

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - *CAMPUS* DE CASCAVEL  
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ATIVIDADE DE *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 SOBRE  
BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ISOLADAS DE AMBIENTE HOSPITALAR**

**DIELY MELONARI DALLA COSTA**

**CASCAVEL – PR  
2020**

**DIELY MELONARI DALLA COSTA**

**ATIVIDADE DE *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 SOBRE  
BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ISOLADAS DE AMBIENTE HOSPITALAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas e em saúde.

Orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thais Soprani Ayala  
Co-orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana  
Oliveira de Fariña

**CASCADEL – PR  
2020**

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Dalla Costa, Diely Melonari

Atividade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 sobre bactérias patogênicas isoladas de ambiente hospitalar / Diely Melonari Dalla Costa; orientador(a), Thais Soprani Ayala; coorientador(a), Luciana Oliveira de Fariña, 2020.

48 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2020.

1. probióticos. 2. bifidobactéria. 3. resistência bacteriana. 4. susceptibilidade. I. Ayala, Thais Soprani. II. Fariña, Luciana Oliveira de. III. Título.

DIELY MELONARI DALLA COSTA

**ATIVIDADE DE *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS ISOLADAS DE AMBIENTE HOSPITALAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestre(a) em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Prospecção de microrganismos e substâncias bioativas com aplicações biotecnológicas e em saúde.

Orientador (a): Prof. Dra. Thais Soprani Ayala  
Co-orientador (a): Prof. Dra. Luciana Oliveira de Fariña

**BANCA EXAMINADORA:**



---

Prof<sup>ª</sup>. Dra Thais Soprani Ayala  
*Universidade Estadual do Oeste do Paraná*  
UNIOESTE  
Orientador



---

Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli  
*Universidade Estadual do Oeste do Paraná*  
UNIOESTE



---

Prof. Dr. Leonardo Mendes Bella  
Universidade Anhembi Morumbi / CisBem

## BIOGRAFIA

Natural de Boa Vista da Aparecida, Paraná, Brasil, nascida no dia 28 de junho de 1992, graduada em Biomedicina pela Universidade Paranaense (2015). Especialista em Microbiologia pela mesma instituição (2017) e Biotecnologia e Bioprocessos pela Universidade Estadual de Maringá (2019). Atuou com análises microbiológicas em amostras biológicas humanas e assessoria científica (Laboratório Alvaro/DASA – 2011/2018) e com análises microbiológicas em alimentos (A3Q laboratório – 2018/2019). Ingressou no Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em nível de mestrado em Ciências Farmacêuticas no ano de 2018. Atualmente é docente na Universidade Paranaense, unidade Cascavel.

*“A alegria não chega apenas com o encontro do achado,  
mas faz parte do processo de busca.”*

(Paulo Freire)

À Deus, à minha família.

## AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos às professoras que fizeram parte da minha caminhada: Juliana Côrrea, minha primeira orientadora, pelo acolhimento e encaminhamento inicial, Nereida Gioppo e Luzia Neri por suas críticas construtivas e importantes sugestões com a parte experimental.

Meu reconhecimento também à Thaina Kipper e Maria Alberton por toda a parceria e colaboração em laboratório. A dedicação prestada por vocês fora de grandiosa importância no desenvolvimento deste projeto.

À Thais Ayala e Luciana Fariña, minhas orientadoras, obrigada pelo encorajamento em desenvolver o projeto, pelos abraços e compreensão nos momentos de desespero, pelos ensinamentos compartilhados e a amizade construída.

Aos meus amigos de trabalho e vida, por entender meus momentos de ausência e pelas palavras de motivação. E a todos aqueles que, em algum momento, me apoiaram e incentivaram, obrigada.

Por fim, mas não menos importante, à minha família, que apoiou meu sonho e a entrada no Programa, e as mudanças de vida implicadas. Ao meu esposo Jean, por estar ao meu lado, meu companheiro, pela paciência nos dias conturbados. Vocês são a razão da minha luta, e de parcela incalculável em meu coração.

