



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Jucelaine Aparecida Deon Schmitt

Avaliação do perfil probiótico de cepas de *Lactobacillus acidophilus* destinados a aplicações farmacêuticas e alimentícias.

Cascavel

2014



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Jucelaine Aparecida Deon Schmitt

Avaliação do perfil probiótico de cepas de *Lactobacillus acidophilus* destinados a aplicações farmacêuticas e alimentícias.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa: Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações em Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Luciana Oliveira de Fariña

Cascavel
2014



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA E APROVADA EM 04 DE NOVEMBRO DE 2014.

PROFA. DRA. LUCIANA OLIVEIRA DE FARINA
PCF-UNIOESTE (ORIENTADORA)

PROFA. DRA. LUCIANA BILL MIKITO KOTTWITZ
TITULAR INTERNO 1 (UNIOESTE)

PROFA. DRA. MÁRCIA REGINA SIMÕES
TITULAR INTERNO 2 (UNIOESTE)

PROFA. DRA. NEREIDA MELO DA ROSA GIOppo
TITULAR INTERNO 1 (UNIOESTE)

PROFA. DRA. DARLILA APARECIDA GALLINA
TITULAR EXTERNO (ITAL – Campinas, SP)

PROF. DR. EDUARDO BORGES DE MELO
COORDENADOR – PCF-UNIOESTE

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,
mas não esqueço de que minha vida

é a maior empresa do mundo,
e posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver
apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e
se tornar um autor da própria história.

É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar
um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.

É saber falar de si mesmo.

É ter coragem para ouvir um “Não”.

É ter segurança para receber uma crítica,
mesmo que injusta.

Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo...”

Fernando Pessoa

DEDICATÓRIA

A meus pais Ademar e Nilce Deon, que sempre me guiaram e orientaram pelos melhores caminhos, sem os quais não seria a pessoa que sou hoje.

Obrigada pela força e orações.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço sempre a Deus por me conceder mais esta grande graça.

À Universidade Estadual Do Oeste do Paraná, por mais uma vez me acolher.

À prof^a. Dr^a. Luciana Oliveira de Fariña, por aceitar me orientar.

À Prof^a. Dr^a. Nereida Mello da Rosa Gioppo, pela sua amizade e por me permitir uso do laboratório e equipamentos.

À Prof^a. Dr^a. Márcia Regina Simões pelo auxílio nos cálculos estatísticos.

À Ângela Maria Fernandes, amiga e conselheira de todas as horas.

A Fernando Marcos Leithardt, pelo seu auxílio e socorro nos trabalhos realizados no laboratório.

Às estagiárias Simone Pudell e Débora Pramiu, por me ajudarem no desenvolvimento do projeto.

A meu esposo Jeferson, por todo amparo e força nos momentos difíceis.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	10
1. PROBIÓTICOS.....	10
1.2. Mecanismos de ação de um probiótico	14
1.2.1. Viabilidade celular.....	16
1.2.2. Adesão às células intestinais e competição entre os microorganismos probióticos e patogênicos.	17
1.2.3. Atividade antimicrobiana de espécies de lactobacilos probióticos	18
1.2.3.1. Bacteriocinas.....	19
1.2.3.2. Classificação de bacteriocinas	20
1.2.3.3. Mecanismo de ação	22
1.2.4. Aplicações clínicas de probióticos.....	23
1.2.4.1. Intolerância à lactose e a outros dissacarídeos.....	24
1.2.4.2. Prevenção de diarreias e probióticos	25
1.2.4.2.1 Diarreia aguda infecciosa.....	25
1.2.4.2.2 Diarreia associada a antibióticos	25
1.2.4.2.3 Diarreia do viajante	26
1.2.4.3 Doença inflamatória crônica do intestino e outras situações gastroenterológicas	26
1.2.4.4 Dislipidemias	27
1.2.4.5 Outras situações clínicas.....	28
1.3 Gênero lactobacilos.....	28
1.3.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	29
1.3.1.2 Mecanismo de ação de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

ARTIGO CIENTÍFICO	52
RESUMO	52
1.INTRODUÇÃO	53
2.0. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1. Microrganismos.....	55
2.2. Ativação do microrganismo.....	56
2.3. Avaliação da viabilidade celular	56
2.4. Preparo do inóculo.....	57
2.5. Avaliação da resistência a diferentes antibióticos de uso comercial... 57	
2.6. Resistência em condições ácidas.....	59
2.7. Determinação da tolerância ao trânsito gastrointestinal	59
2.8. Teste de adesão a solventes da superfície celular para Lactobacilos 60	
2.9. Produção de substâncias antagônicas	62
3.0. Atividade de hidrolase de sais biliares (BSH)	63
<u>3.1. Análise Estatística.....</u>	63
<u>4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</u>	64
<u>4.1. Avaliação da viabilidade celular</u>	64
<u>4.2. Avaliação da resistência a diferentes antibióticos de uso comercial ... 64</u>	
<u>4.3. Resistência a condições ácidas</u>	68
<u>4.4. Determinação da tolerância ao trato gastrointestinal</u>	70
<u>4.5. Teste de adesão a solventes da superfície</u>	73
<u>4.6. Atividade antagonista contra patógenos</u>	75
<u>4.7. Atividade hidrolase de sais biliares (BSH)</u>	77
<u>5. CONCLUSÃO.....</u>	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

INTRODUÇÃO

A maioria das chamadas bactérias probióticas fazem parte do grupo de bactérias ácido lácticas. Seu uso, devido aos efeitos benéficos à saúde, tem sido com frequência observado em uma grande variedade de produtos tanto na indústria alimentícia quanto farmacêutica.

Os efeitos benéficos estão sendo evidenciados através de vários estudos que comprovam a eficácia destes microrganismos probióticos, principalmente em casos como: gastroenterites, síndromes diarreicas relacionadas ao uso de antibióticos, combate a infecções bacterianas, redução dos níveis de colesterol sistêmico, com consequente diminuição de doenças cardíacas, e também como uma abordagem preventiva no equilíbrio da microbiota intestinal.

Para que as bactérias probióticas sejam introduzidas na cadeia alimentar é obrigatória a comprovação de ausência de qualquer determinante de resistência antimicrobiana para se evitar a sua propagação lateral.

Dentre as inúmeras bactérias probióticas conhecidas, destacam-se as classes de *Lactobacillus*, sendo caracterizados como bacilos gram positivos, catalase negativos, microaerofílicos.

Primeiramente, para que estes microrganismos possam exercer seus efeitos positivos é necessário resistir às barreiras gastrointestinais, como acidez estomacal elevada e presença de enzimas digestivas e pancreáticas. Além de chegar ao sítio ativo numa quantidade de células viáveis adequada é de fundamental importância que ocorra a adesão destes ao epitélio intestinal.

A ação benéfica dos *Lactobacillus* ocorre através de alguns mecanismos, como: a redução do colesterol, a qual ocorre pela produção de enzimas conhecidas como hidrolases de sais biliares (HSB), e também, pela produção de substâncias com atividade inibitórias contra agentes patogênicos, além de estimularem benéficamente a imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. PROBIÓTICOS

Os probióticos têm sido consumidos há séculos, principalmente sob a forma de alimentos fermentados. Em 1907, Elie Metchnikoff, trabalhando no Instituto Pasteur na França, verificou que um grande número de pessoas na Bulgária possuía uma sobrevida superior a 100 anos. Observou que os camponeses búlgaros consumiam muito iogurte. Isolando as bactérias do iogurte ele descobriu que estas conferiam grandes benefícios à saúde dos indivíduos, com isso publicou um estudo em que postulava que a ingestão de bactérias ácido lácticas tinha influência positiva na microbiota natural do trato intestinal (ROLFE, 2000).

O pediatra Henry Tissier em 1906 observou que as crianças com diarreia teriam em suas fezes um número escasso de bifidobactérias, ao contrário das crianças saudáveis. Sugeriu então, que esse tipo de bactéria poderia ser administrado em pacientes com diarreia para restaurar a flora intestinal. Ele acreditava que a atividade metabólica das bactérias lácticas inibiria as bactérias

intestinais do mesmo modo que inibem a putrefação dos alimentos. Suas publicações “*The prolongation of life*” e “*The bacillus of long life*” podem ser consideradas como o nascimento dos alimentos probióticos (THAMER e PENNA, 2005).

O termo “probiótico” foi introduzido pela primeira vez em 1965 por Lilly e Stillwell, os quais definiram probiótico como aquele fator de origem microbiológico que estimula o crescimento de outros organismos. Em 1989, Roy Fuller enfatizou o requisito de viabilidade para os probióticos e introduziu a ideia de que têm um efeito benéfico para o hospedeiro.

Hong, Duc e Cutting (2005), classificaram a utilização dos probióticos em dois campos de ação: para uso em animais e em humanos. Ainda de acordo com os mesmos autores, os probióticos utilizados em animais são considerados alternativos a antibióticos e, portanto utilizados como promotores de crescimento.

Os probióticos são considerados como ingredientes GRAS (geralmente reconhecido como seguro) (MATTIA e MERKER, 2008), e seu consumo reduz o número viável de patógenos enquanto fortalece as defesas naturais do corpo (BERTAZZONI-MINELLI e BENINI, 2008; LARSEN *et al.*, 2009; MADUREIRA *et al.*, 2008; SAVARD *et al.*, 2011); por isso, eles ajudam a impulsionar o sistema imunológico e, conseqüentemente, diminuir o risco de doenças gastrointestinais, câncer, diabetes e níveis elevados de colesterol sérico, enquanto melhora a digestão em si (KUMAR *et al.*, 2012; DE VRESE e SCHREZENMEIR, 2008).

Os probióticos são definidos como "microrganismos vivos de origem intestinal humana, que quando ingeridos em quantidades adequadas, conferem

benefícios à saúde do consumidor além da nutrição básica" (FAO / WHO, 2002; COEURET *et al.*, 2004 e NYANZI e JOOSTE, 2012).

Para que um microrganismo possa ser usado como probiótico, ele deve ser capaz de expressar suas atividades, acima de tudo benéficas, no corpo do hospedeiro (no caso o homem), resistindo ao trato digestivo (aos ácidos clorídrico e biliar) e colonizando o intestino (OLIVEIRA e BATISTA, 2012).

Hugas e Monfort (1997) consideram ainda como probióticos, as linhagens de microrganismos que possuem a capacidade de resistir a condições ácidas, à ação da bile, lisozima e colonizar o trato intestinal humano, ao menos temporariamente, mediante a adesão às células intestinais. Além dessas características, somam-se outras condições complementares necessárias às culturas probióticas como: rápido crescimento; permanência no intestino por um período aceitável e resistência aos antibióticos que podem estar eventualmente presentes nos alimentos, porém, sensibilidade àqueles usados em tratamentos contra bactérias (penicilinas e aminoglicosídeos); e ausência de propriedades patogênicas, tóxicas, alérgicas, mutagênicas ou carcinogênicas.

Segundo Patterson e Burkholder (2003), desde que foi estabelecido este postulado, numerosos estudos foram feitos, demonstrando que a microbiota comensal intestinal inibe patógenos, distúrbios da microbiota intestinal podem aumentar suscetibilidade a infecções e a adição de probióticos aumenta a resistência a eles.

No Brasil, o uso de probióticos foi regulamentado pela Resolução RDC nº02, de 07 de janeiro de 2002, que aprova o regulamento técnico de

substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde (ANVISA, 2002; LÓPEZ-BREA e DOMINGO, 2007).

É importante lembrar que os probióticos não se multiplicam com rapidez, razão pela qual não permanecem como colonizadores perenes do tubo digestivo (MORAIS e JACOB, 2006).

Vários microrganismos são utilizados como probióticos, entre eles estão as bactérias ácido lácticas, bactérias não ácido lácticas e leveduras. O íleo terminal e o cólon são, respectivamente, os locais de preferência para a colonização intestinal de espécies de *Lactobacilos* e *Bifidobactérias* (SANTOS *et al.*, 2011).

As bactérias probióticas têm sido utilizadas em uma variedade de alimentos, como laticínios, carnes e vegetais e para tratamento de infecções de superfície da mucosa tanto do trato gastrointestinal (TGI) como no trato genital feminino (GILLOR, ETZION e RILEY, 2008).

Por este motivo, uma variedade de microrganismos vem sendo testada e utilizada como probióticos e, de acordo com Menten e Pedroso (2005), muitos de forma arbitrária, baseados em ensaios de desempenho que possuem resultados variáveis, sem que os pré-requisitos que condicionam sua eficácia sejam observados e confirmados.

As culturas probióticas são bactérias não patogênicas que normalmente derivam da microbiota normal e da mesma espécie animal que a elas serão administradas (FULLER, 1989; GARLICH, 1999). Eventos agressores da microbiota como enterites de origem bacteriana ou viral, ação de algumas micotoxinas, estresse decorrente de modificações drásticas da dieta, jejum, calor ou frio, podem ser evitados pela inoculação contínua de cultivos

probióticos que reduziram a ação bacteriana indesejável, controlando patógenos como *Clostridium*, *Salmonella*, entre outros. Os probióticos quando administrados de forma contínua protegem os vilos e a superfície absorptiva de toxinas irritantes produzidas por microrganismos patogênicos, permitindo e evitando lesões da mucosa intestinal (GARLICH, 1999).

Pancheniak (2005) relata que o probiótico deverá, preferencialmente, apresentar as seguintes características: ser produzido em larga escala e de maneira viável; ser estocado e manter a sua viabilidade até o momento de uso; ter condições de permanecer no ambiente intestinal; produzir um efeito benéfico no intestino e ter habilidade de sobrevivência, não necessariamente de multiplicação no intestino.

A ingestão de microrganismos com efeito probiótico pode ser feita na forma de preparações farmacêuticas como compostos em pó, tabletes ou cápsulas, e preparações alimentícias como iogurtes e outros alimentos fermentados. Esses produtos podem conter somente uma, ou várias espécies distintas de microrganismos (FOOKS e GIBSON, 2002).

O propósito da administração de produtos contendo probióticos é resultar em uma microbiota intestinal balanceada e, conseqüentemente, ter um impacto favorável sobre a saúde do consumidor (TANNOCK, 1998).

1.2. Mecanismos de ação de um probiótico

Os probióticos agem melhorando a permeabilidade gastrointestinal e aumentando a resistência da mucosa contra a penetração bacteriana. Quanto aos mecanismos de proteção: (i) aumentam a resistência da barreira intestinal contra o trânsito de bactérias e suas toxinas; (ii) modificam a resposta do

hospedeiro em relação aos produtos microbianos; (iii) aumentam a resposta das mucosas à IgA; (iv) produzem substâncias bactericidas; (v) excluem competitivamente os patógenos em potencial (ARCIERO *et al.*, 2010; STENGER *et al.*, 2011).

A imunomodulação se dá principalmente pela indução de células dendríticas regulatórias e células T. O contato entre as superfícies externas das células dendríticas intestinais via receptores *Toll-like* e *DC-SIGN* (sinal da célula dendrítica) e dos probióticos (Moléculas de Associação) induz a produção de citocinas que promovem a apresentação de antígenos do complexo de histocompatibilidade e moléculas co-estimulatórias que polarizam células T em células T regulatórias e auxiliares do tipo 1 e 2 (LEEBER, 2010). Essa regulação é muito interessante, já que a associação de vacinas convencionais e probióticos podem gerar tanto uma resposta imune quanto uma proteção humoral mais eficiente (MAC DONALD e BELL, 2010).

De acordo com Schneitz (2005), a exclusão competitiva é o “fenômeno pelo qual a microbiota intestinal normal protege o hospedeiro contra patógenos invasivos”. Ainda segundo a autora, os resultados de diversos estudos sugerem que a proteção por exclusão competitiva é um fenômeno predominantemente físico, e essas características são mais importantes que a produção de ácidos graxos voláteis ou outros metabólitos aos quais são atribuídas funções protetoras.

Segundo Ehrmann *et al.* (2002) e Jin *et al.* (2000), existem dois mecanismos possíveis para os benefícios das BAL como probióticos: a capacidade de produzir substâncias como ácido lático e bacteriocinas; e a

capacidade de aderir à mucosa do TGI e formar uma barreira contra a colonização por patógenos.

