados na ingestão alimentar humana, o qual é considerado um ingrediente seguro (COUSSEMENT, 1999; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2019; KOLIDA; GIBSON, 2007; MAN *et al.*, 2021).

Lactobacillus sp. apresenta capacidade de inibir o crescimento de outras bactérias e a atividade inibitória pode ser atribuída em parte, à produção de bacteriocinas (PÉREZ-IBARRECHE *et al.*, 2016; TASHAKOR *et al.*, 2017). Vários estudos já relataram a atividade antilisteriana da bactéria *L. sakei* 1 (ALVES *et al.*, 2006; ALVES; LAVRADOR; MARTINIS, 2003; DE MARTINIS; SANTAROSA; FREITAS, 2003; WINKELSTRÖTER *et al.*, 2011).

O estudo de Hong *et al.* (2019) demonstrou uma ação antibacteriana de *Lactobacillus*

e relatou que a inibição se tornava mais eficiente na presença de substâncias prebióticas. Segundo aqueles autores, a atividade antimicrobiana de *Lactobacillus plantarum* contra *E. coli* k99 e *L. monocytogenes* foi maior quando as culturas foram tratadas com nanopartículas de pululano, um prebiótico. Martinez *et al.* (2015) também demonstraram que *L. sakei* subsp. *sakei* 2a inibiu *L. monocytogenes* em queijo que foi suplementado com inulina, em uma condição de abuso de temperatura (15°C), durante 28 dias.

Diante do exposto, neste trabalho foi avaliada a atividade antilisteriana da BAL *L. sakei* 1 e de seu sobrenadante livre de células (SLC), frente à infecção por *L. monocytogenes* em células eucarióticas em cultivo tridimensional, e a atividade do prebiótico inulina como possível antagonista da infecção por *L. monocytogenes*, sempre avaliando o uso combinado destes compostos. Também foi avaliada a atividade destes compostos no controle da formação de biofilmes frente a *L. monocytogenes* em superfície abiótica, considerando que a formação de biofilmes é um processo importante para a adesão desta bactéria. Além disso, foi avaliada a possível citotoxicidade do SLC e da inulina, a fim de assegurar sua aplicação no controle de infecções por *L. monocytogenes*.

A literatura científica atual não apresenta muitos dados sobre a utilização de biorreator STLV para a produção de células 3D aplicado à análise de compostos derivados de BAL, BAL e prebióticos e a possível interação destes compostos na adesão e invasão celular de bactérias patogênicas principalmente expressando dados de citotoxicidade destes compostos, e nos estudos de Pereira *et al.* (2021) e Medeiros *et al.* (2021) é demonstrado a escassez de dados científicos sobre o assunto, o que enfatiza ainda mais a importância deste estudo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antilisteriano de combinações de *L. sakei* 1 e de seu SLC, bem como do prebiótico inulina, a fim de antagonizar a adesão e invasão de *L. monocytogenes* em células Caco-2 em cultura tridimensional, bem como inibir a formação de biofilmes em superfície abiótica.

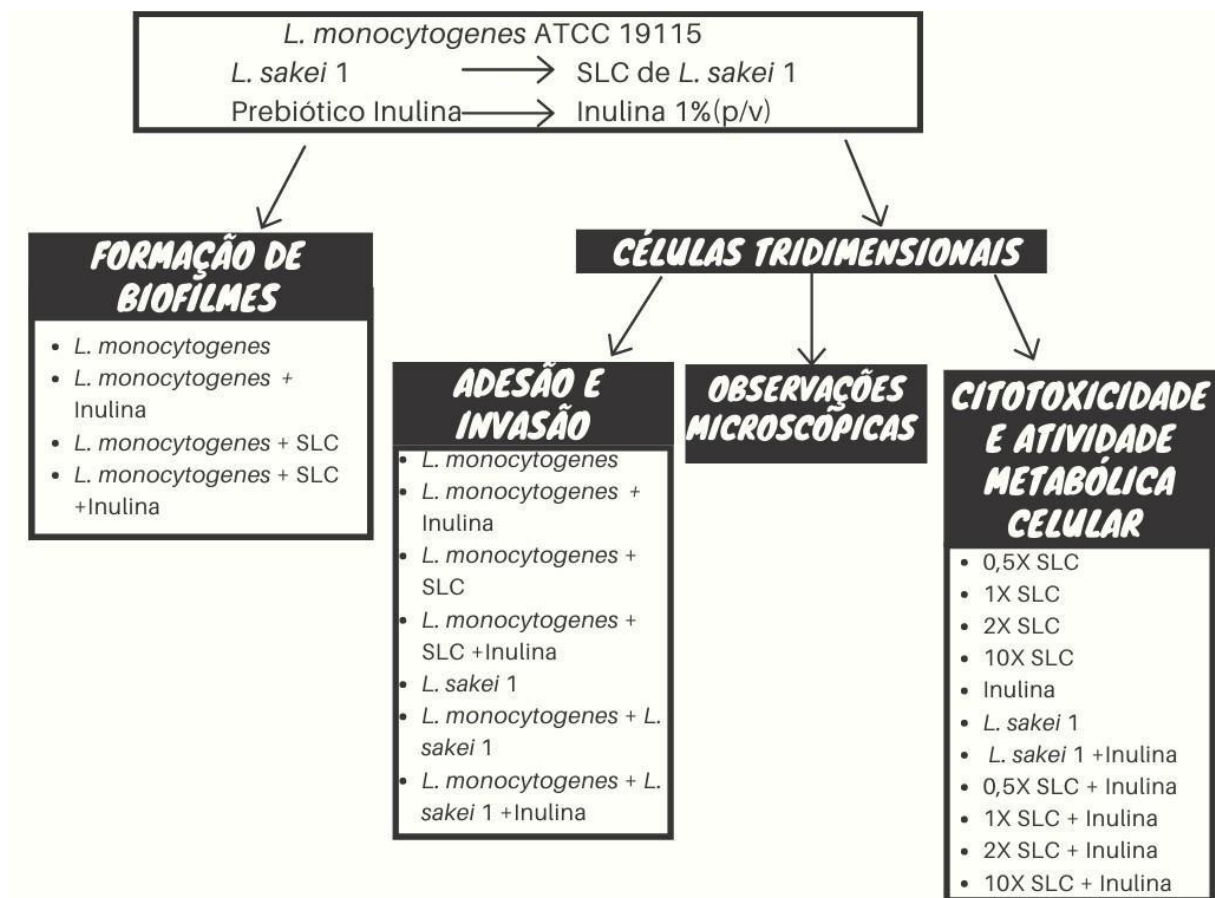
3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a capacidade de SLC de *L. sakei* 1 e do prebiótico inulina, isolados ou em combinação (simbiótico) para inibir a formação de biofilmes por *L. monocytogenes*.
- b) Obter culturas tridimensionais de Caco-2 por crescimento em biorreator STLV, documentando a estrutura obtida por meio de microscopia confocal a laser.
- c) Avaliar a capacidade de adesão e de invasão de *L. monocytogenes* em células Caco-2 3D em presença de *L. sakei* 1, SLC de *L. sakei* 1, do prebiótico inulina, e da combinação dessas condições.
- d) Avaliar a atividade citotóxica da BAL *L. sakei* 1, de SLC de *L. sakei* 1, e do prebiótico inulina, a fim de assegurar a potencial aplicação biotecnológica da cultura bacteriana e seus metabólitos, em combinação com um prebiótico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A figura 4, é uma representação de forma gráfica de todos os ensaios realizados no presente trabalho de forma esquematizada e resumida, posteriormente é descrito em cada tópico a metodologia e os materiais utilizados em cada ensaio.

Figura 4. Representação gráfica dos ensaios realizados no presente trabalho. SLC = Sobrenadante Livre de Células de *Lactobacillus sakei* 1 em diferentes concentrações (para detalhes, consultar o item 4.3).



Fonte: O autor.

4.1 Culturas bacterianas

Neste trabalho, foi utilizada *L. monocytogenes* ATCC 19115, disponível na coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP). Também foi utilizado *L. sakei* 1 produtor da bacteriocina sakacina, e pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCFRP-USP (D'ANGELIS *et al.*, 2009; DE MARTINIS; SANTAROSA; FREITAS, 2003).

4.2 Preparação do prebiótico

O prebiótico utilizado no presente estudo foi a inulina (Orafti Active Food Ingredients,

Tienen, Bélgica; produto 42002019 - Orafti GR BAG, 92% de pureza), originária de raiz da chicória. Foi preparada uma solução de estoque de inulina (10%, p/v) em água esterilizada, e com posterior esterilização da solução por filtração (membrana com poros de 0,2 µm, Corning, EUA). A solução assim preparada foi armazenada a 4°C. Foi utilizada a concentração de trabalho de 1% (p/v) da inulina para a realização dos ensaios, de acordo com dados da literatura (PIOTROWSKI *et al.*, 2019).

4.3 Preparação da bacteriocina semi-purificada

Para obtenção de bacteriocina semi-purificada de *L. sakei* 1, foi utilizado um SLC, por meio da reativação da bactéria em caldo de Man Rogosa Sharpe (Oxoid, Reino Unido) (MRS), por 24h/25°C.

Após este período, a cultura foi centrifugada a 7.500g (Sorvall RC Plus, Du Pont, Reino Unido) por 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi filtrado a vácuo em membrana 0,22 µm com baixa capacidade de ligação de proteínas (GVWP Millipore, EUA), enneutralizado (pH 7,0) com NaOH 4 M. Posteriormente, foi realizado teste de diluição crítica para quantificação da bacteriocina, e para isso, o SLC foi submetido a diluições seriadas em placas de micro titulação de 96 poços (Costar, EUA) com tampão fosfato (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄) na concentração de 10mM e pH 7,0.

Foram testadas as seguintes proporções do SLC: 1/1 (sem diluição), 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048, 1/4096, 1/8192. Alíquotas de cada uma destas diluições (10µl) foram depositadas na superfície de placas contendo uma sobrecamada de ágar Infusão Cérebro Coração (BHI) semi-sólido (1% de ágar bacteriológico) inoculado com 10⁵-10⁶ UFC/mL de *L. monocytogenes* (micro-organismo indicador), seguida de incubação a 37°C/24h. O resultado foi expresso em unidades arbitrárias por mL (UA/mL), considerando-se a recíproca da última diluição onde foi observado halo de inibição de listeria, multiplicado por 100, a fim de calcular a atividade de bacteriocina da preparação original do SLC, em Unidades Arbitrárias (UA). A maior diluição onde houve inibição do crescimento de *L. monocytogenes* no teste de diluição crítica foi selecionada para a realização dos bioensaios deste trabalho (BAREFOOT; KLAENHAMMER, 1983; MAYR-HARTING; HEDGES; BERKELEY, 1972).

Para confirmar a concentração ideal de SLC para ser utilizada nos bioensaios foi realizado o ensaio de concentração inibitória mínima (MIC) de acordo com Lee, Lee e Paik (2021) e Lynch *et al.* (2021) e Stanbro *et al.* (2020) com modificações. Em uma placa de 96 poços, em cada poço foi adicionado 10⁵ UFC/mL da cultura de *L. monocytogenes* e 100 µL das diluições de SLC de *L. sakei* 1, a saber: 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512,

1/1024, 1/2048, 1/4096 e 1/8192. As culturas foram incubadas a 37°C por 24 horas, e em seguida o MIC foi determinado, considerando a maior diluição de SLC que causou a inibição do crescimento visível de *L. monocytogenes*. Então para os ensaios de citotoxicidade avaliação da metabólica celular foi realizada com as concentrações 0,5x da concentração, 1x da concentração, 2x da concentração, 10x da concentração encontrada no ensaio de MIC como a ideal.

4.4 Avaliação da formação de biofilmes

Para este estudo foi adotada a técnica de Azeredo *et al.* (2017), In Lee *et al.* (2017) e Sereno *et al.* (2019), com algumas modificações. Para isso, *L. monocytogenes* foi cultivada a 37°C/24h em caldo BHI, e a cultura foi ajustada no mesmo caldo para uma concentração de 10⁸ UFC/mL. Alíquotas da suspensão de células do isolado foram adicionadas a 200 µL de caldo BHI presente nas cavidades da placa de 96 poços, e incubadas a 37°C/24h para a formação da biomassa de biofilme bacteriano. Após este período, a microplaca foi lavada com solução salina (NaCl 0,9%, p/v) para remoção das células não aderidas, e seca por inversão. As células aderidas foram coradas com cristal violeta 0,1% (p/v) por 15 minutos. O corante foi removido e, após secagem, o corante das células aderidas e coradas foi solubilizado com solução de álcool/acetona (80:20). As densidades óticas (DO) foram lidas em comprimento de onda de 595nm em leitor de microplaca (UV/VIS PowerWaveHt, EUA).

O mesmo método citado anteriormente foi utilizado para avaliar possível influência do prebiótico inulina e do SLC de *L. sakei* 1 na formação de biofilme por *L. monocytogenes*. Para isso, foram acrescentados 200 µL de caldo BHI com 10⁸ UFC/mL de *L. monocytogenes* nas cavidades de placas de 96 poços, e preparadas as seguintes condições: (I) 100 µL de 1% do prebiótico inulina; (II) 100 µL de SLC de *L. sakei* 1, e (III) inulina combinada com SLC de *L. sakei* 1 (WINKELSTRÖTER; DE MARTINIS, 2013).

A capacidade de formação de biofilme por *L. monocytogenes* foi estimada segundo Stepanovic *et al.* (2000). Neste estudo “DOc” foi definido como a absorvância do controle negativo, ou seja, o meio de cultivo não inoculado (“branco”) e “DO” foi definido como a absorvância da amostra, ambos medidos a 595 nm.

Deste modo, foi feita a classificação da bactéria quanto à formação de biofilmes em diferentes condições, como segue:

$DO \leq DOc$ = não aderente;

$DOc < DO \leq 2x DOc$ = aderência fraca;

$2x DOc < DO \leq 4x DOc$ = aderência moderada;

4x DO_c < DO = aderência forte.

4.5 Cultura tridimensional de células Caco-2

O cultivo das células Caco-2 foi realizado seguindo o protocolo de Radtke e Herbst-Kralovetz (2012). As células epiteliais da linhagem Caco-2 (adenocarcinoma de cólon humano) foram obtidas da coleção de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro e gentilmente doadas ao nosso laboratório pela Profa. Dra. Juliana P. Falcão (FCFRP-USP).

A linhagem celular Caco-2 foi cultivada em 2D em frascos de cultura de tecidos até crescimento confluyente com meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium - DMEM high glucose (Gibco, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, EUA, origem Brasil), previamente inativado pelo calor (30 min, 56°C). Foi também adicionado de 1% (v/v) (100 U/mL de penicilina e 100 g/mL de estreptomicina; Gibco, EUA), de solução de Penicilina-Estreptomicina (Pen-Strep, Sigma, EUA) ao meio de cultura já suplementado com o soro fetal bovino, agora referido apenas como DMEM e quando utilizado o mesmo sem a presença de solução de Penicilina-Estreptomicina denominado como DMEM sem antibiótico. As células foram removidas por tripsinização, sendo adicionadas 10⁷ células em tubo cônico contendo esferas micro transportadoras porosas revestidas de colágeno (Citodex 3®, Sigma, EUA) já previamente preparadas, de acordo com instruções de Radtke e Herbst-Kralovetz (2012). As esferas foram preparadas, adicionando-se 250 µL de Citodex 3® em tubo cônico, e foram hidratadas por imersão em 10 mL de solução salina fosfatada tamponada - PBS (cloreto de sódio 137 mM, fosfato 10 mM, cloreto de potássio 2,7 mM, ajustado para pH 7,4) e esterilizadas em autoclave (30 min, 121°C).

Em seguida, a mistura de células e microesferas foi transferida para biorreator modelo "Slow Turning Lateral Device" (STLV, Synthecon Incorporation, EUA). O volume foi completado para 55 mL com o meio DMEM. O biorreator foi mantido em estufa a 37°C em atmosfera de 5 % de CO₂ (Series II Water-Jacketed CO₂ incubator, Thermo Scientific, EUA) e programado para 20 rotações por minuto durante o cultivo. Entretanto, nos primeiros 30 minutos de incubação a cultura permaneceu sem rotação para permitir que as células se fixassem aos grânulos de colágeno (HARDING; VARGIS, 2019).

A primeira troca do meio de cultivo foi realizada após as 96 horas iniciais das células em cultura para manter o metabolismo celular, posteriormente este período a troca do meio do biorreator foi realizada a cada 24 horas até formação completa dos agregados celulares (21 dias). Para realizar o monitoramento da estrutura dos agregados celulares, foi realizada a cada 7 dias a retirada de 200µL do biorreator, com micropipeta com a ponta cortada (para não romper os agregados) e transferidos para uma lâmina de vidro para visualização em microscópio de luz

invertida (Nikon, TMS 0.2A, Japão), em uma ampliação de 20x, para certificação da formação de estruturas tridimensionais.

Aos 21 dias de incubação, antes da realização dos ensaios com bactérias e de citotoxicidade, os agregados foram colhidos do biorreator e transferidos para tubo cônico de 50 mL (PEREIRA *et al.*, 2021). Para isso após o tempo de incubação o meio DMEM foi parcialmente drenado, ficando no fundo do tubo do biorreator o resto do meio DMEM com os esferoides celulares sendo estes transferidos para um tubo cônico de 50 ml, com o volume final ajustado para 15 ml com PBS. Uma alíquota de 150 µL de esferoides foi utilizada para contagem de células, e para isso, foram adicionados 300 µL de solução de 0,05% tripsina e 0,02% de EDTA (Sigma-Aldrich), deixando o tubo em repouso durante 30 minutos. Posteriormente, ao tubo contendo os esferoides mais tripsina e EDTA, foi adicionado 1 mL de solução de ácido cítrico 0,1 M (Êxodo Científica, Brasil) com 0,1% (p/v) de cristal violeta (Newprov produtos para laboratório, Brasil). Estas etapas foram necessárias para desagregar e lisar as células e bem como corar os núcleos celulares, a fim de realizar contagem em câmara de Neubauer (PEREIRA *et al.*, 2021).

Os esferoides com as células Caco-2 em estrutura tridimensional foram utilizados para a realização de ensaios em microscopia confocal, adesão e invasão, e avaliação da atividade metabólica celular (RADTKE; HERBST-KRALOVETZ, 2012; WINKELSTRÖTER; DE MARTINIS, 2013).

4.6 Microscopia confocal de células Caco-2 3D

Após cultivo por 21 dias em biorreator rotativo, o meio DMEM foi parcialmente drenado, ficando no fundo do tubo do biorreator o resto do meio DMEM com os esferoides celulares, sendo estes transferidos para um tubo cônico de 50 ml, com o volume final ajustado para 15 ml com PBS. Alíquotas de 100µl foram transferidas para microtubos. O meio DMEM foi removido, e foi feita a lavagem três vezes com PBS, e as células em crescimento tridimensional aderidas às microesferas de colágeno foram fixadas com 200 µL de solução aquosa de formaldeído 4% (Sigma, EUA) em PBS pH 7,4 por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida as células foram lavadas três vezes com solução gelada de PBS e permeabilizadas com 200 µL de solução aquosa de 0,25% de Triton X100 (Sigma, EUA) em PBS pH 7,4 por 5 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas novamente por três vezes com solução gelada de PBS e mantidas em 4 °C. Posteriormente as células foram coradas com reagentes fluorescentes e observadas utilizando o Microscópio Confocal a Laser (Leica TCS SP8, Buffalo Grove, IL, EUA) do Laboratório de Imagens de Alta Resolução e Estudos Celulares, localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto -

Universidade de São Paulo. As imagens foram processadas com o software LAS AF versão 3.4.2.18368,2018, fornecido pelo fabricante (ABCAM, 2017; DRUMMOND; NICKERSON; COYNE, 2016).

Foram utilizados os seguintes reagentes:

- a) Lectina de *Ulex europaeus* marcada com isotiocianato de fluoresceína (UEA1- FITC), 495 e 515 nm para detecção de mucina (Sigma, USA);
- b) O anticorpo primário Ezrin coelho mAb (Cell Signaling Technology Danvers, MA, EUA) com o anticorpo secundário AlexaFluor® 647 (anti IgG de coelho, Cell Signaling Technology Danvers, MA, EUA) 594 nm e 633nm. A ezrina, que faz parte da família de proteínas ezrin / radixin/ moesin (ERM), que funcionam como agentes de ligação gerais entre as proteínas da membrana plasmática e o citoesqueleto de actina, também envolvidas na expressão funcional das proteínas da membrana na superfície celular;
- c) DAPI (4',6-Diamidino-2 fenilindol) como um contrastante nuclear e cromossômico presente no meio de montagem antifade Vectashield® (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) 300 a 660 nm.

4.7 Ensaios de adesão

Os ensaios de adesão foram realizados de acordo com Merghni *et al.* (2015), Moroni *et al.* (2006) e Pereira *et al.* (2021) com algumas modificações. Para isso, em microtubos foram adicionados 10^5 de células Caco-2 previamente obtidas em cultura tridimensional, utilizando ponteiros de pipetas com a ponta cortada (1000 μ L) para evitar o cisalhamento e proteger as estruturas 3D. As células foram lavadas com PBS para a retirada de resíduos de antibióticos do meio de cultura DMEM. Em seguida foram adicionados 1000 μ L de meio DMEM sem antibiótico. Diferentes condições foram testadas em triplicata, ajustando a MOI = 100 ("Multiplicity of Infection", ou seja, a razão de bactérias por célula hospedeira), tanto para *L. monocytogenes* como *L. sakei* 1, conforme segue:

Tabela 1- Condições utilizadas nos ensaios de adesão e invasão celular.

Condição	Cultura <i>L. monocytogenes</i> 10 ⁷ UFC/mL *	Cultura <i>L. sakei 1</i> 10 ⁷ UFC/mL	SLC <i>L. sakei 1</i>	Inulina 1% (p/v)	DMEM
<i>L. monocytogenes</i>	0,300	NA	NA	NA	0,700
<i>L. monocytogenes</i>	0,300	NA	NA	0,100	0,600
+ Inulina					
<i>L. monocytogenes</i> + SLC <i>L. sakei 1</i>	0,300	NA	0,100	NA	0,600
<i>L. monocytogenes</i> + SLC <i>L. sakei 1</i> + Inulina	0,300	NA	0,100	0,100	0,500
<i>L. sakei 1</i>	NA	0,600	NA	NA	0,400
<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. sakei 1</i>	0,300	0,600	NA	NA	0,100
<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. sakei 1</i> + Inulina	0,300	0,600	NA	0,100	NA
<i>L. monocytogenes</i> (controle)**	0,300	NA	NA	NA	0,700

Fonte: O autor.