E ao criador de tudo e todos, nosso Deus, pela sabedoria e por sempre iluminar meus caminhos, minha gratidão.

## ATIVIDADE DE *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 SOBRE BACTÉRIAS PATOGENICAS ISOLADAS DE AMBIENTE HOSPITALAR

### RESUMO

Probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Entre várias aplicações destaca-se a regulação da microbiota intestinal. Apresentam atividade antibacteriana frente diversas espécies Gram-positivas e negativas através de alguns mecanismos de ação, sendo o principal sugerido a capacidade de produção de substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas. *Bifidobacterium* é um gênero bacteriano probiótico presente na microbiota de alguns sítios humanos, sendo a espécie *B. animalis* subsp. *lactis* uma das cepas conhecidas com bons resultados de sua ação probiótica, mas pouco explorada em relação à atividade antibacteriana. Os crescentes relatos de resistência, principalmente nosocomiais, e a busca por novos agentes antimicrobianos justificam a realização deste trabalho, que objetivou avaliar a atividade do sobrenadante livre de células (CFS) da cultura de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 contra *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase e *Escherichia coli* produtora de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) isoladas de ambiente hospitalar. O CFS da cepa probiótica foi testado utilizando três métodos. Para todos, os microrganismos patógenos foram preparados em suspensões de solução salina a 0,89%, ajustados à escala 0,5 de McFarland. Por difusão em ágar, a suspensão foi semeada em placa e 40 µL do sobrenadante foram adicionados à poços confeccionados no *soft ágar* a fim de permitir a difusão do CFS pelo meio. Na metodologia com disco-difusão, o CFS em teste foi aplicado sobre discos previamente esterilizados, no mesmo volume de 40 µL, também sobre placas com semeadura prévia das soluções ajustadas. Para ambos foram testados em conjunto poços e discos de controle negativo com solução salina a 0,89% estéril. Já na microdiluição em caldo, a atividade antimicrobiana foi avaliada com a utilização de 100 µL do CFS sobre mesmo volume de cada suspensão microbiana. Também foram aplicados na microplaca poços com controle de esterilidade (apenas com caldo Brain Heart Infusion - BHI) e controle de crescimento, (caldo BHI + suspensão bacteriana). Os resultados evidenciaram que o CFS não foi capaz de inibir o crescimento das cepas patógenas e ensejam a necessidade de estudos posteriores que visem a otimização do crescimento da *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 que favoreçam a produção de bacteriocinas e permitam melhor investigar a ação antimicrobiana *in vitro*.

**PARAVRAS-CHAVE:** probióticos, bifidobactéria, resistência bacteriana, susceptibilidade, antagonismo.

## ***Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 ACTIVITY ON PATHOGENIC BACTERIA ISOLATED IN HOSPITAL ENVIRONMENT**

### **ABSTRACT**

Probiotics are living microorganisms that, when administered in appropriate amounts, confer benefits to the health of the host. Among several applications the regulation of intestinal microbiota stands out. They present antibacterial activity in front of several Gram-positive and negative species through some action mechanisms, being the main suggested the capacity of production of antimicrobial substances, as the bacteriocins. *Bifidobacterium* is a probiotic bacterial genus present in the microbiota of some human sites, being the species *B. animalis* subsp. *lactis* one of the known strains with good results of its probiotic action, but little explored in relation to the antibacterial activity. The growing reports of resistance, mainly nosocomial, and the search for new antimicrobial agents justify the realization of this work, which aimed to evaluate the activity of the cell-free supernatant (CFS) of *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 culture against methylicin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* and extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* (ESBL) isolated from hospital environment. The CFS of the probiotic strain was tested using three methods. For all, pathogenic microorganisms were prepared in 0.89% saline suspension, adjusted to McFarland's 0.5 scale. By diffusion on agar, the suspension was sown in plate and 40 µL of the supernatant was added to the wells made in the soft agar in order to allow the diffusion of CFS through the medium. In the disc-diffusion methodology, the CFS in test was applied on previously sterilized discs, in the same volume of 40 µL, also on plates with previous sowing of the adjusted solutions. For both were tested together with negative control wells and discs with 0.89% sterile saline solution. For the microdilution in the broth, the antimicrobial activity was evaluated using 100 µL of CFS on the same volume of each microbial suspension. They were also applied in the microplate wells with sterility control (only with Brain Heart Infusion broth - BHI) and growth control, (BHI broth + bacterial suspension). The results showed that CFS was not able to inhibit the growth of pathogenic strains and there is a need for further studies to optimize the growth of *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 that favor the production of bacteriocins and allow better investigation of the antimicrobial action *in vitro*.