Os mecanismos de ação dos probióticos estão relacionados à competição por sítios de ligação ou à exclusão competitiva, ou seja, as bactérias probióticas ocupam o sítio de ligação na mucosa intestinal formando, uma barreira física às bactérias patogênicas. Assim, as bactérias seriam excluídas por competição de espaço, sendo, as fímbrias os elementos de aderência bacteriana mais conhecidas e estudadas. São estruturas como “pelos” compostos por fosfoglicoproteínas que se projetam do corpo bacteriano. Seus receptores são específicos e se diferem entre as porções anatômicas, ao longo do trato intestinal. Algumas bactérias somente se aderem à superfície superior dos enterócitos, enquanto que outras residem nas criptas onde são produzidas as novas células epiteliais que migram até o topo das vilosidades (DOBROGOSZ *et al.*, 1989).

1.2.1. Viabilidade celular

A recomendação segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é baseada na porção diária de microrganismos viáveis que devem ser ingeridos, sendo o mínimo de 10^8 a 10^9 UFC/dia (BRASIL, 2007).

A habilidade de microrganismos probióticos em sobreviver e se desenvolver no hospedeiro influencia fortemente nos seus efeitos probióticos. O microrganismo que se mostrar metabolicamente estável no produto, sobreviver à passagem pelo trato digestivo com alta viabilidade poderá apresentar efeitos benéficos quando presente no intestino do hospedeiro

(ANAL e SINGH, 2007). No entanto, a viabilidade e atividade não são os únicos fatores importantes na ação de um probiótico. O nível do microrganismo deve ser suficientemente elevado (NICOLI e VIEIRA, 2003).

É importante ressaltar que a maior disponibilidade de dados sobre as concentrações bacterianas efetivas indica, claramente, que a concentração probiótica necessária varia em função da cepa e do efeito desejado sobre a saúde (CHAMPAGNE, GARDNER e ROY, 2005).

1.2.2. Adesão às células intestinais e competição entre os microrganismos probióticos e patogênicos.

A adesão às células epiteliais do intestino é um requisito importante para a colonização de cepas probióticas no trato gastrointestinal, impedindo a sua eliminação imediata pelos movimentos peristálticos e proporcionando uma vantagem competitiva neste ecossistema (PEDERSEN e TANNOCK, 1989; FRETER, 1992; ALANDER *et al.*, 1997). As dificuldades envolvidas em estudar a adesão bacteriana *in vivo*, especialmente em seres humanos, têm levado ao desenvolvimento de sistemas de modelo *in vitro* para a seleção de estirpes potencialmente aderentes (MAYRA-MÄKINEN *et al.*, 1983, CONWAY e KJELLBERG 1989; KIMOTO *et al.*, 1999).

A adesão dos microrganismos patogênicos ocorre na superfície das células epiteliais do intestino, ou seja, na superfície destinada à absorção de nutrientes. Após a colonização, estas se utilizam de um sistema especializado de injeção a fim de enviar algumas de suas próprias proteínas ao interior da célula hospedeira, com a finalidade de se reproduzirem, porém quando isto

ocorre estes microrganismos liberam substâncias tóxicas danosas à saúde do organismo hospedeiro (NUTRIÇÃO EM PAUTA, 2005).

As bactérias nocivas podem formar compostos tóxicos para o hospedeiro, como as substâncias putrefativas (amônia, H₂S, aminas, fenol, indol). Essas substâncias podem prejudicar o intestino diretamente e são também parcialmente absorvidas, contribuindo ao longo da vida do hospedeiro, para o processo de envelhecimento, câncer e outros problemas geriátricos (MITSUOKA, 1992).

Adesão bacteriana é inicialmente baseada em interações físicas não específicas entre duas superfícies, que então permitem interações específicas entre adesinas (geralmente proteínas) e receptores complementares (FRETER, 1992; ROJAS e CONWAY, 1996; PÉREZ *et al.*, 1998).

Características físico-químicas da superfície da célula, tais como hidrofobicidade pode afetar adesão de bactérias a superfícies diferentes (WADSTRÖM *et al.*, 1987; PÉREZ *et al.*, 1998; DEL RE *et al.*, 2000). A natureza proteica de alguns componentes da superfície tem sido demonstrada, e proteínas de superfície detectadas em algumas estirpes de *Lactobacillus* podem estar envolvidas na adesão (SCHNEITZ *et al.*, 1993; MUKAI e ARIHARA 1994).

1.2.3. Atividade antimicrobiana de espécies de lactobacilos probióticos

Substâncias antimicrobianas são produzidas pelas espécies de lactobacilos e são importantes para a exclusão competitiva ou inibição da invasão por outras bactérias. Estas substâncias podem ser ácidos graxos

curtos (CARR *et al.*, 2002), peróxido de hidrogênio, que é característico de lactobacilos (ESCHENBACH *et al.*, 1989), toxinas de espectro restrito ou amplo sintetizado nos ribossomos, chamadas bacteriocinas, ou ainda pode ser por bacteriófagos que são altamente específicos (TAGG e DIERKSEN, 2003; SMITH *et al.* 2007).

A atividade antimicrobiana dos ácidos lácticos e acético é, em parte, devido ao fato de que estes ácidos na forma não dissociada podem atravessar a membrana celular microbiana reduzindo o pH intracelular, que irá interferir com importantes funções metabólicas (NAIDU *et al.*, 1999). O ácido acético possui um efeito inibitório mais acentuado, uma que vez que sua constante de dissociação é maior que a do ácido láctico (PIARD e DESMAZEAUD, 1991).

1.2.3.1. Bacteriocinas

As bactérias sintetizam grande variedade de peptídeos antimicrobianos. Aqueles sintetizados via ribossomos são denominados bacteriocinas e têm sido explorados para aplicação na segurança microbiológica dos alimentos (SCHULZ *et al.*, 2003).

As bacteriocinas produzidas por BAL são distintas dos antibióticos. Há diferenças entre antibióticos e bacteriocinas quanto à síntese, aplicação espectro antimicrobiano, modo de ação, mecanismos de resistência, toxicidade e microrganismos produtores (MONTVILLE e KAISER, 1993; CLEVELAND *et al.*, 2001).

Do ponto de vista aplicado, as bacteriocinas podem ser utilizadas na forma de peptídeos purificados, ou como culturas bacteriocinogênicas. No primeiro caso, as bacteriocinas produzidas *ex situ* por processos fermentativos,

após purificação, podem ser utilizadas na forma de concentrados, o que exige uma aprovação, do ponto de vista legal, do seu uso como conservante em alimentos (REDDY *et al.*, 2004).

A nisina é a única bacteriocina comumente usada, como substância purificada, na preservação de alimentos (GÁLVEZ *et al.*, 2007). Por outro lado, as culturas bacteriocinogênicas podem ser utilizadas diretamente como cultura starter, como adjuvante em combinação com uma cultura starter ou como cultura protetora, especialmente no caso de alimentos não fermentados. Quando usada como cultura starter, a cepa bacteriocinogênica deve ser apta para assegurar o processo fermentativo idealizado e, ao mesmo tempo, de produzir bacteriocina em quantidade suficiente para conferir proteção ao alimento. Quando usada como cultura adjuvante, não contribui com o processo fermentativo, porém não deve interferir na função da cultura *starter* (RODRÍGUEZ *et al.*, 2003; ZHOU *et al.*, 2006).

1.2.3.2. Classificação de bacteriocinas

Apesar de sua heterogeneidade físico-química, as bacteriocinas de bactérias láticas possuem características comuns que possibilitam sua classificação. Baseadas na sua estrutura primária, peso molecular, estabilidade ao calor e organização molecular as bacteriocinas foram primeiramente classificadas por Klaenhammer (1993) o qual as distribuiu em 4 classes. Onde a classe I, ou lantibióticos, representada pela nisina, é constituída por peptídeos termoestáveis de baixo peso molecular (<5kDa), diferenciados dos demais pela presença de lantionina e derivados; a classe II é composta por pequenos peptídeos (<10kDa) termoestáveis divididos em três subclasses: IIa (pediocina

e enterocina), IIb (lactocina G) e IIc (lactocina B); a classe III é representada por peptídeos termolábeis de alto peso molecular (>30kDa) como helvectina J; na classe IV encontram-se grandes complexos peptídicos contendo carboidrato ou lipídio em sua estrutura. Cleveland *et al.* (2001), discordam e acreditam que estes complexos são artefatos de purificação parcial e não uma nova classe de bacteriocinas.

Em 2005, Cotter, Hill e Ross propuseram uma nova classificação, conforme tabela 1.

Tabela 1. Classificação de bacteriocinas sugerida por Cotter, Hil e Ross, (2005).

Classificação	Grupos	Exemplos
<u>Classe I</u> Bacteriocinas/ lantibióticos contendo lantionina.	Lantibióticos simples e duplo peptídeo.	Peptídeos simples: Nisina. Peptídeo duplo: Lacticina.
<u>Classe II</u> Bacteriocinas contendo não lantibióticos.	Classe heterogênea de peptídeos pequenos, incluindo subclasses IIa (tipo pediocina), IIb (duplo peptídeo), IIc (cíclicas), IId (peptídeo linear não pediocina)	IIa: Pediocina, Leucocina A; IIb: Lactacina F; IIc: Enterocina AS48, Reuterina 6; IId: Lactococcina A, Divergicina A;
<u>Bacteriolisinas</u> Proteínas líticas não bacteriocinas.	Proteínas grandes sensíveis ao calor.	Lisostafin, Enterolisina A;

Fonte: Cotter, Hil e Ross, (2005).

Os autores sugerem ainda, que a classe IV seja extinta, por representarem bacteriocinas que requerem grupamentos não protéicos para

sua atividade que ainda não foram convincentemente demonstrados. Para Drider *et al.* (2006), as bacteriocinas estariam distribuídas em três grandes classes de acordo com suas características bioquímicas e genéticas.

Conforme Klaenhamer (1988) 99% das bactérias podem produzir pelo menos uma bacteriocina e a única razão pela qual estas ainda não foram isoladas é o fato de que são pouco investigadas.

Geralmente a produção de bacteriocinas por bactérias Gram-positivas está associada à passagem da fase *log* para a fase estacionária. A produção do antimicrobiano se inicia no meio da fase logarítmica e chega ao máximo quando as células entram na fase estacionária, como ocorre com a nisina. A regulação da expressão da bacteriocina depende da densidade do cultivo e não do ciclo celular (BREUKINK *et al.*, 1999).

Segundo Todorov e Dicks (2004), a produção de bacteriocinas é fortemente dependente das fontes de nutrientes presentes no meio de cultivo, sendo que sua atividade nem sempre é correlacionada à massa celular ou à taxa de crescimento da linhagem produtora.

A maioria das bacteriocinas produzidas por lactobacilos pertencem à Classe II (pequeno tamanho, termoestável e com alto ponto isoelétrico) sendo capazes de combater infecções provocadas por *Listeria monocytogenes* (CORR *et al.*, 2007).

1.2.3.3. Mecanismo de ação

Sugere-se que as bacteriocinas ligam-se a receptores específicos da superfície celular das células susceptíveis, apesar do mecanismo exato ainda não ter sido elucidado (MONTVILLE e KAISER, 1993; MONTVILLE *et al.*, 1995;

De MARTINS *et al.*, 2002). Diversos autores pesquisaram os mecanismos de ação das bacteriocinas sendo que o princípio mais aceito baseado na ocorrência da dissipação da força próton-motriz como consequência da formação de poros na membrana citoplasmática que induz um desbalanço iônico e efluxo de íons fosfato, resultando na inativação ou morte celular (ROSA *et al.*, 2002).

O mecanismo de ação das bacteriocinas é complexo. Geralmente, atuam destruindo a integridade da membrana citoplasmática pela formação de poros, o que provoca a perda de pequenos compostos e íons, promovendo o colapso da força motriz de prótons. Aparentemente, as bacteriocinas se ligam à membrana plasmática por meio de ligações eletrostáticas com fosfolipídios carregados negativamente. Em seguida, são inseridas na membrana com uma reorientação que depende do potencial da membrana, a qual é influenciada pelo pH e composição de fosfolipídios. Os monômeros de bacteriocina formam agregados proteicos que resultam na formação de poros, com consequente saída de íons (principalmente potássio e magnésio), perda da força motriz de prótons, ATP e aminoácidos. A força motriz protônica desempenha papel central na síntese de ATP e no transporte ativo. Assim, a ausência dela inibe a síntese de macromoléculas e produção de energia, resultando na destruição celular (MONTVILLE e CHEN, 1998).

1.2.4. Aplicações clínicas de probióticos

De modo geral, Lactobacilos podem colaborar na digestão da lactose em indivíduos com intolerância a esse dissacarídeo, reduzir a constipação e a diarreia infantil, ajudar na resistência a infecções por *Salmonella*, prevenir a

"diarreia do viajante" e aliviar a síndrome do intestino irritável. São conhecidos também por estimularem o sistema imunológico, produzirem vitamina B, inibirem a multiplicação de patógenos, reduzirem a concentração de amônia e colesterol no sangue e ajudarem a restabelecer a microbiota normal após tratamento com antibióticos. Assim sendo, esses microrganismos são comumente utilizados em intervenções dietéticas que visam à melhoria da saúde dos indivíduos (MANNING e GIBSON, 2004; PICARD *et al.*, 2005; LEAHY *et al.*, 2005; NOVIK *et al.*, 2006).

1.2.4.1. Intolerância à lactose e a outros dissacarídeos

Provavelmente é uma das utilizações mais antigas dos probióticos, pois desde há muito se sabe que o iogurte é muito melhor tolerado que o leite pelos indivíduos intolerantes à lactose. Esta melhor tolerância tem sido atribuída à redução do conteúdo em lactose no iogurte devido à fermentação pelas bactérias produtoras de ácido láctico, à atividade da β -galactosidase das próprias bactérias que produzem o iogurte e, também, à menor velocidade de esvaziamento gástrico deste em relação ao leite. A administração de um probiótico como *Sacharomyces boulardii* melhora a sintomatologia em indivíduos com déficit em sacarase-isomaltase. Espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* têm sido frequentemente utilizadas na produção de iogurtes e outros produtos lácteos fermentados (KOLARS *et al.*, 1984; SAVAIANO *et al.*, 1984; FULLER, 1991; MARTINI *et al.*, 1991; MONTES *et al.*, 1995; JIANG, MUSTAPHA e SAVAIANO, 1996; ROLFE, 2000; GORBACH, 2000; MARTEAU *et al.*, 2001; CALLANAN, BERESFORD e ROSS, 2005; JANER *et al.*, 2005; WARD *et al.*, 2006).

1.2.4.2. Prevenção de diarreias e probióticos

Este benefício está associado à produção de substâncias antimicrobianas que inibem o crescimento de bactérias patogênicas (PROTIC *et al.*, 2005).

1.2.4.2.1 Diarreia aguda infecciosa

O maior número de estudos com probióticos tem incidido quer na prevenção quer no tratamento da diarreia aguda infecciosa (ISOLAURI, 2003; CANANI *et al.*, 2007). Em ensaios preventivos, verificou-se uma diminuição significativa da incidência da diarreia nas crianças que ingeriram probióticos em comparação com os controles (ROLFE, 2000; GORBACH, 2000; SHAMIR *et al.*, 2005). Em ensaios terapêuticos, o conjunto dos resultados aponta para diferenças significativas a favor dos grupos com probióticos no que diz respeito à intensidade e duração da diarreia, ao número de dias de internamento e dos dias em que os vírus são eliminados no caso da diarreia por rotavírus (ROLFE, 2000; JUNTUNEN *et al.*, 2001; PANT *et al.*, 2007). Tendo em conta que a diarreia é uma causa importante de mortalidade nos países em desenvolvimento, sobretudo em crianças e adultos com má nutrição, os probióticos, pela sua eficácia preventiva e terapêutica, são úteis em Saúde Pública (ROLFE, 2000; JUNTUNEN *et al.*, 2001).

1.2.4.2.2 Diarreia associada a antibióticos

Várias estirpes têm comprovado a eficácia dos probióticos na prevenção e tratamento da diarreia associada aos antibióticos. Os mais utilizados têm sido Bifidobactéria, *Saccharomyces boulardi* e Lactobacilos (HICKSON *et al.*, 2007).

1.2.4.2.3 Diarreia do viajante

A diarreia do viajante é a doença mais comum durante a visita às regiões tropicais e subtropicais. O efeito dos probióticos para prevenir esta diarreia não está suficientemente demonstrado e alguns trabalhos são contraditórios. No entanto, alguns ensaios clínicos demonstram um declínio de incidência da diarreia de acordo com as regiões visitadas e as doses utilizadas (SZAJEWSKA e MRUKAWICZ, 2005).