Volumes adicionados em mL, ajustados o volume final para 1 mL.

NA = Não Adicionado/meio DMEM foi adicionado para ajustar o volume final de cada concentração.

*Concentração foi obtida através de curva de crescimento e realização de diluições decimais seriadas em solução PBS, e semeadura em placas de ágar BHI (Oxoid, Reino Unido) para *L. monocytogenes* e MRS (Oxoid, Reino Unido) para *L. sakei 1*, com incubação por 24 horas a 37 °C.

**Controle: *L. monocytogenes* (10⁷ UFC/mL) + meio DMEM (sem antibiótico) e sem presença das células. -Este controle foi realizado pra corrigir um possível crescimento bacteriano ou morte durante a incubação.

As células Caco-2 3D nas diferentes condições de ensaio foram incubadas a 37°C por 2 horas, em atmosfera com 5% CO₂ (PEREIRA *et al.*, 2021). Após o período de incubação, as

culturas foram centrifugadas a 3.000g por 5 minutos (Sorvall Legend Mach 1.6R Centrifuge, Thermo Electron Corporation, EUA), o sobrenadante foi descartado e foi feita a lavagem dos agregados celulares com solução de PBS para remoção das bactérias não aderidas às células eucarióticas. A cada microtubo foram adicionados 250µL Triton X-100 diluído em solução de PBS a 0,1% (v/v) para lise celular, e mantidos em estufa a 37°C por 15 minutos. Após a etapa de lise, foram realizadas diluições decimais seriadas em solução PBS, e semeadura em placas de ágar BHI (Oxoid, Reino Unido), com incubação por 24 horas a 37 °C. Assim, foi obtido o número total em UFC de *L. monocytogenes* que aderiram e invadiram as células, denominado como “bactérias aderidas e invasivas”. Nas condições de co-cultivo bacteriano, a técnica foi modificada pela semeadura das diluições em placas de ágar PALCAM (Oxoid, Reino Unido), que é seletivo para *Listeria* sp.

Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e a porcentagem de adesão foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Bactérias aderentes} = (\text{bactérias aderentes} + \text{bactérias invasivas}) - \text{invasivas}$$

$$\% \text{ adesão} = \frac{\text{Bactérias aderentes}}{\text{Número total de bactérias adicionadas}} \times 100$$

4.8 Ensaios de invasão

Os ensaios de invasão foram realizados de acordo com Merghni *et al.* (2015) e Moroni *et al.* (2006) e Pereira *et al.* (2021) com algumas modificações. Para isso, foram adicionadas em microtubos 10⁵ células Caco-2 tridimensionais crescidas em esferoides 3D, e em seguida foi removido o meio de cultura DMEM. Em seguida, as células foram lavadas com PBS para a retirada de resíduos de antibióticos, com adição final de 1000 µL meio DMEM sem antibióticos. Em seguida foram utilizadas as mesmas condições do ensaio de adesão, ajustando a MOI de 100, para *L. monocytogenes* e/ou para *L. sakei* 1. A incubação foi realizada a 37°C por 2 horas em atmosfera com 5% CO₂. Após incubação, foi realizada a centrifugação a 3.000g por 5 minutos (Sorvall Biofuge Pico Centrifuge, Reino Unido), o sobrenadante foi descartado, e foi feita a lavagem com solução PBS para remoção das bactérias não aderidas às células eucarióticas. Foram adicionados 250µL de solução de gentamicina (250µg/mL) a fim de matar as bactérias não internalizadas, com incubação por 1 hora a 37 °C. A preparação foi centrifugada a 3.000g por 5 minutos (Sorvall Biofuge Pico Centrifuge, Reino Unido), o sobrenadante foi descartado e foi feita a lavagem com solução PBS para remoção das bactérias não aderidas às células eucarióticas. Em seguida foi adicionada solução Triton X-100 diluído em solução de PBS a 0,1% (v/v) por 15 minutos a 37°C, para lise celular. Após a lise das células Caco-2, foram realizadas diluições decimais seriadas em solução PBS, sendo semeadas em

placas de ágar BHI (Oxoid, Reino Unido), que foram incubadas por 24 horas a 37 °C. Pela enumeração de *L. monocytogenes* (UFC/mL) foi calculado o número de “bactérias invasivas”, fazendo a enumeração em meio seletivo (ágar PALCAM, Oxoid, Reino Unido) nas condições de co-cultivo com *L. sakei* 1. Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e a porcentagem de invasão foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ invasão} = \frac{\text{Bactérias invasivas}}{\text{Número total de bactérias adicionadas}} \times 100$$

4.9 Ensaio de atividade metabólica celular

A atividade metabólica celular foi determinada como parâmetro da viabilidade das células Caco-2 após exposição a *L. sakei* 1 e SLC de *L. sakei* 1, combinados ou não com inulina.

4.9.1 Obtenção de SLC de *L. sakei* 1 concentrado

Este ensaio foi preparado de acordo com Htwe *et al.* (2019) com modificações, para a concentração do SLC, a preparação original (denominada 1x SLC) foi seca em liofilizador de bancada (Liotop, L101, Brasil). Para isso, 1000 µL do SLC foi adicionado em microtubos de 2 mL, o tubo foi vedado com Parafilm®, que foi perfurado com uma agulha. Em seguida as amostras foram congeladas por 24h em freezer -70°C. Passado esse período, os tubos contendo as amostras em quintuplicadas foram adicionados em frascos do liofilizador com capacidade para 200 ml. As amostras permaneceram no liofilizador por 24h, até secarem completamente. As amostras foram retiradas do liofilizador e o pó foi ressuscitado, acertando o volume final para 100 µL.

4.9.2 Condições utilizadas no ensaio de atividade metabólica celular

Este ensaio foi preparado de acordo com informações de Abcam (2020), Radtke e Herbst-Kralovetz (2012) e Sharma *et al.* (2017). Para isso foram adicionados em microtubos, 10⁵ células Caco-2 em cultivo tridimensional (350µL), e estas foram lavadas com PBS para retirada de resíduos de antibióticos, e foi adicionado o meio DMEM sem antibióticos em quantidade suficiente para 625 µL de acordo com protocolos. Em seguida foram testadas as condições mostradas na Tabela 1, escolhidas com base em testes prévios de inibição de *L. monocytogenes*, conforme descrito no item 4.3, sendo que todos os volumes finais das condições foram corrigidos para o volume 825 µL:

Tabela 2- Condições utilizadas nos ensaios de atividade metabólica celular e citotoxicidade de Sobrenadante Livre de Células (SLC) de *Lactobacillus sakei* 1 e da cultura de *L. sakei* 1.

Condições	Adição de	Ajuste volume final meio DMEM
0,5x SLC	100 µL de 0,5x de SLC	100µL
1x SLC	100 µL de 1x de SLC	100µL
2x SLC	100 µL 2x de SLC	100µL
10x SLC	100 µL de 10x SLC	100µL
Inulina	100 µL de Inulina 1% (p/v)	100µL
<i>L. sakei</i> 1	100 µL <i>L. sakei</i> 1 (10^7 UFC/mL)	100µL
<i>L. sakei</i> 1 +Inulina	100 µL <i>L. sakei</i> 1 (10^7 UFC/mL) + 100 µL de Inulina 1% (p/v)	NA
0,5x SLC + Inulina	100 µL de 0,5x de SLC + 100 µL de Inulina 1%(p/v)	NA
1x SLC + Inulina	100 µL de 1x da concentração de SLC +100 µL de Inulina 1% (p/v)	NA
2x SLC +Inulina	100 µL de 2x de SLC +100 µL de Inulina 1% (p/v)	NA
10x SLC +Inulina	100 µL de 10x de SLC + 100 µL de Inulina 1% (p/v)	NA
Controle	Controle: Apenas células e meio DMEM sem presença de tratamento.	200µL
Branco	Branco: Apenas meio DMEM sem adição de células	200µL

Fonte: Dados do autor.

Condição branco foi necessária porque o meio DMEM tem vermelho de fenol e soro fetal bovino, que poderiam interferir na análise espectrofotométrica.

NA = Não Adicionado/meio DMEM foi adicionado para ajustar o volume final de cada concentração.

As células tratadas de acordo com as condições descritas na Tabela 1, foram incubadas a 37°C por 2 horas em atmosfera com 5% CO₂. Posteriormente, em cada microtubo foram adicionados 62,5 µL de solução 5mg/mL de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolium]}. A preparação foi incubada novamente a 37°C por 4 horas em atmosfera com 5% CO₂. A solução de MTT foi previamente preparada, pela dissolução de 5 mg/mL do reagente (Sigma-Aldrich) em PBS, e esterilização por filtração através de filtro 0,2 µm (Corning, EUA). A solução foi armazenada em recipiente esterilizado e protegido por luz, a 4 °C. Decorrido o período de incubação, os microtubos foram centrifugados a 3.000g por 5 minutos (Sorvall Biofuge Pico Centrifuge, Reino Unido), o sobrenadante foi removido e as células foram recuperadas.

Neste tipo de ensaio, a atividade metabólica é avaliada pela redução do MTT a cristais de formazana, pela ação de enzimas mitocondriais, e, por isso, foram adicionados 625 µL de DMSO para a solubilização dos cristais para leitura em espectrofotômetro a 570 nm (UV mini 1240-UV-VIS Spectrophotometer, Shimadzu, Japão).

Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e a porcentagem da atividade metabólica celular foi calculada como segue, de acordo com Radtke e Herbst-Kralovetz (2012):

$$\% \text{ Atividade metabólica} = \frac{\text{Absorbância corrigida}}{\text{Absorbância controle} - \text{Absorbância do branco}} \times 100, \text{ onde}$$

Absorbância corrigida

$$= \text{Média da leitura de absorbância de cada amostra} \\ - \text{Absorbância do branco}$$

4.10 Ensaios de Citotoxicidade

A citotoxicidade pode ser avaliada pelo ensaio com azul de tripano, que é um composto capaz de corar somente células mortas, pois células viáveis, que apresentam suas membranas intactas, excluem o corante de seu interior (STROBER, 2015). Para este ensaio, foram adicionadas em microtubos, 10⁵ células Caco-2 em cultura tridimensional (350µL), e estas foram lavadas com solução PBS para retirada de resíduos de antibióticos. A solução PBS foi removida e o volume completado para 250 µL com meio DMEM (sem antibiótico). Em seguida foram preparadas as mesmas condições do item 4.9.2, exceto pelo “branco”. Para a obtenção

do SLC 10x foi realizado o mesmo ensaio do item 4.9.1. Em seguida foi realizada a incubação a 37°C por 2 horas em atmosfera com 5% CO₂, posteriormente os microtubos foram centrifugados a 3000g por 5 minutos (Sorvall Biofuge Pico Centrifuge, Reino Unido), para a retirada do sobrenadante, retendo as células, que foram ressuspensas em 1 mL de solução PBS. Alíquotas de 100 µL dessa suspensão celular foram adicionados a outros microtubos, e a cada um deles também foram adicionados 100 µL de solução aquosa de 0,4% (p/v) de azul de tripano (Sigma, EUA). A incubação foi feita por 3 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi retirada uma gota de suspensão para contagem em câmara de Neubauer, computando as células viáveis (coradas de azul) e as células não viáveis (sem coloração). As contagens foram multiplicadas por dois, para corrigir para o fator de diluição do azul de tripano (DREYER *et al.*, 2019; MURINDA; RASHID; ROBERTS, 2003; STROBER, 2015).

Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes e o cálculo da porcentagem de células viáveis foi feito conforme segue:

$$\% \text{ Células viáveis} = \frac{\text{Células viáveis por mL}}{\text{Células totais por mL}} \times 100$$

4.11 Análises dos dados

Os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados finais foram submetidos à análise estatística, utilizando os testes ANOVA e Dunnet, considerando significativo P<0,05. Os dados foram analisados com GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

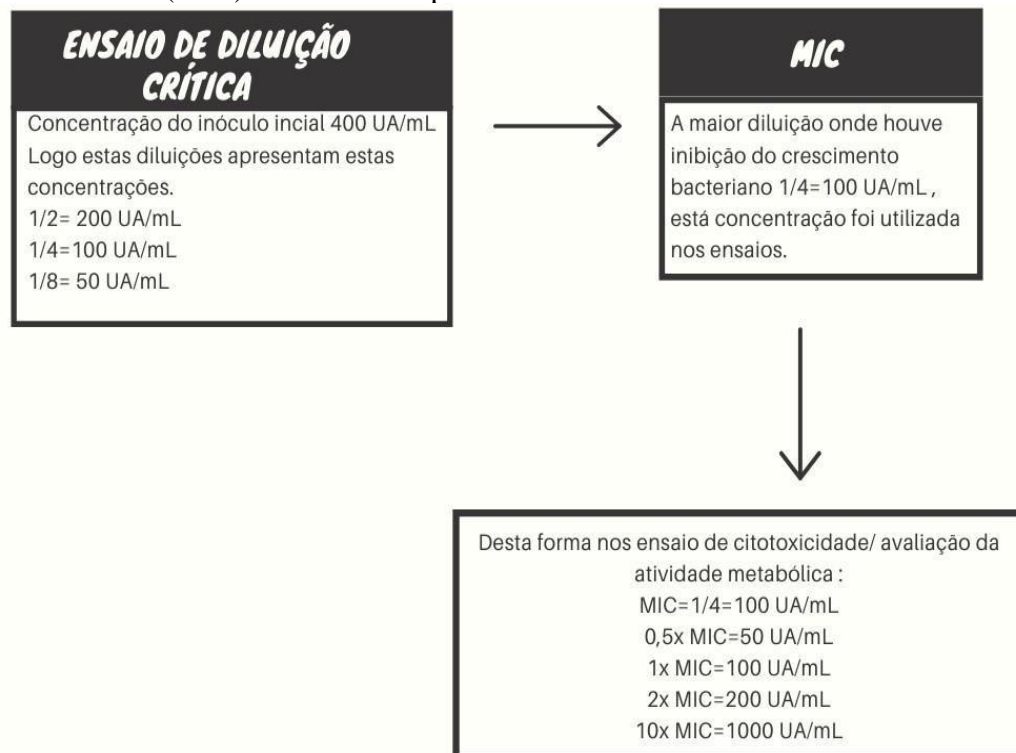
5. RESULTADOS

5.1 Ensaio de diluição crítica

O ensaio de diluição crítica foi realizado com o SLC de *L. sakei* 1 para quantificar a bacteriocina na preparação original do SLC (sem diluição), e utilizando *L. monocytogenes* como micro-organismo indicador como representado na figura 5. De acordo com os cálculos propostos por Mayr-Harting, Hedges e Berkeley (1972), a concentração da preparação original do SLC de *L. sakei* 1 foi de 400 UA/mL. Unidades arbitrárias por mL (UA/mL) são definidas considerando-se a recíproca da maior diluição onde há inibição de crescimento do micro-organismo indicador multiplicado por 100, para corrigir para um mililitro, considerando que foram depositados na placa para titulação, 10 microlitros de cada diluição do SLC testado, desta forma sabendo a concentração do inóculo inicial foi possível saber a concentração das outras diluições.

No ensaio de MIC a maior diluição onde houve a inibição do crescimento de *L. monocytogenes* foi $1/4 = 100$ UA/mL, sendo esta a concentração utilizada para a realização dos bioensaios realizados neste trabalho, desta forma nos ensaios de citotoxicidade e avaliação da atividade metabólica $0,5x = 50$ UA/mL, $1x = 100$ UA/mL, $2x = 200$ UA/mL e $10x = 1000$ UA/mL.

Figura 5. Representação gráfica dos ensaios de diluição crítica e concentração inibitória mínima (MIC) realizados no presente trabalho.



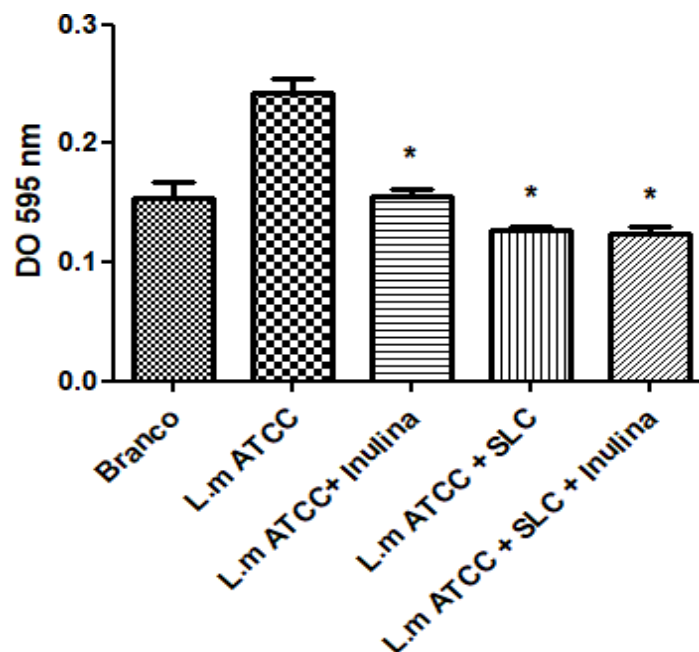
Fonte: O autor.

5.2 Avaliação da formação de biofilmes

Segundo a classificação de Stepanović *et al.* (2000), os resultados revelaram que *L. monocytogenes* apresentou capacidade de formar biofilmes, sendo classificada como fracamente aderente (Figura 6 e Apêndice A).

Após tratamento com o prebiótico inulina 1% (p/v), houve redução significativa ($P < 0,05$) da formação de biofilmes por *L. monocytogenes* (Figura 6 e Apêndice A), também classificada como fraca aderência. O tratamento com SLC de *L. sakei* 1 também diminuiu de forma significativa ($P < 0,05$) a formação de biofilmes por *L. monocytogenes* (Figura 6 e Apêndice A), e neste caso, a classificação foi “não aderente”. *L. monocytogenes* foi classificada como não aderente, quando foi utilizada a combinação de SLC de *L. sakei* 1 com inulina 1% (p/v), (Figura 6 e Apêndice A).

Figura 6. Quantificação da capacidade de formação de biofilme por *L. monocytogenes* em presença de SLC de *L. sakei* 1, do prebiótico inulina e de suas combinações, por meio de ensaio espectrofotométrico (595nm). Todos os resultados comparados com o controle preparado somente com *L. monocytogenes* ATCC 19115. * $p < 0,05$. L. m = *Listeria monocytogenes* ATCC 19115; SLC = Sobrenadante Livre de Células.



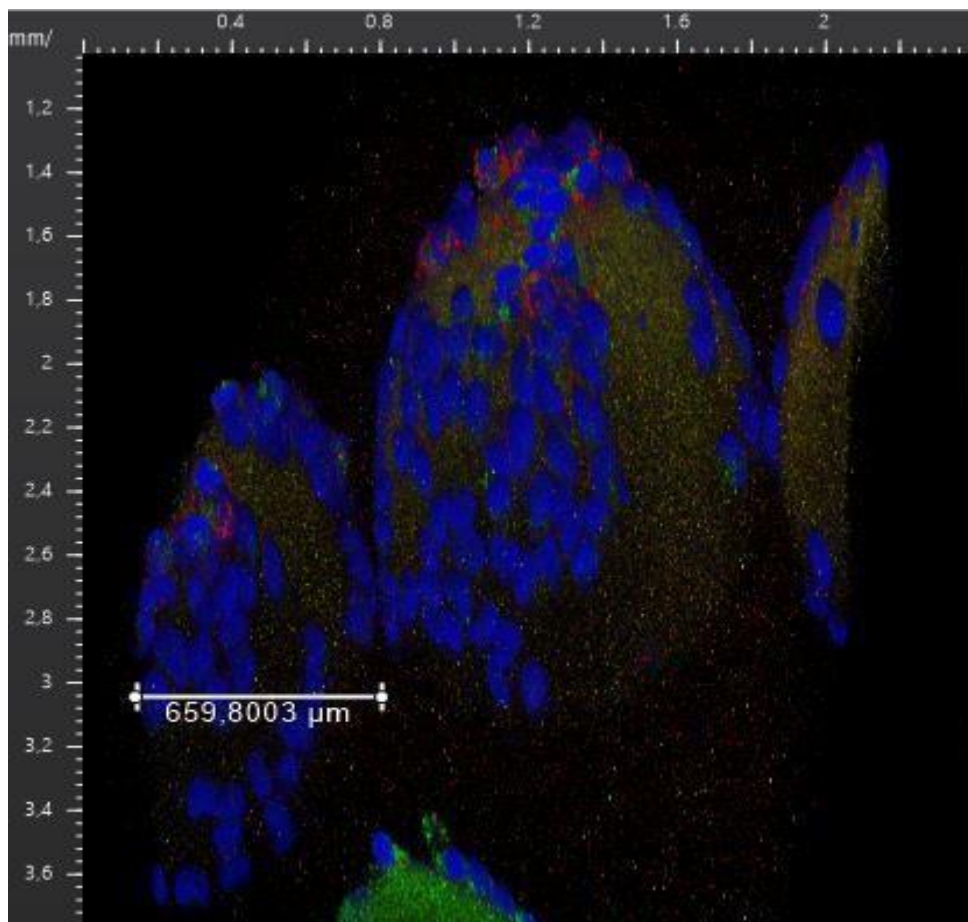
Fonte: Dados do autor.

5.3 Microscopia confocal de células Caco-2 3D

As Figuras 7 e 8 demonstram que as células epiteliais intestinais cultivadas por 21 dias em biorreator rotativo (STLV) atingiram alto grau de diferenciação, conforme revelado pelos corantes fluorescentes que coram estruturas celulares especializadas.

Os núcleos celulares foram corados em azul pelo corante DAPI. As áreas verdes fluorescentes foram coradas através do corante UEA1- FITC, indicando células produtoras de muco. As áreas em vermelho foram marcadas com Ezrina mAb e o anticorpo secundário AlexaFluor® 647, indicando áreas celulares de ligação gerais entre as proteínas da membrana plasmática e o citoesqueleto de actina.