**KEY-WORDS:** probiotics, bifidobacteria, bacterial resistance, susceptibility, antagonism.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	1
LISTA DE FIGURAS .....	2
1 INTRODUÇÃO .....	3
2 OBJETIVOS .....	5
2.1 Objetivo geral.....	5
2.2 Objetivos específicos.....	5
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	6
3.1 Probióticos .....	6
3.1.1 Mecanismo de ação probiótico.....	7
3.2 Gênero <i>Bifidobacterium</i> e <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> .....	8
3.3 Aplicações clínicas.....	9
3.4 Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação das bacteriocinas .....	10
3.5 Resistência bacteriana e infecções hospitalares .....	12
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	15
4.1 Microrganismos .....	15
4.2 Ativação de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1 .....	15
4.3 Ativação das cepas patogênicas .....	15
4.4 Testes fenotípicos das características de resistência .....	16
4.5 Obtenção do sobrenadante livre de células (CFS) da cultura de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1.....	18
4.6 Atividade antibacteriana do sobrenadante livre de células da cultura de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> .....	18
4.6.1 Atividade antibacteriana por difusão em ágar .....	19
4.6.2 Atividade antibacteriana por disco-difusão .....	20
4.6.3 Atividade antibacteriana por microdiluição em caldo.....	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
5.1 Testes fenotípicos das características de resistência .....	23
5.2 Atividade antibacteriana do CSF sobre as bactérias .....	24
5.2.1 Atividade antibacteriana por difusão em ágar .....	24
5.2.2 Atividade antibacteriana por disco-difusão .....	26
5.2.3 Atividade antibacteriana por microdiluição em caldo.....	27
6 CONCLUSÕES .....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Distribuição dos tratamentos ou inoculações do teste por microdiluição em caldo.....	21
Tabela 2 Leitura dos halos de inibição do teste fenotípico de resistência das cepas de <i>S. aureus</i> à meticilina. Interpretação conforme orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica (BRCAST, 2018).....	23

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquematização do mecanismo de ação de probióticos (adaptado de LINARES; ROSS; STANTON, 2016 e DALIRI; LEE, 2015). .....	7
Figura 2 Representação esquemática da ativação de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1. ....	15
Figura 3 Representação esquemática da ativação das cepas patogênicas. ....	16
Figura 4 Representação esquemática da obtenção do sobrenadante livre de células (CFS) da cultura de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> INL1. ....	18
Figura 5 Representação esquemática do método de difusão em ágar. ....	19
Figura 6 Representação esquemática do método de disco-difusão. ....	20
Figura 7 Esquematização do método de microdiluição em caldo. ....	22
Figura 8 Confirmação fenotípica das resistências das cepas Gram-negativas: a – <i>E. coli</i> ESBL (o teste TSDD se mostra positivo quando há aumento no halo de inibição de qualquer disco em direção ao disco com ácido clavulânico, conforme indicado pelas setas na figura) e b – <i>K. pneumoniae</i> produtora de carbapenemase; 1 - <i>E. coli</i> ATCC 25922; 2 – cepa teste (o teste de Hogde confirma a produção de carbapenemase quando há distorção no halo de inibição, conforme seta indicativa na figura). ....	24
Figura 9 Difusão em ágar: a – <i>S. aureus</i> MRSA; a – <i>K. pneumoniae</i> produtora de carbapenemase; c – <i>E. coli</i> ESBL; 1 – poço controle com solução salina; 2, 3, 4 e 5 – poços teste com CFS. ....	25
Figura 10 Disco-difusão: a – <i>S. aureus</i> MRSA; b – <i>K. pneumoniae</i> produtora de carbapenemase; c – <i>E. coli</i> ESBL; 1 – poços controle com solução salina; 2 e 3 – poços teste com CFS. ....	26
Figura 11 Susceptibilidade das cepas patogênicas frente aplicação do CFS em microdiluição: a – controle de crescimento (constituído de BHI e cepa patogênica); b – controle de esterilidade (constituído apenas de BHI); c – teste (constituído de BHI, cepa patogênica e CFS); 1 – coluna de <i>S. aureus</i> MRSA; 2 – coluna de <i>K. pneumoniae</i> produtora de carbapenemase; 3 – coluna de <i>E. coli</i> ESBL. ....	27

