

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA**  
**E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

*Lactobacillus* spp de origem humana probióticos potenciais:  
características funcionais e de segurança

**IVAN PAULO BIANO DA SILVA**

**2015**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

***Lactobacillus* spp DE ORIGEM HUMANA PROBIÓTICOS  
POTENCIAIS: CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS E DE  
SEGURANÇA**

**IVAN PAULO BIANO DA SILVA**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Rosa Helena Luchese**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica – RJ  
Julho de 2015

613.2

S5861

T

Silva, Ivan Paulo Bianco da, 1973-

*Lactobacillus spp* de origem humana  
probióticos potenciais: características  
funcionais e de segurança / Ivan Paulo  
Biano da Silva - 2015.

54 f.

Orientador: Rosa Helena Luchese.

Dissertação (mestrado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de  
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos.

Bibliografia: f. 34-43.

1. Alimentos funcionais - Teses. 2.  
Lactobacilo - Teses. 3. Probióticos -  
Teses. 4. Tecnologia de alimentos - Teses.  
I. Luchese, Rosa Helena, 1957-. II.  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência  
e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

IVAN PAULO BIANO DA SILVA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 29 /07/2015



Rosa Helena Luchese. Ph.D.UFRJ  
(Orientadora)



Adriano Gomes da Cruz. Dr. IFRJ



Sílvia Magalhães Couto Garcia. Drª. UFRJ

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha esposa Débora Gaspar Soares da Silva por sempre ter me incentivado a continuar e também por compreender e aceitar minha ausência principalmente nos longos finais de semana dedicados ao laboratório.*

## **AGRADECIMENTOS**

**Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado saúde e força para continuar a caminhada até aqui.**

**À minha esposa pelo incentivo, força e por sempre acreditar que daria certo.**

**À minha família, meu irmão Ulysses e minha irmã Alessandra e em especial minha mãe por sempre ter se preocupado em garantir os nossos estudos.**

**À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), a minha querida Rural, onde me criei, estudei e estudo, e hoje também trabalho.**

**À chefia do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA), meu local de trabalho, por permitir que eu estudasse.**

**À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Rosa Luchese pela paciência, pelas importantes contribuições e principalmente por estar sempre disposta a ajudar.**

**Aos meus amigos, aos quais não poderia deixar de mencionar pela importância na elaboração deste trabalho: André Fioravante, Roberto Laureano, Lívia Bastos.**

**A todos os meus amigos que direta ou indiretamente sempre me ajudaram e incentivaram.**

**Aos colegas de trabalho e amigos Edlene Ribeiro, Ediná Rodrigues, Daniel e Juarez.**

**A todos os colegas de trabalho, técnicos e professores do DTA que sempre me incentivaram.**

**A todos os estagiários do laboratório de microbiologia por sempre estarem dispostos a ajudar.**

**Aos meus amigos de turma pela harmoniosa convivência e pela amizade que nasceu durante o curso.**

## RESUMO

DA SILVA, Ivan Paulo Bianco. *Lactobacillus spp de origem humana probióticos potenciais: características funcionais e de segurança*. 2015. 51p Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2015.

A disbiose ou desequilíbrio da microbiota intestinal torna-se um problema cada vez mais frequente na atualidade, tendo como consequência várias doenças relacionadas. Bifidobactérias e lactobacilos influenciam positivamente a saúde, especialmente pela sua capacidade de inibir patógenos e estimular o sistema imune. Os principais requisitos de um microrganismo probiótico são a capacidade de resistir aos sucos digestivos, adesão ao epitélio intestinal para que exerçam atividade de exclusão competitiva de patógenos, além de serem seguros. Muitos autores também recomendam a utilização de probióticos espécie-específicos por serem mais adaptáveis ao organismo humano e, portanto, melhor competidores. Esta pesquisa teve como objetivo a caracterização de algumas propriedades probióticas (resistência aos sucos gástrico e intestinal, e atividade antimicrobiana) e aspectos de segurança dos probióticos (resistência aos antimicrobianos e capacidade hemolítica) de lactobacilos isolados de crianças lactentes. Nos ensaios de inibição, nenhuma cepa mostrou-se capaz de reduzir *Candida albicans* quando cultivadas concomitantemente. Porém, as cepas Lac 11 e A1 se mostraram tão ou mais eficientes que as cepas comerciais em inibir *Echerichia coli*. Todavia, a cepa Lac 8 apresentou sinergismo no crescimento desta bactéria. Não houve diferença significativa com relação à resistência aos antibióticos testados entre as cepas comerciais e as de origem humana, com exceção da cepa 24, que se mostrou estatisticamente mais sensível à ampicilina. No que tange à simulação de passagem pelo trato gastrointestinal (TGI), também não houve diferença significativa entre as cepas testadas. Além disso, todas as cepas mostraram-se não hemolíticas. A identificação fenotípica pelo API 50 CHL apontou as cepas 24, Lac 8 e Lac 11 como pertencentes à espécie *Lactobacillus rhamnosus*. Já as cepas A1 e Lac X foram identificadas como *Lactobacillus paracasei*. Os resultados indicaram o potencial probiótico destas cepas de acordo com os quesitos testados.

**Palavras-chave:** Disbiose, Alimentos Funcionais, *Lactobacillus* sp. e Exclusão Competitiva.

## ABSTRACT

DA SILVA, Ivan Paulo Bianco. ***Lactobacillus spp* potential probiotics human origin: functional and safety features**. 2015. 51p. Dissertation (Master Science in Food Science and Technology). Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2015.

The dysbiosis or imbalance of the intestinal tract microbiota becomes an increasingly common problem today, resulting in various related diseases. Bifidobacteria and lactobacilli positively influence the host health, especially due to its ability to inhibit pathogens and stimulate the immune system. The main requirements of a probiotic micro-organism is the ability to resist to digestive juices, adhesion to the intestinal epithelium to exert the activity of pathogen competitive exclusion, besides being safe. Many authors also recommend the use of species-specific probiotic to be most adaptable to the human body and therefore better competitors. This study aimed to characterize some probiotic properties (resistance to gastric and intestinal juices and antimicrobial activity) and safety aspects of probiotics (antimicrobials resistance and hemolytic capacity) of lactobacilli isolated from children infants as compared to commercial probiotic lactobacilli. In inhibition assays, no strain was able to inhibit *C. albicans* when grown concomitantly. However, the Lac 11 and A1 strains have proven to be as or more efficient than commercial strains to inhibit *E. coli*. However, the Lac 8 strain showed synergism, stimulating the growth of this bacterium. There was no significant difference in relation to antibiotic resistance between commercial and human origin strains, with the exception of strain 24, which was statistically more sensitive to ampicillin. Regarding the simulation passage through the gastrointestinal (GI) tract, there was no significant difference between the strains. Furthermore, all strains were non-hemolytic. Phenotypic identification by API 50 CHL pointed strains 24, Lac Lac 8 and 11 as belonging to the species *L. rhamnosus*, the strains A1 and Lac X as *L. paracasei*. The results indicate the potential of these strains as probiotics.

Keywords: Dysbiosis, Functional Foods, *Lactobacillus* sp and Competitive Exclusion.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b>	Crescimento de <i>Candida albicans</i> em consórcio com cepas de <i>Lactobacillus</i>	21
<b>FIGURA 2.</b>	Crescimento de <i>Echirichia coli</i> em consórcio com cepas de lactobacilos.	22
<b>FIGURA 3.</b>	Comparação da sensibilidade aos antimicrobianos entre cepas de lactobacilos comerciais e isolados de origem humana.	24
<b>FIGURA 4.</b>	Sobrevivência de cepas de lactobacilos comerciais (HANS e SACCO) e isolados de origem humana submetidos às condições gástricas (30 minutos) e intestinais (120 minutos).	25
<b>FIGURA 5.</b>	Sobrevivência de cepas de lactobacilos comerciais (HANS e SACCO) e isolados de origem humana submetidos às condições gástricas (30 minutos) e intestinais (120 minutos).	26

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

<b>QUADRO 1.</b>	<b>Classificação taxonômica de <i>Lactobacillus acidophilus</i>.</b>	<b>08</b>
<b>TABELA 1.</b>	<b>Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos.</b>	<b>23</b>
<b>TABELA 2.</b>	<b>Hemólise em Ágar Sangue.</b>	<b>29</b>
<b>TABELA 3.</b>	<b>Identificação das Espécies de Lactobacilos Isolados de Fezes de crianças</b>	<b>29</b>

## LISTA DE ABREVIACOES E SIMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
API 50 CHL	Kit de identificação fenotípica para <i>Lactobacillus ssp</i>
GOS	galacto-oligossacarídeos
Hans	Código usado para designar a cepa comercial <i>Lactobacillus casei-01</i> (Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca)
HT-29	Células do Cólon humano
FOS	fruto-oligossacarídeos
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
mL	Mililitros
mm	Milímetro
QSP	Qualified Presumption of Safety. Sigla em inglês que significa que são qualificados presuntivamente como seguros
Sacco	Código usado para designar a cepa comercial <i>Lactobacillus acidophilus</i> (Sacco, Cadorago, CO, Itália)
SB	Solução Base
TGI	Trato Gastrointestinal
UFC	Unidade Formadora de Colnia
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
$\mu$ l	Microlitros

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Objetivo Geral</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos</b>	<b>3</b>
<b>3. Revisão de Literatura</b>	<b>4</b>
<b>3.1. Disbiose intestinal</b>	<b>4</b>
<b>3.2. Alimentos Funcionais</b>	<b>4</b>
<b>3.2.1. Probióticos</b>	<b>6</b>
<b>3.2.2 . Prebióticos</b>	<b>8</b>
<b>3.2.3. Simbióticos</b>	<b>8</b>
<b>3.3. <i>Lactobacillus sp</i></b>	<b>9</b>
<b>3.3.1. Propriedades Funcionais Atribuídas a Lactobacilos</b>	<b>11</b>
<b>3.3.2. Exclusão Competitiva</b>	<b>12</b>
<b>3.3.3. Produção de Sustâncias Antimicrobianas e Competição por Nutrientes</b>	<b>13</b>
<b>3.4. Critérios de Seleção de Microrganismos Probióticos</b>	<b>13</b>
<b>3.4.1. Critérios de Segurança</b>	<b>14</b>
<b>3.4.2. Resistência a antibióticos</b>	<b>14</b>
<b>3.4.3. Adesão</b>	<b>15</b>
<b>3.4.4. Resistência aos Sucos Digestivos</b>	<b>16</b>
<b>3.5. Propriedades Tecnológicas</b>	<b>16</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>18</b>
<b>4.1. Culturas Microbianas</b>	<b>18</b>
<b>4.2. Padronização do Inóculo</b>	<b>18</b>
<b>4.3. Identificação dos <i>Lactobacillus ssp</i></b>	<b>19</b>
<b>4.4. Caracterização da Atividade Probiótica dos Isolados de Lactobacilos</b>	<b>19</b>
<b>4.4.1 .Resistência às Condições Gastrointestinais</b>	<b>19</b>
<b>4.4.2. Atividade Antimicrobiana Contra <i>Candida albicans</i> e <i>E. coli</i></b>	<b>20</b>
<b>4.4.3. Enumeração das Unidades Formadoras de Colônias ( UFC)</b>	<b>21</b>
<b>4.5. Aspectos de Segurança dos Probióticos Potenciais</b>	<b>21</b>

<b>4.5.1. Teste de Resistência a antibióticos</b>	<b>21</b>
<b>4.5.2. Pesquisa de Atividade Hemolítica</b>	<b>22</b>
<b>4.6. Análise Estatística</b>	<b>22</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>23</b>
<b>5.1. Identificação das Espécies de Lactobacilos</b>	<b>23</b>
<b>5.2. Simulação de Passagem no Trato Gasgointestinal</b>	<b>24</b>
<b>5.3. Atividade Antimicrobiana contra <i>C. albicans</i> e <i>E. coli</i></b>	<b>27</b>
<b>5.4. Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos</b>	<b>29</b>
<b>5.5. Hemólise em Ágar Sangue</b>	<b>32</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>33</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>34</b>

# 1 INTRODUÇÃO

A disbiose intestinal tem se tornado um problema cada vez mais frequente na atualidade, referida em grande parte dos diagnósticos. Causada por diversos fatores, como dieta inadequada, tratamentos quimioterápicos e estresse, ela constitui a perda do equilíbrio na microbiota intestinal e pode ter consequências que vão desde diarreias ou constipação, dores abdominais, problemas de pele como acne, eczema e psoríase, retardo no desenvolvimento em crianças, aumento das infecções por *Candida*, aumento nos níveis de colesterol sérico, fadiga crônica, fibromialgia, resfriados, gripes frequentes e até câncer.