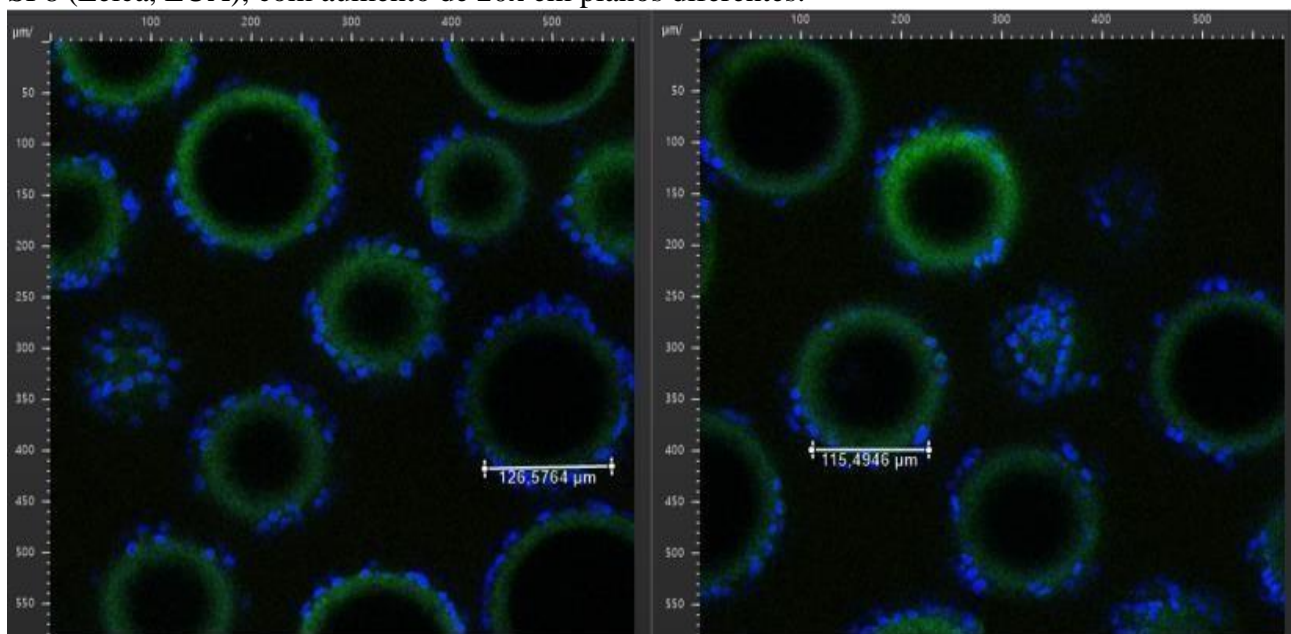
Figura 7. Microfotografia obtida com microscopia confocal a laser, de culturas de células Caco-2 crescidas em biorreator STLV Synthecon®, EUA e coradas com reagentes fluorescentes. Os núcleos celulares foram corados em azul por DAPI, regiões contendo mucina foram coradas de verde por UEA1-FITC e, em vermelho estão coradas as regiões com a proteína Ezrina (AlexaFluor® 647). Microscópio Leica TCS SP8 (Leica, EUA), com aumento de 63x.



Fonte: Dados do autor.

Figura 8. Microfotografias obtidas com Microscopia Confocal a laser, de culturas celulares Caco-2 crescidas em e biorreator STLV Synthecon®, EUA e coradas com reagentes

fluorescentes, indicando os núcleos celulares pelo corante DAPI apresentando coloração azul, a produção de muco pela coloração verde pelo corante UEA1-FITC. Microscópio Leica TCS SP8 (Leica, EUA), com aumento de 20x em planos diferentes.



Fonte: Dados do autor.

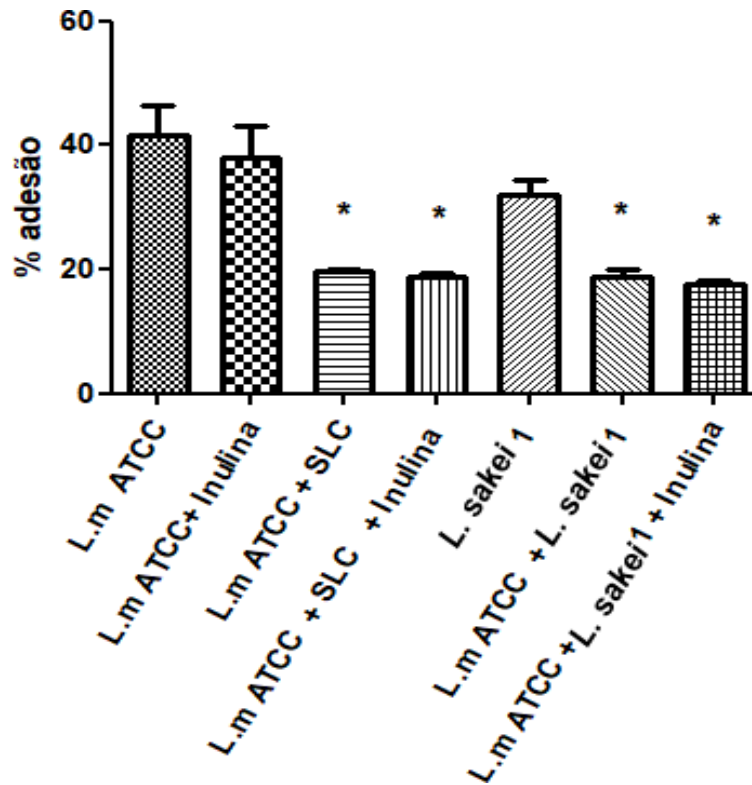
5.4 Ensaios de adesão

A Figura 9 e o Apêndice B mostram os resultados referentes aos testes de adesão bacteriana em células Caco-2. *L. monocytogenes* apresentou alta capacidade de adesão ($41,56\% \pm 8,4\%$), conforme mostrado no Apêndice B. Quando realizado tratamento como prebiótico (1% p/v), houve menor adesão de *L. monocytogenes* ($37,86\% \pm 8,9\%$), com uma diminuição de 3,7%, conforme mostrado na Figura 9, porém este resultado não foi significativo.

Na presença de SLC de *L. sakei* 1, houve diminuição significativa ($P < 0,05$) na adesão celular de *L. monocytogenes* ($19,59\% \pm 0,47\%$) a células Caco-2 em cultivo tridimensional, porém o tratamento com SLC de *L. sakei* 1 combinado com inulina foi ainda mais eficiente para inibir a adesão da bactéria, sendo que ao utilizar apenas o SLC houve uma diminuição de 21,97% e com o uso do SLC com a inulina a diminuição foi de 22,65% (Figura 9 e Apêndice B). *L. sakei* 1 também foi capaz de aderir às células 3D Caco-2 ($32,04\% \pm 4,2\%$), como mostrado no Apêndice B. Em co-cultura de *L. sakei* 1 com *L. monocytogenes*, combinada ou não com inulina, foi possível observar uma redução significativa da adesão do patógeno ($P < 0,05$), utilizando meio seletivo e diferencial para listeria, demonstrando um percentual de diminuição de 22,86% apenas ao utilizar co-cultura e uma diminuição de 24,1% ao utilizar a co-cultura com a inulina (Figura 9 e Apêndice B). No tratamento com SLC houve também redução expressiva ($P < 0,05$) na adesão de *L. monocytogenes* a células Caco-2 (Figura 9 e Apêndice B).

Figura 9. Porcentagem de adesão de *L. monocytogenes* ATCC 19115 em células Caco-

2 3D: na presença ou ausência de inulina; SLC de *L. sakei* 1; inulina e SLC de *L. sakei* 1; Co-cultura com *L. sakei* 1 (7 log UFC/mL); Co-cultura de *L. sakei* 1 com inulina. Está mostrado também o resultado do teste de adesão para a BAL *L. sakei* 1. Todas as variáveis foram comparadas com cepa padrão *L. monocytogenes* ATCC 19115 * $p < 0,05$. L.m ATCC = *L. monocytogenes* ATCC 19115; SLC = Sobrenadante Livre de Células.



Fonte: Dados do autor.

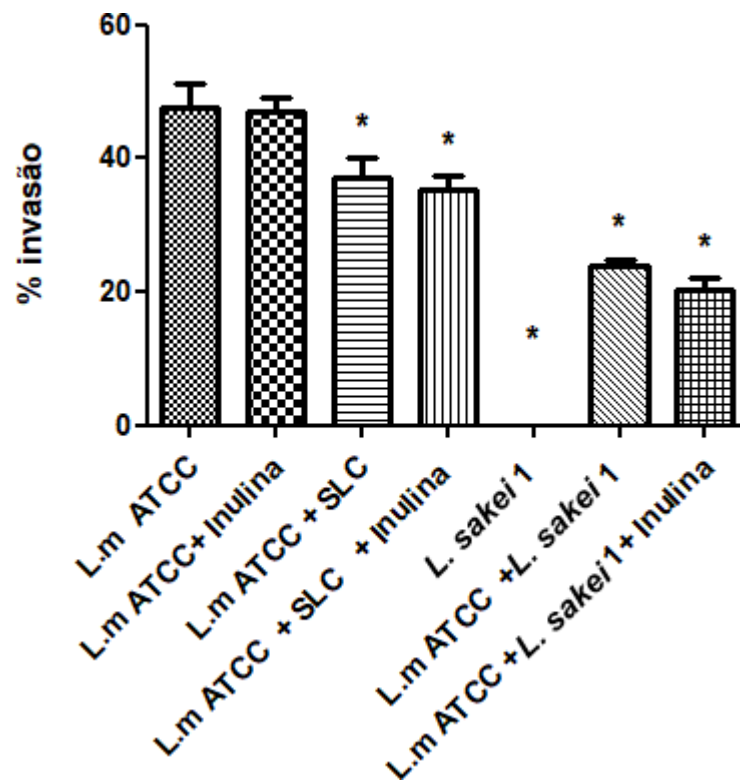
5.5 Ensaios de invasão

A Figura 10 e o Apêndice C mostram os resultados referentes aos testes de adesão bacteriana em células Caco-2. *L. monocytogenes* apresentou alta capacidade invasiva ($47,55\% \pm 6,06\%$), conforme mostrado no Apêndice C, mas a invasão celular do patógeno foi antagonizada pelo tratamento com inulina ($47,08\% \pm 3,55\%$), conforme mostrado na Figura 10 e Apêndice C.

Conforme mostra a Figura 10 e Apêndice C, houve também diminuição significativa ($P < 0,05$) da invasão de *L. monocytogenes* ($36,98\% \pm 5,59\%$) na presença de SLC de *L. sakei* 1 com inulina ($35,52\% \pm 3,51\%$) apresentando uma diminuição percentual de 12,23%. *L. sakei* 1, não foi capaz de invadir células Caco-2 em cultura tridimensional (Figura 10 e Apêndice C). Foi observado também que *L. monocytogenes* em co-cultura com *L. sakei* 1 apresentou menor capacidade de invadir as células eucarióticas ($P < 0,05$) ($23,81\% \pm 1,70\%$). A presença da cultura

de *L. sakei* 1 foi mais efetiva para antagonizar a invasão de *L. monocytogenes*, em comparação com os tratamentos com SLC. Além disso, quando foi adicionado o prebiótico inulina em co-cultura com *L. sakei* 1, a invasão de *L. monocytogenes* acélulas Caco-2 foi ainda menor ($20,2\% \pm 3,41\%$), sendo a melhor condição de inibição do patógeno ($P < 0,05$) (Figura 10 e Apêndice C).

Figura 10. Perfil de invasão de *L. monocytogenes* ATCC 19115 em células Caco-2 3D, e quando cultivada com inulina, SLC de *L. sakei* 1, inulina e SLC de *L. sakei* 1, co-cultura de *L. sakei* 1 ($7 \log$ UFC/mL) e com Co-cultura de *L. sakei* 1 com inulina e perfil de invasão de *L. sakei* 1. Todas as variáveis foram comparadas com condição padrão (controle) somente com *L. monocytogenes* ATCC 19115* $p < 0,05$. L.m ATCC = *L. monocytogenes* ATCC 19115; SLC= Sobrenadante Livre de Células.



Fonte: Dados do autor.

5.6 Avaliação da atividade metabólica celular (viabilidade)

Para avaliar o possível impacto do SLC sobre a viabilidade das células Caco-2 em cultivo tridimensional, foram quantificadas as células metabolicamente ativas pelo ensaio do MTT, que se baseia na avaliação da atividade de enzimas mitocondriais envolvidas na redução do sal tetrazólico (MTT), passando de coloração amarela para roxa (formação de cristais de formazana).

Foram testadas as concentrações da preparação de bacteriocina (s) de *L. sakei* 1

(contidas no SLC), conforme segue: 0,5x MIC=50 UA/mL, 1x MIC=100 UA/mL, 2x MIC=200 UA/mL e 10x MIC= 1000 UA/mL.

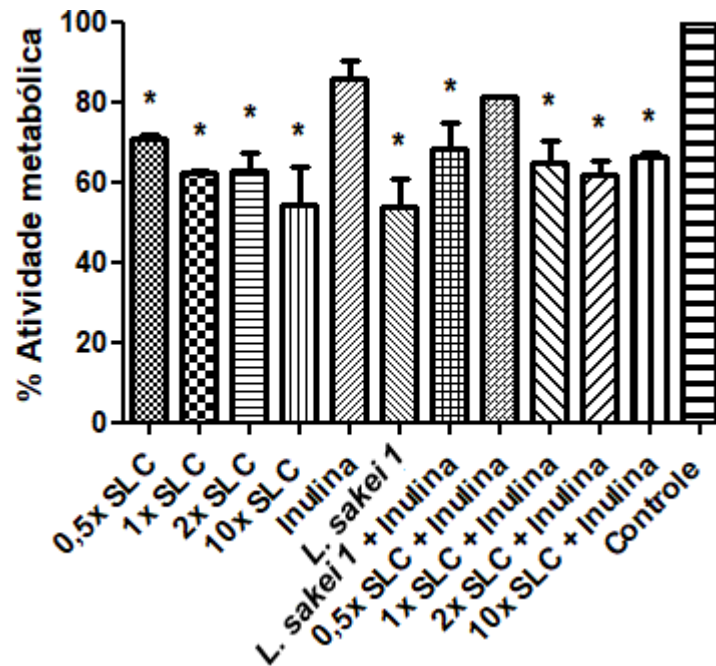
As células Caco-2 expostas ao SLC de *L. sakei* apresentaram uma diminuição significativa ($P<0,05$) na atividade metabólica em todas as condições testadas, em comparação com o controle sem tratamento (Figura 11 e Apêndice D), e foi ainda observado que a viabilidade celular diminuiu com o aumento da concentração de SLC, com variação de 54,43% a 70,95% de atividade metabólica remanescente após tratamento (Figura 11 e Apêndice D).

Com relação à atividade metabólica das células Caco-2 em cultivo tridimensional, quando expostas ao prebiótico inulina 1% (p/v), foi verificado o valor de 85,66% (Figura 11 e Apêndice D).

A atividade metabólica das células Caco-2 3D apresentou uma diminuição significativa ($P<0,05$) quando adicionado *L. sakei* 1 (10^7 UFC/mL), sendo de 53,97% em comparação com o controle (Figura 11 e Apêndice D). Contudo a presença de inulina juntamente com *L. sakei* 1, causou menor redução da atividade metabólica, que permaneceu em 68,34% (Figura 11).

Foi avaliada também a atividade metabólica das células Caco-2 3D na presença de SLC de *L. sakei* 1 combinado com inulina (Figuras 11). Foi observado que na presença de SLC e inulina, as células epiteliais mantiveram alta atividade metabólica, especialmente na menor concentração de SLC (50 UA/mL), com valor de 81,32%. Nas outras concentrações, os valores também foram altos, mas houve diminuição significativa ($P<0,05$) relativamente ao controle sem tratamento (Figura 11 e Apêndice D).

Figura 11. Perfil de atividade metabólica em células Caco-2 em cultivo tridimensional, medida com base no teste de MTT, na presença de diferentes concentrações de SLC de *L. sakei* 1 0,5x (50 UA/mL), 1x (100 UA/mL), 2x (200 UA/mL), 10x (1000 UA/mL), na em combinação ou não com o prebiótico inulina, e em co-inoculação com *L. sakei* 1 ($7 \log$ UFC/mL) e/ou inulina. Todas as variáveis foram comparadas com controle (células não tratadas) * $p<0,05$. 0,5x SLC=0,5x do MIC de sobrenadante livre de células; 1x SLC = 1x o MIC de sobrenadante livre de células; 2x SLC= 2x o MIC do sobrenadante livre de células; 10x SLC= 10x o MIC do sobrenadante livre de células.



Fonte: Dados do autor.

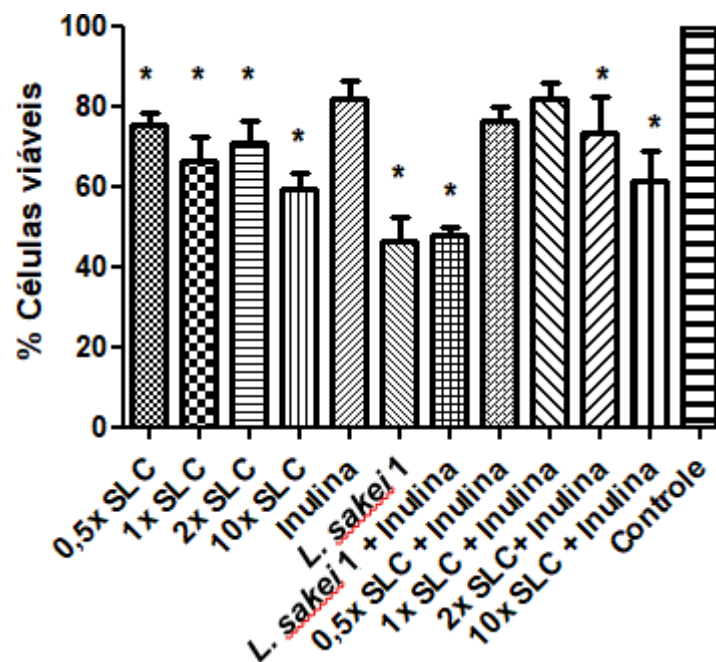
5.7 Avaliação da citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade foi realizada através de ensaio de exclusão do corante azul de tripano, pois células com membranas intactas são capazes de excluir o corante, enquanto que células com danos nas membranas incluem o corante e ficam com o citoplasma corado de azul, desta forma células com danos nas membranas se coram de azul e células sem danos não apresentam a coloração em azul, pois o corante não consegue penetrar e entrar para o citoplasma destas células permanecendo intactas. Foram testadas diferentes concentrações do SLC de *L. sakei 1*, a saber: 50, 100, 200 UA/mL e 1000 UA/mL, e em todas as condições a viabilidade das células Caco-2 ficou acima de 50%. Entretanto, houve diminuição significativa em relação ao controle não exposto a SLC (Figura 12) com aumento de citotoxicidade diretamente proporcional ao aumento das concentrações de SLC. O maior valor de viabilidade celular (75,53%) foi obtido para a menor concentração de SLC testada (50 UA/mL), conforme mostrado no (Apêndice E).

No tratamento de células Caco-2 em cultura tridimensional com o prebiótico inulina, não houve diferença significativa em comparação com o controle (82,01%) (Figura 12, Apêndice E). Por outro lado, a exposição de células Caco-2 3D a *L. sakei 1* diminuiu significativamente ($P < 0,05$) a viabilidade celular ($46,45\% \pm 13,33$), independentemente da combinação com inulina ($48,00\% \pm 3,46$), conforme mostrado no Apêndice E e Figura 12.

As células Caco-2 em cultura tridimensional também foram expostas a diferentes concentrações de SLC de *L. sakei* 1, em combinação com inulina (Figura 12). Neste caso, houve aumento da viabilidade celular, em comparação com o tratamento apenas com SLC (Figura 12). Nas menores concentrações de SLC utilizadas (50 UA/mL e 100 UA/mL), combinadas com inulina, houve maiores viabilidades celulares (respectivamente apresentaram 76,55% e 81,83%) sem diferença significativa em relação ao controle não tratado ($P < 0,05$).

Figura 12. Quantificação de células Caco-2 3D viáveis, na presença ou ausência do prebiótico inulina 1% (p/v), e de diferentes concentrações de SLC de *L. sakei* 1 0,5x (50 UA/mL), 1x (100 UA/mL), 2x (200 UA/mL), 10x (1000 UA/mL). Também foi avaliado perfil de citotoxicidade na presença da bactéria *L. sakei* 1 (7 log UFC/mL) e/ou com inulina. Todas as variáveis foram comparadas com controle (células não tratadas) $*p < 0,05$. 0,5x SLC=0,5x do MIC de sobrenadante livre de células; 1x SLC = 1x o MIC de sobrenadante livre de células; 2x SLC= 2x o MIC do sobrenadante livre de células; 10x SLC= 10x o MIC do sobrenadante livre de células.



Fonte: Dados do autor.

6 DISCUSSÃO

A capacidade de formação de biofilmes, de adesão e invasão celulares são fatores de virulência importantes para o processo de infecção de *L. monocytogenes*, e a obtenção de compostos seguros e eficazes para antagonizar a ação do patógeno são de extrema importância. Um dos compostos testados neste trabalho foi o prebiótico inulina, a 1%, que é uma concentração amplamente recomendada na literatura para esses tipos de bioensaios (ALTAMIMI; ABDELHAY; RASTALL, 2016; CHEN *et al.*, 2017; DI LODOVICO *et al.*, 2021; MÄKELÄINEN *et al.*, 2010; SALLI *et al.*, 2020; SHOAIIB *et al.*, 2016). Ainda, essa concentração de ensaio escolhida foi baseada na ingestão diária *per capita* média de inulina nos EUA, que é de 1-4 gramas Coussement (1999), enquanto que no Brasil não há estimativas sobre o consumo deste composto.

Foi testado também neste trabalho o SLC de *L. sakei* 1, que corresponde a uma preparação bruta de bacteriocinas, com título determinado pelo teste clássico de diluição crítica. Os resultados mostraram uma atividade de 400 UA/mL no extrato obtido, medida frente ao indicador *L. monocytogenes*. Esses dados estão de acordo com Winkelströter e De Martinis (2013) que encontraram atividade semelhante na preparação bruta desta bacteriocina de *L. sakei* 1, e também com Martinez e De Martinis (2005), que no teste de diluição crítica de SLC de *L. sakei* 1 frente a uma outra linhagem de *L. monocytogenes* (IAL 633, sorotipo 1/2a), obtiveram resultados entre 377 e 1067 AU/mL, em temperaturas de 8°C e 15 °C, por até 10 dias. No presente trabalho, a partir do ensaio de diluição crítica, a concentração escolhida para os testes posteriores foi de 100 UA/mL, que correspondia à maior diluição onde houve inibição do crescimento de *L. monocytogenes*. É desejável o uso das menores concentrações de bacteriocinas que apresentem efetividade na inibição do patógeno, a fim de minimizar a possível toxicidade desses peptídeos antimicrobianos frente a células eucarióticas, além de ser vantajoso do ponto de vista econômico, pensando em uma futura aplicação biotecnológica. Neste trabalho foi também verificado que *L. monocytogenes* ATCC 19115 apresentou capacidade de formar biofilmes (Figura 6), em concordância com resultados anteriores (KADAM *et al.*, 2013; MIAO *et al.*, 2019; WINKELSTRÖTER *et al.*, 2011). Ademais, foi demonstrado que *L. monocytogenes* ATCC 19115 era fraca formadora de biofilme, segundo os critérios de Stepanović *et al.* (2000).