## 1 INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal dos mamíferos tem como principal função a digestão e absorção dos alimentos, e estes processos são favorecidos pela presença de centenas de espécies de microrganismos. Patogênicas ou saprófitas, todas buscam a sobrevivência continuamente em uma competição equilibrada, até que algum fator desfaça este equilíbrio, seja ele tratamento com antimicrobianos ou antineoplásicos, situações de estresse e até dieta.

Nesta microbiota variada, entre as espécies que se sobressaem em indivíduos saudáveis, encontram-se as do gênero *Bifidobacterium*, que constituem atualmente uma subdivisão conhecida por bactérias probióticas.

A definição mais aceita no mundo indica que esses microrganismos vivos conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando consumidos em quantidades adequadas. Possuem, por exemplo, a propriedade de repor uma microbiota intestinal em desequilíbrio e aumentar a absorção de minerais e produção de vitaminas. São utilizados no tratamento de diarreias, modulação imunológica, no controle de colesterol e hipertensão e apresentam capacidade de inibir o crescimento de outros microrganismos.

Os mecanismos dos microrganismos probióticos não foram entendidos claramente, mas estudos em modelos animais indicam que, provavelmente, os efeitos benéficos conhecidos resultam da interação entre as diversas cepas nos sítios de ação por meio de competição por regiões na parede intestinal e por nutrientes. Além disso, há estimulação da produção de substâncias que estabilizam a barreira intestinal e de compostos antimicrobianos, como ácidos láctico e acético e bacteriocinas.

As bacteriocinas são peptídeos ribossomais que têm atraído grande atenção para pesquisas científicas devido às características antimicrobianas apresentadas. A capacidade de interferir na permeabilidade da membrana celular e no material genético de outros organismos patogênicos ao ser humano traz oportunidades de exploração deste composto produzido por probióticos.

Nas últimas décadas, o crescente desenvolvimento de bactérias patogênicas resistentes tem se tornando uma preocupação quanto à saúde pública mundial, visto os altos índices de mortalidade principalmente em pacientes imunocomprometidos e em ambiente hospitalar. Essa resistência pode ser atribuída tanto ao processo evolutivo natural dos microrganismos como também pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, entre outros fatores.

A descoberta de novos antimicrobianos é objeto de várias pesquisas e os produtos naturais são uma das principais fontes de exploração, derivadas de bactérias, microrganismos eucarióticos e plantas.

Em razão da constante preocupação em relação à resistência bacteriana desenvolvida a antimicrobianos convencionais e da observação de que diversas cepas do gênero *Bifidobacterium* apresentam ação contra bactérias patogênicas, realizou-se aqui um estudo sobre a atividade do produto de cultivo de uma cepa do gênero probiótico sobre bactérias resistentes hospitalares.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Verificar a ação antibacteriana *in vitro* do sobrenadante de cultura de *Bifidobacterium. animalis* subsp. *lactis* INL1 sobre cepas bacterianas resistentes isoladas de ambiente hospitalar.