1.2.4.3 Doença inflamatória crônica do intestino e outras situações gastroenterológicas

Parece bastante promissor o uso de probióticos, especialmente de *Saccharomyces boulardii* e do *Lactobacillus casei* na doença de Crohn, na colite ulcerosa e na inflamação crônica da bolsa ileal (KARIMI *et al.*, 2005; MATSUMOTO *et al.*, 2005; SCANLAN *et al.*, 2006). Existem resultados animadores com a utilização de probióticos na síndrome do intestino curto e na alergia alimentar, provavelmente pela diminuição da permeabilidade intestinal e pelas suas propriedades antiinflamatórias (ISOLAURI, KIRJAVAINEN e SALMINEN, 2002; ISOLAURI, OUWRHAND e LAITINEN, 2005; MATSUMOTO *et al.*, 2005; DANIEL *et al.*, 2006).

1.2.4.4 Dislipidemias

No organismo, o excesso de colesterol (hipercolesterolemia) pode causar diversos problemas, pois é um importante fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, podendo levar a formação de depósitos de placas nos vasos sanguíneos (aterosclerose), acidentes cardiovasculares (AVC) e infartos (HAVERNAAR *et al.*, 1992). Portanto a redução dos níveis de colesterol sérico é de extrema importância para a manutenção do estado de saúde, podendo até diminuir a incidência de mortes por razões coronarianas.

Diferentes mecanismos têm sido propostos para a capacidade de redução do colesterol das bactérias probióticas; entre eles a atividade hidrolase de sais biliares (BSH) (BEGLEY, HILL e GAHAN, 2006; SWANN *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2012; JONES *et al.*, 2013). Os ácidos biliares são eficazmente conservados em condições normais por um processo denominado de recirculação entero-hepática. Os ácidos biliares conjugados e não conjugados são absorvidos por difusão passiva ao longo de todo o tubo digestivo e por transporte ativo no íleo terminal (CAREY e DUANE, 1994). Sais biliares desconjugados são menos eficientemente reabsorvidos do que os seus homólogos conjugados (DE SMET *et al.*, 1998; JONES *et al.*, 2013). O que resulta na excreção de grandes quantidades de ácidos biliares livres nas fezes. Assim, a atividade BSH tem o efeito de aumentar a síntese de sais biliares no fígado em resposta ao equilíbrio homeostático para substituir os que foram perdidos com excreção, levando a uma redução nos níveis de colesterol sérico (KUMAR *et al.*, 2012).

O perfil probiótico de estirpes de *Lactobacillus acidophilus* mostrou a capacidade de resistir a processos de digestão no trato gastrointestinal e

também na resistência à bÍlis (KOS *et al.*, 2000; ŠUŠKOVIĆET *et al.*, 2000). Além disso, estudos *in vitro* mostraram que estes microrganismos podem assimilar o colesterol na presença de bÍlis, então postula-se que esta estirpe pode ajudar na redução do colesterol sérico *in vivo* (KOS, 2001).

1.2.4.5 Outras situações clÍnicas

Embora com resultados incipientes, alguns probióticos vêm sendo utilizados como coadjuvantes do tratamento em casos de fibrose cÍstica, infecções urogenitais e vaginites devido a sua ação imunoestimulante, inibição da atividade enzimática bacteriana e recolonização do trato vaginal respectivamente (RESTA-LENERT e BARRETT, 2003; SARTOR, 2005; MATTO *et al.*, 2005; PELUSO *et al.*, 2007; ZÁRATE, SANTOS e NADER-MACIAS, 2007).

1.3 Gênero *Lactobacillus*

Taxonomicamente o gênero lactobacilos pertence ao filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales*, família *Lactobacillaceae*. Os lactobacilos são nutricionalmente fastidiosos, precisando de um meio rico em nutrientes, contendo carboidratos, aminoácidos, peptÍdeos, ácidos graxos, sais, derivados de ácidos nucleicos e vitaminas para crescer (CARR *et al.*, 2002). De acordo com Euzéby (1997) o gênero *Lactobacillus* possui cerca de 171 espécies. Estão presentes também em muitos tipos de alimentos como cereais, bebidas fermentadas, queijos e produtos lácteos, carnes e derivados, dentre outros (HAMMES e HERTEL, 2003).

1.3.1 *Lactobacillus acidophilus*

Como um probiótico, *Lactobacillus acidophilus* é muito importante nas indústrias de laticínios e nutracêuticas, devido à sua aplicação na manutenção da saúde humana e animal (PYAR *et al.*, 2014).

Lactobacillus acidophilus é considerado uma das principais espécies deste gênero encontradas no intestino humano e de animais. Quando presentes em número suficiente, como probióticos, os lactobacilos podem criar um equilíbrio saudável entre a microbiota benéfica e aquela potencialmente prejudicial no intestino (TANNOCK, 1999; SUSKOVIC *et al.*, 2001).

O *Lactobacillus acidophilus* é altamente competitivo, em grande parte devido às suas aplicações na produção de alimentos fermentados. Eles também podem produzir substâncias antimicrobianas, incluindo as bacteriocinas que têm capacidade de inibir bactérias patogênicas e deteriorantes de alimentos (RATTANACHAIKUNSOPON e PHUMKHACHORN, 2010).

Uma grande parte das estirpes de *L. acidophilus*, degrada: amigdalina, celobiose, frutose, galactose, glucose, lactose, maltose, manose, sucrose e esculina (NAHAISI, 1986). As condições ótimas para a sua multiplicação eficaz são temperaturas de 35-40 °C e valores de pH de 5.5-6.0. Deve salientar-se que o crescimento de *L. acidophilus* pode ocorrer a 45 °C, e que a sua tolerância em termos de acidez do meio varia entre 0.3 e 1.9% (v/v) de acidez titulável.

As espécies de *Lactobacillus* são catalase negativos, Gram positiva e geralmente em forma de bastão. São encontrados numa grande variedade de ambientes, incluindo vegetais e trato gastrointestinal de animais, como as

abelhas (TANNOCK, 2004; SCHREZENMEIR e DE VRESE, 2001; FUJISAWA e MITSUOKA, 1996) e são utilizados na fabricação de alimentos fermentados, tais como os produtos de soja, produtos de peixe, produtos hortícolas, pão, bebidas alcoólicas, laticínios e para produção de queijo (KANDLER *et al.*, 1986; RHEE *et al.*, 2011; CAPLICE e FITZGERALD, 1999).

1.3.1.2 Mecanismo de ação de *Lactobacillus acidophilus*

Os mecanismos exatos pelos quais *L. acidophilus* poderiam exercer suas ações não são claros. No entanto, foram postuladas algumas possíveis ações. Em primeiro lugar, *L. acidophilus*, semelhante a outros lactobacilos, tem sido relatada a inibição da adesão e invasão de células epiteliais humanas por microrganismos enterovirulentos (COCONNIER, 1993; CHAUVIÈRE, 1992).

Por outro lado, *L. acidophilus* segrega um composto antimicrobiano termoestável diferente a partir do ácido láctico (COCONNIER, 1997). Tem sido documentado que o sobrenadante da cultura de *L. acidophilus* mostra atividade antibiótica contra bactérias como enterovirulentas (COCONNIER, 2005). Em terceiro lugar, *L. acidophilus* estimula respostas imunológicas específicas para organismos patogênicos (COCONNIER, 1997).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de probióticos, principalmente espécies de *Lactobacillus acidophilus*, tem despertado grande interesse tanto da indústria farmacêutica quanto alimentícia. A possibilidade de se obter um produto com probióticos, que além de exercerem vários efeitos benéficos para o organismo humano,

podem atuar inibindo bactérias patogênicas é extremamente atraente. A ampla gama de possibilidades preventivas e terapêuticas dos probióticos é motivo de grande entusiasmo, porém muitos estudos devem ainda ser realizados para se chegar a resultados conclusivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANDER, M., KORPELA, R., SAXELIN, M., VILPPONEN-SALMELA, T., MATILLA-SANDHOLM, T. and Wright, A. (1997) Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. **Leteers in Applied Microbiology** 24, 361-364.

ANAL, A.K.; SINGH, K. Recents advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p.240-251, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) 2002. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos.**

ARCIERO JC, ERMENTROUT GB, UPPERMAN JS, VODOVOTZ Y, RUBIN JE. Using a mathematical model to analyze the role of probiotics and inflammation in necrotizing enterocolitis. *PLoS One*. 2010;5:e10066.

BEGLEY M, HILL C, GAHAN CG (2006) Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl Environ Microbiol* 72:1729–1738. doi:10.1128/ AEM.72.3.1729-1738.2006

BERTAZZONI-MINELLI, E., & BENINI, A. (2008). Relationship between number of bacteria and their probiotic effects. **Microbiology and Ecology of Health and Disease**, 20, 180 e 183.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução n. 05 de 13 de novembro de 2000. Padrão de identidade e qualidade de leites fermentados. **Diário Oficial**, Brasília, 2007.

BREUKINK, E.; WIEDEMANN, I.; Van KRAAIJ, C.; KUIPERS, O. P.; SAHL, H. G.; KRUIJFF, B. Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*, Washington, v. 286, n. 5448, p. 2361-2364, 1999.

CALLANAN, M. J.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P. Genetic diversity in the lactose operons of *Lactobacillus helveticus* strains and its relationship to the role of these strains as commercial starter cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 71, n. 3, p. 1655–1658, 2005.

CANANI, R. B.; CIRILLO, P.; TERRIN, G.; CESARANO, L.; SPAGNUOLO, M. I.; VINCENZO, A.; ALBANO, F.; PASSARIELLO, A.; MARCO, G.; MANGUSO, F.; GUARINO, A. Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: randomised clinical trial of five different preparations. *British Medical Journal*, London, v. 335, n. 7614, p. 340, 2007.

CAPLICE E, FITZGERALD G. Food fermentations: role of micro-organisms in food production and preservation. *Int J Food Microbiol.* 1999;50:131–149.

CAREY MC, DUANE WC (1994). Enterohepatic circulation. In: Arias IM, Boyer N, Fausto N, Jackoby WB, Schachter DA, Shafritz DA (eds) *The liver: biology and pathobiology*. Raven, New York, pp 719–738.

CARR, F. J. et al. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

CASTRO, M.P.; PALAVECINO, N.S.; HERMAN, C.; GARRO, O.A.; CAMPOS, C.A. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. **Meat Science**, Barking, v. 87, p. 321-329, 2011.

CHAMPAGNE, C.P.; GARDNER, N.J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v.45, p.61-84, 2005.

CHAUVIÈRE G, COCONNIER MH, KERN_eis S, FOURNIAT J, SERVIN AL. Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. **J Gen Microbiol** 1992; 138: 1689–96.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 1-20, 2001.

COCONNIER, M.H., BERNET, M.F.; CHAUVIÈRE, G.; SERVIN, A. L. Adhering heatkilled human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research*, v.11, p.235-242, 1993.

COCONNIER MH, Li_EVIN V, BERNET-CAMARD MF, HUDAULT S, SERVIN AL. Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. **Antimicrob Agents Chemother** 1997; 41: 1046–52.

COCONNIER-POLTER MH, LIEVIN-Le MOAL V, SERVIN AL. A *Lactobacillus acidophilus* strain of human gastrointestinal microbiota origin elicits killing of enterovirulent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by

triggering lethal bacterial membrane damage. **Appl Environ Microbiol** 2005; 71: 6115–20.

COEURET, V., GUEGUEN, M. and VERNOUX, J. P. (2004). Numbers and Strains of lactobacilli in some probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 97:147–156.

CONWAY, P.L. and KJELLBERG, S. (1989) Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus fermentum* strain 737 to mouse stomach squamous epithelium. *Journal of General Microbiology* 135, 1175–1186.

CORR, S. C. et al. Bacteriocin production as a mechanism for the anti-infective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 18, p. 7617-7621, May 2007.

COTTER, P.D., HILL, C., ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, v.3, p. 777-788, 2005.

DANIEL, C.; POIRET, S.; GOUDERCOURT, D.; DENNIN, V.; LEYER, G.; POT, B. Selecting lactic acid bacteria for their safety and functionality by use of a mouse colitis model. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 9, p. 5799–5805, 2006.

DE MARTINIS, E.C.P.; ALVES, V.F.; FRANCO, B.D.G. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International**, v. 18, p.191-208, 2002.

DEL RE, B.; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M.; PALENZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 31, n. 6, p. 438–442, 2000.

DE SMET I, VAN HOORDE L, VANDE WOESTYNE M, CHRISTIAENS H, VERSTRAETE W (1995) Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 79:292–301

DE VRESE, M., & SCHREZENMEIR, J. (2008). Probiotics, prebiotics, synbiotics. **Advances on Biochemistry Engineering and Biotechnology**, 111, 1e 66.

DOBROGOSZ WJ, CASAS IA, PAGANO GA, TALARICO TL, SJORBERG B, KARLSON M. *Lactobacillus reuteri* and the enteric microbiota. In: Grubb R, Midtvedt T, Norin E, eds. *The Regulatory and Protective Role of the Normal Microflora*. London: Macmillan Ltd, p. 69–96, 1989.

DRIDER, D.; FIMLAND, G.; HECHARD, Y.; McMULLEN, L. M.; PREVOST, H. The continuing story of class IIa bacteriocins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 70, n. 2, p. 564-582, 2006.

EHRMANN, M.A.; KURZAK, P.; BAUER, J.; VOGEL, R.F. Characterization of *Lactobacillus* towards their use as probiotics adjuncts in poultry. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.92, p.966-975, 2002.

ESCHENBACH, D. A. et al. Prevalence of Hydrogen Peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 251-256, Feb 1989.

EUZEBY, J.P.: List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47, 590-592, 1997.

FALAGAS, M.E., BETSI, G.I., ATHANASIOU, S. (2007). Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Infect.*, 13:657-664.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization)/ Organization/World Health. Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Londres, Ontário, Canadá: **FAO/WHO**, 2002. 11p.

FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R. Probiotics as modulators of the gut flora. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. S39-S49, 2002.

FRETER, M. (1992) Factors affecting the microecology of the gut. In Probiotics. The Scientific Basis ed. Fuller, R. pp. 111–145. Glasgow: Chapman & Hall.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. A review. **Journal of Applied Bacteriology**, Aubiere, v.66, p. 365-378, 1989.

FULLER, R. Probiotics in human medicine. *Gut*, London, v. 32, n. 4, p. 439-442, 1991.

FUJISAWA T, MITSUOKA T (1996). Homofermentative *Lactobacillus* species predominantly isolated from canine feces. *J Vet Med Sci* 58:591-593.

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

GARLICH, J.D. Microbiologia do tracto intestinal aviar. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE AVICULTURA, 1999, Lima. Anais... Lima: 1999. p.110- 120.

GORBACH, S. L. Probiotics and gastrointestinal health. *American Journal of Gastroenterology*, New York, v. 95, n. 1, p. 52-54, 2000.

HAMMES, W. P.; HERTEL, C. The genera *Lactobacillus* and *Cornobacterium*. The prokaryotics - An Evolving Eletronic for the microbiological Community., 2003.

HAVENAAR, R.; BRINK, B. T.; HUIS-INT'VELD, J. H. J. Selection of strains for probiotic use. London: **Chapman e Hall**, 1992.

HICKSON, M.; D'SOUZA, A. L.; MUTHU, N.; ROGERS, T. R.; WANT, S.; RAJKUMAR, C.; BULPITT, C. J. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *British Medical Journal*, London, v. 335, n. 7610, p. 1-5, 2007.

HONG, H.A. DUC, L.H.; CUTTING, S.M. The use of bacterial spore formers a probiotics. **FEMS Microbiology Reviews**. Amsterdam , v.29.p.813-835, 2005.

HUGAS, M.; MONFORT, J. M. Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry*, v. 59, n. 4, p. 547-554, 1997.

ISOLAURI, E.; KIRJAVAINEN, P. V.; SALMINEN, S. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation. **Gut, London**, v. 50, n. 3, p. 54-59, 2002.

ISOLAURI, E.; OUWERHAND, A. C.; LAITINEN, K. Novel approaches to the nutritional management of allergic infant. **Acta Paediatrica**, Stockholm, v. 94, n. 4, p. 110-114, 2005.

ISOLAURI, E. Probiotics for infectious diarrhoea. **Gut, London**, v. 52, n. 3, p. 436–437, 2003

JANER, C.; ARIGONI, F.; LEE, B. H.; PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Enzymatic ability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* to hydrolyze milk

proteins: identification and characterization of endopeptidase O. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 12, p. 8460–8465, 2005.

JIANG, T.; MUSTAPHA, A.; SAVAIANO, D. A. Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 5, p. 750- 757, 1996.