Estes dados de formação de biofilmes também estão de acordo com Doijad *et al.* (2015) que relataram que de 98 isolados de *L. monocytogenes* testados, 62% apresentaram fraca capacidade de formação de biofilmes. Resultados semelhantes também foram publicados por

Rodrigues *et al.* (2010), que analisaram seis isolados de *L. monocytogenes* obtido de mesas de aço inoxidável, e encontraram que todos apresentaram fraca capacidade de formação de biofilmes, Ainda, Franciosa *et al.* (2009) ao realizarem a análise de 74 isolados de origem clínica, verificaram que 28 deles eram os fracos formadores de biofilmes. A cepa de *L. monocytogenes* ATCC 19115 é de origem clínica humana e pertence ao sorotipo 4b, o que condiz com sua fraca capacidade de formação de biofilmes. Geralmente, linhagens ambientais de *L. monocytogenes* são mais fortes formadoras de biofilmes, conforme demonstrado por Romanova *et al.* (2007), que reportaram que cepas de *L. monocytogenes* do sorotipo 4b apresentaram menor capacidade de formação de biofilmes em comparação a cepas do sorotipo 1. Além disso, Barbosa *et al.* (2013) analisaram 725 cepas de *L. monocytogenes* de diversas origens, relatando que das 118 cepas de origem clínica, 70% apresentaram fraca capacidade de formação de biofilmes.

Cabe ainda destacar que *L. monocytogenes* é amplamente utilizada em bioensaios, pois suas características genóticas e fenotípicas clássicas são bem determinadas, e possui capacidade de secretar hemolisina, que é um fator de virulência chave nesta espécie bacteriana (ERDENLIG; AINSWORTH; AUSTIN, 2000; JARADAT; BHUNIA, 2003a; LI *et al.*, 2021; MIAO *et al.*, 2019).

No presente estudo foi observado que a utilização do prebiótico inulina diminuiu significativamente ($P < 0,05$) a formação de biofilmes por *L. monocytogenes* em superfície abiótica (poliestireno) (Figura 6 e Apêndice A). Em outros trabalhos também foi observada a influência de prebióticos nesta característica fenotípica, como relatado por Zhang *et al.* (2018) para biofilmes formados por *Staphylococcus aureus*. Ainda, Piotrowski *et al.* (2019) estudaram dois diferentes prebióticos (fruto-oligossacarídeos e manose) e relataram que houve diminuição na capacidade de formação de biofilmes por *Clostridium difficile* 630 e *C. difficile* M120.

Ackerman *et al.* (2018) também relataram que oligossacarídeos do leite humano (HMOs), um importante prebiótico da primeira infância, apresentaram atividade contra biofilmes de *Streptococcus agalactiae* e *S. aureus* resistente à meticilina. Por outro lado, Ortega-González *et al.* (2014) relataram que inulina estimulou a formação de biofilmes por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Uma hipótese para a modulação da formação de biofilmes por prebióticos e a alteração do metabolismo bacteriano é sua interferência em processos de comunicação bacteriana, por meio de quorum sensing (ACKERMAN *et al.*, 2018). Em estudos de transcriptômica de *P.*

aeruginosa frente a utilização de fruto-oligossacarídeo derivado de inulina, Rubio-Gómez *et al.* (2020) observaram que a utilização de prebiótico diminuiu a secreção do sistema de secreção tipo IV da bactéria, sendo este frequentemente associado à formação de biofilmes.

Na presença do SLC de *L. sakei* 1, *L. monocytogenes* apresentou uma grande diminuição na formação de biofilmes (Figura 6 e Apêndice A), e resultado semelhante foi relatado por Todorov *et al.* (2018), que demonstraram que a formação de biofilme por *L. monocytogenes* foi inibida pelo SLC de *L. plantarum* ST8SH. Também Camargo *et al.* (2016) observaram redução significativa na formação de biofilmes por oito isolados de *L. monocytogenes* pela ação de BAL. Resultado semelhante foi obtido por Singh *et al.* (2020) onde três diferentes preparações de SLC de *L. plantarum* e SLC de *Lactobacillus fermentum* apresentaram capacidade de diminuir a formação de biofilmes por *L. monocytogenes*. Os resultados do presente trabalho estão ainda de acordo com Wasfi *et al.* (2018), que demonstraram que o SLC de *Lactobacillus salivarius* causou redução na aderência de *Streptococcus mutans*.

Os compostos inibitórios produzidos por BAL podem ter atividade bactericida ou bacteriostática, além de impedir a fixação ou favorecer o descolamento de células e estruturas de biofilmes (RENDUELES; GHIGO, 2012). O efeito de SLC frente a biofilmes pode ser atribuído à presença de uma mistura de peptídeos antimicrobianos, ou ainda a metabólitos antimicrobianos de baixo peso molecular, como por exemplo, peróxido de hidrogênio. Também já foi identificada em outros trabalhos a regulação negativa de genes relacionados com a formação de biofilmes causada por SLC de BAL frente a outros isolados bacterianos (MATSUDA *et al.*, 2018; SRIVASTAVA *et al.*, 2020; TAN *et al.*, 2018).

Neste trabalho, a formação de biofilmes por *L. monocytogenes* apresentou uma diminuição significativa com a utilização do SLC de *L. sakei* 1 combinado com inulina (Figura 6 e Apêndice A), sendo está a condição testada que promoveu maior redução na formação de biofilme por *L. monocytogenes*.

De Marco *et al.* (2017) estudaram a atividade antibiofilme do SLC de *Lactobacillus casei* com a presença dos prebióticos inulina, fruto-oligossacarídeo e isomaltose, frente a isolados de *E. coli* e *S. aureus*, e somente foram obtidas reduções na formação de biofilmes com a presença dos prebióticos. Também Tabashsum *et al.* (2019) observaram que na combinação de SLC de *L. casei* com produtos semelhantes a prebióticos de extratos fenólicos de bagaço de babaçu, houve uma redução na formação de biofilme por *E. coli* entero hemorrágica.

De modo semelhante, neste trabalho, a utilização do prebiótico inulina combinada com SLC de *L. sakei* 1 promoveu a inibição mais eficiente da formação de biofilmes por *L. monocytogenes*. Esses resultados indicando a potencialização da ação do SLC por inulina, e corroboram com os achados de Sakr e Massoud (2021). Aqueles autores também observaram que a combinação de SLCs de BAL com prebióticos, tiveram ação antibiofilme potencializada. Um exemplo foi o uso de SLC de *Lactobacillus pentosus* 14FE em combinação com rebaudiosídeo, para inibir a ação antibiofilme do SLC frente a *S. aureus* (SAKR ; MASSOUD, 2021).

Na presente pesquisa foram realizados ensaios de adesão e invasão celular por *L. monocytogenes*, bem como para avaliação da citotoxicidade de diferentes preparações derivadas de bactérias lácticas, foram utilizadas células Caco-2 3D obtidas através do biorreator STLIV. Como demonstrado nas Figuras 7 e 8, os núcleos celulares foram corados com o DAPI apresentando coloração azul, as regiões com produção de muco apresentaram coloração verde de acordo com a imunomarcagem de UEA1-FITC, e em vermelho foi feita as junções celulares foram marcadas com anticorpos primários anti-ezrina combinados com o fluoróforo AlexaFluor® 647. Desse modo, as análises por microscopia confocal a laser evidenciaram diferenciação celular sugestiva de estrutura tridimensional, em concordância com a literatura, pois o crescimento das células eucarióticas neste tipo de biorreator ocorre em baixo cisalhamento, que mimetiza condições *in vivo* (RADTKE; HERBST-KRALOVETZ, 2012).

Neste estudo foi demonstrado que *L. monocytogenes* aderiu às células Caco-2 3D (Figura 9 e Apêndice B), corroborando dados de Medeiros *et al.* (2021), que comprovaram a capacidade de adesão de 25 isolados de *L. monocytogenes* de diferentes fontes, em cultura de células Caco-2 3D obtidas através de biorreator STLIV. Esses dados são bastante importantes, pois o primeiro passo na infecção por *L. monocytogenes* é a adesão e a invasão de células epiteliais do intestino, tornando possível a disseminação da bactéria a partir do local primário de infecção (MARINI *et al.*, 2018; VAZQUEZ-ARMENTA *et al.*, 2020).

Na literatura, há ainda outros dados referentes a ensaios de adesão por *L. monocytogenes* em células Caco-2, mas em cultura bidimensional. Jaradat e Bhunia (2003) demonstraram a capacidade de adesão de *L. monocytogenes* ATCC 19115 a células Caco-2 em cultivo clássico em 2D, bem como para outras 24 cepas de *L. monocytogenes* pertencentes a 13 sorotipos diversos. Zhu *et al.* (2018) também verificaram a adesão de cinco estirpes de *L. monocytogenes* (F4244, ATCC 43257, ATCC 15313 e 10403S), em células Caco-2 em cultivo bidimensional. Resultados semelhantes referentes à adesão do patógeno em células Caco-2

cultivadas em modelo 2D foram relatados ainda por outros autores (BOTES *et al.*, 2008; CASTELLANO *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2015).

Outro parâmetro avaliado no presente trabalho foi o possível efeito do tratamento com o prebiótico inulina na adesão de *L. monocytogenes* a células Caco-2, mas os resultados demonstraram que não houve alteração estatisticamente significativa (Figura 9 e Apêndice B). O efeito da presença de prebióticos na adesão bacteriana a células eucarióticas ainda são controversos, sendo relatado por Ebersbach *et al.* (2012) demonstraram que não houve efeito significativo na adesão de isolados de *L. monocytogenes* (7291, 4446 e Scott A) a células Caco-2 em 2D, na presença xilo-oligossacarídeos. Contudo, aqueles autores relataram que houve diminuição significativa na adesão de *L. monocytogenes* 4446 a células Caco-2 na presença de galacto-oligossacarídeos, inulina, polidextrose.

No estudo de Laparra *et al.* (2013) foi verificado que *L. monocytogenes* CECT 935 não aderiu significativamente a mucina na presença de galacto-oligossacarídeos. Piotrowski *et al.* (2019) demonstraram que o uso de celobiose e inulina apresentou menor eficácia na inibição da adesão de *C. difficile* em 2D de células HT-29, em comparação com manose e rafinose.

Em relação à possível influência de prebióticos em fatores de virulência bacteriana, especificamente sobre a capacidade de adesão a células eucarióticas, o estudo de proteômica feito por Comerlato *et al.* (2020) com *Enterococcus durans* LAB18S, revelou que na presença de galacto-oligossacarídeo houve maior expressão de proteínas bacterianas relacionadas à divisão celular (divIVA, EF-tu) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Entretanto, Coppa *et al.* (1999) descreveram que duas frações específicas de oligossacarídeos de leite humano foram capazes de inibir a adesão de *L. monocytogenes* ATCC 43249 a células Caco-2.

É possível que os prebióticos apresentem efeito direto sobre patógenos no trato gastrointestinal e já foi sugerido que os prebióticos podem antagonizar a adesão, atuando como receptores para os patógenos, que ficariam aderidos aos prebióticos e não conseguiriam aderir e invadir as células eucarióticas, representando assim uma barreira contra os patógenos. Contudo, foram observadas diferenças na inibição da adesão entre vários prebióticos, que podem ser atribuídas à diversidade de estruturas químicas e também diferenças entre os diversos patógenos (ALTAMIMI; ABDELHAY; RASTALL, 2016; CHEN *et al.*, 2017; KUNZ *et al.*, 2003; SHOAIB *et al.*, 2016).

Outro aspecto estudado neste trabalho foi a capacidade de adesão de *L. monocytogenes* em células Caco-2 3D, na presença de preparações contendo peptídeos antimicrobianos (SLC

de *L. sakei* 1), e foi observada inibição da adesão bacteriana nesta condição (Figura 9 e Apêndice B). Efeito semelhante foi demonstrado por Gomes *et al.* (2012) que observaram que o SLC de *L. sakei* 1 diminuiu a adesão de *L. monocytogenes* em células Caco-2 cultivadas em modelo 2D. Outros trabalhos demonstraram a capacidade de SLCs de bactérias lácticas para inibir a adesão de *L. monocytogenes* a células eucarióticas. Neste sentido, Lim e Im (2012) demonstraram a inibição da adesão de *L. monocytogenes* em 2D de célula HT-29 pelo SLC de *Lactobacillus brevis* MLK 27. Também Castellano *et al.* (2018) observaram que os SLCs de *Lactobacillus curvatus* CRL 705, CRL 1532, CRL 1533 e de SLC de *L. sakei* CRL 1613 inibiram a adesão de *L. monocytogenes* a células Caco-2 em cultivo bidimensional. Ainda, Nagarajan *et al.* (2019) observaram que SLCs de *L. plantarum* (LP, ATCC39542) e *L. plantarum* (LP, ATCC39542) fago resistente (mutante) foram capazes de diminuir a adesão celular de *L. monocytogenes* de forma significativa estatisticamente.

Uma hipótese para a ação do SLC de *L. sakei* 1 na redução da adesão de *L. monocytogenes* a células intestinais é que as bacteriocinas presentes no SLC alterem estrutura da membrana celular bacteriana, interferindo com o processo de adesão (CASTELLANO *et al.*, 2018; ENNAHAR *et al.*, 2000; NAGARAJAN *et al.*, 2019).

Foi observado ainda no presente trabalho, que o uso do prebiótico inulina em combinação com o SLC de *L. sakei* 1 diminuiu a adesão de *L. monocytogenes* às células Caco-2 3D (Figura 9 e Apêndice B), em comparação com o uso do SLC isoladamente. Há poucos estudos relacionados com o uso de SLCs de BALs combinados com prebióticos em relação à adesão de bactérias patogênicas a células epiteliais intestinais. De Marco *et al.* (2017) demonstraram que SLC de *L. casei* na presença de inulina diminuiu significativamente a adesão de *E. coli* em células HT-29 cultivadas em modelo 2D. Aqueles autores relataram ainda uma menor adesão de *S. aureus* em células HT-29 na presença de SLC de *Lactobacillus reuteri* e inulina, corroborando os achados do presente trabalho.

Na literatura, alguns outros autores relataram a efetividade da ação combinada de bacteriocinas e de inulina para inibição de bactérias indesejáveis. Likotrafiti *et al.* (2013) relataram que menores taxas de crescimento de *E. coli* O157: H7 NCTC 12900 (VT⁻) e *E. coli* O86 NCTC 8621 enteropatogênica (ambos isolados de fezes humanas) na presença de SLC de *L. fermentum* 907 ou de *Bifidobacterium longum* 1011, combinados com fruto-oligosacarídeos de cadeia curta. Além disso, aqueles autores observaram que o uso de SLC de *B. longum* combinado com galacto-oligosacarídeo diminuiu as taxas de crescimento de *E. coli*.

Outro relato do uso combinado de prebióticos e SLC de BAL foi apresentado por Brink *et al.* (2006), que observaram que SLCs de *L. plantarum*, *L. casei* e *L. salivarius* combinados com fruto-oligosacarídeo apresentaram inibir o crescimento de *Clostridium tyrobutiricum*. O mecanismo de inibição pode ser devido à formação de metabólitos derivados da fermentação, pois Mahmoudi *et al.* (2017) demonstraram que 20 cepas de BAL estudadas foram capazes de fermentar fruto-oligosacarídeo e lactulose.

Desse modo, é possível que a ação de prebióticos na inibição da adesão bacteriana a células epiteliais seja potencializada pela ação de bacteriocinas e de outros produtos de fermentação bacteriana (CHEN *et al.*, 2017; MONTEAGUDO-MERA *et al.*, 2019).

Por outro lado, neste trabalho foi também demonstrada a capacidade de *L. sakei* 1 aderir às células Caco-2 tridimensionais, o que é condizente com a literatura, que tem resultados sobre células eucarióticas em cultivo bidimensional. Singh *et al.* (2017) demonstraram que oito cepas de *L. reuteri* aderiram a células Caco-2, e resultados semelhantes foram obtidos por Sophatha; Piwat e Teanpaisan (2020), ao analisarem *Lactobacillus paracasei* SD1, *L. fermentum* SD7, *Lactobacillus rhamnosus* SD4 e *L. rhamnosus* SD11.

Em outro trabalho, realizado por Song *et al.* (2015) foi demonstrado que *L. sakei* CH8 e *L. sakei* MA9 apresentaram alta capacidade de adesão a células intestinais da linhagem HT-29. Dados mais recentes de Won *et al.* (2020) também reafirmam a significativa adesão de *L. sakei* (linhagem ADM14) a células Caco-2 em cultivo em 2D. No caso das BAL, a capacidade de adesão celular é uma característica benéfica, tendo em vista a possibilidade de representar um mecanismo de exclusão competitiva frente a patógenos (CAMMAROTA *et al.*, 2009; MORELLI, 2007; SINGH *et al.*, 2020). Neste sentido, foi observado neste trabalho que *L. sakei* 1 inibiu a adesão de *L. monocytogenes* a células Caco-2 em cultivo tridimensional.

De acordo com Ortiz *et al.* (2014) a co-cultura de *L. monocytogenes* com *L. fermentum* e *L. rhamnosus* correlacionou-se com uma menor capacidade de adesão do patógeno a células epiteliais vaginais. Efeito semelhante foi relatado por Iglesias *et al.* (2017), com menor adesão de *L. monocytogenes* a células Caco-2 quando o patógeno foi previamente exposto a condições gastrointestinais *in vitro*, na presença de *L. rhamnosus* GG. Também Singh *et al.* (2017) demonstraram que *L. reuteri* LR5, LR6, LR9, LR20, LR34 inibiram a adesão de *L. monocytogenes* a células Caco-2 2D, corroborando dados de Lim e Im (2012), sobre a adesão do patógeno co-cultivado com *L. brevis* MLK27a.

Desse modo, acredita-se que as BAL possam inibir a adesão celular de patógenos, por dois mecanismos: (i) competição por receptores celulares, e (ii) produção de compostos

antimicrobianos, tais como os ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (MATHIPA; THANTSHA; BHUNIA, 2019; ORTIZ *et al.*, 2014).

É possível que BAL e prebióticos utilizados em conjunto tenham efeito potencializado na inibição da adesão de patógenos a células eucarióticas, pois foi observado no presente trabalho que a combinação de inulina e *L. sakei* 1 foi mais eficiente para antagonizar a adesão de *L. monocytogenes* em células Caco-2 em cultivo tridimensional, em comparação com cada tratamento isoladamente (Apêndice B). Corroborando esses achados, Kariyawasam *et al.* (2020) relataram que houve menor adesão de *L. monocytogenes* a células HT-29 na presença de fruto-oligossacarídeos e *L. brevis* ATCC 14869, bem como *L. brevis* KU200019. Além disso, há trabalhos que demonstram que o crescimento de BAL, bem como sua adesão a células eucarióticas são favorecidos por prebióticos (MONTEAGUDO-MERA *et al.*, 2019), o que poderia indicar um estímulo para a exclusão competitiva. Neste sentido, Celebioglu *et al.* (2016) demonstraram que a rafinose contribuiu para aumentar a adesão de *Lactobacillus acidophilus* NCFM a células epiteliais HT-29, e efeito semelhante foi observado por Pan, Kumaree e Shah (2017) para *L. paracasei* e celobiose, em experimentos com células Caco-2. Já, Kavanaugh *et al.* (2013) relataram que a adesão de *B. longum* subsp. *infantis* em células Caco-2 foi favorecida pela presença de oligossacarídeos de leite, e efeitos concordantes ainda foram obtidos por Sophian *et al.* (2019) para *L. plantarum* em combinação inulina.

No que tange à capacidade de invasão de células Caco-2 em cultivo tridimensional, nossos resultados com *L. monocytogenes* corroboram Medeiros *et al.* (2021), que demonstraram a capacidade de invasão de todas as linhagens de *Listeria* estudadas no mesmo modelo celular. Trabalhos anteriores com culturas de células Caco-2 em 2D também demonstraram a capacidade de invasão por *L. monocytogenes*. Marini *et al.* (2018) relataram a alta capacidade invasiva de oito cepas de *L. monocytogenes* de origem clínica, enquanto que Zilelidou *et al.* (2015) reportaram que cinco dentre 31 cepas de *L. monocytogenes* eram invasivas (ScottA (origem de infecção humana), C5 (origem animal), PL25 (origem animal), 6179 (origem de alimento queijo). Em células cardíacas também há relato de invasão por *L. monocytogenes* 07PF0776, conforme trabalho de McMullen e Freitag (2015).

É bem definido que a infecção por *L. monocytogenes* depende de fatores de virulência para sua internalização na célula, sobrevivência em macrófagos e replicação em células epiteliais. Em seguida, ocorre ampla disseminação no hospedeiro suscetível, passando abarreira hematoencefálica e a placenta (KÜHBACHER *et al.*, 2018; PIZARRO-CERDÁ *et al.*, 2016; PIZARRO-CERDÁ; KÜHBACHER; COSSART, 2012).

Foi observado neste trabalho que a capacidade de *L. monocytogenes* invadir células Caco-2 3D não foi significativamente alterada pelo prebiótico inulina (Figura 10 e Apêndice C). Esse resultado concorda com Ebersbach (2012) que obteve resultados semelhantes para *L. monocytogenes* em células Caco-2 em 2D, na presença dos prebióticos inulina, galacto-oligossacarídeo e polidextrose, com exceção para xilo-oligossacarídeo, que causou a diminuição significativa da invasão. Chen *et al.* (2017) demonstraram em seus estudos com mananoligossacarídeo, inulina e oligossacarídeos do leite humano, que apenas os oligossacarídeos do leite humano antagonizaram a invasão de células Caco-2 2D por *L. monocytogenes*.