### 2.2 Objetivos específicos

- Reativar a cepa liofilizada de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 e obter o sobrenadante da cultura livre de células (CFS);
- Realizar a manutenção das cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase e *Escherichia coli* produtora de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) por repique em meios de cultivo;
- Avaliar a atividade antibacteriana do CFS da *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 frente as cepas patogênicas por meio dos métodos de difusão em ágar, disco-difusão e microdiluição.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Probióticos

A origem dos efeitos benéficos dos probióticos foi proposta no início do século XX pelo microbiologista russo Eli Metchnikoff, na teoria de que a vida poderia ser prolongada baseada no consumo diário de leites fermentados pelos povos dos Bálcans (PEREIRA, 2012). Os experimentos de Metchnikoff sugeriam que bactérias ácido-lácticas conseguiam se estabelecer no trato intestinal, reduzindo o número de bactérias putrefativas (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

O termo “probiótico” foi adotado pela primeira vez por Lilly e Stillwell (1965), como definição de organismos capazes de estimular o crescimento de outros organismos. Roy Fuller, em 1989, foi pioneiro na idealização de que os probióticos provocam um efeito benéfico ao hospedeiro (AMARAL, 2015).

No Brasil, a definição de probiótico é “microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde” (BRASIL, 2002), mas o conceito de probiótico mais aceito internacionalmente é o adotado pela Organização da Agricultura e Alimentação (FAO) das Nações Unidas e Organização Mundial de Saúde (WHO), de que os probióticos são “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002).

Diversos benefícios à saúde já foram atribuídos ao uso de produtos que contêm probióticos, enquanto outros, promissores em modelo animal, ainda requerem estudos em humanos para amparar as alegações. Além disso, os benefícios não são fornecidos igualmente por todas as espécies, nem mesmo por todas as cepas de uma mesma espécie (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Capazes de prevenir patologias, como diarreia, câncer de cólon, doença de Chron, intolerância à lactose, regular a microbiota intestinal e prevenir distúrbios no metabolismo gastrointestinal, os probióticos também são utilizados em outras práticas clínicas, como no controle do colesterol (OLIVEIRA; ALMEIDA; BOMFIM, 2017).

Os probióticos podem tanto ser incorporados na alimentação como podem existir naturalmente em alimentos funcionais e, ainda, podem ser ingeridos separadamente como medicamentos ou suplementos (THOMAS; GREER; Committee on Nutrition, 2010). Vários microrganismos são utilizados como probióticos: bactérias ácido-lácticas, bactérias não ácido-lácticas e leveduras (SANTOS; BARBOSA;

BARBOSA, 2011). As bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* recebem maior destaque devido a uma longa trajetória de utilização segura (LINARES; ROSS; STANTON, 2016), além disso, como são isoladas do humano saudável, sugere-se que elas podem desempenhar melhor seus efeitos benéficos, uma vez que estariam em um ambiente similar ao qual foram isoladas (PEREIRA, 2012).

### 3.1.1 Mecanismo de ação probiótico

O mecanismo definitivo da ação das bactérias probióticas ainda não foi entendido claramente (DALIRI; LEE, 2015), porém, a literatura propõe os mesmos atribuídos à microbiota intestinal: competição por receptores intestinais, competição por nutrientes essenciais, restauração da alteração de permeabilidade intestinal, produção de substâncias antimicrobianas, como ácidos orgânicos e bacteriocinas, e modulação do sistema imune, conforme esquematizado na Figura 1 (AMARAL, 2015; MORAIS; JACOB, 2006; CAST, 2007; JUNGENSEN et al., 2014; SOUZA, 2012).