Desta forma, bifidobactérias e lactobacilos, surgem como uma importante ferramenta, contra a disbiose intestinal, pois influenciam positivamente a saúde, especialmente pela sua capacidade de inibir patógenos e estimular o sistema imune, sendo os dois gêneros de microrganismos mais utilizados na formulação de alimentos com alegação de propriedades funcionais.

A modulação da microbiota intestinal, por exclusão competitiva, é o principal benefício dos probióticos. Ocorre através da competição por nutrientes e da adesão no intestino por um determinado probiótico à mucina, produzida pelas células de Goblet e células epiteliais, diminuindo a colonização por microrganismos patogênicos.

Outro mecanismo de exclusão competitiva é a capacidade de produção de substâncias inibidora pelas bactérias probióticas, entre as quais ácidos orgânicos, bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e ácidos graxos voláteis.

Além da exclusão competitiva, outros benefícios potenciais dos probióticos incluem estimulação do sistema imunológico, redução dos níveis de colesterol do soro, efeitos nutricionais, produzindo enzimas importantes e aumentando a disponibilidade de aminoácidos livres e vitaminas especialmente vitamina B e K, aumento da disponibilidade de lactase, ácidos graxos e cálcio.

O conhecimento adequado dos tipos de microrganismos, assim como os eventos que influenciam a sequência da colonização, poderão fornecer subsídios para a modulação da microbiota intestinal, quando esta for necessária para melhorar as funções protetoras que exercem.

Para determinado microrganismo ser considerado probiótico, são avaliados diversos critérios em sua seleção, dentre os quais podemos destacar: origem humana, resistência à bile, ácidos e sucos digestivos, adesão e segurança. No entanto, é praticamente impossível que uma única linhagem consiga agrupar todos os requisitos, portanto, a estratégia adequada é encontrar indivíduos que possuam um conjunto de características direcionadas para determinado tratamento.

A maioria dos produtos probióticos existente no mercado, emprega isolados de origem animal ou de matrizes alimentícias, embora seja amplamente aceito que os espécie-específicos supostamente seriam mais adaptáveis as condições do organismo humano. Desta forma, é objetivo deste trabalho avaliar as características probióticas de lactobacilos de origem humana, incluindo os aspectos de segurança visando desenvolvimento de alimentos funcionais microbianos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Caracterizar as propriedades funcionais de isolados de *Lactobacillus* de origem humana.

### 2.2. Específicos

- a) Identificar fenotipicamente culturas de lactobacilos isolados da microbiota intestinal de lactentes.
  
- b) Avaliar a resistência às condições gastrointestinais dos isolados de lactobacilos utilizando sucos gástrico e intestinal artificiais que mimetizam as condições do sistema digestório, com relação à concentração de sais biliares e pH.
  
- c) Determinar a atividade antagonista dos isolados de *Lactobacillus* com relação à *Candida albicans* e *E. coli* potencialmente patogênica
  
- d) Avaliar aspectos de segurança dos probióticos potenciais no que se referem à resistência a antibióticos e atividade hemolítica em Ágar (MRS) sangue.

## **3 REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1. Disbiose Intestinal**

A disbiose intestinal ocorre pelo desequilíbrio da microbiota local, havendo nesse caso, aumento no número de microrganismos patogênicos em relação àqueles considerados benéficos para nosso organismo. Ela pode acarretar uma série de complicações ao nosso organismo como a má digestão e absorção de nutrientes no intestino delgado, produção de toxinas, mal estar, diarreia, inflamação e produção de substâncias peptídicas mutagênicas e carcinogênicas através da combinação de toxinas e proteínas provenientes da alimentação. De maneira geral a disbiose intestinal é causada pela falta de cuidado adequado com o trato gastrointestinal como má alimentação, consumo excessivo de alimentos processados e estresse. Tratamentos prolongados com antibióticos também podem desempenhar um importante papel no desenvolvimento da disbiose intestinal, pois além de conferir resistência aos microrganismos patogênicos ainda podem diminuir consideravelmente a população de microrganismos benéficos (ALMEIDA et al, 2009).

### **3.2. Alimentos Funcionais**

A ANVISA não define alimentos funcionais. Por outro lado ela estabelece algumas diretrizes importantes. Assim devido à necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, e visando à proteção à saúde da população, a necessidade de estabelecer regulamento referente a procedimentos para registro de alimentos e ou novos ingredientes e ainda levando em consideração que o registro na área de alimentos é um procedimento legal e obrigatório no Brasil, ela resolveu aprovar o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimentos e ou novos ingredientes no qual também se enquadram os alimentos funcionais contendo probióticos (BRASIL, 1999a).

É cada vez mais comum na sociedade, a ideia de que a alimentação saudável esteja associada ao aumento na qualidade de vida e daí ocorre o aumento no interesse e na busca por alimentos funcionais. Porém, muitas das vezes se confunde alimentos funcionais com nutracêuticos, no entanto, os alimentos funcionais devem estar na forma de alimento comum, serem consumidos como parte da dieta e produzir benefícios específicos à saúde, tais como a redução do risco de diversas doenças e a manutenção

do bem-estar físico e mental. As substâncias biologicamente ativas encontradas nos alimentos funcionais podem ser classificadas em grupos tais como: probióticos e prebióticos, alimentos sulfurados e nitrogenados, pigmentos e vitaminas, compostos fenólicos, ácidos graxos poliinsaturados e fibras. Por outro lado, os nutracêuticos são alimentos ou parte dos alimentos que apresentam benefícios à saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de doenças (MORAES E COLLA, 2006).

Com relação à segurança, a ANVISA aprovou o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para avaliação de risco e segurança dos alimentos, incluindo os que contenham probióticos e para isso levou em consideração os seguintes fatores: o consenso científico sobre a relação existente entre alimentação-saúde-doença que vem despertando em todo o mundo o interesse no uso dos alimentos como um dos determinantes importantes da qualidade de vida, os novos conceitos relativos às necessidades de nutrientes em estados fisiológicos especiais e a possibilidade de efeitos benéficos significativos de outros compostos, não nutrientes, dos alimentos, o aumento da expectativa de vida, os fatores ligados à urbanização, a influência da mídia e os aspectos econômicos ligados à industrialização de novos alimentos, as inovações tecnológicas, a globalização da economia, a intensificação da importação de alimentos e por fim, a necessidade da harmonização da legislação em nível internacional além da possibilidade de que novos alimentos ou ingredientes possam conter componentes, nutrientes ou não nutrientes com ação biológica, em quantidades que causem efeitos adversos à saúde. (BRASIL, 1999b)

Outro passo importante foi estabelecer as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas nas rotulagens de alimentos. Dessa forma, a alegação de propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano. Enquanto a alegação de propriedade de saúde é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde. A alegação de propriedades funcionais e ou de saúde é permitida em caráter opcional. Assim, o alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde e ainda devem ser seguro para consumo sem supervisão médica. (BRASIL, 1999c).

Por fim, a ANVISA aprovou o regulamento de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem (BRASIL, 1999d).

Um trabalho muito interessante ressalta a importância dos alimentos funcionais e estabelece a relação entre as diretrizes das políticas públicas de saúde brasileiras e os critérios adotados pela ANVISA para aprovação das alegações de propriedades funcionais. Ainda ressalta a convergência das diretrizes destas políticas que objetivam a redução das doenças crônicas não-transmissíveis na população através da promoção da alimentação saudável e da atividade física ( STRINGHETA, 2007).

### **3.2.1. Probióticos**

Uma das demonstrações mais convincentes do papel da microbiota intestinal em termos de resistência à doenças foi a demonstração de que cobaias livres de microbiota foram mortas por 10 células de *Salmonella enteritidis*, mas foi preciso  $10^9$  células para matar um animal convencional com uma microbiota intestinal completa (COLLINS e CARTER, 1978)

O termo probiótico foi inicialmente definido como “Organismos e Substâncias que contribuem para o equilíbrio intestinal” (PARKER, 1974). Posteriormente, como “Suplemento microbiano vivo que afeta beneficemente o hospedeiro melhorando o equilíbrio microbiano intestinal, tendo efeito na prevenção de condição patológica específica” (FULLER, 1989). Esta definição deixa clara a necessidade de que os probióticos estejam viáveis. De maneira semelhante e mais recentemente os probióticos foram definidos como sendo microrganismos cuja administração em quantidades adequadas promove benefícios à saúde e ao bom funcionamento do organismo do hospedeiro (SAAD, 2006). Eles possuem a propriedade de controlar a população microbiana intestinal através da promoção de efeitos antagônicos e competição contra bactérias patogênicas e estimulação do sistema imunológico. O mesmo autor destaca ainda que outros benefícios obtidos pela sua ingestão envolvem a redução do colesterol, prevenção de doenças inflamatórias, diarreias e neoplasias, síntese de vitaminas e efeitos que se estendem para além do sistema gastrointestinal.

Dessa forma existem diversas definições de diferentes autores, porém de uma maneira geral a definição mais aceita internacionalmente é que eles são microrganismos

vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; Sanders, 2003).

A utilização de culturas de bactérias probióticas estimula o crescimento de microrganismos desejáveis, elimina bactérias potencialmente prejudiciais, e reforça os mecanismos de defesa naturais do corpo. Hoje, existe uma abundância de evidências sobre os efeitos positivos dos probióticos na saúde humana. (SALMINEN et al, 1998a).

A modulação da microbiota intestinal, por exclusão competitiva, é o principal benefício dos probióticos. Ocorre através da competição por nutrientes e através da adesão no intestino por um determinado probiótico à mucina, produzida pelas células de Goblet e células epiteliais, diminuindo a colonização por microrganismos patogênicos (SAVAGE, 1992).

Devido aos seus benefícios para saúde, bactérias probióticas têm sido cada vez mais incluídas nos iogurtes e outros leites fermentados durante as últimas duas décadas. Os microrganismos mais comumente usados para estas finalidades têm sido os lactobacilos como *Lactobacillus acidophilus* e bifidobactérias muitas vezes referida como "bifidus" (DALY e DAVIS, 2008).

Dessa forma a maioria dos probióticos e os mais estudados pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (O'FLAHERTY E KLAENHAMMER, 2010). Os lactobacilos são, há muito tempo, associados à produção de alimentos fermentados, especialmente de produtos lácteos, mas a adição de bifidobactérias a alimentos é mais recente. Esses microrganismos são geralmente resistentes à bile e a ácidos porque muitas das espécies são encontradas no trato gastrointestinal (TGI) como parte da microbiota normal (O'FLAHERTY E KLAENHAMMER, 2010).

O conceito de utilização de espécies de *Lactobacillus* para o tratamento e prevenção de doenças, bem como a restauração e manutenção da saúde não é nova. Nos últimos tempos, tem havido uma renovação do interesse no uso de probióticos (distinta de antibióticos), impulsionado em grande parte pelos consumidores, a imprensa leiga, e o rápido aparecimento de cepas patogênicas resistentes aos antibióticos. Os produtos lácteos, em conjunto com o conteúdo do trato gastrointestinal, são as principais fontes de isolamento de novos potenciais organismos probióticos (AMBADOYIANNIS et al, 2005).

A ANVISA instituiu o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde, e através dele definiu probiótico como microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio

microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (ANVISA, 2002). Ela ainda define uma lista de lactobacilos e bífidos bactérias aceitos como probióticos bem como as respectivas alegações. Tais lactobacilos são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactococcus lactis*. Através deste regulamento determina que a alegação deve seguir da seguinte forma: “O (indicar a espécie do microrganismo) (probiótico) contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis” (Brasil, 2015).

### **3.2.2 Prebióticos**

O termo prebiótico foi adotado para definir "ingredientes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e / ou atividade de uma ou um número limitado de bactérias no intestino afim de melhorar a saúde do hospedeiro" (Mattila-Sandholm et al 2002). Por exemplo, inulina, galacto-oligossacarídeos (GOS), fruto-oligossacarídeos (FOS) (GIBSON e ROBERFROID, 1995). Os mesmos autores destacam que modificações por prebióticos da composição da microbiota do cólon leva à predominância de algumas das bactérias potencialmente promotoras de saúde, especialmente, mas não exclusivamente, lactobacilos e bifidobactérias.