Entretanto, há estudos sobre a interferência de prebióticos na capacidade de invasão de alguns outros patógenos. Ganan *et al.* (2010) relataram que houve menos invasão de células Caco-2 por *Campylobacter jejuni* com o uso de oligossacarídeos pécticos. Também Gonia *et al.* (2015) relataram que oligossacarídeos do leite materno quando adicionados *in vitro* antes da formação de hifas foram capazes de inibir a invasão a células epiteliais humanas prematuras por *Candida albicans*.

O efeito dos prebióticos na adesão e invasão bacteriana a células eucarióticas é ainda controverso, havendo a hipótese da inibição dessas etapas pelo bloqueio da ligação dos patógenos a receptores celulares, embora não haja consenso sobre esse mecanismo (CHEN *et al.*, 2017; EBERSBACH *et al.*, 2012; LICHT; EBERSBACH; FRØKIÆR, 2012; QUINTERO *et al.*, 2011).

Neste trabalho foi também observada a ação de metabólitos de *L. sakei* 1 (SLC) na invasão de *L. monocytogenes* a células Caco-2 (Figura 10 e Apêndice C), em concordância com estudos anteriores que relataram a influência de SLC de BALs na invasão de células Caco-2 por bactérias patogênicas. Gomes *et al.* (2012) demonstraram a menor invasão em células Caco-2 2D por *L. monocytogenes* na presença de SLC de *L. sakei* 1, enquanto que Castellano *et al.* (2018) observaram a redução da invasão de *L. monocytogenes* FBUNT na presença dos SLCs de *L. curvatus* (CRL705, CRL 1532, CRL1533) e de *L. sakei* CRL1613, em células Caco-2 2D. Corroborando esses resultados, Botes *et al.* (2008) demonstraram uma diminuição na invasão de células Caco-2 por *L. monocytogenes* Scott A, na presença de SLCs de *Enterococcus mundtii* ST4SA e *L. plantarum* 423.

É provável que a ação do SLC de *L. sakei* 1 na diminuição da invasão celular de *L. monocytogenes* seja devida à presença de peptídeos com ação antilisteriana, que podem afetar diretamente a célula da bactéria e romper sua membrana pela formação de poros (CASTELLANO *et al.*, 2018; ENNAHAR *et al.*, 2000; NAGARAJAN *et al.*, 2019).

Neste trabalho foi observado que o uso combinado de SLC de *L. sakei* 1 e inulina inibiu significativamente a invasão *L. monocytogenes* às células Caco-2 3D (Apêndice C), quando comparado ao uso isolado do SLC de *L. sakei* 1, indicando um possível efeito aditivo entre prebiótico e bacteriocina (BRINK *et al.*, 2006; LIKOTRAFITI *et al.*, 2013; MAHMOUDI *et al.*, 2017).

De Azevedo *et al.* (2017) relataram que SLC de *Pediococcus pentosaceus* apresentou maior atividade antimicrobiana frente a *Listeria innocua* quando combinado com inulina e sacarose. De modo semelhante, Mandadzhieva *et al.* (2014) demonstraram que o SLC de *L. sakei* S161 apresentou efeitos antimicrobianos significativos frente a *Enterobacter aerogenes* e *L. innocua* quando combinados com fruto- oligossacarídeo. O trabalho realizado por De Marco *et al.* (2017) com SLC de *L. acidophilus*, *Lactococcus lactis* e *L. casei* combinados com inulina, proporcionaram uma menor concentração inibitória mínima frente a *S. aureus*.

Esta pesquisa demonstrou ainda que *L. sakei* 1 não apresentou capacidade de invadir células Caco-2 3D, reforçando a hipótese exclusão competitiva do patógeno (KÜHBACHER *et al.*, 2018; MONTEAGUDO-MERA *et al.*, 2019; PETERSON, 1996; PIZARRO-CERDÁ *et al.*, 2016; PIZARRO-CERDÁ; KÜHBACHER; COSSART, 2012).

Na condição de co-cultura de *L. sakei* 1 com *L. monocytogenes*, a invasão às células Caco-2 3D por *L. monocytogenes* diminuiu de forma significativa (Figura 10 e Apêndice C), e este resultado corrobora com Parveen *et al.* (2016) que realizaram ensaio de invasão de *L. monocytogenes* na presença de *Bacillus tequilensis* FR9 em células de carcinoma do cólon HCT-116 e reportaram que houve menor invasão celular de *L. monocytogenes*. Também Dutra *et al.* (2016) demonstraram que *L. casei* Shirota, *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* (LB95) e *Lactobacillus paraplantarum* (LB13) foram capazes de diminuir a invasão de *L. monocytogenes* a células HT-29. O trabalho de Campana, Van Hemert e Baffone (2017) com *Bifidobacterium bifidum*, *L. salivarius* e *L. rhamnosus* também demonstrou que as BALs apresentaram capacidade de diminuir a invasão de *L. monocytogenes* a células Caco-2.

A interação Inl-A e E-caderina é muito importante para a adesão e invasão de *L. monocytogenes*, e acredita-se que por meio do bloqueio competitivo da ligação desses receptores é realizada a inibição da adesão e invasão pelas BAL. Também se acredita que a inibição possa ser mediada pela produção de compostos antimicrobianos (CAMPANA; VAN HEMERT; BAFFONE, 2017; DAS *et al.*, 2013; DUTRA *et al.*, 2016; GOLOWCZYC *et al.*, 2011; KHAN; KANG, 2016; NAKAMURA *et al.*, 2012; PARVEEN *et al.*, 2016).

Neste trabalho foi observado que *L. sakei* 1 juntamente com o prebiótico inulina aumentou a inibição da invasão de *L. monocytogenes* às células Caco-2 3D, sendo está a

condição de maior inibição. Esses resultados estão de acordo com Brufau *et al.* (2017) que observaram efeito simbiótico pelo uso do prebiótico salmosan (rico em β -galactomanano) com *L. plantarum*, representando uma barreira intestinal frente infecção por *Salmonella* Enteritidis mediada pela produção de citocinas, neste estudo foi utilizado modelo de cultivo celular 2D de células Caco-2 e THP-1 (macrófagos).

BALs são capazes de fermentar alguns prebióticos com produção de ácido lático, que apresenta atividade antimicrobiana, o que também poderia influenciar diretamente na capacidade de adesão e invasão celular dos patógenos (BOSSCHER; LOO; FRANCK, 2006; PRANCKUTE *et al.*, 2016).

Os resultados deste estudo demonstraram que o uso combinado de inulina com SLC de *L. sakei* 1, bem como o uso de inulina com *L. sakei* 1, causaram uma potencialização do efeito antiadesivo e anti-invasivo de *L. monocytogenes* frente a células Caco-2.

Além da avaliação do efeito anti-infectivo de prebióticos, BALs e bacteriocinas, é primordial também avaliar a citotoxicidade e viabilidade celular de cada uma dessas condições. Por isso, foram realizados ensaios de atividade metabólica, demonstrando que o inulina não afetou esse parâmetro de forma significativa, com atividade remanescente nas células Caco-2 maior que 80% na presença do prebiótico. Este resultado corrobora com Rahnama *et al.* (2021) que ao relataram que não houve alteração na atividade metabólica em células de linhagem celular de fibroblastos L-929 expostos a hidrogéis produzidos à base de quitosana, dopamina e aldeído de inulina.

Também Afinjuomo *et al.* (2019) relataram atividades metabólicas maiores que 70% em células de carcinoma colorretal humano HCT116, expostas a hidrogel de inulina, com ou sem modificação de grupo aldeído. Já Adebola, Corcoran e Morgan (2013) avaliaram a atividade metabólica induzida por ácidos desoxicólico e litocólico em células HT-29, concluindo que houve efeito protetor na presença de inulina e lactulose. Ghosh, Sutradhar e Baishya (2019) reportaram que não houve alteração da atividade metabólica de células normais VK2/E6E7 ATCC CRL-2616 na presença de xilo-oligossacarídeos, mas foi observado que o prebiótico ao ser utilizado em células de carcinoma cervical HeLa, na maior concentração testada (100 μ g/ mL), houve uma redução nas células viáveis em 60% e 50%, respectivamente em 24 e 48 horas.

Os mecanismos envolvidos na redução da citotoxicidade mediada por prebióticos ainda não são totalmente conhecidos, mas acredita-se que os prebióticos podem agir como um carbono extra ou fonte de energia (ADEBOLA; CORCORAN; MORGAN, 2013). A inulina é ingerida diariamente pela dieta por muitas populações desde os primórdios da humanidade, sem

conhecimento de toxicidade ou danos à saúde registrados. Estudos em modelos animais com várias dosagens e concentrações de inulina também indicaram que está não apresenta efeitos tóxicos. Devido à sua segurança e facilidade de filtração pelos rins, a inulina é utilizada em clínica humana desde 1931, para medir taxa de filtração glomerular por injeção intravenosa (COUSSEMENT, 1999).

Outros dados indicam que a dose letal média em camundongos e ratos de dose única de fruto-oligossacarídeos (FOS) é maior que 9g/kg, uma dose bem alta; há ainda estudos mostrando a ingestão de 70 gramas de inulina por dia sem prejuízos e danos de nenhuma forma à saúde humana em adultos saudáveis, sendo autorizado o uso da inulina como ingrediente alimentar nos Estados Unidos (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2019).

O consumo de fibras alimentares como a inulina aumenta a frequência de evacuações um efeito benéfico quando não ocasiona diarreia (HIGGINS; THOMPSON, 2004). Vries *et al.* (2019) ao realizar uma revisão sistemática e uma meta-análise para avaliar o efeito dos β -frutanos na função intestinal, ao final foram analisadas 45 publicações, em nenhum dos estudos o consumo de β -frutanos instaurou a diarreia, também Azpiroz *et al.* (2017) ao realizar um estudo controlado com placebo, randomizado e duplo-cego com n de 18 pessoas de 20 a 70 anos que apresentavam gastroenterologia com desconforto abdominal sem diarreia, o grupo que utilizou o prebiótico inulina diminuiu a retenção de gás, e apresentou maior abundância relativa na contagem de bifidobactérias.

No ensaio de avaliação da atividade metabólica celular na presença de SLC de *L. sakei* 1, os danos celulares foram diretamente proporcionais ao aumento de concentração de SLC, mas exceto pela maior concentração (10x SLC), em todas as outras condições foram observadas viabilidade superior a 60% (Figura 11 e Apêndice D). Esses resultados concordam com Pourbaferani *et al.* (2021), que também reportaram que grandes concentrações de SLC de BAL causaram danos a culturas celulares. Os dados do presente trabalho são também corroborados por Ahmad *et al.* (2018) que fizeram ensaios de atividade metabólica em células HT-29 na presença de SLC de *L. plantarum* e relataram que o dano celular era dependente da concentração utilizada. Outros autores, Er, Koparal e Kivanç (2015) demonstraram em células Caco-2 que SLC de *L. plantarum* (500 μ L/mL; 8 a 24 horas) causaram danos celulares, com viabilidade de 74% a 50%.

A redução da viabilidade de células Caco-2 causada por SLC de *L. sakei* 1 é compatível com um mecanismo proposto para o efeito probiótico de BALs, as quais podem afetar células cancerígenas (ER; KOPARAL; KIVANÇ, 2015). Pourbaferani *et al.* (2021) estudaram células de câncer de mama humano e fibroblastos normais em testes de viabilidade celular (MTT),

frente ao SLC de *L. brevis* MKo5, observando que para os fibroblastos não houve danos significativos (viabilidade >70%), mas as células tumorais foram danificadas.

Outros estudos também demonstraram que SLC de BALs não causam danos significativos em células saudáveis. Neste sentido, Cha *et al.* (2020) relataram que SLC de *L. paraplantarum* THG-G10 não causou danos significativos em macrófagos murinos RAW 264.7, e Castiblanco *et al.* (2016) descreveram que SLC de *L. reuteri* não afetou a viabilidade de fibroblastos gengivais humanos, em ensaios com MTT. Embora no presente trabalho não tenham sido feitos testes com SLC de *L. sakei* 1 em células normais, apenas em células de carcinoma (Caco-2), é possível que em estudos com células não tumorais, a viabilidade celular seja ainda maior.

A atividade metabólica das células Caco-2 incubadas com *L. sakei* 1 indicou 53,97%±9,85 de células viáveis, que é um valor semelhante ao apresentado pelo SLC de *L. sakei* 1 concentrado dez vezes (Figura 11 e Apêndice D). Ainda, vale lembrar que, de acordo com a literatura, é possível que o efeito dessa LAB em células tumorais seja menor do que em células saudáveis.

Rosa *et al.* (2020) demonstraram que bebidas lácteas de soro de leite com *L. casei* -01 e *L. acidophilus* La-05 diminuíram a viabilidade de células de câncer de próstata humano DU-145 em 50%. E Bharti *et al.* (2015) descreveram que *L. plantarum* na concentração de 500µg/mL inibiram em 72% em células de câncer de mama (MCF-7).

Motevaseli *et al.* (2013) avaliaram a atividade metabólica (MTT) na presença de *Lactobacillus gasseri* e *Lactobacillus crispatus* em fibroblastos humanos normais e em células de carcinoma cervical HeLa, encontrando que em células HeLa as BALs apresentaram IC₅₀ (concentração inibitória média) de 5%, sem efeito sobre a viabilidade dos fibroblastos humanos. Widyarman *et al.* (2018) também descreveram que *L. reuteri* (suplementado ou não com glicerol), não alterou a atividade metabólica (MTT) de queratinócitos de linhagem não tumoral (HaCat) com viabilidade celular acima de 90% na condição sem suplementação com glicerol.

A atividade anti-tumoral de probióticos pode ser parcialmente atribuída à produção de exopolissacarídeos, como relatado por Kim *et al.* (2006) que demonstraram que *L. rhamnosus* ATCC 9595 reduziu o crescimento de células cancerígenas de cólon (HT-29) e de pâncreas (PANC-1) pela síntese de dois exopolissacarídeos com capacidade de ligação a receptores celulares. Também Mojibi, Tafvizi e Torbati (2019) fizeram ensaio de avaliação da atividade metabólica com extrato de exopolissacarídeo ligado a células em várias concentrações e tempos de incubação de *L. paracasei* e *L. brevis*, observando houve menores danos a fibroblastos normais que em comparação com células de adenocarcinoma de cólon humano HT-29, sendo

que na maior concentração testada (40 mg/mL) e com o maior tempo de incubação (72 horas), as células de fibroblastos normais apresentaram viabilidade maior que 50% e as células HT-29 apresentaram viabilidade menor que 30%.

A combinação do prebiótico inulina com SLC de *L. sakei* 1 em várias concentrações, bem como inulina com *L. sakei* 1 promoveu proteção células, com aumento do número de células viáveis. Há poucos estudos relatando a ação de prebióticos na proteção celular, e os mecanismos são poucos conhecidos, mas acredita-se que os prebióticos podem agir como um carbono extra e fonte energia, e desta forma diminuem os danos celulares provocados pelos compostos (ADEBOLA; CORCORAN; MORGAN, 2013).

No ensaio de citotoxicidade com corante azul de tripano, em células Caco-2 3D na presença do prebiótico inulina, houve $82,01\% \pm 8,27\%$, com segurança semelhante à encontrada no ensaio de avaliação da atividade metabólica (Figura 12 e Apêndice 12). É preciso destacar que pequenas diferenças entre os ensaios de avaliação de citotoxicidade pelos métodos do MTT ou do azul de tripano podem ocorrer. O corante azul deve corar somente células inviáveis, mas como limitação intrínseca ao ensaio, pode haver células inviáveis com membranas intactas (que não seriam coradas) e células viáveis com rupturas nas membranas (com pequena absorção do corante). Idealmente, o ensaio de avaliação da atividade metabólica (MTT) é proporcional à atividade metabólica das mitocôndrias, e permite quantificar somente as células viáveis presentes na amostra. Contudo, a retenção de cristais de formazana no interior das células (principalmente em altas concentrações) pode ser tóxica e induzir a erros de leitura. Para o presente trabalho, a fim de ter uma medida mais fidedigna da viabilidade das células Caco-2 em cultura tridimensional expostas a diferentes condições, foram utilizados os dois testes - MTT azul de tripano (BORENFREUND; BABICH; MARTIN-ALGUACIL, 1988; STROBER, 1997).

Neste trabalho não foi afetada a citotoxicidade no ensaio com azul de tripano com o uso do prebiótico inulina, outros trabalhos também demonstraram que prebióticos e oligossacarídeos não causaram danos celulares, como Cerezuela *et al.* (2008) que demonstraram que a inulina não afetou a citotoxicidade de leucócitos HK, e também Miyamoto *et al.* (2006) que demonstraram que a viabilidade e sobrevivência de hepatócitos humanos criopreservados aumentou na presença de oligossacarídeos. Rosas-Ramírez *et al.* (2017) realizaram ensaios de citotoxicidade com oligossacarídeos obtidos de sementes de chia em linhagens de células de carcinoma do cólon (HCT-15 e HCT-116), relatando ausência de citotoxicidade. Os resultados de Wang *et al.* (2008) também indicaram ausência de citotoxicidade em linfócitos humanos normais, na presença de oligossacarídeos feruloílo, com número de células viáveis superior a

96%.

Os ensaios de citotoxicidade realizados neste trabalho com azul de tripano em células Caco-2 3D, demonstraram que na presença de SLC de *L. sakei* 1 a viabilidade permaneceu acima de 60%, com pequena redução com a maior concentração testada (10x), em concordância com a literatura (Figura 12 e Apêndice E) (ER; KOPARAL; KIVANÇ, 2015).

Foi demonstrado por Abdel-Daim *et al.* (2013) que SLC de *Lactobacillus* não apresentou potencial citotóxico frente a linhagem celular vero (ATCC no. CCL-81), entretanto Awaisheh *et al.* (2016) demonstraram que o número de células viáveis de cultura Caco-2 2D reduziu em 44,3%, 58,8% e 73,3% por *L. acidophilus* LA102 e por *L. casei* LC232 em 39,3%, 52,0% e 64,7% após 24, 48 e 72 horas respectivamente, em ensaios com azul de tripano.

Também Jafari-Nasab *et al.* (2021) relataram que SLC de M1 *Pediococcus* sp. apresentaram toxicidade significativa contra células de câncer de mama (MCF-7), com viabilidade abaixo de 40%, e Borah *et al.* (2019) demonstraram que SLC de *Bacillus velezensis* cepa DU14 não apresentou toxicidade para células hepáticas normais de camundongo.

BALs e seus metabólitos têm sido estudadas quanto à possível proteção contra câncer (principalmente de cólon), mas o mecanismo de ação sobre células tumorais preferencialmente a células normais ainda não está elucidado, mas é postulado que pode ocorrer modulação da resposta imune, ligação de certas toxinas e produção de exopolissacarídeos (AWAISHEH *et al.*, 2016; MAFTUNI; ZARE, 2017).

No ensaio de citotoxicidade de *L. sakei* 1 com azul de tripano, houve $46,45\% \pm 13,33\%$ de células viáveis, o que indica uma maior capacidade citotóxica frente a células Caco-2 3D em comparação com SLC da mesma bactéria (Figura 12 e Apêndice E), que provavelmente pode ser atribuída à produção de ácido láctico pela BAL (ER; KOPARAL; KIVANÇ, 2015; KAWARIZADEH *et al.*, 2021).

Butler, Silvestroni e Stapleton (2016) demonstraram que *L. crispatus* CTV-05 não apresentou toxicidade frente células epiteliais vaginais (queratinócitos imortalizados com vírus do papiloma humano), também Jaffar *et al.* (2018) relataram que *Lactobacillus johnsonii* NBRC13952, e *L. plantarum* NBRC15891 e *L. fermentum* NBRC 15885 não apresentaram efeito citotóxico em macrófagos murinos RAW264.7.

Motevaseli *et al.* (2013) realizaram ensaios de citotoxicidade com azul de tripano na presença de *L. gasseri* e *L. crispatus* em fibroblastos humanos normais e em células de carcinoma cervical HeLa, relatando efeito apenas nas células tumorais. Porém Vemuri *et al.* (2018) demonstraram que *L. acidophilus* DDS-1 09 não apresentaram efeito citotóxico de forma significativa e *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* UABla-12, *L. plantarum* UALp-05 e

Streptococcus thermophilus UAS_t-09 apresentaram apenas pequeno efeito citotóxico frente a células epiteliais do cólon humano (HT-29 e LS174T).

Cerezuela *et al.* (2008) demonstraram por meio de ensaio com azul de tripano, que a inulina não afetou de forma significativa a viabilidade de leucócitos do peixe *Sparus aurata* L. Também Burns e Rowland (2004) demonstraram que em células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) sobrenadantes de fermentação de *L. plantarum* juntamente com os prebióticos raftilina, raftilose, inulina, fibersol e actilight apresentaram reduções nos danos celulares.

Estes resultados demonstram como o uso combinado de SLC de *L. sakei* 1 e BAL *L. sakei* 1 com o prebiótico inulina, apresentam potencial simbiótico para serem utilizados para a prevenção de infecção de *L. monocytogenes*, também demonstram a necessidade de maior investigação destes mecanismos de interação simbiótica.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- A formação de biofilmes em placa de poliestireno de 96 poços, por *L. monocytogenes* foi desfavorecida através da utilização de inulina e SLC de *L. sakei* 1, e o melhor resultado foi obtido com a combinação de SLC e inulina.
- Células formadas através do biorreator STLV fornece estruturas celulares adequadas para estudos científicos.
- A capacidade de adesão/invasão celular por *L. monocytogenes* foi alterada na presença de SLC de *L. sakei* 1 e BAL *L. sakei* 1, sendo que estes compostos apresentaram melhores resultados combinados com o prebiótico inulina.
- Os danos celulares causados por SLC de *L. sakei* 1 e BAL *L. sakei* 1 não foram significativos, sendo que todas as condições apresentaram uma porcentagem maior que 45% de células viáveis, mesmos os ensaios sendo realizados com células de adenocarcinoma e não em células normais como já discutido e estes danos se apresentaram menores na presença do prebiótico.

Neste trabalho ficou evidenciado como o uso do prebiótico inulina e do SLC de *L. sakei* 1, e da BAL *L. sakei* 1 apresenta capacidade de modular a formação de biofilmes, adesão e invasão celular da bactéria *L. monocytogenes*, mesmo ainda não sendo elucidados os mecanismos de ação destes compostos, também os resultados apresentaram de forma clara como estes compostos apresentam potencial simbiótico por apresentar mecanismos sinérgicos para serem futuramente utilizados para a prevenção de infecção por *L. monocytogenes*.