JIN, L.Z.; HO, Y.W.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. Digestive and bacterial enzyme activities in broilers fed diets supplemented with *Lactobacillus* cultures. **Poultry Science**, Champaign, v.79, p.886-891, 2000.

JONES ML, MARTONI CJ, PARENT M, PRAKASH S (2012a). Cholesterol-lowering efficacy of a microencapsulated bile salt hydrolase-active *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 yoghurt formulation in hypercholesterolaemic adults. **Brit J Nutri** 107: 1505-1513.

JONES ML, MARTONI CJ, PRAKASH S (2012b) Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial. **Eur J Clin Nutr** 66:1234– 1241.

JONES ML, TOMARO-DUCHESNEAU C, MARTONI CJ, PRAKASH S (2013). Cholesterol lowering with bile salt hydrolase-active probiotic bacteria, mechanism of action, clinical evidence, and future direction for hearth health applications. **Expert Opin Ther** 13:631-642.

JUNTUNEN, M.; KIRJAVAINEN, P.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 8, n. 2, p. 293-296, 2001.

KANDLER, O. & WEISS, N. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212^{AL}.
In ***Bergey's Manual of Systematic Bacteriology***, vol. 2, pp. (1986). Edited by
P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams &
Wilkins.

KARIMI, O.; PENA, A. S.; VAN BODEGRAVEN, A. A. Probiotics in
arthralgia in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease: a pilot study.
Drugs of Today, Barcelona, v. 41, n. 7, p. 453-459, 2005.

KIMOTO, H., KURISAKI, J., TSUJI, N.M., OHMOMO, S., AND OKAMOTO
T. 1999. Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like
Caco- 2 cells and tolerance to low pH and bile. *Lett. Appl. Microbiol.* 29: 313-
316.

KLAENHAMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid
bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v.12, p.39-86, 1993.

KLAENHAMMER, T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie**,
v.70, p.337-349, 1998.

KOLARS, J. C.; LEVITT, M. D.; AOUJI, M.; SAVAIANO, D. A. Yogurt auto
digesting source of lactose. *New England Journal of Medicine*, Boston, v. 310,
n. 1, p. 1-3, 1984.

KOS, B., ŠUSKOVIC, J., GORETA, J. and MATOSIĆ, S. (2000) Effect
of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated
gastrointestinal conditions. **Food technology and Biotechnology**, 38, 121–128.

KOS, B. (2001) Probiotic Concept: In Vitro Investigations with Chosen
Lactic Acid Bacteria, PhD Thesis, Faculty of Food Technology and
Biotechnology, University of Zagreb, Croatia.

KUMAR, M., NAGPAL, R., KUMAR, R., HEMALATHA, R., VERMA, V., KUMAR, A., et al. Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. **Experimental Diabetes Research**, 1 e 14, 2012.

LARSEN, N., MICHAELSEN, K., PÆRREGAARD, A., VOGENSEN, T., & JAKOBSEN, M. A comparative study on adhesion and recovery of potential probiotic strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro assay and analysis of human colon biopsies. **Microbial Ecology and Health Disease**, 21, 95 e 99. 2009.

LEBEER, S. et al. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, v. 8, n. 3, p. 171-184, 2010.

LEAHY, S.C.; HIGGINS, D.G.; FITZGERALD, G.F.; VAN SINDEREN, D. Getting better with bifidobacteria. *Appl. Microbiol.*, v.98, n.6, p.1303-1315, 2005.

LILLY, D. M.; STILLWEKK, R.H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, Washigton DC, v.147, p.747-748, 1965.

LIONG MT, SHAH NP (2006) Effects of a *Lactobacillus casei* symbiotic on serum lipoprotein, intestinal microflora, and organic acids in rats. **J Dairy Sci** 89:1390–1399. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06) 72207-X.

LÓPEZ-BREA, M.; DOMINGO, D. Antibioticoterapia con probióticos. **Revista Española de Quimioterapia**, Madrid, v. 20, p.170-181, 2007.

MACDONALD, T. T.; BELL, I. Probiotics and the immune response to vaccines. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, n. 3, p. 442-446, Aug 2010.

MADUREIRA, A. R., SOARES, J. C., PINTADO, M. E., GOMES, A. M. P., FREITAS, A. C., & MALCATA, F. X. Sweet whey cheese matrices inoculated

with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* LAFTI_ L26. **Dairy Science and Technology**, 88, 649 e 665. 2008.

MANNING, T.S.; GIBSON, G.R. Prebiotics. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*,v.18, p.287-298, 2004.

MARKETS and MARKETS, global market research and consulting company (2009). **Probiotics Market** (2009-2014).

MARTEAU, P. R.; VRESE, M.; CELLIER, C. J.; SCHREZENMEIR, J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 73S, n. 2, p. 430S–436S, 2001.

MARTINI, M. C.; LEREBOURS, E. C.; LIN, W. J.; HARLANDER, S. K.; BERRADA, N. M.; ANTOINE, J. M.; SAVAIANO, D. A. Strains and species of lactic acid bacteria in fermented milks (yogurts): effect on in vivo lactose digestion. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 54, n. 12, p. 1041–1046, 1991.

MATTIA, A., & MERKER, R. Regulation of probiotic substances as ingredients in foods: premarket approval or “generally recognized as safe” notification. **Clinical Infection Disease**, 46, S115 e S118. 2008.

MATTO, J.; MAUNUKSELA, L.; KAJANDER, K.; PALVA, A.; KORPELA, R.; KASSINEM, S.; SAARELA, M. Composition and temporal stability of gastrointestinal microbiota in irritable bowel syndrome: a longitudinal study in IBS and control subject. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 43, n. 2, p. 213-222, 2005.

MATSUMOTO, S.; HARA, T.; HORI, T.; MITSUYAMA, K.; NAGAOKA, M.; TOMIYASU, N.; SUZUKI, A.; SATA, M. Probiotic *Lactobacillus*-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with

the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. *Clinical and Experimental Immunology*, Oxford, v. 140, n. 3, p. 417–426, 2005.

MAYRA-MAKINEN, A., MANNINEN, M. and GYLLENBERG, H. (1983) The adherence of lactic acid bacteria to the columnar epithelial cells of pigs and calves. ***Journal of Applied Microbiology*** 55, 241–245.

McCOY, S.; GILLILAND, S. E. Isolation and Characterization of Lactobacillus Species Having Potential for Use as Probiotic Cultures for Dogs. ***Food Microbiology and Safety***, v. 72, n. 3, p. 94-97, 2007.

MENTEN, J. F. M.; PEDROSO, A. A. Fatores que interferem na eficácia de probióticos. In: CONFERENCIA APINCO DE CIENCIA E TECNOLOGIA AVICOLAS, 2005, Santos. Anais... Campinas: **FACTA**, p.41-52, 2005.

METCHNIKOFF, E. 1907. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: *The prolongation of life: optimistic studies*. pp. 161-183. W. Heinemann, London.

MITSUOKA, T. Intestinal flora and aging. *Nut Ver.*, v.50, p. 438-446, 1992.

MONTVILLE, T. J.; KAISER, A. Antimicrobial proteins: classification, nomenclature, diversity and relationship to bacteriocins. In: HOOVER, D.G.; STEENSON, L.R. *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. New York: **Academic Press**, p.1-22,1993.

MONTES, R. G.; BAYLESS, M.; SAAVEDRA, J. M.; PERMAN, J. A. Effect of milks inoculated with Lactobacillus acidophilus or a yogurt starter culture in lactose-maldigesting children. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 78, n. 8, p. 1657-1664, 1995.

MONTVILLE, T.J.; WINKOWSKI, K.; LUDESCHER, R.D. Models and mechanisms for bacteriocin action and application. **International Dairy Journal**, v.5, p.797-814, 1995.

MONTVILLE, T. J.; CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 511-519, 1998.

MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. A.. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. **Jornal de Pediatria**, v.82, n.5, p.189-197, 2006.

MUKAI, T. and ARIHARA, K. (1994) Presence of intestinal lectin-binding glycoproteins on the cell surface of *Lactobacillus acidophilus*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry** 58, 1851–1854.

NAGPAL R, KUMAR A, KUMAR M, BEHARE PV, JAIN S, YADAV H (2012). Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. **FEMS Microbiol Lett** 334:1–15. doi:10. 1111/j.1574-6968.2012.02593.x

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

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 38, n. 1, p. 13-126, 1999.

NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. Probióticos, prebióticos y simbióticos: Moduladores del sistema digestivo. **Ciencia Hoy**, v. 13, n. 75, p. 39-43, 2003.

NOVIK, G.I.; SAMARTSEV, A.A.; ASTAPOVICH, N.I.; KAVRUS, M.A.; MIKHALYUK, A.N. Biological activity of probiotic microorganisms. **Appl. Biochem. Microbiol.**, v.42, p.166-172, 2006.

NUTRIÇÃO EM PAUTA. Disponível em: <http://nutricaoempautaositedprofissionaldenutricao.htm>. Acesso em: 08 agosto 2014.

NYANZI R and JOOSTE PJ (2012). Cereal-Based Functional Foods. **InTech**. Chapter 8 : probiotic pp 161-196.

OLIVEIRA, L. T.; BATISTA, S. M. M.. A atuação dos probióticos na resposta imunológica. **Pediatria Moderna**, v.48, n.9, p.57-62, 2012.

PANCHENIAK, E.F.R. Isolamento, Seleção, Caracterização Bioquímica e Molecular para Produção e Avaliação do Potencial Probiótico de *Lactobacillus Reuteri* Lpb P01-001 em Suínos. Curitiba, 2005. Tese (Doutorado) - **Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná**.

PANT, N.; MARCOTTE, H.; BRÜSSOW, H.; SVENSSON, L.; HAMMARSTRÖM, L. Effective prophylaxis against rotavirus diarrhea using a combination of *Lactobacillus rhamnosus* GG and antibodies. **Microbiology, Edinburgh**, v. 7, n. 86, p. 1-9, 2007.

PATTERSON, J.A.; BURKHOLDER, K.M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. **Poultry Science**, Champaign, v.82, p.627-631, 2003.

PEDERSEN, K. and TANNOCK, G.W. (1989) Colonization of the porcine gastrointestinal tract by lactobacilli. **Applied and Environmental Microbiology** 55, 279–283.

PELUSO, I.; FINA, D.; CARUSO, R.; STOLFI, C.; CAPRIOLI, F.; FANTINI, M. C.; CASPANI, G.; GROSSI, E.; DI IORIO, L.; PAONE, F. M.; PALLONE, F.; MONTELEONE, G. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B21060 suppresses human T-cell proliferation. *Infection and immunity*, Washington, v. 75, n. 4, p. 1730- 1737, 2007.

PEREIRA DI, GIBSON GR (2002b) Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. **Crit Rev Biochem Mol Biol** 37:259–281. doi:10.1080/10409230290771519.

PÉREZ, P.F., MINNAARD, Y., DISALVO, E.A. and de ANTONI, G.L. (1998). Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. **Applied and Environmental Microbiology** 64, 21–26.

PIARD, J.C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Oxygen metabolites and catabolism and products. **Lait**, v. 71, p. 525-541, 1991.

PICARD, C.; FIORAMONTI, J.; FRANCOIS, A.; ROBINSON, T.; NEANT, F.; MATUCHANSKY, C. Review article: bifidobacteria as probiotic agents physiological effects and clinical benefits. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v.22, p.495-512, 2005.

PROTIC, M.; JOJEC, N.; BOJEC, D.; MILUTINOVCS S.; NEAC D.; BOJEC B.; SVORCON P.; KRSTIC M.; POPOVIC O. Mechanism of diarrhea in microscopic colitis. *World Journal of Gastroenterology*, Beijing, v. 11, n. 35, p. 5535-5539, 2005.

PYAR, HASSAN; PEH, KOK-KHIANG. Enteric coating of granules containing the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **Acta pharmaceutica** (Zagreb, Croatia), 2014, Vol.64(2), pp.247-56;

RATTANACHAIKUNSOPON, P., PHUMKHACHORN, P. Antimicrobial activity of basil (*Ocimum basilicum*) oil against *Salmonella* Enteritidis *in vitro* and in food. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.74, n.6, p.1200 - 1204, 2010.

REDDY, K. V. R.; YEDERY, R. D. C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 536-547, 2004.

RESTA-LENERT, S.; BARRETT, K. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). **Gut**, London, v. 52, n. 7, p. 988-997, 2003

RHEE SJ, LEE JE, LEE CH. Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. **Microb Cell Fact**. 2011;10:1–13.

RODRÍGUEZ, J. M.; MARTINEZ, M. I.; HORN, N.; DODD, H. M. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, p.101-116, 2003.

ROJAS, M. and CONWAY, P.L. (1996) Colonization by lactobacilli of piglet small intestinal mucus. **Journal of Applied Bacteriology** 81, 474–480.

ROLFE, R.D. The role of probiotic culture in the control of gastrointestinal health. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.130. p.396S-402S, 2000.

ROSSI M, AMARETTI A (2010) Probiotic properties of bifidobacteria. In: Mayo B, van Sinderen D (eds) *Bifidobacteria: genomics and molecular aspects*. Horizon, Rowan House, UK, pp 97–123. ISBN 978-1-904455-68-4.

ROSA, C. M.; FRANCO, B.D.G.M.; MONTVILLE, T.J.; CHIKINDAS, M.L. Purification and mechanistic action of a bacteriocin produced by a Brazilian

sausage isolate, *Lactobacillus sakei* 2a. **Journal of Food Safety**, v.22, p.39-54, 2002.

SANTOS, R. B.; BARBOSA, L. P. J. L.; BARBOSA, F. H. F.. Probióticos: microrganismos funcionais. **Ciência Equatorial**, v.1, n.2, p.26-38, 2011.

SARTOR, R. B. Probiotic therapy of gastrointestinal inflammation and infection. *Current Opinion in Gastroenterology*, Philadelphia, v. 21, n. 1, p. 44-50, 2005.

SAVARD, P., LAMARCHE, B., PARADIS, M. E., Thiboutot, H., Laurin, E., & Roy, D. Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB-12 and, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. **International Journal of Food Microbiology**, 149, 50e57. 2011.

SAVAIANO, D. A.; ABOUELANOUAR, A.; SMITH, D. E.; LEVITT, M. D. Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. *American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v. 40, n. 6, p. 1219-1223, 1984.

SAZAWAL S, HIREMATH G, DHINGRA U, MALIK P, Dob S, Black R. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials. **Lancet Infect Dis** 2006; 6: 374-82.

SCANLAN, P. D.; SHANAHAN, F.; O'MAHONY, C.; MARCHESI, J. R. Culture-independent analyses of temporal variation of the dominant fecal microbiota and targeted bacterial subgroups in Crohn's disease. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 44, n. 11, p. 3980–3988, 2006

SCHILLINGER, U., Guigas, C., & Holzapfel, W. H. (2005). **International Dairy Journal**, 15, 1289–1297.

SCHNEITZ, C. Competitive exclusion in poultry – 30 years of research. **Food control**, Guildford, v.16, p.657 – 667, 2005.

SCHNEITZ, C.; NUOTIO, L.; LOUNATMA, K. Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S-layer). *J.Appl. Bacteriol.* v. 74, p.290–294, 1993.

SCHREZENMEIR J, VRESE M de (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition. **Am J Clin Nutr** 73:361-364.

SCHULZ, D.; PEREIRA, M. A.; BONELLI, R. R.; NUNES, M. M.; BATISTA, C. R. V. Bacteriocinas: mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos. **Alimentação e Nutrição**, v. 14, n. 2, p. 229-235, 2003.

SHAH NP (2007) Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal** 17(11): 1262-1277.

SHAMIR, R.; MAKHOUL, I. R.; ETZIONI, A.; SHEHADEH, N. Evaluation of a diet containing probiotics and zinc for the treatment of mild diarrheal illness in children younger than one year of age. *Journal of the American College of Nutrition*, New York, v. 24, n. 5, p. 370-375, 2005.

SMITH, J. L. et al. Lantibiotic production by *Streptococcus mutans*: their uses in replacement therapy for the prevention of dental caries and as antibiotics for the treatment of various infectious diseases. In: RILEY, M.; GILLOR, O. (Ed.). Norfolk: . **Horizon Bioscience**, 2007. p. pp. 95–115.

STENGER MR, REBER KM, GIANNONE PJ, NANKERVIS CA. Probiotics and prebiotics for the prevention of necrotizing enterocolitis. **Curr Infect Dis Rep.** 2011;13:13-20.