Em outra definição os prebióticos são considerados carboidratos não digeríveis que afetarão benéficamente os hospedeiros após a ingestão, pois eles estão disponíveis como fonte de energia seletiva para os probióticos, estimulando seu crescimento e atividade no intestino (ZIEMER e GIBSON, 1998). Dessa forma a eficiência dos benefícios para saúde é probiótica, aumentada pelo uso de prebióticos (ANJO, 2004; SAAD, 2006).

### **3.2.3 Simbióticos**

Um grande desenvolvimento em alimentos funcionais refere-se a alimentos que contêm probióticos e prebióticos que melhoram a saúde promovendo a microbiota intestinal. Há cada vez mais evidências científicas para apoiar o conceito de que a manutenção da microbiota intestinal saudável pode fornecer proteção contra doenças gastrointestinais, incluindo infecções gastrintestinais, doenças inflamatórias intestinais,

e até mesmo câncer (HAENEL e BENDIG, 1975; MITSUOKA, 1982; SALMINEN et al, 1998a).

Assim, a aplicação combinada de pró e prebióticos, um conceito conhecido como simbióticos, segundo Fooks et al, 1999 vem sendo inclusive utilizada nos processos de microencapsulação de probióticos. Uma abordagem simbiótica é frequentemente realizada por co-encapsulação de amido resistente (RS), na forma de amido de milho de alto teor de amilose juntamente com os microorganismos probióticos dentro da microcápsula. O ideal seria que o componente prebiótico fosse metabolizado pelo probiótico utilizado na formulação (STEFE, ALVES e RIBEIRO, 2008).

### **3.3. *Lactobacillus* spp.**

As bactérias do gênero *Lactobacillus* fazem parte da microbiota saprófita desejável e foram isolados pela primeira vez a partir de fezes de lactentes amamentados no peito materno por Moro em 1900. Inicialmente, este pesquisador atribuiu o nome *Bacillus acidophilus* como uma designação genérica dos lactobacilos intestinais (OLIVEIRA, 2011). A classificação taxonômica atual do *L. acidophilus* está mostrada no quadro 1.

*Lactobacillus* foi o primeiro gênero a ser empregado em bactoterapia e também em profilaxia a partir de bactérias com os trabalhos de Metchnikoff em 1907, relacionando a modulação da microbiota intestinal e a longevidade dos habitantes dos Balkans. Os lactobacilos são incapazes de formar esporos, são desprovidos de flagelos e possuem uma forma bacilar ou cocobacilar. Eles são bactérias anaeróbicas ou microaerófilas, gram-positivas, que convertem lactose e outros açúcares simples em ácido láctico. A produção de ácido láctico leva à redução do pH, e por consequência a inibição do crescimento de bactérias patogênicas. Eles ainda são capazes de colonizar o intestino, prevenir diarreias, promover recuperação de gastroenterites infantis causadas por rotavírus (SUGITA E TOGAWA, 1994). O gênero compreende aproximadamente 60 espécies, sendo que as mais utilizadas para fins de aditivo dietético são as espécies *Lactobacillus acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. casei*. A primeira é a espécie mais comum, encontrada na forma de células livres, aos pares ou em cadeias curtas. Trata-se de uma espécie pouco tolerante à salinidade do meio e microaerófila. Seu crescimento em meios sólidos pode ser favorecido pela anaerobiose ou pressão de oxigênio reduzida. Uma grande parte das linhagens de *L. acidophilus* são capazes de degradar a amígdalina,

celobiose, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, manose, sacarose e esculina (NAHAISI, 1986).

<i>L. acidophilus</i>	
<u>Classificação científica</u>	
<u>Domínio:</u>	<u>Bacteria</u>
<u>Filo:</u>	<u>Firmicutes</u>
<u>Classe:</u>	<u>Bacilli</u>
<u>Ordem:</u>	<u>Lactobacillales</u>
<u>Família:</u>	<u>Lactobacillaceae</u>
<u>Gênero:</u>	<u>Lactobacillus</u>
<u>Espécie:</u>	<b><i>L. acidophilus</i></b>
<u>Nomenclatura binomial</u>	
<b><i>Lactobacillus acidophilus</i></b>	

Fonte: Oliveira (2011)

Quadro 1: Classificação taxonômica de *Lactobacillus acidophilus*.

Os lactobacilos estão inseridos dentro do grupo das bactérias lácticas, e muitas espécies são utilizadas na indústria alimentícia como culturas iniciadoras em fermentados e outros produtos. Além disso, eles são responsáveis pelo aumento da vida de prateleira destes produtos, graças à produção de substâncias antimicrobianas e ao seu efeito competitivo, evitando que microrganismos deteriorantes ou patogênicos consigam crescer e se estabelecer nos alimentos (PEREIRA e GÓMEZ, 2007).

A multiplicação destes microrganismos ocorre melhor em temperaturas de 35-40°C, embora possam se desenvolver a 45°C e, quanto ao pH, preferem valores de pH de 5.5-6.0. Sua tolerância à acidez do meio varia entre 0.3 e 1.9% (v/v) de acidez titulável (MACEDO et al, 2008). Vários fatores ambientais podem afetar a interação de lactobacilos com microrganismos patogênicos como pH, disponibilidade de oxigênio, nível de substratos específicos e presença de secreções (SALMINEN et al, 1996).

O equilíbrio entre as espécies de bactérias residentes promove a estabilidade da população microbiana em condições normais. No entanto, em situações particulares como nos casos de diarreias agudas ou em casos de intervenções com dietas restritivas ou mesmo em casos de tratamento antimicrobiano, o equilíbrio pode ser rompido e haver a permissão de crescimento excessivo de espécies com potencial patogênico, como *Clostridium difficile*, associado com colites pseudomembranosas (BÚRIGO et al, 2007)

### 3.3.1 Propriedades Funcionais Atribuídas a Lactobacilos

Os aspectos funcionais principais desejáveis nas cepas de *Lactobacillus* devem ir de encontro aos critérios de seleção dos probióticos e dessa forma incluem: adesão ao epitélio intestinal e ao muco, exclusão competitiva de patógenos tais, como *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e *Clostridium difficile*, *E. Colli spp* e *Candida spp* através de antagonismo e produção de compostos antimicrobianos) e estimulação do sistema imune intestinal conhecido pela sigla GALT, do inglês *gut-associated lymphoid tissue*. Evidentemente que para exercerem esta atividade no intestino, estas bactérias, conforme já citado, para probióticos de uma maneira geral, primeiramente devem apresentar características bioquímicas como resistência ao baixo pH do suco gástrico à bile e suco pancreático (SAARELA et al, 2000).

*Lactobacillus* spp. tem capacidade de modular a população microbiana do intestino. Ao que parece, as estratégias relacionadas à função de controle da microbiota intestinal são a produção de substâncias com atividade antimicrobiana, a adesão ao epitélio intestinal e coagregação aos demais microrganismos (WYNNE et al, 2004).

De acordo com Redondo-Lopez et al (1990) a proteção do ecossistema vaginal exercida por lactobacilos pode ser acompanhada por dois mecanismos: (i) produção de substâncias antimicrobianas tais como ácido lático e bacteriocinas e (ii) aderência à mucosa e coagregação que pode formar uma barreira a qual previne colonização por microrganismo patogênicos.

Já o processo de coagregação no qual bactérias geneticamente distintas se aderem umas as outras via moléculas específicas tem sido atribuído a três mecanismos. O primeiro diz respeito à interação entre componentes da superfície celular, em que as proteínas de aderência (adesinas) são lectinas – proteínas de origem não imunológica que realizam

aglutinação celular graças a sua propriedade de se ligar de forma reversível a carboidratos. Este mecanismo parece ser o observado na aglutinação de células de leveduras por espécies de *Lactobacillus* através de ligação a manose presente na parede celular de leveduras (ADLERBERTH et al., 1996). Já nos dois mecanismos restantes, as adesinas não são lectinas. Eles se baseiam, respectivamente, na secreção de uma proteína específica que media agregação e altera a frequência de conjugação, e secreção de ferormônios sexuais, também capazes de alterar a frequência da conjugação (MORI, SAKAGAMI e NARITA, 1985; RENIERO et al, 1991). A parede celular de leveduras consiste de polissacarídeos contendo manose (manana). *Escherichia coli* e outras enterobactérias portadoras de receptores contendo adesinas manose-específicas aglutinam células de leveduras. Desta forma, a capacidade de ligar-se às células de leveduras pode ser uma indicação de atividade específica a manose. Portanto, a lectina ligadora de manose (MBL) tem papel fundamental na defesa contra *Candida albicans*. A adesão de *Lactobacillus plantarum* às células do cólon humano (HT-29) é devido a um mecanismo sensível a manose. (ADLERBERTH et al, 1996).

Os requisitos funcionais de probióticos devem ser estabelecidos por meio de métodos *in vitro* e os resultados destes estudos devem ser refletidos em estudos controlados em humanos. Outros requisitos desejáveis incluem imunoestimulação, mas nenhum efeito pró-inflamatório, e atividade antígeno-tóxica (SAARELA et al, 2000).

### **3.3 Exclusão Competitiva**

O principal benefício atribuído aos probióticos é a exclusão competitiva de patógenos, que ocorre por diferentes mecanismos como: a) competição com receptores no epitélio intestinal, como ocorre com lactobacilos que inibem diretamente a ligação de *Salmonella*, *E. coli* e outros patógenos de origem alimentar b) secreção de fatores que inibem a internalização e a adesão de agentes patogênicos, assim como o aumento da secreção de mucina como ocorre com lactobacilos que estimulam a secreção de MUC 2 e MUC 3, que inibe a aderência de *E. coli* enteropatogênica c) estímulo do efeito de barreira da mucosa, tal como os lactobacilos e bifidobactérias, que ajudam a impedir agentes patogênicos de induzir um aumento da permeabilidade intestinal, d) a produção de ácidos graxos voláteis e / ou outras substâncias antibacterianas, por microbiota anaeróbia além da competição por nutrientes (LUCHESE, 2012).

### **3.3.3 Produção de Substâncias Antimicrobianas e Competição por Nutrientes**

Um tipo de mecanismo de exclusão competitiva é a capacidade de produção de substâncias inibidoras pelas bactérias probióticas, entre as quais ácidos orgânicos, bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e ácidos graxos voláteis (LUCHESE, 2012; MORO e ARSLANOGLU , 2005; REID, 2008)

Há vários relatos na literatura de que outros produtos, especialmente sintetizados por lactobacilos, sejam capazes de apresentar atividade contra microrganismos indesejáveis, o que vem fortalecer a aceitação de Lactobacilos como probiótico. Entre as principais substâncias podemos citar o ácido lático causando redução do pH intestinal, assim como de ácidos graxos voláteis, como acetato, propionato e butirato, peróxido de hidrogênio, proteínas e/ou peptídeos (bacteriocinas) com ação inibitória contra grupos selecionados de bactérias. Relatos de alguns trabalhos sugerem também que os probióticos fazem uma rápida metabolização de substratos, tornando-os indisponíveis aos patógenos e eliminando-os por competição de nutrientes (MORO e ARSLANOGLU, 2005; REID, 2008).

### **3.4 Critérios de Seleção de Microrganismos Probióticos**

Vários critérios são utilizados para classificar um microrganismo como probiótico. Além de possuírem propriedades funcionais reconhecidas, devem ser seguros e não apresentarem qualquer risco aos consumidores e, quando estes microrganismos probióticos forem utilizados em alimentos, apresentarem características tecnológicas desejáveis (SAARELA et al, 2000 ).

Para determinado microrganismo ser considerado probiótico, são avaliados diversos critérios em sua seleção, dentre os quais podemos destacar: origem humana, resistência à bile, ácidos e sucos digestivos, ou seja, resistência ao trato gastrointestinal, adesão e agregação e por fim segurança. No entanto, é praticamente impossível que uma única linhagem consiga agrupar todos os requisitos. Portanto, a estratégia adequada é encontrar indivíduos que possuam um conjunto de características direcionadas para determinado tratamento. Os probióticos mais estudados e aceitos ultimamente pertencem a dois gêneros, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sendo que outras bactérias e algumas leveduras também desempenham esse papel (CYPRIANO, 2013).

### 3.4.1 Critérios de Segurança

Os seguintes critérios de segurança devem ser observados: as cepas para uso humano devem ser preferencialmente de origem humana, isoladas a partir do trato gastrointestinal humano saudável, não poderão ter nenhum histórico de patogenicidade, bem como não ter nenhum tipo de associação com doenças como a endocardite infecciosa ou distúrbios gastrointestinais. Não devem desconjurar sais biliares, pois isso seria uma característica negativa no intestino delgado e por fim não podem carregar genes transmissíveis de resistência a antibióticos (MARTEAU et al, 1995).