REFERÊNCIAS

- ABCAM. **Immunocytochemistry and immunofluorescence protocol** . Disponível em: <<https://www.abcam.com/protocols/immunocytochemistry-immunofluorescence-protocol>>. Acesso em: 31 maio. 2021.
- ABCAM. **Protocolo de ensaio MTT | Abcam**. Disponível em: <<https://www.abcam.com/kits/mtt-assay-protocol>>. Acesso em: 5 jun. 2021.
- ABDEL-DAIM, A; HASSOUNA, N; HAFEZ, M; ASHOR, M.S.A; ABOULWafa, M.M. Antagonistic activity of *Lactobacillus* isolates against *Salmonella typhi* in vitro. **BioMed Research International**, v. 2013,p. 1-13,Setem. 2013.
- ACKERMAN, D; CRAFT, K; DOSTER, R; WEITKAMP, J; ARONOFF,D; GADDY, J; TOWNSEND,S. Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Human Milk Oligosaccharides against *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, and *Acinetobacter baumannii*. **ACS Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 315–324, mar. 2018.
- ADEBOLA, O; CORCORAN, O; MORGAN, W. A. Protective effects of prebiotics inulin and lactulose from cytotoxicity and genotoxicity in human colon adenocarcinoma cells. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 269–274, jun. 2013.
- AFINJUOMO, F; FOULADIAN, P; PARIKH, A; BARCLAY,T; SONG,Y;GARG, S. Preparation and Characterization of Oxidized Inulin Hydrogel for Controlled Drug Delivery. **Pharmaceutics** 2019, v. 11, n. 7, p. 356, jul. 2019.
- AHMAD, A; YAP,W; KOFLI,N; GHAZALI, A. Probiotic potentials of *Lactobacillus plantarum* isolated from fermented durian (Tempoyak), a Malaysian traditional condiment. **Food Science & Nutrition**, v. 6, n. 6, p. 1370–1377, set. 2018.
- AHMED, W.; RASHID, S. Functional and therapeutic potential of inulin: A comprehensive review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 1, p. 1–13, jan. 2017.
- AIGAL, S; CLAUDINON, J; RÖMER, W. Plasma membrane reorganization: A glycolipid gateway for microbes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1853, n. 4, p. 858–871, abr. 2015.
- ALTAMIMI, M; ABDELHAY, O; RASTALL, R. A. Effect of oligosaccharides on the adhesion of gut bacteria to human HT-29 cells. **Anaerobe**, v. 39, p. 136–142, jun. 2016.
- ALVES, V. F; LAVRADOR, M. A. S; MARTINIS, E. C. P. DE. Bacteriocin exposure and food ingredients influence on growth and virulence of *Listeria monocytogenes* in a model meat gravy system. **Journal of Food Safety**, v. 23, n. 3, p. 201–217, out. 2003.
- ALVES, V. F; MARTINEZ, R; LAVRADOR, M; MARTINIS, E. C.P. DE. Antilisterial activity of lactic acid bacteria inoculated on cooked ham. **Meat Science**, v. 74, n. 4, p. 623– 627, dez. 2006.
- ANABAZHAGAN, A; CHATTERJEE, I; PRIYAMVADA, S; KUMAR, A; TYAGI, S;SAKSENA, S; ALREFAI, W; DUDEJA, P; GILL, R. Methods to Study Epithelial Transport Protein Function and Expression in Native Intestine and Caco-2 Cells Grown in 3D. **JoVE**

Journal of Visualized Experiments, v. 2017, n. 121, p. e55304, mar. 2017.

ANGELONI, S; RIDET, J; KUSY, N; GAO,H;CREVOISIER, F; GUINCHARD, S; KOCHHAR, S; SIGRIST, H; SPRENGER, N.Glycoprofiling with micro-arrays of glycoconjugates and lectins. **Glycobiology**, v. 15, n. 1, p. 31–41, jan. 2005.

ASHAOLU, T. J. Immune boosting functional foods and their mechanisms: A critical evaluation of probiotics and prebiotics. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 130, n. 110625,p. 1-11 out. 2020.

AWAISHEH, S; OBEIDAT, M; AL-TAMIMI, H; ASSAF, A; EL-QUDAH, J; AL-KHAZA' LEH, J; RAHAHLEH, R.In vitro cytotoxic activity of probiotic bacterial cell extracts against Caco-2 and HRT-18 colorectal cancer cells. **Milk Science International - Milchwissenschaft**, v. 69, n. 7, p. 33–37, Jun. 2016.

AZEREDO, J; AZEVEDO, N. F; BRIANDET, R; CERCA, N; COENYE, T; COSTA, A.R; DESVAUX, M; DI BONAVENTURA, G; HÉBRAUD, M; JAGLIC, Z; KAČÁNIOVÁ, M; KNØCHEL, S; LOURENÇO, A; MERGULHÃO, F; MEYER, R.L; NYCHAS, G; SIMÕES, M; TRESSE, O; STERNBERG, C. Critical review on biofilm methods.**Critical Reviews in Microbiology**, v. 43,n. 3, p.313-351, maio 2017.

AZPIROZ, F; MOLNE, L;MENDEZ, S;NIETO, A;MANICHANH, C; MEGO, M;ACCARINO, A;SANTOS, J;SAILER, M;THEIS, S;GUARNER, F. Effect of Chicory-derived Inulin on Abdominal Sensations and Bowel Motor Function. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 51, n. 7, p. 619-625, ago.2017.

BARBOSA, J; Borges, S; Camilo, R; Magalhães, R; Ferreira,V; Santos, I; Silva, J; Almeida, G;Teixeira, P. Biofilm formation among clinical and food isolates of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Microbiology**, v. 2013, n.2013: 524975,Dez. 2013.

BAREFOOT, S. F.; KLAENHAMMER, T. R. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 1808–1815, Abril. 1983.

BEYENAL, H.; BABAUTA, J. Microsensors and Microscale Gradients in Biofilms. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 146, p. 235–256, Setem.2013.

BHARTI, V; MEHTA, A;SINGH, S; JAIN, N;AHIRWAL, L.Cytotoxicity of live whole cell, heat killed cell and cell free extract of *lactobacillus* strain in u-87 human glioblastoma cell line and mcf-7 breast cancer cell line. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 10, n. 4, p. 153–158, Nov. 2015.

BLUM-MENEZES, D;DELIBERALLI, I;BITTENCOURT, N;DO COUTO, C;BARBOSA, L;DOS SANTOS, A;PINTO, G.Listeriosis in the far South of Brazil: neglected infection? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 3, p. 381–383, maio 2013.

BORAH, T; GOGOI, B;KHATANIAR, A;GOGOI, M;DAS, A;BORAH, D.Probiotic characterization of indigenous *Bacillus velezensis* strain DU14 isolated from Apong, a traditionally fermented rice beer of Assam. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, n. 101008, p.1-8, mar. 2019.

BORENFREUND, E; BABICH, H; MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays—The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxicology in Vitro**, v. 2, n. 1, p. 1–6, jan. 1988.

BOSSCHER, D; LOO, J. VAN; FRANCK, A. Inulin and oligofructose as prebiotics in the prevention of intestinal infections and diseases. **Nutrition Research Reviews**, v. 19, n. 2, p. 216–226, dez. 2006.

BOTES, M; LOOS, B; VAN REENEN, C; DICKS, L. Adhesion of the probiotic strains *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. **Archives of Microbiology**, v. 190, n. 5, p. 573–584, jul. 2008.

BRAGA, V; VÁZQUEZ, S; VICO, V; PASTORINO, V; MOTA, M; LEGNANI, M; SCHELOTTO, F; LANCIBIDAD, G; VARELA, G. Prevalence and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Montevideo-Uruguay. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 689–694, out. 2017.

BRASIL. Instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019, estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**: edição 133, seção 1, página 133, Brasília, DF, 26 dez 2019a.

BRASIL. Resolução RDC nº 331, dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. **Diário Oficial da União**: edição 249, seção 1, página 96, Brasília, DF, 26 dez 2019b.

BRINK, M; TODOROV, S; MARTIN, J; SENEKAL, M; DICKS, L. The effect of prebiotics on production of antimicrobial compounds, resistance to growth at low pH and in the presence of bile, and adhesion of probiotic cells to intestinal mucus. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 4, p. 813–820, abr. 2006.

BRUFAU, M; CAMPO-SABARIZ, J; CARNÉ, S; FERRER, R; MARTÍN-VENEGAS, R. Salmosan, a β -galactomannan-rich product, in combination with *Lactobacillus plantarum* contributes to restore intestinal epithelial barrier function by modulation of cytokine production. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 41, p. 20–24, mar. 2017.

BURMØLLE, M; REN, D; BJARNSHOLT, T; SØRENSEN, S. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 84–91, fev. 2014.

BURNS, A. J; ROWLAND, I. R. Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 551, n. 1–2, p. 233–243, jul. 2004.

BUTLER, D. S. C; SILVESTRONI, A; STAPLETON, A. E. Cytoprotective Effect of *Lactobacillus crispatus* CTV-05 against Uropathogenic *E. coli*. **Pathogens** 2016, v. 5, n. 1, p. 27–39, mar. 2016.

CAMARGO, A; DE PAULA, O; TODOROV, S; NERO, L. In Vitro Evaluation of Bacteriocins Activity Against *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. **Applied Biochemistry and**

Biotechnology, v. 178, n. 6, p. 1239–1251, Mar. 2016.

CAMMAROTA, M;DE ROSA, M;STELLAVATO, A;LAMBERTI, M;MARZAIOLI, I; GIULIANO, M. In vitro evaluation of *Lactobacillus plantarum* DSMZ 12028 as a probiotic: Emphasis on innate immunity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 135, n. 2, p. 90–98, out. 2009.

CAMPANA, R; VAN HEMERT, S; BAFFONE, W. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. **Gut Pathogens**, v. 9, n. 1, p. 1–12, mar. 2017.

CASTELLANO, P;PÉREZ IBARRECHE, M;LONGO BORGES, L;NIÑO ARIAS, F; ROSS, G;DE MARTINIS, E. *Lactobacillus* spp. impair the ability of *Listeria monocytogenes* FBUNT to adhere to and invade Caco-2 cells. **Biotechnology Letters** **2018 40:8**, v. 40, n. 8, p. 1237–1244, jun. 2018.

CASTIBLANCO, A.G; YUAL-LINDBERG, T; ROSS, S; TWETMAN,S.Effect of *Lactobacillus reuterion* cell viability and PGE2 production in human gingival fibroblastos.**Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v .9,n.3,p.278-283,dez.2016.

CELEBIOGLU, H. U;EJBY, M;MAJUMDER, A;KØBLER, C;GOH, Y;THORSEN, K;SCHMIDT, B;O'FLAHERTY, S;ABOU HACHEM, M;LAHTINEN, S;JACOBSEN, S;KLAENHAMMER, T;BRIX, S;MØLHAVE, K;SVENSSON, B.Differential proteome and cellular adhesion analyses of the probiotic bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM grown on raffinose – an emerging prebiotic. **PROTEOMICS**, v. 16, n. 9, p. 1361–1375, maio 2016.

CEREZUELA, R; CUESTA, A;MESEGUER, J;ÁNGELES ESTEBAN, M.Effects of inulin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune parameters. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 24, n. 5, p. 663–668, maio 2008.

CHA, H. M; KIM, S;KOOK, M;YI, T. *Lactobacillus paraplantarum* THG-G10 as a potential anti-acne agent with anti-bacterial and anti-inflammatory activities. **Anaerobe**, v. 64, n.102243, p. 1-7, ago. 2020.

CHAMPOMIER-VERGÈS, M. C; CHAILLOU, S;CORNET, M;ZAGOREC, M. *Lactobacillus sakei*: Recent developments and future prospects. **Research in Microbiology**, v. 152, n. 10, p. 839–848, 2001.

CHEN, M; CHENG, J;WU, Q;ZHANG, J;CHEN, Y;XUE, L;LEI, T;ZENG, H;WU, S;YE, Q;BAI, J;WANG, J.Occurrence, Antibiotic Resistance, and Population Diversity of *Listeria monocytogenes* Isolated From Fresh Aquatic Products in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. ,set. 2018.

CHEN, P;REITER, T;HUANG, B;KONG, N;WEIMER, B.Prebiotic oligosaccharides potentiate host protective responses against *Listeria Monocytogenes* infection. **Pathogens**, v. 6, n. 4, p. 1–25, dez. 2017.

CHERSICH, M. F; SCORGIE, F;REES, H;WRIGHT, C. How climate change can fuel listeriosis outbreaks in South Africa. **SAMJ: South African Medical Journal**, v. 108, n. 6, p. 453–454, jun. 2018.

- CLAUS, S. P. Inulin prebiotic: is it all about bifidobacteria? **Gut**, v. 66, n. 11, p. 1883–1884, nov. 2017.
- COLAGIORGI, A; BRUINI, I; DI CICCIO, P; ZANARDI, E; GHIDINI, S; IANIERI, A. *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Wonderland of Food Industry. **Pathogens**, v. 6, n. 3, p.1-9, set. 2017.
- COMERLATO, C. B; RITTER, A; MIYAMOTO, K; BRANDELLI, A. Proteomic study of *Enterococcus durans* LAB18S growing on prebiotic oligosaccharides. **Food Microbiology**, v. 89, n. 103430, p.1-6, ago. 2020.
- COPPA, G. V ; BRUNI, S; ZAMPINI, L; PIERANI, P; FACINELLI, B; GABRIELLI, O. Bacterial Adhesivity Inhibition By Human Milk Oligosaccharides. **Pediatric Research**, v. 45, n. 5, p. 744–744, maio 1999.
- COPPA, G. V; ZAMPINI, L; GALEAZZI, T; FACINELLI, B; FERRANTE, L; CAPRETTI, R; ORAZIO, G. Human Milk Oligosaccharides Inhibit the Adhesion to Caco-2 Cells of Diarrheal Pathogens: *Escherichia coli* , *Vibrio cholerae* , and *Salmonella fytis*. **Pediatric Research**, v. 59, n. 3, p. 377–382, mar. 2006.
- COUSSEMENT, P. A. A. Inulin and oligofructose: Safe intakes and legal status. **Journal of Nutrition**, v.129, p.1412s-1417s, jul. 1999.
- CRUZ, C. D; MARTINEZ, M. B; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes* : Um agente infeccioso ainda pouco conhecido no brasil. **Alim Nutrição**, v. 19, n. 03, p. 195–206, 2008.
- D'ANGELIS, C; POLIZELLO, A; NONATO, M; SPADARO, A; DE MARTINIS, E. Purification, characterization and n-terminal amino acid sequencing of sakacin 1, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* 1. **Journal of Food Safety**, v. 29, n. 4, p. 636–649, nov. 2009.
- DAS, J. K; MISHRA, D; RAY, P; TRIPATHY, P; BEURIA, T; SINGH, N; SUAR, M. In vitro evaluation of anti-infective activity of a *Lactobacillus plantarum* strain against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Gut Pathogens**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 13 maio 2013.
- DE AZEVEDO, P. O.S; CONVERTI, A; DOMÍNGUEZ, J; DE SOUZA, O. R. Stimulating Effects of Sucrose and Inulin on Growth, Lactate, and Bacteriocin Productions by *Pediococcus pentosaceus*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 9, n. 4, p. 466–472, maio 2017.
- DE MARCO, S; PICCIONI, M; MURADYAN, D; ZADRA, C; PAGIOTTI, R; PIETRELLA, D. Antibiofilm and Antiadhesive Activities of Different Synbiotics. **Journal of Probiotics & Health**, v. 05, n. 03, p.1-9, 2017.
- DE MARTINIS, E. C. P. DE; SANTAROSA, P. R; FREITAS, F. Z. Caracterização preliminar de bacteriocinas produzidas por seis cepas de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos embalados a vácuo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 195–199, ago. 2003.
- DE MARTINIS, E. C. P; PÚBLIO, M; SANTAROSA, P; FREITAS, F. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat and meat products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 32–37, 2001.

DELCARU, C;ALEXANDRU, I;PODGOREANU, P;GROU, M;STAVROPOULOS, E; CHIFIRIUC, M;LAZAR, V. Microbial Biofilms in Urinary Tract Infections and Prostatitis: Etiology, Pathogenicity, and Combating strategies. **Pathogens**, v. 5, n. 4, p.1-12, dez. 2016.

DI LODOVICO, S;GASPARRI, F;DI CAMPLI, E;DI FERMO, P; D'ERCOLE, S; CELLINI, L;DI GIULIO, M. Prebiotic combinations effects on the colonization of staphylococcal skin strains. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 1–15, jan. 2021.

DOIJAD, S. P;BARBUDDHE, S;GARG, S;POHARKAR, K;KALOREY, D;KURKURE, N;RAWOOL, D;CHAKRABORTY, T. Biofilm-forming abilities of *Listeria monocytogenes* serotypes isolated from different sources. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, n. e0137046, p.1-14, set. 2015.

DRABIŃSKA, N; ROSELL, C. M; KRUPA-KOZAK, U. Inulin-Type Fructans Application in Gluten-Free Products: Functionality and Health Benefits. **Reference Series in Phytochemistry**, p. 723–762, jan.2019.

DREYER, L;SMITH, C;DEANE, S;DICKS, L;VAN STADEN, A. Migration of Bacteriocins Across Gastrointestinal Epithelial and Vascular Endothelial Cells, as Determined Using In Vitro Simulations. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–11, dez. 2019.

DRUMMOND, C. G; NICKERSON, C. A; COYNE, C. B. C. A Three-dimensional cell culture model to study enterovirus infection of polarized intestinal Epithelial cells. **mSphere**, v. 1, n. 1, p.1-17, fev. 2016.

DUARTE, F;PINTO, S;TRIGO, A;GUIMARAES, F;PEREIRA, R;NENO, M;ABREU, R;NEVES, I. A rare presentation of *Listeria monocytogenes* infection: Perianal abscess associated with lumbar spine osteitis. **IDCases**, v. 15, n. e00488,p.1-2, jan. 2019.

DUTRA, V;SILVA, A;CABRITA, P;PERES, C;MALCATA, X;BRITO, L. *Lactobacillus plantarum* LB95 impairs the virulence potential of Gram-positive and Gram-negative food-borne pathogens in HT-29 and Vero cell cultures. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 28–35, jan. 2016.

EBERSBACH, T;ANDERSEN, J;BERGSTRÖM, A;HUTKINS, R;LICHT, T. Xylo-oligosaccharides inhibit pathogen adhesion to enterocytes in vitro. **Research in Microbiology**,v. 163, n. 1, p. 22–27, jan. 2012.

ENNAHAR, S; SASHIHARA, T; SONOMOTO, K; ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 85–106, jan. 2000.

ER, S; KOPARAL, A. T; KIVANÇ, M. Cytotoxic effects of various lactic acid bacteria on Caco-2 cells. **Turkish Journal of Biology**, v. 39, n. 1, p. 23–30, jan. 2015.

ERDENLIG, S; AINSWORTH, A. J; AUSTIN, F. W. Pathogenicity and production of virulence factors by *Listeria monocytogenes* isolates from channel catfish. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 5, p. 613–619, maio. 2000.

FAN, C. H; CAO, J. H; ZHANG, F. C. The prebiotic inulin as a functional food - A review. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 20, n. 15, p. 3262–3265,

julho.2016.

FAN, Z;XIE, J;LI, Y;WANG, H. Listeriosis in mainland China: A systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 81, p. 17–24, abr. 2019.

FANG, K; PARK, O. J; HONG, S. H. Controlling biofilms using synthetic biology approaches. **Biotechnology Advances**, v. 40, p. 107518, maio. 2020.

FARBER, J. M; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 476, setem. 1991.

FLEMMING, H. EPS—Then and Now. **Microorganisms**, v. 4, n.41, p 1-18, nov. 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. GRAS Notification - Inulin from Jerusalem Artichoke. n. 849, 2019.

FRANCIOSA, G;MAUGLIANI, A;SCALFARO, C;FLORIDI, F;AURELI, P. Expression of internalin a and biofilm formation among *Listeria monocytogenes* clinical isolates. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 22, n. 1, p. 183–193, jan. 2009.

GAHAN, C. G. M; HILL, C. Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1345–1353, jun. 2005.

GANAN, M;COLLINS, M;RASTALL, R; HOTCHKISS, A;CHAU, H;CARRASCOSA, A;MARTINEZ-RODRIGUEZ, A. Inhibition by pectic oligosaccharides of the invasion of undifferentiated and differentiated Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2–3, p. 181–185, fev. 2010.

GHOSH, A; SUTRADHAR, S; BAISHYA, D. Delineating thermophilic xylanase from *Bacillus licheniformis* DM5 towards its potential application in xylooligosaccharides production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 1–18, jan. 2019.

GIBSON, G. R; MCCARTNEY, A. L; RASTALL, R. A. Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. **British Journal of Nutrition**, v. 93, n. S1, p. S31–S34, abr. 2005.

GOLOWCZYC, M. A;SILVA, J;TEIXEIRA, P;DE ANTONI, G;ABRAHAM, A. Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 556–560, jan. 2011.

GOMES, B;RODRIGUES, M;WINKELSTRÖTER, L;NOMIZO, A;DE MARTINIS, E.C.P. In vitro evaluation of the probiotic potential of bacteriocin producer *Lactobacillus sakei*. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 6, p. 1083–1089, jun. 2012.

GONIA, S;TUEPKER, M;HEISEL, T;AUTRAN, C;BODE, L;GALE C. Human Milk Oligosaccharides Inhibit *Candida albicans* Invasion of Human Premature Intestinal Epithelial Cells. **The Journal of Nutrition**, v. 145, n. 9, p. 1992–1998, set. 2015.

HARDING, C. P; VARGIS, E. Muscle Atrophy Marker Expression Differs between Rotary Cell Culture System and Animal Studies. **BioMed Research International**, v. 2019, p.1-12, fev.

2019.

HAUBERT, L;MENDONÇA, M;LOPES, G;DE ITAPEMA, C. M;DA SILVA, W. *Listeria monocytogenes* isolates from food and food environment harbouring tetM and ermB resistance genes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 23–29, jan. 2016.

HIGGINS, J. P. T; THOMPSON, S. G. Controlling the risk of spurious findings from meta-regression. **Statistics in Medicine**, v. 23, n. 11, p. 1663–1682, jun. 2004.

HONG, L;KIM, W;LEE, S;KANG, S;CHOI, Y;CHO, C.Pullulan Nanoparticles as Prebiotics Enhance the Antibacterial Properties of *Lactobacillus plantarum* Through the Induction of Mild Stress in Probiotics. **Frontiers in Microbiology**, v.10, p. 142, fev. 2019.