SZAJEWSKA, H.; MRUKOWICZ, J. Meta-analysis: non-pathogenic yeast *Saccharomyces boulardi* in the prevention of antibiotic-associated diarrhea. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, Oxford, v. 22, n. 5, p. 365-372, 2005.

SWANN JR, WANT EJ, GEIER FM, SPAGOU K, WILSON ID, SIDAWAY JE, NICHOLSON JK, HOLMES E (2011). Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments. **Proc Natl Acad Sci USA** 108:4523-4530.

ŠUŠKOVIĆ, J., KOS, B., GORETA, J. and MATOŠIĆ, S. (2001) Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in symbiotic effect. **Food Technology and Biotechnology** 39, 227–235.

SUSKOVIC', J., KOS, B., MATOS'IC', S. and BESENDORFER, V. (2000) The effect of bile salts on survival and morphology of a potential probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 16, 673–678

TAGG, J. R.; DIERKSEN, K. P. Bacterial replacement therapy: adapting 'germ warfare' to infection prevention. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 217-223, May 2003.

TANNOCK, G.W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. **Int. Dairy J.**, v.8, p.527-533, 1998.

TANNOCK, G.W. (1999). A fresh look at the intestinal microflora. In *Probiotics. A Critical. Review* ed. Tannock, G.W. pp. 5–14. **Wymondham: Horizon Scientific Press.**

TANNOCK G (2004). A special fondness for *Lactobacilli*. **Appl Environ Microbiol** 70:3189-3194.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L.B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligosacarídeos sobre a população de bactérias ácido lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.41, n.3, p.393-400, 2005.

TODOROV, S. D.; DICKS, L. M. D. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST 151BR, a strain isolated from beer produced by the fermentation of maize, barley and soy flour. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, AZ Dordrecht, v.20, p. 643-650, 2004.

USMAN, HOSONO A (2000) Effect of administration of *Lactobacillus gasseri* on serum lipids and fecal steroids in hypercholesterolemic rats. **J Dairy Sci** 83:1705–1711. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)75039-9

VAN REENEN, C.A., DICKS, L.M., 2011. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. **Arch. Microbiol.** M193, 157–168.

WADSTROM, T; ANDERSSON, K.; SYDOW, M.; AXELSSON, L.; LINDGREN S.; GULLMAR, B. Surface properties of *Lactobacilli* isolated from the small intestine of pigs. **Journal of Applied Bacteriology**, New York, n. 62, p. 513-520, 1987.

WARD, R. E.; NINÓNUEVO, M.; MILLS, D. A.; LEBRILLA, C. B.; GERMAN, J. B. In vitro fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. *Applied And Environmental Microbiology*, Washington, v. 72, n. 6, p. 4497–4499, 2006.

WILLIAMS NT (2010) Probiotics. **Am J Health Syst Pharm** 67:449–458. doi:10.2146/ajhp090168.

ZÁRATE, G.; SANTOS, V.; NADER-MACIAS, M. E. Protective effect of vaginal *Lactobacillus paracasei* CRL 1289 against urogenital infection produced by *Staphylococcus aureus* in a mouse animal model. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 2007, n. 48358, p. 1-6, 2007.

ZHOU, X. X. L.; WEI FEN LI, W. F.; MA, G. X.; PAN, Y. J. The nisin-controlled gene expression system: construction, application and improvements. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 285-295, 2006.

ARTIGO CIENTÍFICO

AVALIAÇÃO DO PERFIL PROBIÓTICO DE *Lactobacillus acidophilus* UTILIZADOS EM APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS E ALIMENTÍCIAS.

Jucelaine Deon Schmitt, Luciana Oliveira de Fariña, Márcia Regina Simões.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE. Cascavel, PR – Brasil.

RESUMO

Lactobacillus acidophilus utilizados em três diferentes aplicações, sendo: farmácias de manipulação (LA1), em produtos lácteos fermentados (LA2) e em formulações alopáticas (LA3) foram testadas para avaliar a existência de diferenças significativas entre elas e em diferentes condições de crescimento: Para o teste de avaliação da resistência aos diferentes antibióticos de uso comercial todas as estirpes de LA foram sensíveis aos antibióticos ampicilina, cloranfenicol, doxiciclina e tetraciclina. LA1 foi considerada moderadamente sensível (MS) a eritromicina e LA3 MS a clindamicina e eritromicina. LA3 enquadrou-se na classificação entre MS a resistente (R) para eritromicina. As 3 cepas de LA foram resistentes a gentamicina. Na avaliação à resistência em pH ácido, as três origens apresentaram comportamento similar, com diminuição da viabilidade celular em pH 2, mantendo constante a viabilidade em pH 3 e 4. No teste de resistência à condições do trato gastrointestinal e hidrofobicidade LA2 apresentou os melhores resultados. As 3 estirpes apresentaram produção

de compostos inibitórios frente a bactérias patogênicas e desconjugaram sais biliares tauroconjugados (TDCA). Concluiu-se que, dependendo da origem, o *Lactobacillus acidophilus* pode apresentar diferentes comportamentos que poderão determinar o seu crescimento e conseqüentemente sua ação *in vivo*. Pela facilidade, praticidade de acesso, economia e resultados satisfatórios nos testes realizados, LA2 pode ser considerada a estirpe de escolha entre as estudadas.

Palavras-chaves: Saúde intestinal. Imunidade. Resistência a patógenos.

1. INTRODUÇÃO

Os probióticos são considerados como ingredientes GRAS (geralmente reconhecido como seguro) (MATTIA e MERKER, 2008), e seu consumo reduz o número viável de patógenos enquanto fortalece as defesas naturais do corpo (BERTAZZONI-MINELLI e BENINI, 2008; MADUREIRA *et al.*, 2008; LARSEN *et al.*, 2009; SAVARD *et al.*, 2011) por isso, eles ajudam a impulsionar o sistema imunológico e, conseqüentemente, diminuir o risco de doenças gastrointestinais, câncer, diabetes e níveis elevados de colesterol sérico, enquanto melhora a digestão em si (DE VRESE e SCHREZENMEIR, 2008; KUMAR *et al.*, 2012).

A ingestão de microrganismos com efeito probiótico pode ser feita na forma de preparações farmacêuticas como compostos em pó, tabletes ou cápsulas, ou de iogurtes e outros alimentos fermentados. Esses produtos podem conter somente uma, ou várias espécies distintas de microrganismos (FOOKS e GIBSON, 2002).

O uso de espécies de *Lactobacillus* como probióticos têm atraído muita atenção, devido à sua ocorrência natural no sistema gastrointestinal humano (PYAR *et al.*, 2014).

O *L. acidophilus*, é um bacilo gram - positivo com pontas arredondadas, que se encontra na forma de células livres, aos pares ou em cadeias curtas, pouco tolerantes à salinidade do meio. É considerado microaerofílico, com o crescimento em meios sólidos favorecidos por anaerobiose ou pressão reduzida de oxigênio. A sua multiplicação eficaz ocorre em temperaturas de 35-40 °C e valores de pH de 5.5-6.0 (NAHAISI, 1986; SALMINEN *et al.*, 1996).

A habilidade de microrganismos probióticos em sobreviver e se desenvolver no hospedeiro influencia fortemente nos seus efeitos probióticos. O microrganismo que se mostrar metabolicamente estável no produto, sobreviver à passagem pelo trato digestivo com alta viabilidade poderá apresentar efeitos benéficos quando presente no intestino do hospedeiro (ANAL e SINGH, 2007).

A viabilidade e atividade não são os únicos fatores importantes na ação de um probiótico. O nível do microrganismo deve ser suficientemente elevado (NICOLI e VIEIRA, 2003). A recomendação segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é baseada na porção diária de microrganismos viáveis que devem ser ingeridas, sendo o mínimo de 10^8 a 10^9 UFC/dia (BRASIL, 2007).

O uso dos probióticos com a finalidade de beneficiar a saúde do hospedeiro e de prevenir ou tratar doenças, aumentou nos últimos anos, particularmente, devido ao aumento da incidência de microrganismos resistentes a antibióticos, e a necessidade de buscar tratamentos alternativos

para tratar doenças gastrointestinais (TEITELBAUM e WALKER, 2002; NICOLI e VIEIRA, 2003; MARTINS *et. al.*, 2005).

A falta de informações em relação à atividade de microrganismos probióticos administrados através de formas farmacêuticas, como cápsulas, muitas vezes chamados de nutracêuticos, e de produtos alimentícios de diferentes origens justifica o nosso estudo, que visa avaliar as diferenças quanto ao perfil probiótico.

O objetivo do presente trabalho foi comparar o perfil probiótico de diferentes origens de *Lactobacillus acidophilus*. Para isso foram avaliados seu crescimento em presença de antibióticos de uso comercial e resistência em condições que simulam *in vitro* o ambiente gastrointestinal. Investigar as habilidades de adesão *in vitro* destas culturas probióticas, bem como avaliar a capacidade de produção de enzimas hidrolases de sais biliares e produção de compostos inibitórios com características bactericidas.

2.0. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos

Foram utilizados *Lactobacillus acidophilus* de três diferentes origens:

- Origem 1 (LA1): *Lactobacillus acidophilus* oriundo de suplemento manipulado, comercializado na forma de cápsulas ou sachês com finalidade de regular a microbiota intestinal em caso de diarreia ou constipação. Conforme especificação do fornecedor Aché, cada grama de produto liofilizado continha 10^9 UFC.

- Origem 2 (LA2): *Lactobacillus acidophilus*, utilizado em formulações alimentícias como produtos fermentados, gentilmente cedida pela empresa SACCO® Brasil. Conforme especificação do fornecedor, cada grama de produto liofilizado continha 10^{11} UFC.

- Origem 3 (LA3): *Lactobacillus acidophilus*: de origem alopática, comercializado em farmácias de dispensação, também com finalidade de regular a microbiota intestinal. Conforme especificação do fabricante, cada cápsula continha o equivalente a 10^9 UFC/g.

2.2. Ativação do microrganismo

Para ativação e preparo da suspensão celular foi pesado assepticamente 1g do liofilizado de *Lactobacillus acidophilus* de cada origem, transferidos individualmente para tubos contendo 10 mL de caldo TSB (Tryptic Soy Broth) 10% (v/v) (REDONDO, 2008), os quais foram posteriormente incubados por um período de 24h em jarra de anaerobiose a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.3. Avaliação da viabilidade celular

Após 24h de incubação foi realizada centrifugação (CENTRIBIO SO-2B) a 5000rpm por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante e foi acrescentada 10 mL de solução salina fosfatada tamponada para ressuspender o sedimento, realizou-se homogeneização em vórtex (PHOENIX LUFERCO – AP56) seguida de centrifugação, procedimento que foi realizado por 3 vezes. Em seguida, acrescentou-se 1 mL de salina fosfatada tamponada (NaCl - 80g; KCl - 2g; Na_2HPO_4 - 14,4g; KH_2PO_4 - 2,4g - Água qsp – 1000 mL) para suspender o

sedimento e posteriormente acrescentou-se 9 mL de solução salina fosfatada tamponada. A partir desta suspensão foram realizadas oito diluições sucessivas. Determinou-se a viabilidade celular pela técnica de semeadura em profundidade (ZAYED e WINTER, 1995), utilizando o meio ágar MRS (Man Rogosa e Sharp). A incubação foi realizada por um período de 48 h em jarra de anaerobiose a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. As análises foram realizadas em duplicata, com duas repetições.

Para contagem, foram utilizadas placas que apresentaram entre 30 e 300 colônias, multiplicando-se o resultado individual pela respectiva diluição. Os resultados médios por diluição foram expressos em UFC/g de produto.

2.4. Preparo do inóculo

Para garantir que em todos os testes realizados a quantidade de células microbianas adicionadas seria exatamente a mesma, procedeu-se à padronização do inóculo bacteriano, sendo a absorvância equivalente a uma solução padrão igual a 0,5 na escala de Mac Farland a um comprimento de onda de 625 nm, onde a densidade óptica desejada estava entre 0,08 a 0,10, o que equivaleu a $1,5 \times 10^8$ UFC (NCCLS, 2003).

2.5. Avaliação da resistência a diferentes antibióticos de uso comercial

O perfil de resistência a antimicrobianos em *Lactobacillus acidophilus* foi determinado a partir do antibiograma, o qual foi realizado em duplicata, com três repetições, de acordo com a técnica adaptada de susceptibilidade a

antimicrobianos por difusão da droga em discos (CHARTERIS *et al.*, 1998b). As amostras de microrganismos (*Lactobacillus acidophilus*) a serem testados foram cultivadas em ágar MRS (Himedia, Mumbai, India), em condições de microaerofilia utilizando jarra de anaerobiose pelo método da vela (37 ± 1 °C, 48h). Fragmentos das colônias foram transferidas para tubos contendo 3,5 mL de salina (0,85% NaCl) até alcançarem 0,5 na escala Mac Farland (10^8 UFC/mL). Em seguida, utilizando-se *swabs*, os microrganismos foram inoculados sobre a superfície de placas de petri contendo ágar MRS (Himedia, Mumbai, India). Logo após, foram distribuídos os discos de papel-filtro contendo concentrações específicas dos seguintes antimicrobianos: Ampicilina (10µg), Clindamicina (2µg), Cloranfenicol (30µg), Doxiciclina (30µg), Eritromicina (15µg), Gentamicina (10µg) e Tetraciclina (30µg) (Laborclin, Brasil). As placas foram novamente incubadas em jarra de anaerobiose com vela (37 ± 1 °C, 24h).

O agar MRS foi utilizado, pois como observado em experimento de Ocana *et al.*, (2006), é o meio mais apropriado para realização de antibiograma para espécies de *Lactobacillus*, os quais exigem um ambiente microaerófilo ou anaeróbio.

Após a incubação, foram feitas as leituras dos diâmetros dos halos de inibição e a média das triplicatas foi calculada. Os resultados foram submetidos a uma classificação qualitativa dos microrganismos como sensíveis, moderadamente sensíveis ou resistentes às drogas antimicrobianas testadas segundo tabela proposta por Charteris *et al.*, (1998b). Esta tabela foi adotada, pois não existe ponto de corte padrão para determinação de resistência a antimicrobianos, destinados especificamente para espécies de *Lactobacillus*.

2.6. Resistência em condições ácidas

Testou-se a resistência do *Lactobacillus acidophilus* ao ácido clorídrico de acordo com o procedimento descrito por Charteris *et al.*, (1998a). Para tal, os microrganismos foram inoculados em caldo MRS ajustado para valores de pH baixos (pH 2,0, 3,0 e 4,0) com HCl 0,1N e incubados durante 3 horas a 37±1 °C. Esse período simulou o tempo médio de permanência de um alimento no estômago, onde o microrganismo estaria exposto à acidez (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2002).

Alíquotas de 0,1 mL foram coletadas após os tempos 0, 1 e 3h para a determinação do número de células viáveis através do método de inoculação em profundidade utilizando ágar MRS, após diluições em série usando água peptonada tamponada a 0,1%. As placas foram incubadas a 37±1 °C em jarra de anaerobiose com vela durante 48 h. Após este período as placas com contagem de colônias entre 30 e 300 foram utilizadas e o resultado expresso em log UFC/g⁻¹.

2.7. Determinação da tolerância ao trânsito gastrointestinal

Simulando as condições do estômago e do intestino delgado, a viabilidade dos microrganismos foi determinada frente à pepsina em pH 2,0 e a pancreatina em pH 8,0, respectivamente, de acordo com a metodologia descrita por Charteris *et al.*, (1998b).

Foram utilizadas soluções salinas a 0,5% contendo 0,003g/mL de pepsina (Pepsin Cristalín – Sigma) e 0,01 g/mL de pancreatina (Pancreatin Pâncreas –

Sigma). O pH foi ajustado para 2,0 e 8,0 com HCL 0,1 N e NaOH 0,1 N, respectivamente. Em seguida as soluções foram esterilizadas por meio de filtração em membrana de 0,22 µm (Millipore®).

Foram transferidos 10 mL de cada solução para tubos esterilizados contendo 3 mL de solução salina estéril adicionados de 2 mL de suspensão celular de *Lactobacillus acidophilus* de cada estirpe a ser testada individualmente. Após homogeneização, os tubos foram mantidos a 37 °C. Alíquotas de 1 mL foram retiradas em duplicata para cada ensaio, para o teste de tolerância gástrica nos tempos 1, 90 e 180 minutos e nos tempos 1 e 240 minutos para o ensaio de tolerância ao trânsito intestinal. Essas alíquotas foram diluídas em série em água tamponada fosfatada e, posteriormente, plaqueadas em profundidade, em duplicata e incubadas a 37 °C por 48 h.