### 3.4.2 Resistência a Antibióticos

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um importante problema de saúde pública global, que afeta não só a medicina humana e veterinária, mas também a produção de alimentos (AMMOR et al, 2007).

O crescente problema global da resistência antimicrobiana também pode envolver bactérias lácticas, como *Lactobacillus* por causa do possível risco de transferência de genes de resistência (DUŠKOVÁ e KARPÍŠKOVÁ 2013).

Os antibióticos têm sido amplamente utilizados como aditivos para a alimentação de gado para promover o seu crescimento, aumentar o ganho médio diário, melhorar o consumo alimentar, para prevenir infecções, diminuir a mortalidade de bezerras, etc. (MORRILL et al, 1995). No entanto, a utilização de drogas antimicrobianas no gado, pode contribuir para a resistência aos antibióticos de agentes patogênicos em humanos e animais (FEY et al, 2000).

A cadeia alimentar está se tornando uma possível forma de disseminação da resistência aos antibióticos nas populações bacterianas de animais e seres humanos (WITTE, 2000). As cepas com plasmídeos de resistência a antibióticos não devem ser empregadas como probióticos, por serem, possivelmente capazes de transmitir os fatores de resistência para bactérias patogênicas, dificultando a cura de infecções (SAARELA et al, 2000, SALMINEN et al, 1998a). Porém cabe ressaltar que diarreia pós-tratamentos com antibióticos é um dos problemas de saúde que as bactérias probióticas são capazes de moderar (SEPP et al, 2011). Vlková et al, (2006) sugere que as cepas resistentes aos antibióticos testados parecem ser adequadas para administração a ruminantes jovens durante o tratamento com antibióticos. E neste caso, o uso de probióticos é muito comum. Determinadas cepas a serem utilizadas nesses tratamentos devem ser resistentes aos antibióticos usados na terapia (CLEMENTI; AQUILANTI,

2011; DUŠKOVÁ; KARPÍŠKOVÁ, 2013). Por estas razões, é fundamental conhecer o perfil de sensibilidade a antibióticos por parte da bactéria probiótica. De maneira semelhante, Hyacinta et al, (2014) também defenderam, em alguns casos, o uso de cepas resistentes, pois em seus estudos concluíram, que as cepas por eles testadas não representavam risco no que tange a transferência de genes de resistências para outras bactérias. Eles atribuíram isso, à declarada resistência intrínseca à vancomicina (BERNARDEAU et al, 2008) e quinolonas (HUMMEL et al, 2007) no gênero *Lactobacillus*.

### 3.4.3 Adesão

Foi caracterizado um peptídeo produzido por *Lactobacillus gasseri* (anteriormente classificado como *L. plantarum*), que promove a agregação de células de *L. plantarum* e *Enterococcus* spp. Foi levantada a hipótese de que esses agregados poderiam mediar a proteção de mucosas através da formação de um filme bacteriano que impediria o acesso de microrganismos indesejáveis na mucosa vaginal (BORIS et al, 1997).

A adesão ocorre através de mecanismo que envolve ligação entre adesinas presentes na superfície celular dos microrganismos e receptores celulares da mucosa intestinal. A capacidade de proteção exercida pelos comensais da microbiota contra a colonização do trato intestinal por microrganismos patogênicos é um tipo de exclusão competitiva (SANDERS, 1993).

Os probióticos podem competir pela adesão à mucosa intestinal através da secreção de substâncias que inibem a internalização e a adesão de patógenos, assim como aumento na secreção de mucina, como ocorre com lactobacilos os quais estimulam a secreção de MUC2 e MUC3 que inibe a aderência de *E. coli* enteropatogênica. Além disso, a exclusão de patógenos pode ocorrer através da competição por receptores no epitélio intestinal como ocorre com lactobacilos que inibem diretamente a adesão de *Salmonella*, *E. coli* e outros patógenos veiculados por alimentos (CABALLERO-FRANCO, et al. 2007).

Este fato levou a uma série de estudos relacionados à inclusão de componentes naturais não digeríveis junto à alimentação. Esta inclusão tem como objetivo intervir ou suprimir a aderência de patógenos a superfície intestinal. Como existem carboidratos não digeríveis, metabolizáveis por bactérias específicas que podem fazer parte da microbiota ou serem introduzidas nela, como é o caso dos lactobacilos, surgiu a ideia de

associar os dois conhecimentos, levantando a possibilidade de administração de substâncias probióticas que possam suprimir adesão de culturas patogênicas e ao mesmo tempo, estimular o crescimento e colonização dos *Lactobacillus* na microbiota ou probióticos. Essa nova abordagem define a ecoimunonutrição (GIBSON et al, 1995; NOUSIAINEN e SETÄLÄ, 1998).

#### **3.4.4 Resistência aos Sucos Digestivos**

Para exercerem esta atividade no intestino, os probióticos primeiramente devem apresentar características bioquímicas como resistência ao baixo pH do suco gástrico à bile e suco pancreático (SAARELA et al, 2000).

### **3.5 Propriedades Tecnológicas**

Apesar de não ser objeto de estudo deste trabalho vale ressaltar que ainda que um determinado microrganismo atenda aos critérios de segurança e funcionalidade, para que ele seja considerado um probiótico, deve ter também, boas propriedades tecnológicas de modo que possa ser incorporado nos produtos alimentares, sem perder a viabilidade e a funcionalidade ou a criação de sabores desagradáveis ou ainda texturas. Deve ter capacidade de crescer no leite, ou outro produto de interesse, ter boas propriedades sensoriais e estabilidade, enfim deve ter viabilidade de processo (LUCHESE; MACEDO; OLIVEIRA, 2014).

*Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os dois gêneros de microrganismos mais utilizados como probióticos por suas propriedades funcionais. Entretanto, quando são consideradas especificamente as características tecnológicas, bactérias do gênero *Lactobacillus* tendem a ser mais tolerantes a ácidos produzidos nos alimentos fermentados assim como ao aumento do potencial de óxido-redução que ocorre por permeação de oxigênio através das embalagens, do que *Bifidobacterium*. Isto porque *Lactobacillus* são microaerófilos ou anaeróbios facultativos, enquanto que *Bifidobacterium* são anaeróbios ou aerotolerantes, portanto mais sensíveis aos níveis de oxigênio. Ademais, espécies de *Lactobacillus* empregadas como probióticas são homofermentativas ou heterofermentativas facultativas, enquanto que *Bifidobacterium* são heterofermentativas e sintetizam ácido acético de odor pungente e desagradável (LUCHESE; MACEDO; OLIVEIRA, 2014).

A manutenção da viabilidade e atividade dos probióticos são consideradas pré-requisitos para a funcionalidade ideal. No entanto, alguns estudos demonstraram que os

probióticos não viáveis podem ter efeitos benéficos, como a modulação imune e obrigatória no paciente com doença oncológica (SALMINEN et al, 1999). Assim, para certas cepas probióticas pode ser suficiente que elas cresçam bem durante as etapas iniciais de produção, a fim de obter números altos o suficiente no produto, mas eles em alguns casos, não precisam manter boa viabilidade durante o armazenamento.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Culturas Microbianas

***Lactobacillus spp.***: As cepas de lactobacilos fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFRRJ. Foram isoladas do intestino de lactentes de até duas semanas de idade, e identificados em nível de gênero durante o trabalho de doutoramento de Oliveira (2011).

Testou-se inicialmente 14 isolados de origem humana sendo selecionadas 05 cepas (Lac 8, Lac 11, Lac A1, Lac x e Lac 24) com base nos resultados de interação.

Também foram utilizadas culturas comerciais como comparação: *Lactobacillus acidophilus* (Sacco, Cadorago, CO, Itália), as quais foram identificadas simplesmente pelo código Sacco, e *Lactobacillus casei*-01 (Christian Hansen, Hoersholm, Dinamarca) denominada de Hans.

***Candida albicans***: Isoladas do intestino de lactentes de até duas semanas de idade, e identificadas por testes morfológicos e bioquímicos por Oliveira 2011.

***Escherichia coli***: A linhagem de *E. coli* ATCC 25.922 foi obtida da coleção de culturas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - INCQS, Rio de Janeiro, RJ) na forma liofilizada.

### 4.2 Padronização do Inóculo

Para cada cultura de probiótico potencial, foi determinada a equação de regressão linear relacionando absorvância com UFC/mL que permitiu conhecer o valor do inóculo a ser usado. A suspensão de células obtida da terceira transferência em caldo MRS (Himédia) foi centrifugada e lavada duas vezes com 2mL de tampão fosfato pH 7,2. Diluições de 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100 foram preparadas em tampão fosfato pH 7,2 e o valor da absorvância de cada diluição foi determinado em espectrofotômetro (1105, BEL PHOTONICS SP, USA) a 480 nm. Ao mesmo tempo, foi feita a contagem de células por inoculação de diluições seriadas em Ágar MRS (Himedia) adicionado de 0,05% de cisteína (Vetec) e incubadas a 36°C em jarra de anaerobiose. A curva foi linearizada e obteve-se uma equação do 1º grau.

As culturas foram ativadas por três transferências sucessivas em caldo MRS (Himédia) e incubadas a 36°C por 48 horas sob anaerobiose. O crescimento da última ativação foi centrifugado. Logo após, foi desprezado o sobrenadante e o pellet foi lavado duas vezes com 2mL de tampão fosfato pH 7,2. Posteriormente, a massa celular foi re-suspensa em volume suficiente do mesmo tampão de forma a obter concentração  $10^7$  UFC/mL

### **4.3 Identificação dos *Lactobacillus ssp***

Os isolados de lactobacilos foram previamente identificados através da realização de coloração de Gram, seguida dos testes da catalase e oxidase, do crescimento a 15 °C e a 45 °C e da digestão do soro de Loeffler (CYPRIANO, 2013). Para a identificação bioquímica das culturas pelo estudo do perfil de fermentação de carboidratos, foi utilizada a bateria de testes API 50 CHL, para lactobacilos (Biomérieux®, França). Os perfis de fermentação dos carboidratos no API 50 CHL foram processados com o auxílio do software apiweb™ (Biomérieux), disponível no endereço eletrônico: <https://apiweb.biomerieux.com/index.jps>.

### **4.4 Caracterização da Atividade Probiótica dos Isolados de Lactobacilos**

#### **4.4.1 Resistência às condições gastrointestinais**

A simulação das condições gastrointestinais foi realizada com a utilização de suco gástrico e suco intestinal, ambos artificiais, os quais foram preparados segundo a metodologia de Picot; Lacroix (2004) e Mozzi et al (2009) com modificações.

Para o preparo tanto do suco gástrico quanto do suco intestinal, foi utilizada uma solução base (SB) aquosa com a seguinte composição: cloreto de cálcio (0,11 g/l); cloreto de potássio (1,12 g/l); cloreto de sódio (2,0 g/l) e fosfato ácido de potássio (0,4 g/l). Para esterilização dessa solução, a mesma foi autoclavada a 121°C por 15 minutos.

Para obtenção do suco gástrico artificial, imediatamente antes da sua utilização, foram adicionadas mucina (3,5 g/l) e pepsina de origem suína (0,26g/l) à SB, sendo o pH corrigido para 2,0 com solução HCl 1N. Em seguida, para realização do ensaio, uma alíquota de 0,1 ml da suspensão com lactobacilos e 0,9 ml do suco gástrico artificial foi adicionada em tubos de Eppendorf. Logo após, as amostras foram incubadas à 37°C e sob leve agitação. Depois de 30 minutos, a fim de avaliar a viabilidade celular, foram realizadas diluições seriadas ( $10^{-2}$  a  $10^{-9}$ ) e o plaqueamento pela técnica da microgota em Ágar MRS.

Já para obtenção do suco intestinal artificial, também imediatamente antes da utilização, foram adicionadas solução de bile a 15% (10 ml/l) e solução de pancreatina (78 g/L), sendo o pH ajustado para 7,0 com solução de bicarbonato de sódio 1N. Para realização do ensaio, as amostras de lactobacilos suspensas em suco gástrico foram centrifugadas à 6000 rpm por 5 minutos. Em seguida, a solução sobrenadante foi descartada e o pellet, contendo os micro-organismos, foi ressuscitado em 0,9 ml do

suco intestinal. Logo após, as amostras foram incubadas à 37°C sendo agitadas manualmente a cada 15 minutos por 30 segundos. Depois de 120 minutos, a fim de avaliar a viabilidade celular, foram realizadas diluições seriadas ( $10^{-2}$  a  $10^{-9}$ ) e aplicada a técnica da microgota em Ágar MRS para verificar o crescimento de unidades formadoras de colônias.