HOR, Y-Y;OOI, C;KHOO, B;CHOI, S;SEENI, A;SHAMSUDDIN, S;OON, C;ONG, K;JEONG, W;LIONG, M. *Lactobacillus* Strains Alleviated Aging Symptoms and Aging-Induced Metabolic Disorders in Aged Rats. v. 22, n. 1, p. 1–13, jan. 2019.

HTWE, M. M;TEANPAISAN, R;KHONGKOW, P;AMNUAIKIT, T. Liposomes of probiotic's lyophilized cell free supernatant; A potential cosmeceutical product. **Pharmazie**, v. 74, n. 8, p. 462–466, ago. 2019.

IGLESIAS, M. B;VIÑAS, I;COLÁS-MEDÀ, P;COLLAZO, C;SERRANO, J;ABADIAS, M.Adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes* and interaction with *Lactobacillus rhamnosus* GG after habituation on fresh-cut pear. **Journal of Functional Foods**, v. 34, p. 453–460, jul.2017.

IN LEE, S. H;BARANCELLI, G;DE CAMARGO, T;CORASSIN, C;ROSIM, R;DA CRUZ, A;CAPPATO, L;DE OLIVEIRA, C.Biofilm-producing ability of *Listeria monocytogenes* isolates from Brazilian cheese processing plants. **Food Research International**, v. 91, p. 88–91, jan. 2017.

JAFARI-NASAB, T;KHALEGHI, M;FARSINEJAD, A;KHORRAMI, S. Probiotic potential and anticancer properties of *Pediococcus* sp. isolated from traditional dairy products. **Biotechnology Reports**, v. 29, p.1-10, mar. 2021.

JAFFAR, N; OKINAGA, T; NISHIHARA, T; MAEDA, T.Enhanced phagocytosis of aggregatibacter actinomycetemcomitans cells by macrophages activated by a probiotic *Lactobacillus* strain. *Journal of Dairy Science*, v.101,n. 7,p.5789-5798, fev.2018.

JARADAT, Z. W.; BHUNIA, A. K. Adhesion, invasion, and translocation characteristics of *Listeria monocytogenes* serotypes in Caco-2 cell and mouse models. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3640–3645, jun. 2003.

KADAM, S. R;DEN, B.H;VAN, D. V. S;ZWIETERING, M;MOEZELAAR, R;ABEE, T. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, n. 3, p. 259–264, ago. 2013.

KARIYAWASAM, K. M. G. M. M; YANG, S;LEE, N;PAIK, H.Probiotic Properties of *Lactobacillus brevis*KU200019 and Synergistic Activity with Fructooligosaccharides in AntagonisticActivity against Foodborne Pathogens. **Food Science of Animal Resources**, v. 40,

n. 2, p. 297-310, mar. 2020.

KAVANAUGH, D. W;O'CALLAGHAN, J;BUTTÓ, L;SLATTERY, H;LANE, J;CLYNE, M;KANE, M;JOSHI, L;HICKEY, R. Exposure of *Bifidobacterium longum* subsp. infantis to Milk Oligosaccharides Increases Adhesion to Epithelial Cells and Induces a Substantial Transcriptional Response. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p.1-12, jun. 2013.

KAWARIZADEH, A;POURMONTASERI, M;FARZANEH, M;HOSSINZADEH, S;POURMONTASERI, Z. Cytotoxicity, apoptosis, and IL-8 gene expression induced by some foodborne pathogens in presence of *Bacillus coagulans* in HT-29 cells. **Microbial Pathogenesis**, v. 150, p.1-6, jan. 2021.

KELLY, G. Inulin-type prebiotics: A review (Part 2). **Alternative Medicine Review**, v. 14, n. 1, p. 36–55, 2009.

KHAN, I.; KANG, S. C. Probiotic potential of nutritionally improved *Lactobacillus plantarum* DGK-17 isolated from Kimchi – A traditional Korean fermented food. **Food Control**, v. 60, p. 88–94, fev. 2016.

KIM, J;KIM, Y;HAN, K;OH, S;WHANG, K;KIM, J;KIM, S. Function of cell-bound and released exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.6,n. 6, p.939-945,2006.

KLEIN, G;PACK ,A;BONAPARTE, C;REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 103–125, maio 1998.

KOLIDA, S.; GIBSON, G. R. Prebiotic capacity of inulin-type fructans. **Journal of Nutrition**,v.137,n.11,p.2503s-2506s,nov. 2007.

KÜHBACHER, A;NOVY, K;QUEREDA, J;SACHSE, M;MOYA-NILGES, M;WOLLSCHIED, B;COSSART, P;PIZARRO-CERDÁ J. Listeriolysin O-dependent host surfaceome remodeling modulates *Listeria monocytogenes* invasion. **Pathogens and Disease**, v. 76, n. 8, p. 82-94, nov. 2018.

KUMARIYA, R;GARSA, A;RAJPUT, Y;SOOD, S;AKHTAR, N;PATEL, S. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, p. 171–177, mar. 2019.

KUNZ, C; RUDLOFF, S;BAIER, W;KLEIN, N;STROBEL, S. Oligosaccharides in Human Milk: Structural, Functional, and Metabolic Aspects. **Annual Review of Nutrition**, v. 20, p. 699–722, nov. 2003.

LAPARRA, J. M;HERNANDEZ-HERNANDEZ, O;MORENO, F;SANZ, Y. Neoglycoconjugates of caseinomacropptide and galactooligosaccharides modify adhesion of intestinal pathogens and inflammatory response(s) of intestinal (Caco-2) cells. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 1096–1102, nov. 2013.

LEE, J. E; LEE, N. K; PAIK, H. D. Antimicrobial and anti-biofilm effects of probiotic *Lactobacillus plantarum* KU200656 isolated from kimchi. **Food Science and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 97–106, 2021.

LEI, X;NING, L;CAO, Y;LIU, S;ZHANG, S;QIU, Z;HU, H;ZHANG, H;LIU, S;DUAN, E.NASA-Approved Rotary Bioreactor Enhances Proliferation of Human Epidermal Stem Cells and Supports Formation of 3D Epidermis-Like Structure. **PLOS ONE**, v. 6, n. 11, p.1-8 , nov. 2011.

LEONG, D; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A; JORDAN, K. Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the Republic of Ireland. **Frontiers in Microbiology**, v. 5,p 1-8, ago. 2014.

LI, J;LI, S;LI, H;GUO, X;GUO, D;YANG, Y;WANG, X;ZHANG, C;SHAN, Z; XIA, X; SHI, C.Antibiofilm activity of shikonin against *Listeria monocytogenes* and inhibition of key virulence factors. **Food Control**, v. 120, p.1-9 , fev. 2021.

LICHT, T. R; EBERSBACH, T; FRØKIÆR, H. Prebiotics for prevention of gut infections. **Trends in Food Science & Technology**, v. 23, n. 2, p. 70–82, fev. 2012.

LIKOTRAFITI, E;TUOHY, K;GIBSON, G;RASTALL, R. Development of antimicrobial synbiotics using potentially-probiotic faecal isolates of *Lactobacillus fermentum* and *Bifidobacterium longum*. **Anaerobe**, v. 20, p. 5–13, abr. 2013.

LIM, S. M; IM, D. S. Inhibitory effects of antagonistic compounds produced from *lactobacillus brevis* MLK27 on adhesion of *Listeria monocytogenes* KCTC3569 to HT-29 cells. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 775–784, 2012.

LIU, D;LAWRENCE, M;AINSWORTH, A;AUSTIN, F. Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. **International Journal of Food Microbiology**, v. 118, n. 2, p. 101–115, set. 2007.

LYNCH, D;HILL, C;FIELD, D;BEGLEY, M.Inhibition of *Listeria monocytogenes* by the *Staphylococcus capitis* - derived bacteriocin capidermicin. **Food Microbiology**, v. 94, p.1-11, abr. 2021.

MAFTUNI, K.; ZARE, P. Effects of *Lactobacillus casei* Culture Supernatant on Differentiation of K562 Cell Line. **Medical Laboratory Journal**, v. 11, n. 5, p. 16–21, 2017.

MAHMOUDI, I; MOUSSA, O; HASSOUNA M. Symbiotic, Hypocholesterolemic and Antioxidant Effects of Potential Probiotic *Lactobacilli* Strains Isolated from Tunisian Camel Milk. **Advances in Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 328–342, abr. 2017.

MÄKELÄINEN, H; Mäkeläinen, H;SAARINEN, M;STOWELL, J;RAUTONEN, N; OUWEHAND, A.Xylo-oligosaccharides and lactitol promote the growth of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus* species in pure cultures. **Beneficial Microbes**, v. 1, n. 2, p. 139–148, 2010.

MAN, S;LIU, T;YAO, Y;LU, Y;MA, L;LU, F.Friend or foe? The roles of inulin-type fructans.**Carbohydrate Polymers**,v.252, p.1-10, jan. 2021.

MANDADZHIEVA, T;IGNATOVA-IVANOVA, T;KAMBAREV, S;ILIEV, I; IVANOVA, I. Utilization of Different Prebiotics by *Lactobacillus* Spp. and *Lactococcus* Spp. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 25, n. suppl. 4, p. 117–120, dez. 2014.

MANGANYE, P; DESAI, B; DAKA, M; BISMILLA, R. Listeriosis in the City of Johannesburg, South Africa. **Southern African Journal of Public Health**, v. 2, n. 3, p. 55–58, 2018.

MARDER, E. P; GRIFFIN, P; CIESLAK, P; DUNN, J; HURD, S; JERVIS, R; LATHROP, S; MUSE, A; RYAN, P; SMITH, K; TOBIN-D'ANGELO, M; VUGIA, D; HOLT, K; WOLPERT, B; TAUXE, R; GEISSLER, A. Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006–2017. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 67, n. 11, p. 324–328, mar. 2018.

MARINI, E; MAGI, G; FERRETTI, G; BACCHETTI, T; GIULIANI, A; PUGNALONI, A; RIPPO, M; FACINELLI, B. Attenuation of *Listeria monocytogenes* Virulence by Cannabis sativa L. Essential Oil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 293, ago. 2018.

MARTINEZ, R. C. R; STALIANO, C; VIEIRA, A; VILLARREAL, M; TODOROV, S; SAAD, S; FRANCO, B. Bacteriocin production and inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in a potentially synbiotic cheese spread. **Food Microbiology**, v. 48, p. 143–152, jun. 2015.

MARTINEZ, R. C. R; DE MARTINIS, E. C. P. Evaluation of bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* 1 against *Listeria monocytogenes* 1/2a growth and haemolytic activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 83–87, 2005.

MARTINS, I. S; DA CONCEIÇÃO, F. F; MIGUEL, M; DE SÁ, C. D. M; CARDOSO, F; DE GOUVEIA, M. A; MASCARENHAS, L; NOUÉR, S; BARBOSA, A; VALLIM, D; HOFER, E; REBELLO, R; RILEY, L; MOREIRA, B. A cluster of *Listeria monocytogenes* infections in hospitalized adults. **American journal of infection control**, v. 38, n. 9, p. e31–e36, nov. 2010.

MATHIPA, M. G; THANTSHA, M. S; BHUNIA, A. K. *Lactobacillus casei* expressing Internalins A and B reduces *Listeria monocytogenes* interaction with Caco-2 cells in vitro. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 715–729, 1 jul. 2019.

MATHUR, H; BERESFORD, T. P; COTTER, P. D. Health Benefits of Lactic Acid Bacteria (LAB) Fermentates. **Nutrients** 2020, v. 12, n. 6, p. 1679–1695, jun. 2020.

MATSUDA, Y; CHO, O; SUGITA, T; OGISHIMA, D; TAKEDA, S. Culture Supernatants of *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus crispatus* Inhibit *Candida albicans* Biofilm Formation and Adhesion to HeLa Cells. **Mycopathologia**, v. 183, n. 4, p. 691–700, mar. 2018.

MAYR-HARTING, A; HEDGES, A. J; BERKELEY, R. C. W. Methods for studying bacteriocins. **In: Methods in Microbiology**, v. 7, p. 313–342, 1972.

MCLAUCHLIN, J. Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 9, n. 3, p. 210–213, mar. 1990.

MCMULLEN, P. D; FREITAG, N. E. Assessing Bacterial Invasion of Cardiac Cells in Culture and Heart Colonization in Infected Mice Using *Listeria monocytogenes*. **JoVE Journal of Visualized Experiments**, v. 2015, n. 99, p. 1–8, maio 2015.

MEDEIROS, M;DE CASTRO, V;DE ALENCAR, M. A;PEREIRA, M;DE MARTINIS, E.C.P;PERECMANIS, S;SANTANA, A. Assessment of Internalin A Gene Sequences and Cell Adhesion and Invasion Capacity of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Foods of Animal and Related Origins. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 18, n. 4, p. 243–252, abr. 2021.

MERGHNI, A;BEM, N. M;HELALI, I;HENTATI, H;BONGIOVANNI, A;LAFONT, F;AOUNI, M;MASTOURI, M. Assessment of adhesion, invasion and cytotoxicity potential of oral *Staphylococcus aureus* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 86, p. 1–9, set. 2015.

MERLICH, A;GALKIN, M;CHOISET, Y;LIMANSKA, N;VASYLIEVA, N;IVANYTSIA, V;HAERTLÉ, T. Characterization of the bacteriocin produced by *Enterococcus italicus* ONU547 isolated from Thai fermented cabbage. **Folia Microbiologica**, v. 64, n. 4, p. 535–545, jan. 2019.

MIAO, X ;LIU, H;ZHENG, Y;GUO, D;SHI, C;XU, Y;XIA, X. Inhibitory Effect of Thymoquinone on *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 Biofilm Formation and Virulence Attributes Critical for Human Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 9, p. 304-314, ago. 2019.

MIYAMOTO, Y;SUZUKI, S;NOMURA, K;ENOSAWA, S. Improvement of hepatocyte viability after cryopreservation by supplementation of long-chain oligosaccharide in the freezing medium in rats and humans. **Cell Transplantation**, v. 15, n. 10, p. 911–919, 2006.

MOJIBI, P; TAFVIZI, F; TORBATI, M. B. Cell-bound Exopolysaccharide Extract from Indigenous Probiotic Bacteria Induce Apoptosis in HT–29 cell-line. **Iranian Journal of Pathology**, v. 14, n. 1, p. 41-51, jan. 2019.

MOKOENA, M. P. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. **Molecules**, v. 22, n. 8, p. 1255-1268, jul. 2017.

MONTEAGUDO-MERA, A;RASTALL, R;GIBSON, G;CHARALAMPOPOULOS, D;CHATZIFRAGKOU, A. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 16, p. 6463–6472, jul. 2019.

MORELLI, L. In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 11, p. 1278–1283, nov. 2007.

MORONI, O;KHEADR, E;BOUTIN, Y;LACROIX, C;FLISS, I. Inactivation of adhesion and invasion of food-borne *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Bifidobacterium* strains of human origin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 6894–6901, nov. 2006.

MOTEVASELI, E;SHIRZAD, M;AKRAMI, S;MOUSAVI, A;MIRSALEHIAN, A;MODARRESSI, M. Normal and tumour cervical cells respond differently to vaginal lactobacilli, independent of pH and lactate. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 7, p. 1065–1072, jul. 2013.

MURINDA, S. E; RASHID, K. A; ROBERTS, R. F. In vitro assessment of the cytotoxicity of

nisin, pediocin, and selected colicins on simian virus 40-transfected human colon and Vero monkey kidney cells with trypan blue staining viability assays. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 5, p. 847–853, maio 2003.

NAGARAJAN, V;PENG, M;TABASHSUM, Z;SALAHEEN, S;PADILLA, J;BISWAS, D. Antimicrobial Effect and Probiotic Potential of Phage Resistant *Lactobacillus plantarum* and its Interactions with Zoonotic Bacterial Pathogens. **Foods** **2019**, v. 8, n. 6, p. 194-207, jun. 2019.

NAKAMURA, S; KUDA, T;AN, C;KANNO, T;TAKAHASHI, H;KIMURA, B. Inhibitory effects of *Leuconostoc mesenteroides* 1RM3 isolated from narezushi, a fermented fish with rice, on *Listeria monocytogenes* infection to Caco-2 cells and A/J mice. **Anaerobe**, v. 18, n. 1, p. 19–24, fev. 2012.

NEWBURG, D. S; RUIZ-PALACIOS, G. M; MORROW, A. L. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. **Annual Review of Nutrition**, v. 25, p. 37–58, jul. 2005.

OGAKI, M. B; FURLANETO, M. C; MAIA, L. F. Review: General aspects of bacteriocins. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 267–276, 2015.

OLIVEIRA, R. P. S; FLORENCE, A.C.R; SILVA,R.C; PEREGO, P; CONVERTI, A; GIOIELLI, L.A; OLIVEIRA, M.N. Effect of different prebiotics on the fermentation kinetics, probiotic survival and fatty acids profiles in nonfat symbiotic fermented milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 3, p. 467–472, jan. 2009.

OLIVEIRA, G.; GONZÁLEZ-MOLERO, I. Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. **Endocrinología y Nutrición**, v. 63, n. 9, p. 482–494, nov. 2016.

OLOKETUYI, S. F; KHAN, F. Inhibition strategies of *Listeria monocytogenes* biofilms—current knowledge and future outlooks. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 9, p. 728–743, set. 2017.

OMOLO, M. A; WONG, Z-Z; MERGEN, A.K; HASTINGS, J.C; LE, N.C; REILAND, N.H.A; CASE, K.A; BAUMLE, D.J. Antimicrobial Properties of Chili Peppers. **Journal of Infectious Diseases & Therapy**, v. 2, n. 4, p. 1–8, jun. 2014.

OOI, S. T; LORBER, B. Gastroenteritis Due to *Listeria monocytogenes*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 9, p. 1327–1332, maio 2005.

ORTEGA-GONZÁLEZ, M;SÁNCHEZ, M. F;MOLINA-SANTIAGO, C;LÓPEZ-POSADAS, R;PACHECO, D;KRELL, T;MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O;ABDELALI, D.Fructooligosaccharides reduce *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 pathogenicity through distinct mechanisms. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1-12, jan. 2014.

ORTIZ, L;RUIZ, F;PASCUAL, L;BARBERIS, L.Effect of two probiotic strains of *Lactobacillus* on in vitro adherence of *listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, and *Staphylococcus aureus* to vaginal epithelial cells. **Current Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 679–684, 2014.

PAN, M; KUMAREE, K. K; SHAH, N. P. Physiological Changes of Surface Membrane in *Lactobacillus* with Prebiotics. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 3, p. 744–750, mar. 2017.

- PARVEEN R. R;ANANDHARAJ, M;HEMA, S;DEEPIKA, R;RAVINDRAN, A.Purification of Antilisterial Peptide (Subtilisin A) from Novel *Bacillus tequilensis* FR9 and Demonstrate Their Pathogen Invasion Protection Ability Using Human Carcinoma Cell Line. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1910-1918, 2016.
- PEREIRA, M. G;DE ALMEIDA, O;DA SILVA, H;ISHIZAWA, M;DE MARTINIS, E.Studies on host-foodborne bacteria in intestinal three-dimensional cell culture model indicate possible mechanisms of interaction. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 1–18, jan. 2021.
- PÉREZ-IBARRECHE, M;CASTELLANO, P;LECLERCQ, A;VIGNOLO G.Control of *Listeria monocytogenes* biofilms on industrial surfaces by the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CRL1862. **FEMS Microbiology Letters**, v. 363, n. 12, p. 1–6, jun. 2016.
- PEREZ, R. H; ZENDO, T; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1-13, ago. 2014.
- PETERSON, J. W. Bacterial Pathogenesis. **Bacteria versus Antibacterial Agents**, p. 33–42, abr. 1996.
- PIOTROWSKI, M;WULTAŃSKA, D;OBUCH-WOSZCZATYŃSKI, P;PITUCH, H.Fructooligosaccharides and mannose affect *Clostridium difficile* adhesion and biofilm formation in a concentration-dependent manner. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 38, n. 10, p. 1975–1984, out. 2019.
- PIRONE-DAVIES, C;CHEN, Y;PIGHTLING, A;RYAN, G;WANG, Y;YAO, K;HOFFMANN, M;ALLARD, M. Genes significantly associated with lineage II food isolates of *Listeria monocytogenes*. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 1–11, set. 2018.
- PIZARRO-CERDÁ, J;CHARBIT, A;ENNINGA, J;LAFONT, F;COSSART, P.Manipulation of host membranes by the bacterial pathogens *Listeria*, *Francisella*, *Shigella* and *Yersinia*. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 60, p. 155–167, dez. 2016.
- PIZARRO-CERDÁ, J; KÜHBACHER, A; COSSART, P. Entry of *Listeria monocytogenes* in Mammalian Epithelial Cells: An Updated View. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 2, n. 11, p. 1-18, nov. 2012.
- POURBAFERANI, M;MODIRI, S;NOROUZY, A;MALEKI, H;HEIDARI, M;ALIDOUST, L;DERAKHSHAN, V;ZAHIRI, H;NOGHABI, K.A Newly Characterized Potentially Probiotic Strain, *Lactobacillus brevis* MK05, and the Toxicity Effects of its Secretory Proteins Against MCF-7 Breast Cancer Cells. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 13, n. 4, p. 982–992, mar. 2021.
- PRANCKUTE, R;KAUNIETIS, A;KUISIENE, N;ČITAVIČIUS, D.Combining prebiotics with probiotic bacteria can enhance bacterial growth and secretion of bacteriocins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 89, p. 669–676, 1 ago. 2016.
- QUINTERO, M;MALDONADO, M;PEREZ-MUNOZ, M;JIMENEZ, R;FANGMAN, T; RUPNOW, J;WITTKE, A;RUSSELL, M;HUTKINS, R.Adherence Inhibition of *Cronobacter sakazakii* to Intestinal Epithelial Cells by Prebiotic Oligosaccharides. **Current Microbiology**,

v. 62, n. 5, p. 1448–1454, fev. 2011.

RABIN, N; ZHENG, Y; OPOKU-TEMENG, C; DU, Y; BONSU, E; SINTIM, H.O. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 493–512, mar. 2015.

RADOSHEVICH, L; COSSART, P. *Listeria monocytogenes* : towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 32–46, nov. 2017.

RADTKE, A. L; HERBST-KRALOVETZ, M. M. Culturing and applications of rotating wall vessel bioreactor derived 3D epithelial cell models. **Journal of Visualized Experiments**, n. 62, abr. 2012.