Após 48 horas de incubação, foi realizada a contagem das colônias de cada gênero, sendo os resultados expressos em unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

Foram considerados microrganismos tolerantes para o teste de sobrevivência à simulação gástrica, aqueles que diminuíram, no máximo, em 30% a sua concentração celular e, para o ensaio de sobrevivência ao trânsito intestinal, aqueles que apresentaram uma redução de 1,5 log da sua contagem inicial (CHARTERIS *et al.*, 1998b).

2.8. Teste de adesão a solventes da superfície celular para Lactobacilos

A hidrofobicidade da superfície celular bacteriana foi avaliada através da medida do MATS (microbial adhesion to solvents) conforme descrito por

Rosenberg *et al.*, (1980), Pelletier *et al.*, (1997) e Kos *et al.*, (2003), com modificações. O microrganismo foi ativado em caldo MRS, incubado sob anaerobiose, a 37 ± 1 °C, durante 24 horas. Após três ativações, os cultivos foram centrifugados a 1.500 rpm, por 15 minutos. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com solução tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ (50 mM, pH 7,0) e, posteriormente, as mesmas foram suspensas em solução de KNO_3 (0,1M, pH 6,2) cerca de 10^8UFC mL^{-1} . A absorvância da suspensão de células foi medida a 600 nm (A_0). Em tubos de vidro, 3 mL de cada suspensão bacteriana obtida foram adicionados de 1 mL dos seguintes solventes: xilol (solvente apolar), clorofórmio (solvente ácido) e acetato de etila (solvente básico). Após repouso de 10 minutos, as fases foram misturadas por agitação em vórtex por 2 minutos. Então, os tubos foram mantidos em repouso por 30 minutos aproximadamente, para que as fases se separassem completamente. Após esse período, foi realizada leitura de absorvância da fase aquosa a 600 nm (A_1) em espectrofotômetro (Bioespectro SP-220).

A percentagem de aderência bacteriana para o solvente foi calculada como

$$\text{MATS} = \left(\frac{(1 - A_1)}{A_0} \right) \times 100$$

A_0 = Leitura da absorvância da suspensão de células em KNO_3 .

A_1 = Leitura da absorvância da fase aquosa após exposição de 30 minutos em solventes orgânicos.

Os isolados foram classificados como de alta (66,67 a 100%), média (33,37 a 66,66%) e baixa hidrofobicidade (0 a 33,33%) segundo proposto em Nader-Macías e Otero (2008). Os resultados obtidos basearam-se na média de três experimentos.

De acordo com Del Re *et al.*, (2000) e Giarous *et al.*, (2009), as estirpes devem apresentar uma superfície hidrofóbica para ter elevada capacidade de aderência às células intestinais e materiais sólidos.

2.9. Produção de substâncias antagônicas

Para verificar a produção de substâncias antibacterianas foi utilizada a técnica de inibição pelo método de multicamadas descrito por Diep, Håvarstein e Nes (1995), com algumas modificações. As seguintes camadas de ágar foram adicionadas à cada placa de Petri: 1º) 7 mL de ágar MRS (1,4% de ágar) sem microrganismos; 2º) 7 mL de ágar MRS (0,7% de ágar) adicionado de 0,5 mL do cultivo ativado de *Lactobacillus acidophilus*, previamente diluído em água peptonada 0,1%, até aproximadamente $1,0 \times 10^2$ UFC/mL; 3º) 7 mL de ágar BHI (0,7% de ágar) sem microrganismos. Após incubação a 37 °C por 72 horas, para crescimento da bactéria láctica, foi adicionada a última camada, contendo 7 mL de ágar BHI adicionados de 50 µL de um cultivo de 24 horas do patógeno indicador, previamente diluído em água peptonada 0,1%, até aproximadamente $1,0 \times 10^5$ UFC/mL. Foram utilizados como patógenos indicadores os seguintes microrganismos patogênicos isolados de alimentos: *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*; *Staphylococcus sp.* e *Listeria monocytogenes*.

As placas foram incubadas a 37 °C por mais 24 horas em ambiente aeróbio. Em caso de inibição positiva, verifica-se um halo de não desenvolvimento do microrganismo patogênico indicador, ao redor da colônia do *L. acidophilus*.

No teste de Multicamadas, utilizado neste trabalho para verificar o antagonismo entre a cultura probiótica e os microrganismos indicadores, as

culturas são separadas umas das outras por uma camada de ágar semissólido, o que impede o contato direto entre elas. Desta forma, qualquer substância inibidora deve difundir-se no ágar para exercer seu efeito sobre a bactéria indicadora, ou seja, deve ser extracelular e difusível (GONZÁLEZ *et al.*, 1993; GARCIA, 1999).

3.0. Atividade de hidrolase de sais biliares (BSH)

Neste ensaio foi utilizado a metodologia de Tanaka *et al.*, (2000), baseada na desconjugação dos sais biliares TDCA (sodium taurodeoxycholate hydrate – Sigma Aldrich) e GDCA (Glycodeoxycholic acid monohydrate – Sigma Aldrich) pelas estirpes de *Lactobacillus acidophilus*.

As células de *Lactobacillus acidophilus* foram incubadas em placas contendo ágar MRS suplementado com 5% de TDCA ou GDCA. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo verificada a ocorrência de halos de precipitações de sais biliares e mudança de cor das colônias (branco opaco) e do meio de cultivo, indicando a presença ou não, dessa enzima.

3.1. Análise Estatística

Para os testes de resistência a diferentes antibióticos de uso comercial, resistência frente a condições ácidas, tolerância ao trato gastrointestinal e hidrofobicidade, foi aplicada a Análise de Variância e as médias dos tratamentos foram comparadas entre si pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade, utilizando o programa Statistica[®]7.0 e Minitab 14[®].

4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação da viabilidade celular

Para garantir que a quantidade de microrganismo informada na embalagem dos produtos estava coerente, foi realizado o teste de viabilidade com contagem das células microbianas. Na Tabela 2 são apresentadas as concentrações dos microrganismos em estudo.

Tabela 2. Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* de acordo com a origem.

Origem	Log UFCg ⁻¹	Viabilidade declarada*
LA1*	9,20	9
LA2*	11,16	11
LA3*	9,06	9

*LA1(*Lactobacillus acidophilus* – medicamento de manipulação); LA2 (*Lactobacillus acidophilus* – formulações alimentícias); LA3 (*Lactobacillus acidophilus* – medicamento alopático); Viabilidade declarada em laudo e/ou bula fornecida pelo fabricante.

Os resultados obtidos estão de acordo com as informações apresentadas pelos fabricantes/ fornecedores.

Barreto e colaboradores (2003), ao avaliarem a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em 177 amostras de 15 marcas de produtos probióticos comercializados no Brasil, no período de janeiro a agosto de 2001. Verificaram que a maioria dos produtos apresentou contagem total de microrganismos viáveis acima de 10^7 UFC/g.

4.2. Avaliação da resistência a diferentes antibióticos de uso comercial

Os resultados apresentados na Tabela 3 demonstram que as culturas que apresentaram halos de inibição maiores que os valores de referência foram considerados como sensíveis aos antibióticos. Culturas que apresentaram zonas de inibição menores que os valores de referência foram considerados moderadamente sensíveis e resistentes.

Tabela 3. Sensibilidade do *Lactobacillus acidophilus* a antimicrobianos de acordo com a origem demonstrada pelo diâmetro médio dos halos de inibição, seguido do desvio-padrão.

Antibióticos	Diâmetro médio do Halo de Inibição (mm)			Perfil de Sensibilidade*		
	LA1	LA2	LA3	*R	*MS	*S
Ampicilina	34,00±0,82 ^a	21,25 ±2,06 ^c	29,20 ±1,89 ^b	≤12	13-15	≥ 16
Clindamicina	16,75±2,88 ^a	12,00±1,15 ^a	16,75±1,15 ^a	≤8	9-11	≥12
Cloranfenicol	29,50±0,57 ^{ac}	27,25±0,95 ^c	31,25±2,75 ^{ab}	≤13	14-17	≥18
Doxiciclina	23,50±2,51 ^c	32,50±2,08 ^{ad}	31,75±0,5 ^{bd}	≤14	15-18	≥ 19
Eritromicina	15,70±2,21 ^a	16,75±0,95 ^a	13,50±2,38 ^a	≤13	14-17	≥ 18
Gentamicina	08,25±0,5 ^a	09,25±0,5 ^a	09,50±0,57 ^a	≤12	—	≥ 13
Tetraciclina	20,75±1,5 ^b	31,50±1,9 ^a	31,00±1,82 ^a	≤14	15-18	≥ 19

* Diâmetro dos halos de inibição considerados para cada antibiótico, segundo Charteris *et al.*, (1998b).

Suscetibilidade expressa como R (resistente), MS (moderadamente sensível), ou S (sensível).

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

As espécies de lactobacilos são geralmente sensíveis aos inibidores da síntese de proteínas, tais como cloranfenicol, eritromicina, clindamicina e tetraciclina e mais resistente aos aminoglicosídeos (neomicina, canamicina, estreptomicina e gentamicina) (CHARTERIS *et al*, 1998; COPPOLA *et al*,

2005.; ZHOU *et al.*, 2005). Isto é parcialmente apresentado em nossos resultados, onde todos os lactobacilos foram inibidos por, cloranfenicol, doxiciclina e tetraciclina. E também pelo inibidor de síntese de parede celular (ampicilina). Porém, ao analisarmos o halo de inibição do antibiótico eritromicina, observamos que LA1 e LA2 encontram-se na faixa moderadamente sensível, enquanto LA3 se enquadra na resistência. Similarmente, Thumu e Halami (2012) constataram que *Lactobacillus plantarum* isolado a partir de produtos lácteos, era resistente a eritromicina.

LA2, quando analisado o antibiótico clindamicina, encontra-se na faixa entre moderadamente sensível e sensível. Este fato ocorre, pois apesar de serem da mesma espécie *Lactobacillus acidophilus* pertencem a cepas diferentes.

Foi observada resistência para o antibiótico gentamicina (aminoglicosídeo) nos três microrganismos testados. Este fato ocorre pela inibição do transporte do antibiótico na célula bacteriana, já que a entrada desta droga nas células procariontes é O₂-dependente. Isso explica a resistência natural das bactérias anaeróbias estritas a este antibiótico (SILVA, 1999; MURRAY *et al.*, 2000 e BROOKS *et al.*, 2000).

Sabe-se também, que os aminoglicosídeos são mais amplamente utilizados contra bactérias entéricas Gram-negativas e não Gram-positivas como é o gênero *Lactobacillus* (BROOKS *et al.*, 2000; MURRAY *et al.*, 2000).

Muitos dos mecanismos de resistência em culturas probióticas são atribuídos a características intrínsecas complexas tais como, estrutura da parede celular ou propriedades metabólicas (KASTNER *et al.*, 2006), sendo

que a impermeabilidade é o mecanismo de resistência intrínseca mais frequentemente observada (CHARTERIS *et al.*, 1998b).

Paralelamente, apesar de muitas cepas de bactérias lácticas, particularmente as de *Lactobacillus* spp., serem resistentes a determinados antibióticos, essa resistência normalmente não é mediada por plasmídios, não sendo transmissível (SAAD, 2006). Esta característica é benéfica, pois possibilita a utilização de *Lactobacillus* em terapia associada com antibióticos.

Tendo em vista o alto nível de resistência de lactobacilos para alguns agentes antimicrobianos utilizados na profilaxia e quimioterapia da chamada diarreia dos viajantes, afigura-se que a terapia concomitante pode provar ser uma abordagem mais bem-sucedida do que somente a terapia à base de lactobacilos (CHARTERIS *et al.*, 1998b).

A susceptibilidade a antimicrobianos em microrganismos intestinais é critério importante para a seleção de linhagens probióticas (MOOUBARECK *et al.*, 2005). Além da questão da transferência de genes de resistência de bactérias probióticas para as patogênicas, linhagens que mostram resistência intrínseca a antibióticos específicos podem ser ministradas juntamente com os com os antibióticos (CEBECI e GÜRAKAN, 2003), podendo beneficiar paciente cuja microbiota intestinal normal se encontra desbalanceada ou reduzida em razão da administração de agentes antimicrobianos (ZHOU *et al.*, 2005). Nesses casos, o uso de antimicrobiano associado com uma linhagem probiótica, resistente intrinsecamente a esse antimicrobiano, pode oferecer resultados significativamente melhores (CEBECI e GÜRAKAN, 2003).

4.3. Resistência a condições ácidas

Para atingir o intestino e garantir sua funcionalidade, as bactérias probióticas devem possuir como uma de suas características, a resistência ao suco gástrico, como apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Crescimento médio ($\log \text{UFC g}^{-1}$) seguido do desvio padrão, dos microrganismos expostos ao ácido clorídrico (HCl P.A.) por até 3 h.

ORIGEM	Tempo de exposição (horas)	Exposição à diferente pH ($\log \text{UFC g}^{-1}$)			
		pH 2	pH 3	pH 4	pH controle (6,5)
LA1	0	5,46±0,15 ^{aA}	5,85±0,06 ^{aA}	5,54±0,34 ^{aA}	5,62±0,32 ^{bA}
	1	1,90±0,21 ^{bA}	5,67±0,32 ^{aA}	5,97±0,17 ^{aA}	6,21±0,15 ^{bA}
	3	1,52±0,11 ^{cA}	5,78±0,46 ^{aA}	6,01±0,44 ^{aA}	7,18±0,11 ^{aA}
LA2	0	6,08±0,14 ^{aA}	5,87±0,10 ^{aA}	6,06±0,09 ^{aA}	6,12±0,03 ^{aA}
	1	2,07±0,38 ^{bA}	5,54±0,09 ^{aA}	6,16±0,02 ^{aA}	6,30±0,19 ^{aA}
	3	1,99±0,01 ^{bA}	4,25±0,07 ^{bB}	6,05±0,22 ^{aA}	6,80±0,31 ^{aA}
LA3	0	5,78±0,46 ^{aA}	5,57±0,39 ^{aA}	5,52±0,06 ^{aA}	5,83±0,12 ^{cA}
	1	2,11±0,44 ^{bA}	4,83±0,24 ^{aA}	5,89±0,30 ^{aA}	6,27±0,16 ^{acA}
	3	1,90±0,14 ^{bA}	4,66±0,15 ^{aB}	6,27±0,37 ^{aA}	6,87±0,18 ^{aA}

*Letras iguais minúsculas na mesma coluna e letras iguais maiúsculas na mesma linha correspondem a médias iguais pelo teste de Tukey ($p>0,05$).

O meio com pH 2,0 no decorrer do tempo de incubação provocou uma redução gradativa no número de células viáveis, porém no final de 3 h existe

presença de células viáveis. Fuchs *et al.* (2006) encontraram o mesmo perfil onde em pH 2,0 houve queda no número de células viáveis presentes, o qual permaneceu constante no meio com pH 4,0.

Em pH 3,0 foi verificado que o número de células viáveis se mantém praticamente constante para todos os LA avaliados, não havendo diferença significativa ($p>0,05$) nas contagens desses microrganismos. Ocorre uma pequena queda na contagem de células viáveis observada no término da incubação para LA2 em relação aos dois outros LA.

Oliveira (2006) verificou que as células de *Lactobacillus acidophilus* se mostram pouco resistentes às condições ácidas extremas, já que após o período de 3 horas de incubação foi verificada uma redução significativa na contagem das mesmas, de até 3 ciclos logarítmicos em pH 1,0 e de 1 ciclo logarítmico em pH3,0.

A capacidade de sobreviver em pH 3,0 durante um período aproximado de três horas é uma característica fundamental para que um microrganismo tenha perfil probiótico, pois é esse o pH estomacal após a ingestão do alimento e o tempo médio de permanência do alimento nestas condições (ERKKILÄ e PETÄJÄ, 2000).

Observa-se que os microrganismos testados apresentaram a mesma característica de crescimento em pH 4,0 e pH 6,5 (pH controle) durante o período de incubação, ou seja, não houve diferença significativa no decorrer do tempo de incubação ($p>0,05$). Apesar do pH 4,0 ser considerado ácido foi observado um aumento da viabilidade celular ao final do tempo de exposição desses microrganismos. Isso ocorreu, pois esta faixa de pH (de 4 a 6,5) é

considerada ideal para crescimento de espécies de *Lactobacillus* (KANDLER e WEIS, 1986).