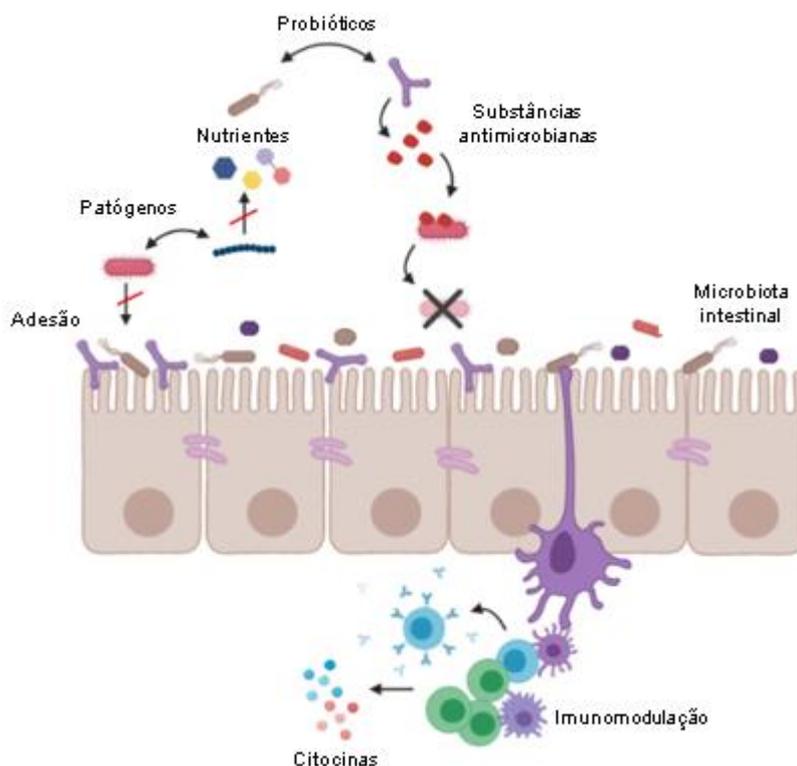


Figura 1 Esquematização do mecanismo de ação de probióticos (adaptado de LINARES; ROSS; STANTON, 2016 e DALIRI; LEE, 2015).

No mecanismo relacionado à competição por sítios de ligação, os probióticos ocupam os receptores da mucosa intestinal, formando uma barreira física, de modo

que bactérias patogênicas seriam excluídas por competição de espaço (DOBROGOSZ et al., 1989).

A restauração da permeabilidade gastrointestinal pode ser atribuída à estimulação da produção de mucina, que auxilia na integridade das junções das células epiteliais do intestino, o que aumenta a resistência da mucosa contra o trânsito de bactérias e suas toxinas (CAST, 2007).

A imunomodulação ocorre principalmente pela estimulação de células dendríticas do intestino e células T. O contato entre as superfícies externas das células via receptores *Toll-like* e *DC-SIGN* e dos probióticos leva à produção de citocinas que agem na apresentação de antígenos e à estimulação de polarização de células T em células T regulatórias e auxiliares (LEBEER; VANDERLEYDEN; KEERSMAECKER, 2010).

### **3.2 Gênero *Bifidobacterium* e *B. animalis* subsp. *lactis***

As bifidobactérias foram isoladas e descritas originalmente no período de 1899-1900 por Henry Tissier, ao observar em grande quantidade uma bactéria em forma de Y nas fezes de bebês com aleitamento materno em comparação com os bebês alimentados com outras fontes de leite. Foi denominada inicialmente como *Bacillus bifidus*; porém, o microbiologista Orla-Jensen sugeriu, em 1924, que a espécie *B. bifidus* fosse classificada separadamente, sob o gênero *Bifidobacterium*. Não havendo ainda um consenso taxonômico, foi classificada como membro do gênero *Lactobacillus* durante grande parte do século XX (LEAHY et al., 2005).

O gênero *Bifidobacterium* engloba bactérias de caráter anaeróbico, Gram-positivas, de motilidade e catalase negativas, em forma de bacilos curtos e curvados e bacilos bifurcados, encontradas no trato gastrointestinal, cavidade oral e na vagina de mamíferos (FIJAN, 2014; BUNESOVA et al., 2017; NOGUEIRA; GONÇALVES, 2011). Em humanos, após um mês de nascimento o intestino do bebê estará ocupado com 80% de bifidobactérias, mantendo-se em quantidade estável até a idade adulta, quando declina. Sua população sofre influência pela dieta, uso de antimicrobianos e estresse (PEREIRA, 2012).