RAHNAMA, H; NOURI, K. S; AMINOROAYA, A; MOLAVIAN, M; ALLAFCHIAN, A; KHALILI, S. Facile preparation of chitosan-dopamine-inulin aldehyde hydrogel for drug delivery application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 185, p. 716–724, ago. 2021.

RAVI, M; PARAMESH, V; KAVIYA, S; ANURADHA, E; SOLOMON, P. F. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 1, p. 16–26, jan. 2015.

REIMER, A; WEEDMARK, K; PETKAU, A; PETERSON, C; WALKER, M; KNOX, N; KENT, H; MABON, P; BERRY, C; TYLER, S; TSCHETTER, L; JEROME, M; ALLEN, V; HOANG, L; BEKAL, S; CLARK, C; NADON, C; VAN, D.G; PAGOTTO, F; GRAHAM, M; FARBER, J; GILMOUR, M. Shared genome analyses of notable listeriosis outbreaks, highlighting the critical importance of epidemiological evidence, input datasets and interpretation criteria. **Microbial Genomics**, v. 5, n. 1, p. 1–16, jan. 2019.

RENDUELES, O; GHIGO, J. M. Multi-species biofilms: How to avoid unfriendly neighbors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 5, p. 972–989, 2012.

ROBERFROID, M. Prebiotics: The Concept Revisited. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3, p. 830S–837S, 1 mar. 2007.

RODRIGUES, L. B; DOS SANTOS, L; TAGLIARI, V; RIZZO, N; TRENHAGO, G; DE OLIVEIRA, A; GOETZ, F; DO NASCIMENTO, V. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1082–1085, 2010.

ROGALLA, D; BOMAR, P. A. *Listeria Monocytogenes*. **Encyclopedia of Microbiology**, p. 803–818, jul. 2021.

ROMANOVA, N. A; GAWANDE, P; BROVKO, L; GRIFFITHS, M. Rapid methods to assess sanitizing efficacy of benzalkonium chloride to *Listeria monocytogenes* biofilms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, n. 3, p. 231–237, dez. 2007.

ROSA, L. S; SANTOS, M; ABREU, J; BALTHAZAR, C; ROCHA, R; SILVA, H; ESMERINO, E; DUARTE, M; PIMENTEL, T; FREITAS, M; SILVA, M; CRUZ, A; TEODORO, A. Antiproliferative and apoptotic effects of probiotic whey dairy beverages in human prostate cell lines. **Food Research International**, v. 137, p. 1–13, nov. 2020.

ROSAS-RAMÍREZ, D. G;FRAGOSO-SERRANO, M;ESCANDÓN-RIVERA, S;VARGAS-RAMÍREZ, A;REYES-GRAJEDA, J;SORIANO-GARCÍA, M.Resistance-modifying Activity in Vinblastine-resistant Human Breast Cancer Cells by Oligosaccharides Obtained from Mucilage of Chia Seeds (*Salvia hispanica*). **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 6, p. 906–914, jun. 2017.

RUBIO-GÓMEZ, J. M;SANTIAGO, C;UDAONDO, Z;GARITAONAINDIA, M;KRELL, T;RAMOS, J;DADDAOUA, A.Full Transcriptomic Response of *Pseudomonas aeruginosa* to an Inulin-Derived Fructooligosaccharide. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 202-223, 20 fev. 2020.

SAKR, E. A. E; MASSOUD, M. I. Impact of prebiotic potential of stevia sweeteners-sugar used as synbiotic preparation on antimicrobial, antibiofilm, and antioxidant activities. **Lwt**, v. 144, p.1-12 ,mar. 2021.

SALLI, K;SÖDERLING, E;HIRVONEN, J;GÜRISOY, U;OUWEHAND, A.Influence of 2'-fucosyllactose and galacto-oligosaccharides on the growth and adhesion of *Streptococcus mutans*. **British Journal of Nutrition**, v. 124, n. 8, p. 824–831, out. 2020.

SAMROT, A. V; MOHAMED, A.A;FARADJVA, E; JIE, L.S; SZE, C.H; ARIF, A;SEAN, T.C; MICHAEL, E.N; MUN,C.Y; QI, N.X; MOK, L.P; KUMAR, S.S. Mechanisms and Impact of Biofilms and Targeting of Biofilms Using Bioactive Compounds—A Review. **Medicina** **2021**, v. 57, n. 8, p. 839, ago. 2021.

SCHUCHAT, A;DEAVER, K;WENGER, J;PLIKAYTIS, B;MASCOLA, L;PINNER, R;REINGOLD, A;BROOME, C.Role of Foods in Sporadic Listeriosis: I. Case-Control Study of Dietary Risk Factors. **JAMA**, v. 267, n. 15, p. 2041–2045, abr. 1992.

SCHULZ, D; PEREIRA, M. A; BONELLI, R. R. Bacteriocinas : Mecanismo De Ação E Uso Na Conservação De Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 229–235, 2003.

SCHUSTER, J. A; VOGEL, R. F; EHRMANN, M. A. Characterization and distribution of CRISPR–Cas systems in *Lactobacillus sakei*. **Archives of Microbiology**, v. 201, n. 3, p. 337–347, jan. 2019.

SCHWAB, J. P; EDELWEISS, M. I. A. Identificação de *Listeria monocytogenes* em placentas humanas e espécimes de aborto pela técnica de imunoistoquímica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 2, p. 111–114, jun. 2003.

SERENO, M. J;VIANA, C;PEGORARO, K;DA SILVA, D;YAMATOGLI, R;NERO, L;BERSOT, L. Distribution, adhesion, virulence and antibiotic resistance of persistent *Listeria monocytogenes* in a pig slaughterhouse in Brazil. **Food Microbiology**, v. 84, p. 1-7, dez. 2019.

SEVEAU, S; PIZARRO-CERDA, J; COSSART, P. Molecular mechanisms exploited by *Listeria monocytogenes* during host cell invasion. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 10, p. 1167–1175, ago. 2007.

SHARMA, G;RATURI, K;DANG, S;GUPTA, S;GABRANI, R.Inhibitory effect of cinnamaldehyde alone and in combination with thymol, eugenol and thymoquinone against *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Herbal Medicine**, v. 9, p. 68–73, set. 2017.

SHOAIB, M;SHEHZAD, A;OMAR, M;RAKHA, A;RAZA, H;SHARIF, H;SHAKEEL, A;ANSARI, A;NIAZI, S.Inulin: Properties, health benefits and food applications. **Carbohydrate Polymers**, v.147,p. 444-454,ago. 2016.

SIEGMAN-IGRA, Y;LEVIN, R;WEINBERGER, M;GOLAN, Y;SCHWARTZ, D;SAMRA, Z;KONIGSBERGER, H;YINNON, A;RAHAV, G;KELLER, N;BISHARAT, N;JEHUDA, K. R;ALKAN, M;LANDAU, Z;NOVIKOV, J;HASSIN, D;RUDNICKI, C;RUTH, K.S;ZVI, S. R;SHOHAT, T.*Listeria monocytogenes* Infection in Israel and Review of Cases Worldwide. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 305-310, mar.2002.

SINGH, N;KAUR, R;SINGH, B;ROKANA, N;GOEL, G;PUNIYA, A;PANWAR, H.Impairment of *Cronobacter sakazakii* and *Listeria monocytogenes* biofilms by cell-free preparations of lactobacilli of goat milk origin. **Folia Microbiologica**, v. 65, n. 1, p. 185–196, jun.2020.

SINGH, T. P;KAUR, G;KAPILA, S;MALIK, R.Antagonistic Activity of *Lactobacillus reuteri* Strains on the Adhesion Characteristics of Selected Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p.1-8, mar. 2017.

SLEATOR, R. D; CLIFFORD, T; HILL, C. Gut osmolarity: A key environmental cue initiating the gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection? **Medical Hypotheses**, v. 69, n. 5, p. 1090–1092, jan. 2007.

SOLANO, C; ECHEVERZ, M; LASA, I. Biofilm dispersion and quorum sensing. **Current Opinion in Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 96–104, abr. 2014.

SONG, M;YUN, B;MOON, J;PARK, D;LIM, K;OH, S.Characterization of Selected *Lactobacillus* Strains for Use as Probiotics. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 35, n. 4, p. 551-556, ago. 2015.

SOPHATHA, B; PIWAT, S; TEANPAISAN, R. Adhesion, anti-adhesion and aggregation properties relating to surface charges of selected *Lactobacillus* strains: study in Caco-2 and H357 cells. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 6, p. 1349–1357, mar. 2020.

SOPHIAN, A;JULENDRA, H;SOFYAN, A;KARIMY, M;ABINAWANTO. Adhesion activity assay of *Lactobacillus plantarum* AKK30 combined with oligosaccharides Adhesion activity assay of *Lactobacillus plantarum* AKK30 combined with oligosaccharides.**IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 251, p.1-7,2019.

SRIVASTAVA, N;ELLEPOLA, K;VENKITESWARAN, N;CHAI, L;OHSHIMA, T; SENEVIRATNE, C.*Lactobacillus plantarum* 108 inhibits *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* mixed-species biofilm formation. **Antibiotics**, v. 9, n. 8, p. 1–20, ago.2020.

STANBRO, J;PARK, J;BOND, M;STOCKELMAN, M;SIMONS, M;WATTERS, C.Topical Delivery of *Lactobacillus* Culture Supernatant Increases Survival and Wound Resolution in Traumatic *Acinetobacter baumannii* Infections. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 3, p. 809–818, set. 2020.

STEPANOVIĆ, S;VUKOVIĆ, D;DAKIĆ, I;SAVIĆ, B;ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M.A modified

microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, abr. 2000.

STOODLEY, P; SAUER, K; DAVIES, D; COSTERTON J. Biofilms as Complex Differentiated Communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187–209, nov. 2003.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 21, n. 1, p. A.3B.1-A.3B.2, mar. 1997.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 111, n. 1, p. A3.B.1-A3.B.3, nov. 2015.

SUSEWIND, J; CARVALHO-WODARZ, C.S; REPNIK, U; COLLNOT, E.M; SCHNEIDER-DAUM, N; GRIFFITHS, G.W; LEHR, C-M. A 3D co-culture of three human cell lines to model the inflamed intestinal mucosa for safety testing of nanomaterials. **Nanotoxicology**, v. 10, n. 1, p. 53–62, jan. 2015.

TABASHSUM, Z; PENG, M; BERNHARDT, C; PATEL, P; CARRION, M; BISWAS, D. Synbiotic-like effect of linoleic acid overproducing *Lactobacillus casei* with berry phenolic extracts against pathogenesis of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Gut Pathogens**, v. 11, n. 1, p. 1–11, jul. 2019.

TAN, Y; LEONHARDA, M; MOSERB, D; MA, S; SCHNEIDER-STICKLER, B. Inhibitory effect of probiotic lactobacilli supernatants on single and mixed *non-albicans Candida* species biofilm. **Archives of Oral Biology**, v. 85, p. 40–45, ago. 2018.

TASHAKOR, A; HOSSEINZADEHDEHKORDI, M; EMRUZI, Z; GHOLAMI, D. Isolation and identification of a novel bacterium, *Lactobacillus sakei* subsp. dgh strain 5, and optimization of growth condition for highest antagonistic activity. **Microbial Pathogenesis**, v. 106, p. 78–84, maio 2017.

TODOROV, S. D; DE PAULA, O.A.L; CAMARGO, A.C; LOPES, D.A; NERO, L.A. Combined effect of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST8SH and vancomycin, propolis or EDTA for controlling biofilm development by *Listeria monocytogenes*. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 50, n. 1, p. 48–55, 2018.

TOURDJMAN, M; LAURENT, É; LECLERCQ, A. Listériose humaine: Une zoonose d'origine alimentaire. **Revue Francophone des Laboratoires**, v. 2014, n. 464, p. 37–44, jul. 2014.

TRENTIN, D. DA S; GIORDANI, R. B; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 213–236, dez. 2013.

UNSWORTH, B. R; LELKES, P. I. Growing tissues in microgravity. **Nature Medicine**, v. 4, n. 8, p. 901–907, ago. 1998.

VAZQUEZ-ARMENTA, F. J; HERNANDEZ-OÑATE, MA; MARTINEZ-TELLEZ, M.A; LOPEZ-ZAVALA, A.A; GONZALEZ-AGUILAR, G.A; GUTIERREZ-PACHECO, M.M; AYALA-ZAVALA, J.F. Quercetin repressed the stress response factor (sigB) and virulence

genes (*prfA*, *actA*, *inlA*, and *inlC*), lower the adhesion, and biofilm development of *L. monocytogenes*. **Food Microbiology**, v. 87, p. 1-2, maio 2020.

VEMURI, R;SHINDE,T;SHASTRI,M.D; PERERA,A.P; TRISTRAM,S; MARTONI,C.J; GUNDAMARAJU,R; AHUJA,K.D.K; BALL,M; ERI,R.1. A human origin strain *Lactobacillus acidophilus* DDS-1 exhibits superior in vitro probiotic efficacy in comparison to plant or dairy origin probiotics. **International Journal of Medical Sciences**, v. 15, n. 9, p. 840–848, maio.2018.

VISHWAKARMA, V. Impact of environmental biofilms: Industrial components and its remediation. **Journal of Basic Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 198–206, mar. 2020.

VRIES, J; Bourgot, C.L;Calame, W; Respondek, F. Effects of β -Fructans Fiber on Bowel Function: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 91-95, jan. 2019.

WALLACE, N; RINEHART, E; SUN, Y. Stimulating Respiratory Activity Primes Anaerobically Grown *Listeria monocytogenes* for Subsequent Intracellular Infections. **Pathogens**, v. 7, n. 4, p. 96-108, dez. 2018.

WALSH, H; HENDRICKS, G; GUO, M. Physico-Chemical Properties, Probiotic Survivability, Microstructure, and Acceptability of a Yogurt-Like Symbiotic Oats-Based Product Using Pre-Polymerized Whey Protein as a Gelation Agent. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 5, p. M327–M337, jun. 2010.

WANG, J; SUN,B; CAO, Y; SONG, H; COLLEGE, T.Y. Inhibitory effect of wheat bran feruloyl oligosaccharides on oxidative DNA damage in human lymphocytes. **Food Chemistry**, v. 109, n. 1, p. 129–136, jul. 2008.

WASFI, R; EL-RAHMAN,O.A.A; ZAFER, M.M; ASHOUR, H.M. Probiotic *Lactobacillus* sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans*. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 22, n. 3, p. 1972–1983,nov. 2018.

WIDYARMAN, A. S; DRESTIA, A.M; BACHTIAR, E.W; BACHTIAR, B.M. The Anti-inflammatory Effects of Glycerol-supplemented Probiotic *Lactobacillus reuteri* on Infected Epithelial cells In vitro. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 9, n. 2, p. 298-303, jun.2018.

WINKELSTRÖTER, L. K; GOMES, B.C;THOMAZ, M.R.S; SOUZA, V.M; DE MARTINIS, E.C.P. *Lactobacillus sakei* 1 and its bacteriocin influence adhesion of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1404–1407, ago. 2011.

WINKELSTRÖTER, L. K; DE MARTINIS, E. C. P. Effect of Bacteriocins and Conditions that Mimic Food and Digestive Tract on Biofilm Formation, In Vitro Invasion of Eukaryotic Cells and Internalin Gene Expression by *Listeria monocytogenes*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 5, n. 3, p. 153–164, set. 2013.

WON, S. M; CHEN,S; PARK,K.W; YOON, J-H. Isolation of lactic acid bacteria from kimchi and screening of *Lactobacillus sakei* ADM14 with anti-adipogenic effect and potential probiotic properties. **Food Science and Technology journal LWT**, v. 126, p. 1-12, maio 2020.

XU, Y; LI, G; ZHANG, B; WU, Q; WANG, X; XIA, X. Tannin-rich pomegranate rind extracts

reduce adhesion to and invasion of Caco-2 cells by *Listeria monocytogenes* and decrease its expression of virulence genes. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 1, p. 128–133, setem. 2015.

ZHANG, G; ID , LIU, J; LI, R; JIAO, S; FENG, C; WANG, Z.A; DU, Y. Conjugation of inulin improves anti-biofilm activity of chitosan. **Marine Drugs**, v. 16, n. 5, p. 151-157, maio 2018.

ZHENG, J. *et al.* A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, abr. 2020.

ZHU, X;LIU,D; SINGH, A.K;DROLIA,R; BAI,X;TENGURIA,S;BHUNIA, A.K. Tunicamycin Mediated Inhibition of Wall Teichoic Acid Affects *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* Cell Morphology, Biofilm Formation and Virulence. **Frontiers in Microbiology**, v.9 , n.1352 , p. 1-20, jul. 2018.

ZILELIDOU, E. A; RYCHLI, K;MANTHOU, E; CIOLACU, L; WAGNER,M; SKANDAMIS, P.N. Highly Invasive *Listeria monocytogenes* Strains Have Growth and Invasion Advantages in Strain Competition. **PLOS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1-17 , nov. 2015.

ZOELLNER, C; JENNINGS, R;WIEDMANN, M; IVANEK, R. EnABLE: An agent-based model to understand *Listeria* dynamics in food processing facilities. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–14, jan. 2019.

**APÊNDICE A - DENSIDADES ÓTICAS DO ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA
FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM MICROPLACAS PELO ENSAIO DO CRISTAL
VIOLETA (ITEM 4.4).**

Tabela 3-Densidades óticas (DO) em 595nm do ensaio de avaliação da formação de biofilmes por *L. monocytogenes* (L.m) ATCC 19115, com adição de inulina, Sobrenadante Livre de Células (SLC) de *Lactobacillus sakei* 1 e combinações.

Condição	DO
Branco*	0,154 ± 0,071
L.m ATCC	0,242 ± 0,064
L.m ATCC + Inulina	0,155 ± 0,028
L.m ATCC + SLC	0,126 ± 0,016
L.m ATCC + SLC + Inulina	0,124 ± 0,023

Fonte: Dados do autor.

***Branco:** Absorbância do controle negativo meio de cultivo não inoculado (Doc).

APÊNDICE B-RESULTADOS DO ENSAIO DE ADESÃO.

Tabela 4- Porcentagens de adesão em células Caco-2 3D, do isolado de *L. monocytogenes* (L.m) ATCC 19115 na presença e ausência do prebiótico inulina (1% p/v) e de sobrenadante livre de células (SLC) de *Lactobacillus sakei* 1 (*L. sakei* 1) e Co-cultura de *L. sakei* 1 estes também combinados com prebiótico inulina, e o perfil de adesão de *L. sakei* 1.

Condições	Adesão (%)
L.m ATCC	41,56±8,4
L.m ATCC + Inulina	37,86±8,9
L.m ATCC + SLC	19,59± 0,47
L.m ATCC + SLC + Inulina	18,91 ± 0,99
<i>L. sakei</i> 1	32,04 ± 4,2
L.m ATCC + <i>L. sakei</i> 1	18,70 ± 2,19
L.m ATCC + <i>L. sakei</i> 1 + Inulina	17,46 ± 1,31

Fonte: Dados do autor.

APÊNDICE C-RESULTADOS DO ENSAIO DE INVASÃO.

Tabela 5- Porcentagens de invasão em células Caco-2 3D, do isolado de *L. monocytogenes* (L.m) ATCC 19115 na presença e ausência do prebiótico inulina (1% p/v) e de sobrenadante livre de células (SLC) de *Lactobacillus sakei* 1 (*L. sakei* 1) e Co-cultura de *L. sakei* 1 estes também combinados com prebiótico inulina, e o perfil de invasão de *L. sakei* 1.

Condição	Invasão (%)
L.m ATCC	47,55 ± 6,06
L.m ATCC + inulina	47,08±3,55
L.m ATCC + SLC	36,96±5,59
L.m ATCC + SLC + inulina	35,32 ± 3,51
<i>L. sakei</i> 1	0 ± 0
L.m ATCC + <i>L. sakei</i> 1	23,81 ± 1,70
L.m ATCC + <i>L. sakei</i> 1+ inulina	20,21 ± 3,41

Fonte: Dados do autor.

APÊNDICE D-RESULTADOS DO ENSAIO DE AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE METABÓLICA.

Tabela 6- Porcentagens de atividade metabólica de células Caco-2 3D, na presença e ausência de 0,5x (50 UA/mL) de sobrenadante livre de células de *Lactobacillus sakei* 1 (SLC), 1x (100 UA/mL) de SLC, 2x (200 UA/mL) de SLC e 10x (1000 UA/mL) de SLC estes também combinados com prebiótico inulina (1% p/v) também na presença de *L. sakei* 1 e *L. sakei* 1 com prebiótico inulina, e apenas na presença de inulina (1% p/v).

Condição	Atividade metabólica (%)
0,5x SLC	70,95±1,29
1x SLC	62,02±1,09
2x SLC	62,66±6,83
10x SLC	54,43 ± 13,61
Inulina 1% (p/v)	85,66 ± 6,26
<i>L. sakei</i> 1	53,97 ± 9,85
<i>L. sakei</i> 1 + Inulina	68,34 ± 8,99
0,5x SLC + Inulina	81,32 ± 0,07
1x SLC + Inulina	64,60 ± 8,06
2x SLC + Inulina	61,64 ± 5,35
10x SLC + Inulina	66,29 ± 1,81

Fonte: Dados do autor.

APÊNDICE E-RESULTADOS DO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE CELULAR

Tabela 7- Porcentagens de células viáveis de células Caco-2 3D, na presença e ausência de 0,5x (50 UA/mL) de sobrenadante livre de células de *Lactobacillus sakei* 1 (SLC), 1x (100 UA/mL) de SLC, 2x (200 UA/mL) de SLC e 10x (1000 UA/mL) de SLC estes também combinados com prebiótico inulina (1% p/v) também na presença de *L. sakei* 1 e *L. sakei* 1 com prebiótico inulina, e apenas na presença de inulina (1% p/v).

Condição	Células viáveis (%)
0,5x SLC	75,53 ± 4,81
1x SLC	66,34 ± 10,67
2x SLC	70,83 ± 11,17
10x SLC	59,53 ± 8,90
Inulina 1% (p/v)	82,01 ± 8,27
<i>L. sakei</i> 1	46,45 ± 13,33
<i>L. sakei</i> 1 + Inulina	48,00 ± 3,46
0,5x SLC + Inulina	76,55 ± 5,60
1x SLC + Inulina	81,83 ± 6,53
2x SLC + Inulina	73,49 ± 15,69
10x SLC + Inulina	61,35 ± 14,74

Fonte: Dados do autor.