#### **4.4.2 Atividade Antimicrobiana Contra *Candida albicans* e *E. coli***

A capacidade de inibição do crescimento de patógenos por lactobacilos foi realizada em meio líquido, empregando-se a metodologia descrita por Drago et al, (1997) com modificações.

Para avaliação da capacidade de inibição do crescimento de *C. albicans*, foram utilizados tubos de Eppendorf com capacidade de 2,0 mL, que continham, ao mesmo tempo, 0,4 mL de caldo MRS e 0,4 mL de caldo extrato de levedura triptona. Em seguida, foram adicionados a essa solução 0,1 mL de uma suspensão com *Lactobacilos* e 0,1 mL da suspensão com *C. albicans*. Já para avaliação da capacidade de inibição do crescimento de *E. coli*, um procedimento semelhante foi adotado. Nesse caso, foram usados 0,4 mL de caldo Casoy (Himedia®) e 0,4 mL de caldo MRS. Logo após, foram adicionados 0,1 mL da suspensão de lactobacilos e 0,1 mL da suspensão de *E. coli*.

É importante ressaltar que todos os meios foram previamente autoclavados e que os tubos foram incubados concomitantemente em aerobiose, sendo a concentração da suspensão de lactobacilos na ordem de  $10^7$  células, e de  $10^5$  células para *E. coli* e *C. albicans*. Além disso, nos casos em que foram associados lactobacilos com *E. coli*, a temperatura de incubação foi de 36°C. Já em casos de incubação conjunta entre lactobacilos e *C. albicans*, a temperatura de incubação foi de 30°C. Esse procedimento se deu a fim de favorecer o crescimento do agente potencialmente patogênico.

Após um período de 18 horas, os meios foram substituídos por meio fresco a fim de minimizar o efeito do pH e da depleção de nutrientes. Para esse propósito, as culturas foram centrifugadas (3300 x g, 20 °C, 15 minutos) e os pellets ressuspensos em novos meios. Logo depois, as culturas foram reincubadas por um período de 24 horas em anaerobiose a 36 °C a fim de simular as condições do intestino humano. Ao término desse período, foi empregada técnica da microgota para contagem de *E. coli* e *C. albicans*.

#### **4.4.3 Enumeração das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)**

Os tubos foram agitados em vórtex (K MS1 Minishaker, IKA) para proceder às diluições sucessivas ( $10^{-1}$  até  $10^{-6}$ ) de cada suspensão. Por fim, foi empregada a técnica da microgota cujo alíquota era de 25µl para posteriormente verificar o número de unidades formadoras de colônia em placas com Ágar Sabouraud para inoculação de *C. albicans* e Ágar EMB para *E. coli*. Não obstante, foram preparados controles sem inoculação de lactobacilos.

A incubação procedeu-se em anaerobiose e a temperatura foi de 36°C para *E.coli* e de 30° C para *C. albicans* sendo a contagem das unidades formadoras de colônia realizadas no tempo de 24h e 48h com auxílio de uma lupa.

#### **4.5 Aspectos de segurança dos probióticos potenciais**

Alguns aspectos de segurança específicos devem ser levados em conta, mesmo no caso de bactérias lácticas consideradas QSP (Qualified Presumption of Safety), sigla em inglês que significa que são qualificados presuntivamente como seguros. Estes testes incluem a ausência de resistência a antibióticos adquirida e ausência de fatores de virulência.

##### **4.5.1 Teste de resistência a antibióticos**

Foi empregado o método de difusão em Ágar descrito por Kirby Bauer (1966) com modificações. Esse ensaio foi realizado para sete antibióticos de uso humano (associação entre amoxicilina e ácido clavulânico, ciprofloxacino, cefaloxina, cloranfenicol, tetraciclina, ampicilina e ácido nalidíxico) impregnados em discos (Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes la Coquette, França).

Foram preparados inóculos das cepas de *Lactobacillus* em caldo MRS com aproximadamente  $10^8$  ufc/mL, cuja turbidez equivale a 0,5 na escala de McFarland. A suspensão bacteriana foi diluída na proporção de 1:100 e 200 µl da mesma foram semeados com um swab em placas de Ágar MRS. Após perfeita absorção do inóculo, os discos com antibióticos foram posicionados nas placas e as zonas de inibição observadas após 36 h de incubação, a 37°C e em anaerobiose. Após esse período, os diâmetros (em milímetros) das zonas claras de inibição do crescimento ao redor de cada disco foram medidos com auxílio de um paquímetro.

A fim de classificar os lactobacilos isolados em relação à sensibilidade às substâncias antimicrobianas, foi empregada a metodologia padronizada por Vlakova et al, (2006). De acordo com esse trabalho, essa sensibilidade é proporcional ao tamanho do halo formado a partir do disco impregnado com antibiótico. Dessa forma, a classificação foi estabelecida da seguinte forma: halo de até 15mm indica a cepa como resistente; halo com diâmetro entre 16mm e 22mm, cepa com uma susceptibilidade intermediária e o halos maiores de 23 mm, cepa sensível.

#### **4.5.2 Pesquisa de atividade hemolítica em Ágar sangue**

Os lactobacilos isolados foram mantidos por 18 horas em caldo MRS. Após esse período, inoculou-se uma microgota de 25 µL da suspensão de lactobacilos na superfície de Ágar MRS adicionado de 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Imediatamente após a inoculação, as amostras foram incubadas em anaerobiose, a 35°C, por 48h. A atividade hemolítica era considerada após a constatação de um halo de hemólise ao redor do crescimento.

#### **4.6 Análises Estatísticas**

Todos os resultados obtidos foram apresentados em valores de média  $\pm$  erro padrão. No presente estudo, para grupos submetidos à interferência de um único fator de variação, os resultados foram analisados por ANOVA de uma via. Já para grupos submetidos à interferência simultânea de dois fatores de variação, os dados foram analisados por ANOVA de duas vias. Em ambos os casos, quando necessário, tais análises foram sucedidas teste de Tukey para detectar não somente diferenças entre os tratamentos, mas também dentro dos próprios grupos. Não obstante, foi usado o teste de Grubbs para detecção de valores aberrantes. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando os valores de  $p < 0,05$ . Vale destacar que o software GraphPad Prism 5 (La Jolla, CA, EUA) foi utilizado para todas as análises estatísticas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação das Espécies dos Lactobacilos Isolados

A fim de identificar as espécies dos lactobacilos isolados de fezes de crianças, utilizamos o método do API 50 CHL. Os resultados obtidos através desse teste bioquímico se encontram na tabela 3.

Tabela 3. Identificação das Espécies de Lactobacilos Isolados de Fezes de crianças.

<b>CÓDIGO</b>	<b>ESPÉCIE</b>
HANS	<i>L. casei</i>
SACCO	<i>L. acidophilus</i>
LAC 8	<i>L. rhamnosus</i>
LAC 11	<i>L. rhamnosus</i>
LAC A1	<i>L. paracasei</i>
LAC X	<i>L. paracasei</i>
LAC 24	<i>L. rhamnosus</i>

Vale ressaltar que já foram constatados casos em que os lactobacilos estudados diferiram na sua capacidade de fermentação de açúcares, determinada pelo API 50 CHL e sua identificação com base nesses perfis não coincidiam com uma identificação molecular-biológica na maioria dos casos. Entretanto as cepas comerciais HANS e SACCO usadas no presente estudo tem indicação na embalagem de serem *L. casei* e *L. acidophilus* respectivamente. Esta identificação foi comprovada fenotipicamente através do API 50 CHL realizada nesta pesquisa para a comercial Sacco.

## 5.2 Simulação de Passagem no Trato Gastrointestinal.

Outro pré-requisito importante para se considerar um microrganismo como probiótico é a resistência às condições físico-químicas do trato gastrointestinal. Para verificarmos essa propriedade, realizamos uma simulação de passagem no trato gastrointestinal. Usando o teste ANOVA de duas vias, foi demonstrado que nem o tipo de lactobacilo e nem a interação entre as variáveis experimentais foram estatisticamente significativos. Todavia, houve um efeito fortemente significativo da progressão temporal [ $F(2, 41) = 42,28$ ;  $p < 0,0001$ ] (Figura 4).

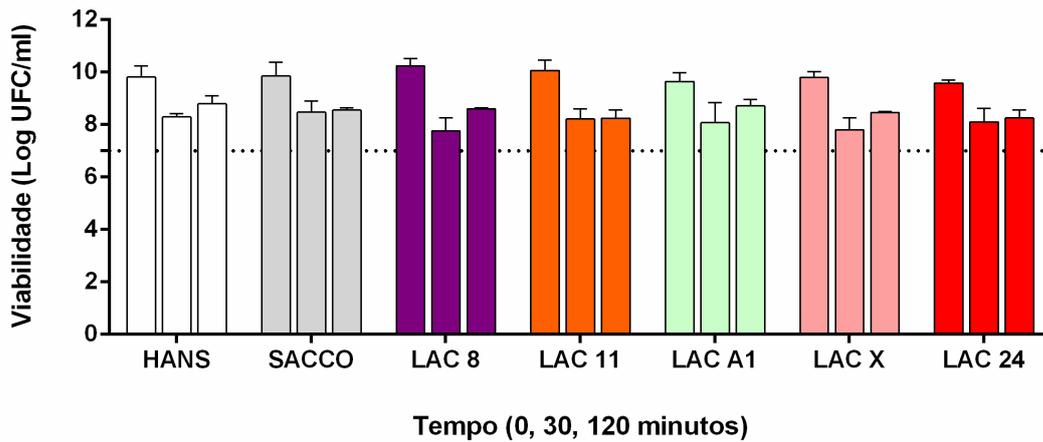


Figura 4: Sobrevivência de cepas de lactobacilos comerciais (HANS e SACCO) e isolados de origem humana submetidos às condições gástricas (30 minutos) e intestinais (120 minutos).