A natureza do alimento afeta o tempo de trânsito através do estômago, mas normalmente o alimento permanece por 2 a 4 h (HUANG e ADAMS, 2004), bem como o pH do conteúdo gástrico. Esses fatores afetam a ação das bactérias probióticas e indicam que a recomendação de ingestão desse tipo de microrganismo, seja na forma de cápsulas ou alimentos fermentados não deve ser feita em jejum, mas logo após as refeições para que os seus efeitos sejam mantidos ou potencializados.

4.4. Determinação da tolerância ao trato gastrointestinal

As metodologias *in vitro* representam uma importante forma de caracterização da determinação da tolerância ao TGI, pois além de garantir resultados confiáveis, são executadas com maior facilidade que os estudos *in vivo* (CHARTERIS *et al.*, 1998a).

Como proposto por Charteris *et al.* (1998), foram considerados microrganismos tolerantes para o teste de sobrevivência à simulação gástrica, aqueles que diminuíram, no máximo, em 30% a sua concentração celular.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 5, as 3 estirpes de LA apresentaram uma diminuição considerável na viabilidade, superior aos 30% recomendados quanto à simulação das condições gástricas, no entanto, após 180 minutos ainda é possível observar células viáveis.

Tabela 5. Total de células viáveis resistentes ao teste de simulação de tolerância gástrica em diferentes tempos de exposição.

Origem	Exposição à pepsina (log UFC mL ⁻¹)		
	1 min	90 min	180 min
LA1	7,93 ^{aA} (±0,02)	5,74 ^{bB} (±0,08)	3,60 ^{cC} (±0,05)
LA2	7,94 ^{aA} (±0,03)	6,04 ^{bA} (±0,11)	4,66 ^{cA} (±0,04)
LA3	7,93 ^{aA} (±0,05)	5,75 ^{bB} (±0,05)	3,79 ^{cB} (±0,03)

*Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si para o Teste de Tukey com $p > 0,05$.
 Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si para o Teste de Tukey com $p > 0,05$.

Observa-se que dentre as 3 estirpes a que apresentou maior número de células viáveis ao final do experimento foi LA2 - *Lactobacillus acidophilus* destinado a aplicações alimentícias.

Vizoso *et al.* (2006) apresentaram um estudo onde, estirpes de *Lactobacillus* isolados de produtos lácteos fermentados africanos, bem como isolados intestinais humanos foram identificados e investigados *in vitro* para as suas características funcionais e tecnológicas como potenciais para novas estirpes probióticas. Para o teste que simula condições gastrointestinais, na passagem pelo modelo estomacal, cinco estirpes identificadas como *L. plantarum* e dois identificados como *L. johnsonii* apresentaram boa sobrevivência.

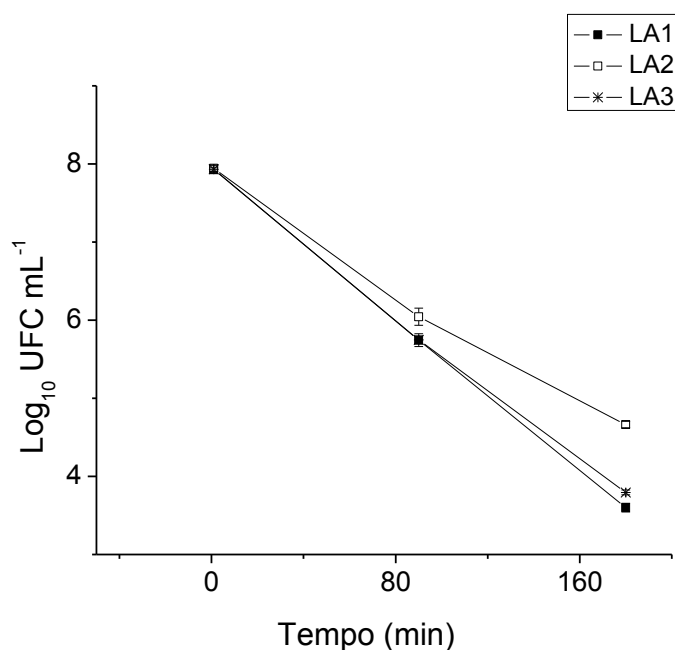


Figura 1 - Taxa de sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* em diferentes aplicações frente a condições que simulam ambiente estomacal.

Com relação à resistência intestinal o recomendado é que o microrganismo tenha uma redução de no máximo 1,5 log da sua contagem inicial. Conforme visualizado na Tabela 6, todas as estirpes se mantiveram dentro desta faixa, sendo LA2 a estirpe que apresentou maior resistência frente à pancreatina.

Tabela 6. Total de células viáveis resistentes ao teste de simulação de tolerância do trânsito intestinal em diferentes tempos de exposição.

Origem	Exposição à pancreatina (log UFC mL ⁻¹)	
	1 min	240 min
LA1	7,87 ^{aA} (±0,03)	6,57 ^{bC} (±0,07)
LA2	7,89 ^{aA} (±0,03)	7,38 ^{bA} (±0,04)
LA3	7,89 ^{aA} (±0,04)	6,79 ^{bB} (±0,02)

*Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si para o Teste de Tukey com $p > 0,05$.

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si para o Teste de Tukey com $p > 0,05$.

Resultado similar foi encontrado por Pithva *et. al.* (2014) ao testar produtos fermentados comerciais à base de *Lactobacillus* verificou que a maior redução na viabilidade das cepas após simulação do trânsito intestinal ocorreu com uma redução média de 1,3 log.

O tempo de incubação para o teste de tratamento gástrico (120 min) e fluido intestinal (180 min) simula a ingestão de alimentos e o tempo de passagem do estômago para o intestino, durante os processos digestivos (GARDINER *et al.*, 2000).

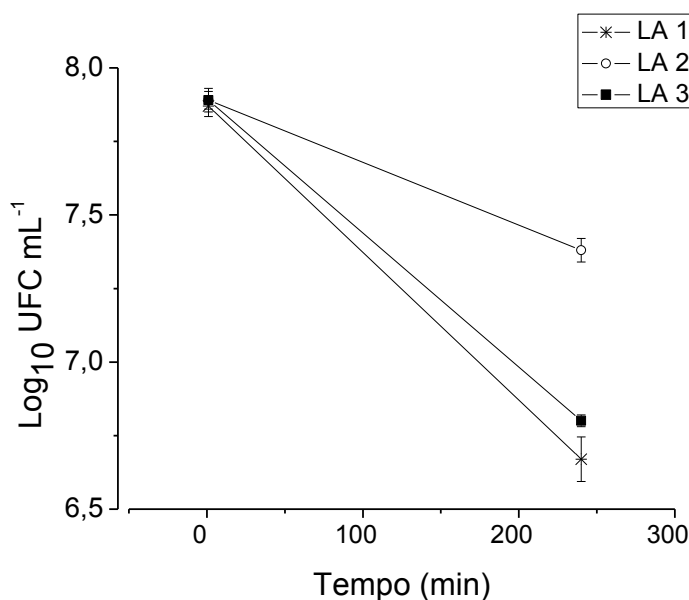


Figura 2 - Taxa de sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* em diferentes aplicações frente a condições que simulam ambiente intestinal.

4.5. Teste de adesão a solventes da superfície

O índice de hidrofobicidade pode ser utilizado para prever o potencial de adesão das estirpes, facilitando o seu contato com a superfície hidrofóbica das células epiteliais eucarióticas, ou com a natureza hidrofílica do muco que cobre

a superfície do epitélio, em algumas áreas específicas (NADER-MACÍAS *et al.*, 2008).

A adesão bacteriana depende em parte de interações reversíveis ou irreversíveis. O estágio inicial e reversível é mediado por um complexo de interações físico-químicas, incluindo hidrofobicidade e cargas, que não são consideradas específicas, mas propriedades importantes (PELLETIER, 1997).

Através do teste de adesão microbiana a solventes (MATS) é possível avaliar qualitativamente o quão polar ou apolar é a superfície bacteriana, sendo importante, pois indicaria o potencial de adesão do probiótico às superfícies apolares do epitélio intestinal e vaginal. Entretanto, propõe-se ser o teste apenas o indicador primário para adesão de microrganismos (MANGONI, 2009).

A hidrofobicidade de superfície celular e hidrofiliabilidade foram avaliadas pela separação de células entre as fases aquosa e orgânica.

Tabela 7. Hidrofobicidade da superfície celular de cepas de *Lactobacillus acidophilus* por adesão bacteriana aos hidrocarbonetos.

Origens	% de Adesão		
	Xilol	Acet. De etila	Clorofórmio
LA1	45,00 ^{CA} (±1,88)	72,52 ^{BB} (±3,01)	84,03 ^{AB} (±1,60)
LA2	55,75 ^{CA} (±1,25)	84,16 ^{BA} (±1,60)	98,41 ^{AA} (±0,90)
LA3	48,96 ^{BA} (±1,37)	77,34 ^{AB} (±1,89)	76,90 ^{AC} (±1,04)

*Os valores estão representados com média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si para o Teste de Tukey com ($p>0,05$).

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si para o Teste de Tukey com ($p>0,05$).

Conforme classificação proposta por Nader-Macías e Otero (2008), onde a alta hidrofobicidade fica entre 66,67 a 100%, média entre 33,37 a 66,66% e baixa hidrofobicidade fica de 0 a 33,33%. Observa-se que a aderência de células de LA1 para xilol encontra-se na faixa de média adesão, enquanto que para o solvente acetato de etila e clorofórmio a adesão pode ser considerada alta. O mesmo perfil foi observado para as estirpes LA2 e LA3. Dentre as três estirpes avaliadas a que apresentou valores mais elevados de adesão foi a LA2.

Ao contrário dos resultados encontrados neste trabalho, ao avaliar a hidrofobicidade da superfície celular de isolados de seis espécies diferentes de lactobacilos provenientes de produtos industriais, Pelletelier *et al.* (1997) realizaram o teste de MATS para o xilol, um solvente apolar orgânico, e verificaram que os microrganismos estudados eram relativamente hidrofílicos, com as porcentagens de adesão ao solvente variando entre 2,7 e 26,5%.

O valor de aderência mais elevada para os microrganismos *L. plantarum* FAbM2 foi obtida com clorofórmio com um máximo de 72% (SATHYABAMA *et al.*, 2012).

Um estudo com *L. plantarum*, mostrou uma afinidade acima de 40% para um solvente apolar, geralmente presente em elevadas características hidrofóbicas (GIAROUS *et al.*, 2009).

De acordo com Del Re *et al.* (2000) e Giarous *et al.* (2009), as estirpes probióticas devem apresentar uma superfície hidrofóbica por ter uma elevada capacidade de aderência às células intestinais e materiais sólidos.

A capacidade de aderir às superfícies mucosas do intestino e a subsequente colonização de longo ou de curto prazo tem sido um dos critérios

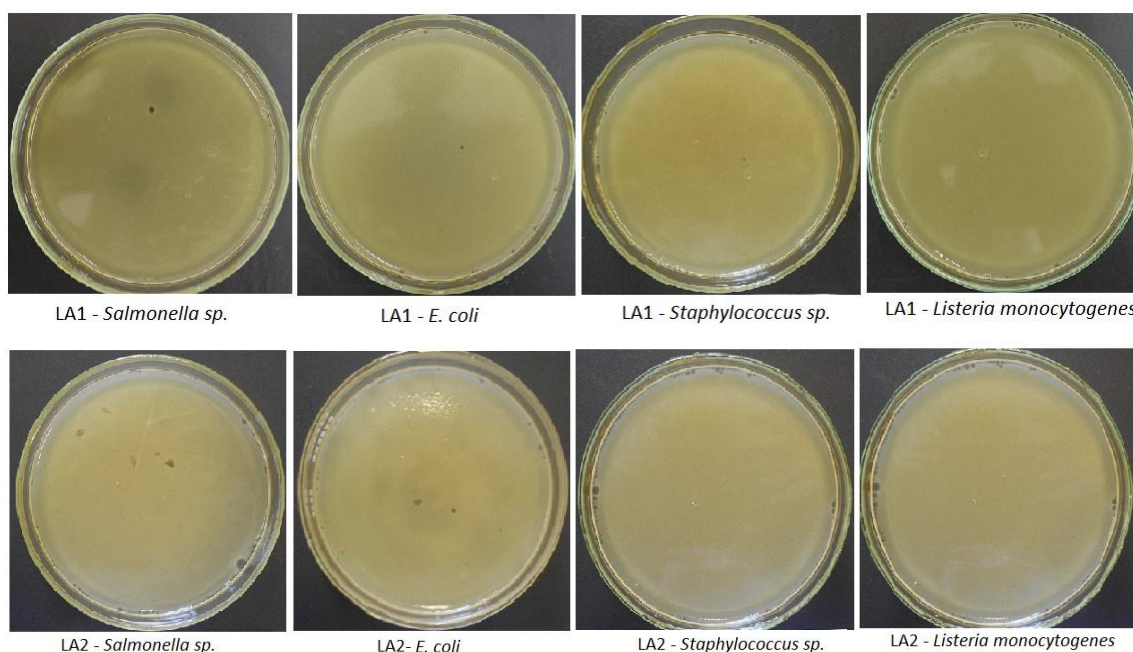
mais comumente encontrados para a seleção de cepas probióticas (MARCO *et al.*, 2006; LEBEER *et al.*, 2008; COLLADO *et al.*, 2009).

4.6. Atividade antagonista contra patógenos

Os mecanismos de atividade antibacteriana em estirpes probióticas de *Lactobacillus* parecem ser multifatoriais (SERVIN, 2004) e ocorrem devido à presença de bacteriocinas e/ou ácidos orgânicos produzidos por eles.

As bactérias testadas no presente trabalho apresentaram atividade antagonista para patógenos Gram positivos e Gram negativos.

As três estirpes de *L. acidophilus* apresentaram halos inibitórios para todos os microrganismos patogênicos testados, sendo eles: *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus sp.* e *Listeria monocytogenes*. Em algumas placas verifica-se um número maior de halos quando comparado a outras, porém, a metodologia utilizada não permite a quantificação da atividade, apenas determina presença ou ausência de inibição.



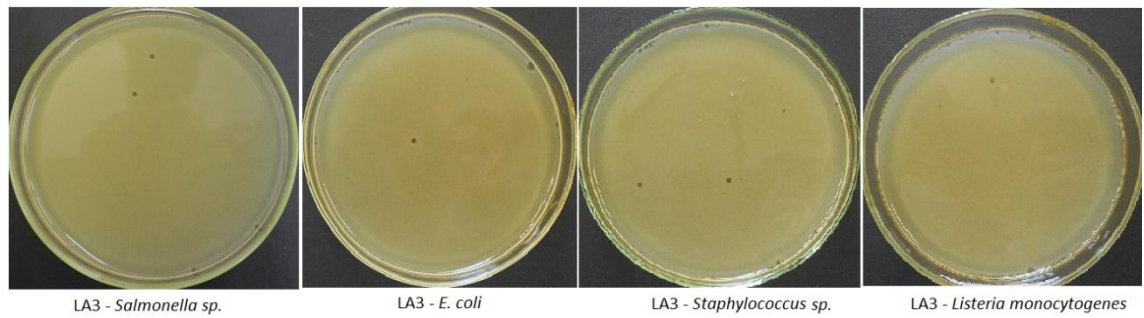


Figura 3 – Halos inibitórios produzidos por cepas de *Lactobacillus acidophilus* de diferentes aplicações contra bactérias patogênicas.

O efeito inibitório pode ser decorrente da produção de H_2O_2 , ácido láctico, bacteriocinas (substâncias que agem como antibióticos), ou a combinação de vários destes compostos (NARDI *et al.*, 2005), as quais são substâncias características do metabolismo destes microrganismos demonstrando a importância e interesse da utilização destas bactérias em alimentos ou formulações farmacêuticas com a finalidade de se tornarem integrantes da microbiota humana e animal.

Pereira e Gómez (2007), utilizando a mesma metodologia relataram inibição de *E. coli* e *S. aureus* por *L. acidophilus* obtido a partir de uma cultura comercial probiótica liofilizada.

Resultados semelhantes foram descritos anteriormente por Garcia (1999), onde o *L. acidophilus* inibiu duas linhagens de *E. coli* de origem humana (*E. coli* 29.1 O119 e *E. coli* 64.1 OH7) e duas cepas de origem suína. Também González *et al.* (1993) conseguiram a inibição de *E. coli*, cultivando uma cepa de *L. acidophilus* pela metodologia de Multicamada.