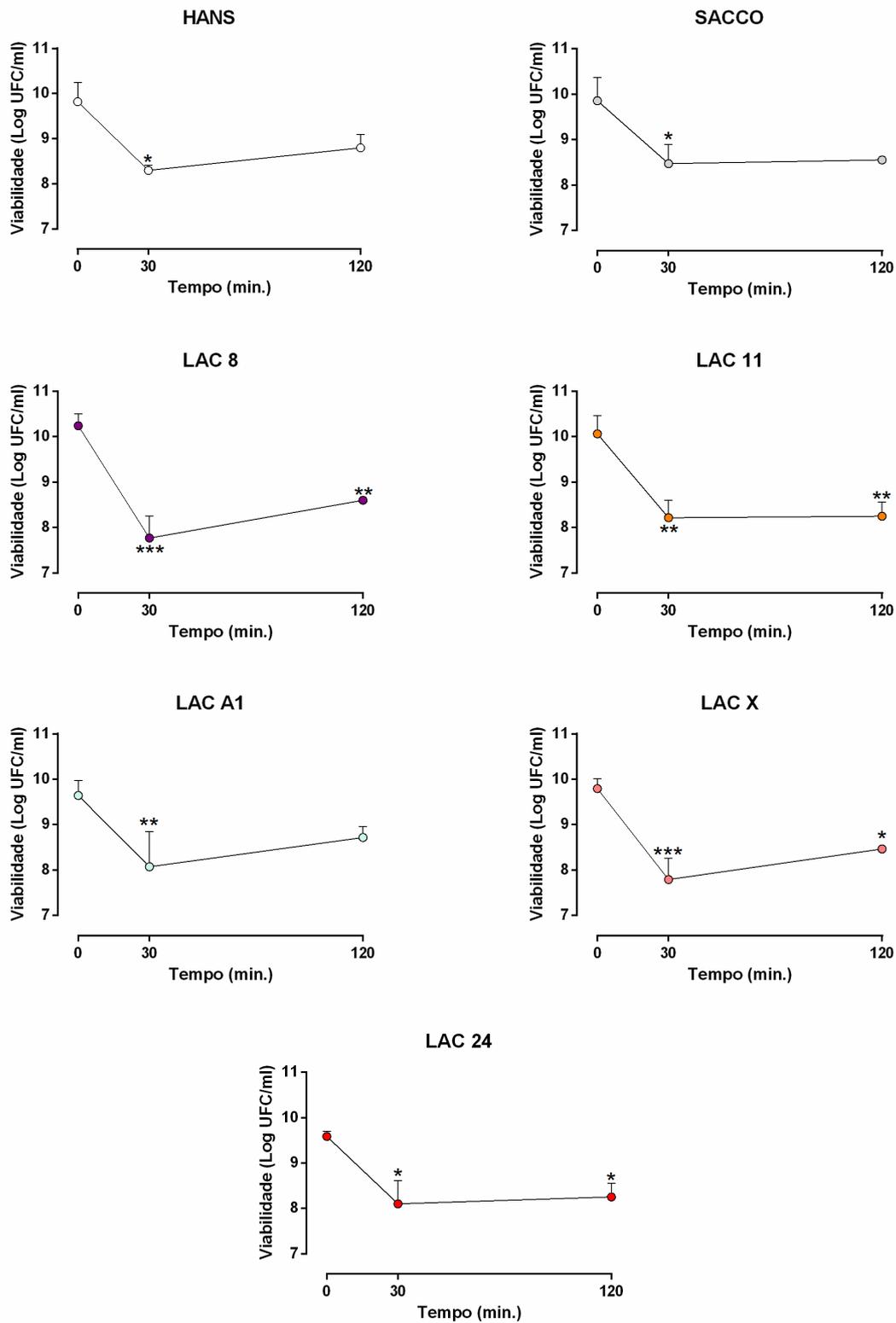


Figura 5: Sobrevivência de cepas de lactobacilos comerciais (HANS e SACCO) e isolados de origem humana submetidos às condições gástricas (30 minutos) e intestinais (120 minutos). Representação em gráfico. \* representa  $p < 0,05$ ; \*\* representa  $p < 0,01$  e \*\*\*,  $p < 0,001$  quando comparados à viabilidade celular no tempo 0.

É de amplo conhecimento que o TGI diminui o número de células viáveis, sendo essa uma característica muito importante no que diz respeito ao potencial probiótico dos lactobacilos. A ANVISA determina que a concentração de lactobacilos nos alimentos funcionais probióticos deve estar em torno de  $10^8$  a  $10^9$  (BRASIL, 1999a). Porém não se sabe ao certo o quanto deveria ser a concentração no intestino humano para que se tenha uma boa resposta probiótica. Para efeito deste trabalho se considerou que  $10^7$  seria uma concentração viável. A redução da viabilidade celular observada (Figura 5) após 120 minutos em contato com os sucos digestivos foi menor que duas reduções decimais para todas as cepas de lactobacilos, incluindo as comerciais. Diferentemente Favarin, Laureano-Melo e Luchese (2015) encontraram uma redução drástica de até cinco reduções decimais no número de células viáveis de bifidobactérias não encapsuladas após exposição das condições simuladas do TGI. Vale ressaltar que o tempo de exposição aos sucos gástrico e intestinal empregado por Favarin, Laureano-Melo e Luchese (2015) foi o dobro do utilizado nesta pesquisa.

Os resultados obtidos nesta pesquisa indicam que não houve diferença significativa entre as cepas testadas e as cepas comerciais. Esse resultado também ressalta um ponto positivo para estas cepas, pois se trata de uma característica probiótica desejável.

O gênero *Lactobacillus* desempenha um papel crucial no intestino humano e se destaca por ser o microrganismo mais utilizado como probiótico. Dessa forma tem que sobreviver à passagem por este intestino em forma vital. Em termos de concentração, com exceção da região do estômago que possui acidez elevada com pH médio 2 (SICILIANO e MAZZEO 2012) e região do intestino e cólon onde ficam expostas a ação da bile, a concentração varia entre 1 e 40 mmol / L. (FONTANA et al, 2013).

Para superar as condições impostas por esta travessia, os lactobacilos intestinais são capazes de metabolizar sais biliares conjugados por hidrólise (DE BOEVER e VERSTRAETE 1999). Inclusive, já foi comprovado em estudos recentes que algumas cepas oriundas do TGI se adaptam mais progressivamente à presença de sais biliares (RUIZ et al, 2013) em comparação com as bactérias provenientes de outros nichos. Partindo dessa premissa, possíveis cepas probióticas isoladas de queijo não mostraram tão elevada taxa de sobrevivência na presença de 0,5 e 1% biliar (BELICOVÁ et al, 2013).

Em concordância com os nossos resultados, a sobrevivência de duas cepas de *Lactobacillus*, *L. murinus* e *L. reuteri*, não foram afetadas pela presença de bile nos estudos realizados por Hyacinta e colaboradores, que ainda obtiveram um surpreendente resultado do efeito da bile nas cepas de lactobacilos estudadas. Segundo este autor, foi observado que a resistência ou susceptibilidade dos lactobacilos à alguns antibióticos pode ser revertida mediante à exposição aos sais biliares. Ainda de acordo com esse trabalho, as cepas que obtiveram maior sobrevivência em presença de bile foram *L.reuteri* KO 4b, *L. plantarum* KG 4, e *L. reuteri* E (HYACINTA et al, 2014).

Além da bile, enzimas que auxiliam na digestão realizada pelo hospedeiro, micro-organismos comensais circundantes e microbiota patogênica oportunista também afetam a composição da microbiota do TGI e representam um obstáculo contra agentes probióticos pela obtenção de nutrientes e pela ligação aos receptores da célula hospedeira (HOROŠOVÁ et al, 2006). Portanto, é amplamente aceito que o estresse sofrido por esses probióticos durante a passagem pelo TGI influencia negativamente na capacidade dos mesmos em manter seus benefícios à saúde do hospedeiro. Foram ressaltados importantes mecanismos envolvidos na estratégia usada pelos lactobacilos para vencer e atravessar as barreiras impostas pelo TGI e, conseqüentemente, conseguirem chegar com viabilidade ao seu destino final, onde geralmente exercem o seu papel de agente probiótico. Dentre tais mecanismos, destacam-se: manutenção da homeostase do pH intracelular, reparação do DNA e de proteínas danificadas devido ao baixo pH e modificação da arquitetura do envelope celular (LEBEER et al, 2008).

### **5.3 Atividade Antimicrobiana Contra *C. albicans* e *E. coli***

A fim de avaliar a interação dos lactobacilos isolados com micro-organismos potencialmente patogênicos, como *C. albicans* e *E. coli*, realizamos o teste de inibição (Figura 1 e Figura 2, respectivamente). Nesse teste, foi verificado que nenhum dos lactobacilos isolados foi capaz de reduzir a viabilidade de *C. albicans*. Todavia, através do teste Tukey, foi observado que as cepas comerciais HANS e SACCO, bem como as cepas isoladas Lac 11 e Lac A1, quando cultivadas em consórcio com *E. coli*, reduziram de maneira significativa ( $P < 0,001$  e  $P < 0,01$  respectivamente) o crescimento dessa bactéria em relação à condição controle. Curiosamente, o Lac 8 aumentou

significativamente o crescimento da *E. coli* quando comparado com as cepas comerciais HANS e SACCO.

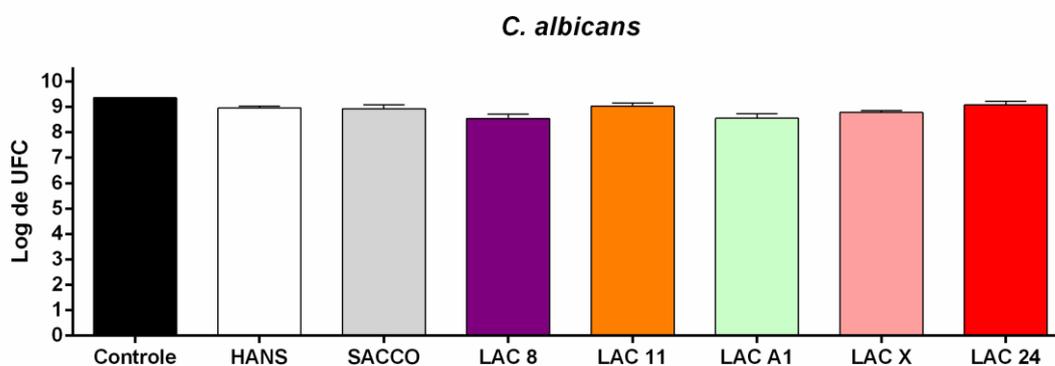


Figura 1. Crescimento de *C. albicans* em consórcio com cepas de *Lactobacillus*. Os resultados são médias de três repetições. Controle, *C. albicans* em crescimento axênico.

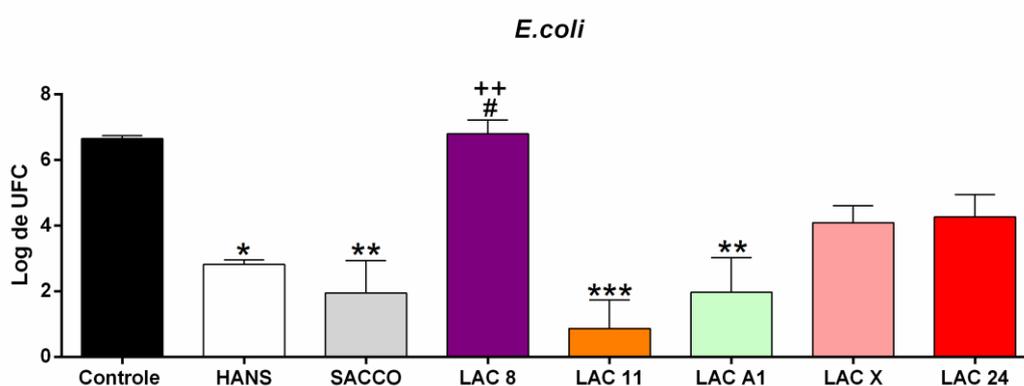


Figura 2. Crescimento de *E. coli* em consórcio com cepas de lactobacilos. Controle, *E. coli* em crescimento axênico. Os resultados são médias de três repetições, \* representa  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  quando comparado à condição controle. ++,  $p < 0,01$  quando comparado com a cepa comercial HANS. #,  $p < 0,05$  quando comparado com a cepa comercial SACCO.

O fato de *Lactobacillus* serem capazes de inibir patógenos é cientificamente aceito e comprovado (BERNET-CAMARD et al, 1997; DUNNE et al, 2001). Isso pode se dar por vários fatores, tais como: produção de ácido láctico, substância capaz de reduzir o pH do meio, condição esta, não suportada pela maioria dos agentes

patogênicos ou ainda produção de peróxido de hidrogênio e ácidos graxos de cadeia curta. Compostos antibacterianos específicos como antibióticos ou bacteriocinas também têm sido indicados como responsáveis pela inibição de patógenos (DRAGO et al, 1997). Todavia, o tipo de compostos antibacterianos usados para inibição de patógenos varia de acordo com cada cepa. Recentemente, foi observado que as atividades inibidoras de *L. fermentum* e *L. rhamnosus* foram decorrentes da produção de peróxido de hidrogênio, enquanto que a de *L. gallinarum* e outra cepa de *L. rhamnosus*, pela produção de bacteriocinas (BUJŇÁKOVÁ, 2012).

No presente estudo, vale ressaltar que as cepas Lac 11 e A1 se mostraram tão ou mais eficientes quanto às duas cepas já usadas comercialmente. Embora tais resultados tenham sido promissores por indicarem um potencial probiótico das cepas testadas, não sabemos ainda os mecanismos envolvidos nesta inibição. De maneira semelhante, também não sabemos explicar os mecanismos envolvidos no processo de sinergismo entre a cepa Lac 8 e *E. coli* usada nesse ensaio.

#### **5.4 Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos.**

Em termos de segurança a ANVISA através da resolução nº 17 aprova o Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. (BRASIL, 1999b).

Para que um micro-organismo seja considerado potencial probiótico também é necessário que o mesmo não seja resistente aos agentes antimicrobianos utilizados na rotina médica. Para verificarmos essa peculiaridade, realizamos um teste de sensibilidade a antimicrobianos. No presente estudo, classificamos a sensibilidade dos lactobacilos isolados às substâncias antimicrobianas através da metodologia padronizada por Vlakova (2006). Os dados estão demonstrados na (Tabela 1).

Tabela 1. Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos.

	<b>CFX 30</b>	<b>TET 30</b>	<b>AMP 10</b>	<b>CLO 30</b>	<b>CIP 5</b>	<b>AMC 30</b>	<b>NAL 30</b>
<b>HANS</b>	17,6±1,38 I	35,0±5,02 S	34,0±2,62 S	28,6±1,92 S	21,4±5,46 I	34,3±3,18 S	0 R
<b>SACCO</b>	16,8±2,42 I	35,3±3,34 S	33,3±1,89 S	35,1±2,30 S	20,3±4,62 I	38,2±4,16 S	0 R
<b>LAC 8</b>	17,7±3,38 I	26,2±5,18 S	36,3±2,57 S	31,1±3,19 S	22,6±7,55 I	41,3±0,70 S	0 R
<b>LAC 11</b>	13,5±1,72 R	34,3±2,41 S	33,5±1,17 S	24,6±2,93 S	19,1±4,42 I	38,9±1,07 S	0 R
<b>A1</b>	16,2±3,54 I	34,5±4,10 S	32,9±4,14 S	29,5±1,67 S	22,9±5,75 I	33,3±1,65 S	0 R
<b>LAC X</b>	15,3±2,69 R	38,0±2,11 S	38,7±3,17 S	28,7±3,36 S	24,0±0,30 S	39,2±1,07 S	0 R
<b>24</b>	21,2±0,14 I	43,6±2,97 S	53,0±8,34 S	43,0±3,42 S	25,0±0,42 S	44,3±5,80 S	0 R

S: sensível (> 23mm), I: intermediário (16 a 23 mm) e R: resistente (<16 mm). CFX 30 (cefalexina) TET 30 (tetraciclina) AMP 10 (ampicilina) CLO 30 (cloranfenicol) CIP 5 (ciprofloxacina) AMC 30 (Amoxicilina com Ácido Clavulânico) NAL 30 (naloxona)

Para avaliar possíveis diferenças de sensibilidade entre os lactobacilos isolados e cepas comerciais, realizamos o teste ANOVA de uma via, sucedido, quando necessário, do teste Tukey. Em nossos resultados, não foram verificadas diferenças significativas entre os micro-organismos isolados e cepas comerciais quando submetidos ao tratamento com Cefalexina (Figura 3a), Tetraciclina (Figura 3b), Naloxona (Figura 3c), Ciprofloxacina (Figura 3d), Amoxicilina (Figura 3e) e Cloranfenicol (Figura 3f). Esse resultado reforça ainda mais o potencial probiótico das cepas isoladas e avaliadas nesse estudo. Entretanto, vale ressaltar que já foi confirmada a resistência do gênero *Lactobacillus* à vancomicina e quinolonas (ofloxacina, ciprofloxacina) para oito cepas testadas (HYACINTA et al, 2014). Da mesma forma como já foi demonstrado em estudo recente que, apesar da maioria das 24 cepas testadas terem sido sensíveis a certos agentes antimicrobianos (estreptomicina, gentamicina, clindamicina, eritromicina, tetraciclina, quinupristina-dalfopristina), três cepas de *Lactobacillus rhamnosus* foram resistentes, sendo inclusive eliminadas em triagens posteriores (BUJŇÁKOVÁ et al, 2012).

Por outro lado, neste teste, outro resultado que chamou a atenção foi que ao utilizarmos a ampicilina (Figura 3g), foi constatado que o Lac 24 é estatisticamente mais sensível a esse antibiótico do que as cepas comerciais HANS ( $5,3 \pm 0,41$  log de UFC vs  $3,4 \pm 0,26$  log de UFC,  $p = 0,03$ ) e SACCO ( $5,3 \pm 0,41$  log de UFC vs  $3,3 \pm 0,18$  log de UFC,  $p = 0,02$ ). Este é um dado interessante uma vez que ampicilina é amplamente usado em medicina humana e veterinária. Dessa forma, poderia ser esperado que cepas comerciais, que naturalmente não estivessem tão expostas à pressão

seletiva por parte destes antibióticos, fossem mais sensíveis a ele do que uma cepa recentemente isolada de um organismo humano.

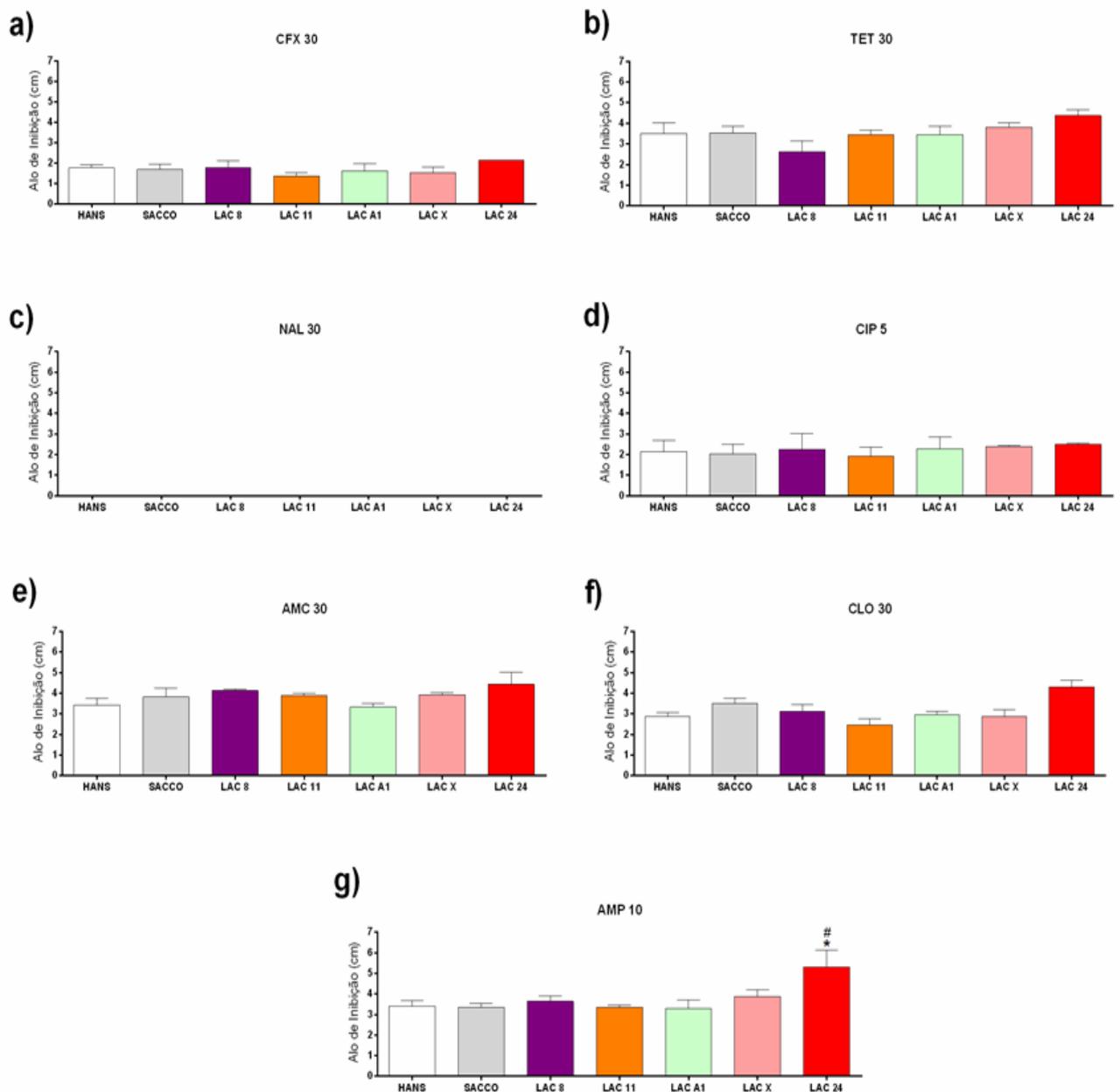


Figura 3. Comparação da sensibilidade aos antimicrobianos entre cepas de lactobacilos comerciais e isolados de origem humana. \* representa  $p < 0,05$  quando comparado à cepa comercial HANS e #,  $p < 0,05$  quando comparado com a cepa comercial SACCO

### 5.5 Hemólise em Ágar Sangue.

A capacidade de hemólise é uma propriedade indesejável comum em muitos micro-organismos patogênicos. Para verificarmos se os lactobacilos isolados usados nesse estudo possuíam tal particularidade, realizamos a semeadura dos lactobacilos em Ágar sangue. De acordo com a tabela 2, nenhum dos lactobacilos apresentou capacidade hemolítica, reforçando ainda mais seu potencial probiótico.

Tabela 2. Hemólise em Ágar Sangue.

<b>CÓDIGO</b>	<b>HEMÓLISE</b>
HANS	Negativo
SACCO	Negativo
LAC 8	Negativo
LAC 11	Negativo
LAC A1	Negativo
LAC X	Negativo
LAC 24	Negativo

## 6 CONCLUSÕES

Todas as cepas atenderam aos requisitos de segurança, não apresentando atividade hemolítica e sensibilidade a antimicrobianos semelhante às cepas comerciais, sendo uma cepa de *L. rhamnosus* Lac 24 ainda mais sensível que as comerciais ao antibiótico ampicilina.

Da mesma forma, todas as cepas avaliadas apresentaram resistência quando submetidas a condições simuladas de passagem pelo trato gastrointestinal.

Com relação a atividade antagonista contra *C. albicans* nenhum dos lactobacilos, incluindo os comerciais, foi capaz de reduzir a viabilidade deste microrganismo, mas todas, com exceção de *L. rhamnosus* lac 8 tiveram ação antagonista contra *E. coli* destacando-se a atividade de dois isolados identificados como *L. rhamnosus* lac 11 e *L. paracasei* A1.

Conclui-se que as cepas isoladas de humanos *L. rhamnosus* lac 11 e *L. paracasei* Lac A1 apresentaram maior potencial probiótico com relação aos testes efetuados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLERBERTH, I.; AHRNÉ, S.; JOHANSSON, M-L.; MOLIN, G. A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, n. 7, p. 2244-2251, Jul. 1996.

ALMEIDA, L. B.; MARINHO, C. B.; SOUZA, C. S.; CHEIB, V. B. P. Disbiose intestinal. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, Belo Horizonte, v. 24, n. 1, p. 58-65, dez. 2009

AMBADOYIANNIS, G.; HATZIKAMARI, M.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; TZANETAKIS, N. Probiotic and technological properties of enterococci isolates from infants and cheese. **Food Biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 307-325, 2005.

AMMOR, Mohammed Salim; FLÓREZ, Ana Belén; MAYO, Baltasar. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 559-570, 2007.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **J Vasc Brasil**, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.

BELICOVÁ, A.; MIKULÁŠOVÁ, M.; DUŠINSKÝ, R. Probiotic potential and safety properties of *Lactobacillus plantarum* from Slovak Bryndza cheese. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J. P.; HENRI-DUBERNET, S.; GUEGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. **International journal of food microbiology**, v. 126, n. 3, p. 278-285, 2008.

BERNET-CAMARD M. F.; Lievin V.; Brassart D.; Neeser J. R.; Servin A. L.; Hudault S. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a non-bacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2747-2753, 1997.

BORIS S.; SUAREZ J.E.; BARBÉS C. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. **Journal of Applied Microbiology**. v. 83, p. 413-420, out 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução n. 16 de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes, constante do anexo desta Portaria.. Brasília, ANVISA, 1999a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução n. 17 de 30 de abril de 1999b. Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos.. Brasília, ANVISA, 1999b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução n.18 de 30 de abril de 1999. Aprova regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Brasília, ANVISA, 1999c.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). n.19 de 30 de abril de 1999. Aprova regulamento técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Brasília, ANVISA, 1999d.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Brasília, ANVISA, 2002.

BRASIL. Lista de alegações de propriedades funcionais aprovada. In: Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Sustâncias Bioativas e Probióticos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Alimentos+Com+Alegacoes+de+Propriedades+Funcionais+e+ou+de+Saude/Alegacoes+de+propriedade+funcional+aprovadas> acessado em 15/ 09/2015

BUJŇÁKOVÁ, D.; KMEŤ, V. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **Folia microbiologica**, v. 57, n. 4, p. 263-267, 2012.

BÚRIGO, T.; FAGUNDES, R. L. M.; TRINDADE, E. B. S. M.; VASCONCELOS, H. C. F. F. Efeito bifidogênico do frutooligossacarídeo na microbiota intestinal de pacientes com neoplasia hematológica. *Rev. Nutr.* 20 (5) Set.-Out. 2007.