4.7. Atividade hidrolase de sais biliares (BSH)

A BSH é uma enzima produzida por diversos microrganismos, entre eles os probióticos. Muitos estudos envolvendo a cinética dessa enzima relataram a sua eficiência em hidrolisar os sais biliares tauroconjugados e, como consequência dessa ação, tem sido demonstrado que este mecanismo auxilia na redução das concentrações de colesterol total sanguíneo (TARANTO *et al.*, 1996; TANAKA *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2005), razão pela qual a produção dessa enzima por bactérias probióticas tem sido amplamente estudada.

Para o meio contendo GDCA não houve crescimento das estirpes de LA.

As três estirpes de *Lactobacillus acidophilus* desconjugam sais biliares presentes em meio contendo TDCA, tal como observado na figura a seguir, onde se verifica formação de precipitação branca em volta das colônias desenvolvidas em meio MRS contendo sais de biliares.



Figura 4 – Formação de precipitados de sais biliare de colônias de LA de diferentes aplicações em meio contendo TDCA.

As evidências sugerem que os probióticos exercem várias propriedades biológicas de saúde, sendo um deles a atividade de sais biliares anticolesterolêmicos por meio de hidrólise e assimilação de colesterol (NAGPAL *et al.*, 2012). A seleção de cepas específicas e as provas da sua eficácia resultam em um controle de valores lipêmicos que pode ser explorada para formular novos alimentos probióticos ou suplementos que em contrapartida podem exercer um papel na prevenção de doenças cardiovasculares.

As propriedades de lactobacilos que influenciam a diminuição do colesterol foram avaliadas *in vivo* em vários estudos em humanos e em modelos animais, em sua maioria constituída pelo consumo de suplementos e alimentos fermentados contendo estirpes selecionadas de *Lactobacillus* (KUMAR *et al.*, 2011; JONES *et al.*, 2013). Schillinger *et al.* 2005, em um estudo o qual isolou diferentes *Lactobacillus* de iogurtes comerciais, verificou que todas as estirpes do grupo *L. acidophilus* produziram zonas de precipitação no ensaio de placa BSH.

5. CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos de acordo com os microrganismos testados, pode-se concluir que LA2 utilizado para aplicação em produtos alimentícios fermentados se destacou em relação às outras origens, pois apresentou resistência satisfatória após 3 horas em pH 4,0, o que pode favorecer a colonização do trato intestinal, além de ter apresentado um perfil de resistência à moderada sensibilidade aos antibióticos clindamicina, gentamicina e eritromicina, o que pode favorecer a reposição da flora intestinal durante a

antibioticoterapia. LA2, também apresentou resistência superior às outras origens frente às enzimas digestivas e intestinais, e foi responsável pela maior adesão ao teste MATS.

Isso leva a concluir que se pode ter um efeito probiótico igual, ou melhor, utilizando produtos alimentícios com este tipo de microrganismo do que utilizando produtos adquiridos em farmácias de manipulação ou dispensação. Este efeito é importante do ponto de vista econômico para o paciente, considerando o custo reduzido e a facilidade de acesso a este tipo de produto em relação aos demais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAL, A.K.; SINGH, K. 2007. Recents advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p.240-251.

ARCIERO JC, ERMENTROUT GB, UPPERMAN JS, VODOVOTZ Y, RUBIN JE. Using a mathematical model to analyze the role of probiotics and inflammation in necrotizing enterocolitis. *PLoS One*. 2010;5:e10066.

BARRETO, G.P.de M. *et al.* Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n. 1, p. 36, jan./jun., 2003.

BERTAZZONI-MINELLI, E., & BENINI, A. (2008). Relation ship between number of bacteria and their probiotic effects. **Microbiology and Ecology of Health and Disease**, v.20, p.180 e 183.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução n. 05 de 13 de novembro de 2000. Padrão de identidade e qualidade de leites fermentados. **Diário Oficial**, Brasília, 2007.

BROOKS, G. F., BUTEL, J. S. & MORSE, S. A. **Microbiologia Médica**, 21 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 117-141, 2000.

CEBECI, A., CURAKAN, C. (2003). Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. **Food Microbiology**, v.20, p. 511-518.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. (1998a). Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. **Int. J. of Food Microbiol.** v. 35, n. 1, p. 1-27.

CHARTERIS, W. P., P. M. KELLY, L. MORELLI, and J. K. COLLINS. (1998b). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. **J. Food Prot.** 61:1636-1643.

COLLADO, M.C., ISOLAURI, E., SALMINEN, S., SANZ, Y., (2009). The impact of probiotic on gut health. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Curr. Drug Metab.* 10, 68 e 78.

COPPOLA, R., SUCCI, M., TREMONTE, P., REALE, A., SALZANO, G., & SORRENTINO, E. (2005). Antibiotic susceptibility of *L. rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. **Le Lait**, 85, 193 e 204.

DEL RE, B.; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M.; PALENZONA, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 31, n. 6, p. 438–442.

DE VRESE, M., e SCHREZENMEIR, J. (2008). Probiotics, prebiotics, synbiotics. **Advances on Biochemistry Engineering and Biotechnology**, 111, 1e 66.

DIEP D.B., HÅVARSTEIN L.S., NES I.F. (1995). A bacteriocin-like peptide induces bacteriocin synthesis in *Lactobacillus plantarum* C11. *Mol. Microbiol.* 18:631–639.

ERKKILÄ, S.; PETÄJÄ, E. (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Science**, v. 55, p. 297-300.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization)/ Organization/World Health. Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Londres, Ontário, Canadá: **FAO/WHO**, 2002. 11p.

FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R. Probiotics as modulators of the gut flora. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. S39-S49, 2002.

FUCHS, R. H. B.; TANAMATI, A. A. C. ; MICHELS, C. A. ; GASPARELLO, E. A. ; DONEDA, I. Utilização de *Lactobacillus casei* e cultura iniciadora na obtenção de iogurte suplementado com inulina e oligofrutose. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 24, n.1, p. 83-98, 2006.

GARCIA, S. Isolamento e caracterização de bactérias lácticas para uso como probiótico. (1999). Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

GARDINER, G. E., O’SULLIVAN, E., KELLY, J., AUTY, M. A. E., FITZGERARD, G. F., COLLINS, G. K., ROSS, R. T., & STANTON, C. (2000). **Applied and Environmental Microbiology**, 6, 2605–2612.

GIAOURIS, E.; CHAPOT-CHARTIER, M. P.; BRIANDET, R. (2009). Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 131, n. 1, p. 2–9.

GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M. A. The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n.4, p. 591-606, Dec 2008.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J.F.; INGLIS, V. (1998). A review on the use of microorganisms as probiotics. **Rev. Latinoam. Microbiol.** v.40, p. 166–172.

GONZÁLEZ, S. N.; APELLA, M. C.; ROMERO, N. C.; DE MACÍAS, M. E. N.; OLIVER, G. (1993). Inhibition of enteropathogens by lactobacilli strains used in fermented milk. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v.56, n.9, p.773-776.

GUPTA, P.K.; MITAL, B.K.; GARG, S.K. Characterization of *Lactobacillus acidophilus* strains for use as dietary adjunct. **International J.Food Microbiol.**, v. 29, p. 105–109, 1996.

HUANG, Y.; ADAMS, M. C. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy *Propionibacteria*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 91, p. 253- 260, 2004.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Probiotics. Best Practice & Research. **Clinical Gastroenterology**, v. 18, p. 299-313, 2004.

JONES ML, TOMARO-DUCHESNEAU C, MARTONI CJ, PRAKASH S (2013). Cholesterol lowering with bile salt hydrolase-active probiotic bacteria, mechanism of action, clinical evidence, and future direction for health applications. **Expert Opin Ther** 13:631-642.

KANDLER, O. & WEISS, N. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212^{AL}. In **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol. 2, pp. (1986). Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.

KASTNER, S., PERRETEN, V., BLEULER, K., HUGENSCHMIDT, G., LACROIX, C., MEILE, L. (2006). Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic used in food. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 145-155.

KIM, G. B.; BROCHET, M.; LEE, B. H. (2005.). Cloning and characterization of a bile salt hydrolase (bsh) from *Bifidobacterium adolescentis*. *Biotechnol. Lett.* v.27, p.817–822.

KOS B., SUSKOVIC J., VUKOVIC S., SIMPRAGA M., FRECE J. AND MATOSIC S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**. 94: 981-987

KUMAR, M., NAGPAL, R., KUMAR, R., HEMALATHA, R., VERMA, V., KUMAR, A., et al. Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. **Experimental Diabetes Research**, 1 e 14, 2012.

KUMAR R., GROVER S., BATISH V. K. (2011). Hypocholesterolaemic effect of dietary inclusion of two putative probiotic bile salt hydrolase-producing *Lactobacillus plantarum* strains in Sprague-Dawley rats. *Br. J. Nutr.* 105 561–57310.1017/S0007114510003740.

LARSEN, N., MICHAELSEN, K., PÆRREGAARD, A., VOGENSEN, T., & JAKOBSEN, M. (2009). A comparative study on adhesion and recovery of potential probiotic strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro assay and analysis of human colon biopsies. **Microbial Ecology and Health Disease**, 21, 95 e 99.

LEBEER, S., VANDERLEYDEN, J., DE KEERSMAECKER, S.C., 2008. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 728e764.

MADUREIRA, A. R., SOARES, J. C., PINTADO, M. E., GOMES, A. M. P., FREITAS, A. C., MALCATA, F. X. Sweet whey cheese matrices inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* LAFTI_ L26. **Dairy Science and Technology**, 88, 649 e 665. 2008.

MAHAN, K. L.; ESCOTT-STUMP, S. KRAUSE. (2002): **Alimentos, Nutrição & Dietoterapia**. 10 ed. São Paulo: Roca.

MANGONI, J. Potencial Probiótico de Lactobacilos de origem suína. (2009). 45 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – **Universidade Estadual do Oeste do Paraná**, Marechal Cândido Rondon.

MARCO, M.L., PAVAN, S., KLEEREBEZEM, M., 2006. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 204 e 210.

MARTINS, F. S.; TIAGO, F. C. P.; BARBOSA, F. H. F.; PENNA, F. J.; NARDI, R. M. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. Utilização de leveduras como probióticos. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, v. 5, p. 1-13, 2005.

MATTIA, A., e MERKER, R. Regulation of probiotic substances as ingredients in foods: premarket approval or “generally recognized as safe” notification. **Clinical Infection Disease**, 46, S115 e S118. 2008.

MOOUBACRECK, C.; GAVINI, F., VAUGIEN, L., BUTEL, M. J., DOUCET-POPULAIRE, F. (2005). Antimicrobial susceptibility of bifidobacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, p. 38-44.

MURRAY, P. R., ROSENTHAL, K. S., KOBAYASHI, G. S. & PFALLER, M. A. (2000). **Microbiologia Médica**, 3 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 135-141.

NADER-MACÍAS, M.E.F., OTERO, M.C., ESPECHE, M.C., AND MALDONADO, N.C. (2008). Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 35: 1387–1395.

NAGPAL R, KUMAR A, KUMAR M, BEHARE PV, JAIN S, YADAV H (2012). Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. **FEMS Microbiol Lett** 334:1–15. doi:10. 1111/j.1574-6968.2012.02593.x

NARDI, R.M.; SANTORO, M.M.; OLIVEIRA, J.S.; PIMENTA, A.M.; FERRAZ, V.P.; BENCHETRIT, L.C.; NICOLI, J.R. Purification and molecular characterization of antibacterial compounds produced by *Lactobacillus murinus* strain L1. **J Appl Microbiol.**, v. 99, p. 649-656, 2005.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS – NCCLS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard.** Document M2-A8. 8th ed. Wayne: NCCLS; 2003.

NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. (2003). Probióticos, prebióticos y simbióticos: Moduladores del sistema digestivo. **Ciencia Hoy**, v. 13, n. 75, p. 39-43.

OCAÑA, V.; SILVA, C.; NADER-MACÍAS, M. E. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic vaginal Lactobacilli. **Infect. Dis. Obstet. Gynecol.**, v.2006, p.1-6, 2006, doi: 10.1155/idog.2006.18.182

OLIVEIRA, A.A.P. Pesquisa de substâncias tipo bacteriocina produzidas por amostras do gênero *Fusobacterium* isoladas da cavidade oral de primatas humanos e não humanos, Belo Horizonte, 2006. **Dissertação (Mestrado)- Instituto de Ciências Biológicas** – Universidade Federal de Minas Gerais.

PARK, S.C.; HWANG, M.H. ; KIM², Y.H.; Kim, J.C.; SONG, J.C.; LEE, K.W.; JEONG, K.S.; RHEE, M.H.; KIM, K.S.; KIM, T.W. Comparison of pH and bile resistance of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from rat, pig, chicken, and human sources. **World J.I of Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, p.

PELLETIER C, BOULEY C, CAYUELA C, BOUTTIER S, BOURLIOUX P, BELLON-FONTAINE MN. (1997). Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1725-1731.

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, 2007.

PITHVA S, SHEKH S, DAVE J, VYAS BR. Probiotic attributes of autochthonous *Lactobacillus rhamnosus* strains of human origin. **Appl Biochem Biotechnol.** 2014 May;173(1):259-77. doi: 10.1007/s12010-014-0839-9. Epub 2014 Mar 30.

PYAR, HASSAN; PEH, KOK-KHIANG. Enteric coating of granules containing the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **Acta Pharmaceutica** (Zagreb, Croatia), 2014, Vol.64(2), pp.247-56;

REDONDO, N. C. Avaliação in vitro de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416, **Dissertação (mestrado)**: 2008.

ROSENBERG, M., GUTNICK, D. AND ROSENBERG, E. (1980) Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* 9, 29–33.

SAAD, S., (2006). Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**; vol. 42, n. 1, jan./mar.

SATHYABAMA, S., VIJAYABHARATHI, R., BRUNTHA devi, P., RANJITHKUMAR, M., & Brinda Priyadarisini, V. (2012). **Journal of Microbiology**, 50, 603–612.

SAVARD, P., LAMARCHE, B., PARADIS, M. E., Thiboutot, H., Laurin, E., & Roy, D. (2011). Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. **International Journal of Food Microbiology**, 149, 50e 57.

SCHILLINGER, U., Guigas, C., & Holzapfel, W. H. (2005). **International Dairy Journal**, 15, 1289–1297.

SERVIN AL (2004) Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews** 28(4): 405-440.

SILVA, C.H.P.M. (1999). **Bacteriologia: um texto ilustrado**, Teresópolis: Eventos, p. 107-119.

STENGER MR, REBER KM, GIANNONE PJ, NANKERVIS CA. (2011). Probiotics and prebiotics for the prevention of necrotizing enterocolitis. **Curr Infect Dis Rep.**;13:13-20.

TAHRI, K.; CROCIANI, J.; BALLONGUE, J.; SCHNEIDER, F. Effects of three strains of bifidobacteris on cholesterol. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.21, p. 149-151, 1995.

TANAKA, H.; HASHIBA, H.; KOK, J.; MIERAU, I. (2000). Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum*: biochemical and genetic characterization. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, p.2502–2512.

TARANTO, M. P.; DE LLANO, D. G.; RODRIGUEZ, A. ; DE RUIZ HOLGADO, A. P.; FONT DE VALDEZ, G. Bile tolerance and cholesterol reduction by *Enterococcus faecium*, a candidate microorganism for the use as a dietary adjunct in milk products. *Milchwissenschaft*, v. 51, p.383–385, 1996

TEITELBAUM, J. E.; WALKER, W. A. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. **Annual Reviews Nutrition**, v. 22, p. 107-138, 2002.

THUMU S. C, HALAMI P. M. (2012). Acquired resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotics in lactic Acid bacteria of food origin. **Indian J Microbiol.** Dec;52(4):530-7.

VAN REENEN, C.A., DICKS, L.M. (2011). Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. **Arch. Microbiol.** M193, 157–168.

VIZOSO PINTO, MARIA G. ; FRANZ, CHARLES M.A.P. ; SCHILLINGER, ULRICH; HOLZAPFEL, WILHELM H.; *Lactobacillus spp.*, with in vitro probiotic

properties from human faeces and traditional fermented products **International Journal of Food Microbiology**, 2006, Vol.109(3), pp.205-214.

ZAYED, G.; WINTER, J. Batch and continuous production of lactic acid from salt whey using free and immobilized cultures of *Lactobacilli*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Berlin, v. 44, n. 3-4, p. 362-366, 1995.

ZHOU, J. S., PILLIDGEC, C. J., GOPALC, P. K., GILLA, H. S. (2005). Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **International Journal of Food Microbiology**, 98, 211e217.