CABALLERO-FRANCO, C.; Keller, K.; De Simone, C.; Chadee, K. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. **Mucosal Biology**. v. 292(1), p. 315-322. 2007.

CLEMENTI, F.; AQUILANTI, L. Recent investigations and updated criteria for the assessment of antibiotic resistance in food lactic acid bacteria. **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p. 394-398, 2011.

COLLINS, F. M.; CARTER, P. B. Growth of salmonellae in orally infected germfree mice. **Infection and immunity**, v. 21, n. 1, p. 41-47, 1978.

CYPRIANO, V. H. N. **Propriedades Probióticas de *Lactobacillus* spp. de Origem Humana e Interação com Leveduras Potencialmente Patogênicas do Gênero *Candida***. 2013. 40 f. Dissertação ( Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2013.

DALY, C.; DAVIS, R. The biotechnology of lactic acid bacteria with emphasis on applications in food safety and human health. **Agricultural and Food Science**, v. 7, n. 2, p. 251-265, 2008.

DE BOEVER, P.; VERSTRAETE, W. Bile salt deconjugation by *Lactobacillus plantarum* 80 and its implication for bacterial toxicity. **Journal of applied microbiology**, v. 87, n. 3, p. 345-352, 1999.

DUNNE, C.; O'Mahony L.; Murphy, L.; Thornton, G.; Morrissey, D.; O'Halloran, S.; Feeney, M.; Flynn, S.; Fitzgerald, G.; Daly, C.; Kiely, B.; O'Sullivan, G. C.; Shanahan,

F.; Collins, J. K. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. **Am J Clin Nutr** 73:386S–392S, 2001.

DRAGO, L.; GISTMONDO, M. R.; LOMBARDI, A.; HAEN, C.; GOZZINI, L. Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new Lactobacillus isolates of human intestinal origin. Federation of European Microbiological Societies. **Microbiology Letters**, v. 153, n. 2, p. 455-463, ago. 1997.

DUŠKOVÁ, M.; RENÁTA, K. Antimicrobial resistance of lactobacilli isolated from food. **Czech J Food Sci**, v. 31, p. 27-32, 2013.

WHO, FAO. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. **Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report**, p. 1-34, 2001. Disponível em [www.fao.org/es/esn/food/prebioreport\\_en.pdf](http://www.fao.org/es/esn/food/prebioreport_en.pdf). Acesso em 06.09.2015

FAVARIN, L.; LAUREANO-MELO, R.; LUCHESE, R. H. Survival of free and microencapsulated Bifidobacterium: effect of honey addition. **Journal of microencapsulation**, n. 0, p. 1-7, 2015.

FEY, P. D.; Safranek, T. J.; Rupp, M. E.; Dunne, E. F.; Ribot, E.; Iwen, P. C.; Hinrichs, S. H. Ceftriaxone-resistant Salmonella infection acquired by a child from cattle. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 17, p. 1242-1249, 2000

FONTANA, L.; BERMUDEZ-BRITO, M.; PLAZA-DIAZ, J.; MUNOZ-QUEZADA, S.; Gil, A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. **British journal of nutrition**, v. 109, n. S2, p. S35-S50, 2013.

FOOKS, L.J.; FULLER, R.; GIBSON, G.R. Probiotics, prebiotics and human gut microbiology. **Int Dairy J** v. 9, p. 53–61, 1999.

FULLER, R. Probiotics in man and animals., v. 66, p. 365-78, 1989.

GIBSON, G.R.; BEATTY, E.R.; WANG, X.; COMMINGS, J.H. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. **Gastroenterology**. v. 108, n. 4, p. 975-982, abr. 1995.

HAENEL, H.; BENDIG, J. Intestinal flora in health and disease. **Progr. Food Nutr. Sci.** v. 1, p. 21- 64, 1975.

HOROŠOVÁ, K.; BUJŇÁKOVÁ, D.; KMEŤ, V. Effect of lactobacilli on E. coli adhesion to caco-2 cells in Vitro. **Folia microbiologica**, v. 51, n. 4, p. 281-282, 2006.

HUMMEL, A. S.; HERTEL, C.; HOLZAPFEL, W. H.; FRANZ, C. M. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 3, p. 730-739, 2007.

HYACINTA, Májerková et al. Bile tolerance and its effect on antibiotic susceptibility of probiotic Lactobacillus candidates. **Folia microbiologica**, p. 1-5, 2014.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 4, p. 728-764, 2008.

LUCHESE, R. H. MICROBIAL INTERACTIONS IN THE GUT: THE ROLE OF BIOACTIVE COMPONENTS IN MILK AND HONEY. **Probiotics**. v.2, p. 400-416, 2012. [link para acessar www.intechopen.com/articles/show/title/microbial-interactions-in-the-gut-the-role-of-bioactive-components-in-milk-and-honey](http://www.intechopen.com/articles/show/title/microbial-interactions-in-the-gut-the-role-of-bioactive-components-in-milk-and-honey)

LUCHESE, R.H.; MACEDO, L. N.; OLIVEIRA, G.S. **Alimentos funcionais microbianos. In:** Tendências e inovações em ciência, tecnologia e engenharia de alimentos. Ed. Kurozawa, L.E & Costa, S.R.R editora Atheneu, São Paulo. Seção IV, Cap. 11, p. 199-213, 2014.

MACEDO, L. N.; LUCHESE, R. H.; GUERRA, A. F.; BARBOSA, C. G. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e Viabilidade de Bifidobacterium spp e

Lactobacillus spp em leite **Ciencia e Tecnol de Aliment**, v. 28, n.4., Campinas, S. P., oct/dez, 2008

MARTEAU, P.; GERHARDT, M. F.; MYARA, A.; BOUVIER, E.; TRIVIN, F.; RAMBAUD, J.C. Metabolism of bile salts by alimentary bacteria during transit in the human small intestine. **Microb. Ecol. Health Dis.** v. 8, p. 151 – 157, 1995.

Mattila-Sandholm, T.; Myllärinen, P.; Crittenden, R.; Mogensen, G.; Fondén, R.; Saarela, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2, p. 173-182, 2002.

METCHNIKOFF, I. The prolongation of life. Revised ed. of 1907. **Heinemann, London.** (s.n). 1900.

MITSUOKA, T. Recent trends in research on intestinal flora. **Bifidobacteria Microflora** v. 1, p. 3 – 24, 1982.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M.; Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MORI M.; SAKAGAMI Y.; NARITA M. Isolation and structure of the bacterial sex pherormone CADI, that induces plasmid transfer in *Streptococcus faecalis*. **FEBS Letters.** v. 178 p. 97-100, 1985.

MORRILL, J. L.; MORRILL, J. M.; FEYERHERM, A. M.; LASTER, J. F. Plasma proteins and a probiotic as ingredients in milk replacer. **Journal of dairy science**, v. 78, n. 4, p. 902-907, 1995.

MORO, G. E.; ARSLANOGLU, S. Reproducing the bifidogenic effect of human milk in formula-fed infants: Why and how? **Acta Paediatrica**, v. 94, n. Supplement 449, p. 14-17, 2005.

MOZZI, F.; GERBINO, E. ; FONT DE VALDEZ, G; TORINO, M.I. Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in an in vitro gastric system. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 56-64, 2009.

NAHAISI, M.H. Lactobacillus acidophilus: therapeutic properties, products and enumeration. Chapt 6. Em Robinson, R.K. (ED), *Developments in Foods Microbiology*, pp. 153-178. Elsevier. Applied Science Publishers, Londres, RU. 1986.

NOUSIAINEN, J.; SETÄLÄ, J. Lactic acid bacterial as animal probiotics. *In Lactic Acid Bacteria - Microbiology and Functional Aspects*, 3<sup>rd</sup> ed. Salminen S. e Wright A. von (eds), New York: Marcel Dekker, Inc., p. 437-473, 1998.

O'FLAHERTY, S.; KLAENHAMMER, T.R. The role and potential of probiotic bacteria in the gut, and the communication between gut microflora and gut/host Review Article. **International Dairy Journal**, v.20, n. 4, p. 262-268, 2010.

OLIVEIRA, G. S. Potencial prebiótico do leite humano comparado ao leite em pó modificado na modulação da microbiota colônica e sanidade de lactentes. 2011. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Anim. Nutr. Health** v. 29, p. 4-8, 1974.

PEREIRA, V. G.; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de Lactobacillus acidophilus, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 28, n. 2, p. 229-240, abr.-jun. 2007.

PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal condition and in yoghurt. **International Dairy journal**, v. 14, n.6, p. 505-515, 2004.

REDONDO-LOPEZ, V.; COOK, R.L.; SOBEL, J. D. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. **Reviews of Infectious Diseases**. v.12, p. 856-872, 1990.

REID, G. Probiotics and prebiotics – Progress and challenges. **International Dairy Journal**, v. 18 p.10-11, 969-75, 2008.

RENIERO R.; COCCONCELLI, P.; BOTAZZI, V.; MORELLI, L. High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promoting factor. **Journal of General Microbiology**. 138: 763-68, 1991.

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

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo. v. 42, n.1, p. 1-16, 2006.

SAARELA, M.; MONGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MATTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**. v. 84 p. 197 – 215, 2000.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y.; LEE, Y.K. Probiotics: how should they be defined? **Trends Food Sci. Technol.** v. 10, p. 107 – 110. 1999.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C.; ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5, p. 563-572, 1998a.

SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A.; MORELLI, L.; MARTEAU, P.; BRASSART, D.; DE VOS, W.M.; FONDÉN, R.; SAXELIN, M.; COLLINS, K.; MONGENSEN, G;

BIRKELAND, S.-E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Demonstration of safety of probiotics — a review. **Int. J. Food Microbiol.** 44, 93–106. 1998b.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, E. Probiotics and stabilisation of the gut mucosal barrier. **Asia Pacific J. Clin. Nutr.** V. 5, p. 53 – 56, 1996a.

SANDERS, M. E. Effect of consumption of lactic cultures on human health. In: **Advances in Food and Nutrition Research.** v. 37, p. 67-130, 1993.

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Review.** v.61, n.3, p. 91-100, 2003.

SAVAGE, D. C. Growth phase, cellular hydrophobicity, and adhesion in vitro of lactobacilli colonizing the keratinizing gastric epithelium in the mouse. **Applied and environmental microbiology**, v. 58, n. 6, 1992.

SEPP, E.; ŠTŠEPETOVA, J.; SMIDT, I.; RÄTSEP, M.; KÕLJALG, S.; LÕIVUKENE, K.; MÄNDAR, R.; JAANIMÄE, L.; LÖHR, HI.; NATÅS, OB.; NAABER, P. Intestinal lactoflora in Estonian and Norwegian patients with antibiotic associated diarrhea. **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p. 407-409, 2011.

SICILIANO, R. A.; MAZZEO, M. F. Molecular mechanisms of probiotic action: a proteomic perspective. **Current opinion in microbiology**, v. 15, n. 3, p. 390-396, 2012.

STEFE, C. A.; ALVES, M. A. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, prebióticos e simbióticos Artigo de revisão. **Saúde & Ambiente em Revista.** Duque de Caxias, v. 3, n.1, p. 16-33, jan.-jun., 2008.

STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, T. T. D.; GOMES, R. C.; AMARAL, M. D. P. H. D.; CARVALHO, A. F. D.; VILELA, M. A. P. **RBCF, Rev. bras. ciênc. farm.(Impr.)**, v. 43, n. 2, p. 181-194, 2007.

SUGITA, T.; TOGAWA, M. Efficacy of Lactobacillus preparation Biolactis powder in children with rotavirus enteritis. **Jpn J Pediatr**, v. 47, p. 2755-2762, 1994.

VLKOVÁ, E.; RADA, V.; POPELÁŘOVÁ, P.; TROJANOVÁ, I.; KILLER, J. Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria isolated from gastrointestinal tract of calves. **Livestock Science**, v. 105, n. 1, p. 253-259, 2006.

WITTE, W. Selective pressure by antibiotic use in livestock. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. 19-24, 2000.

WYNNE, A. G.; MCCARTNEYA, A. L.; BROSTOFF, J.; HUDSPITHB, B. N.; GIBSON, G. R. An in vitro assessment of the effects of broad-spectrum antibiotics on the human gut microflora and concomitant isolation of a *Lactobacillus plantarum* with anti-Candida activities. **Anaerobe**. v. 10, n. 3, p. 165-169, jun. 2004.

ZIEMER, C.J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **Int. Dairy J., Amsterdam**, v.8, p.473-479, 1998