Capazes de fermentar glicose em ácidos láctico e acético por meio de uma via metabólica com a presença da enzima frutose-6-fosfato fosfocetolase (F6PPK) (GOMES; MALCATA, 1999), as espécies do gênero *Bifidobacterium* também são conhecidas por sua resistência aos sais biliares, característica muito importante para

as bactérias probióticas, pois estabelece sua sobrevivência no trato gastrointestinal e desempenho do seu papel probiótico (RUIZ; MARGOLLES; SÁNCHEZ, 2013).

De modo geral, o fenômeno de resistência aos sais biliares é multifatorial e envolve processos que visam neutralizar efeitos nocivos sobre as estruturas bacterianas por meio da hidrólise e efluxo dos sais e alterações na composição da membrana e parede celular bacteriana (KUMAR et al., 2006; RUIZ et al., 2012; GÓMEZ-ZAVAGLIA et al., 2002).

*Bifidobacterium lactis* (DSM 10140) foi isolada de iogurte e descrita primeiramente como uma espécie única do gênero *Bifidobacterium* (MEILE et al., 1997), porém, uma análise taxonômica polifásica posterior a reclassificou como *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (MASCO et al., 2004). Naturalmente, seu habitat é o trato gastrointestinal de animais, como o das galinhas, mas principalmente de mamíferos, como os coelhos, cães e inclusive o homem (BUNESOVA et al., 2017).

Diferente de outras bifidobactérias, apresenta certa tolerância ao oxigênio, sobrevivência durante exposição à pH 3,5, viabilidade durante o armazenamento refrigerado prolongado e também uma resistência intrínseca a estresses tecnológicos e fisiológicos, características que permitem sua utilização em diversos produtos comerciais em condições não anaeróbicas, principalmente lácteos, suplementos alimentares e preparações farmacêuticas (MASCO et al., 2004; LEAHY et al., 2005; KAILASAPATHY; HARMSTORF; PHILLIPS, 2008; MARGOLLES; SANCHÉZ, 2012).

A relação simbiótica da subespécie com o hospedeiro e os benefícios ocasionados são considerados por suas propriedades imunomoduladoras e antimicrobianas (BIAVATI et al., 2000; GILL et al, 2000; SINGH; DAMLE; CHAWLA, 2011; TOIVIAINEN et al., 2015).

### **3.3 Aplicações clínicas**

De modo geral, os probióticos contribuem no controle da microbiota intestinal, estabilizando a mesma após o uso de antimicrobianos, promovendo resistência gastrointestinal à colonização de patógenos, conferindo melhoria na digestão de lactose em indivíduos intolerantes, aliviando a constipação e proporcionando aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas (PEREIRA, 2012).

A utilização de probióticos se mostra eficaz na profilaxia de diarreias em crianças desnutridas ou em pacientes hospitalizados, diarreia em viajantes, diarreia associada a antibióticos, bem como outras diarreias bacterianas e proteção contra

atividade de *Helicobacter pylori* (LINARES; ROSS; STANTON, 2016; GUARNER; MALAGELADA, 2003). Os resultados satisfatórios nas alterações gastrointestinais ocorrem supostamente pela redução da permeabilidade intestinal e pelas características anti-inflamatórias, conforme retratado na Figura 1 (VARAVALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008). Já a capacidade de quebra de proteínas com potencial alergênico no trato gastrointestinal pelos probióticos minimiza a alergenicidade das proteínas e reduz o risco de alergia alimentar (MORAIS; JACOB, 2006).

Além disso, os probióticos também têm demonstrado ação em casos de neoplasia e hipercolesterolemia, restauração da microbiota vaginal, na dermatologia e no tratamento de diabetes (MATOS, 2010; OLIVEIRA; ALMEIDA; BOMFIM, 2017).

### **3.4 Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação das bacteriocinas**

Várias bactérias probióticas têm demonstrado capacidade de produzir substâncias antimicrobianas, que incluem ácidos orgânicos (ácido láctico e ácido acético), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, bem como bacteriocinas (CAST, 2007). No que diz respeito à atividade antimicrobiana de bifidobactérias, incluindo a subespécie *lactis*, essas são capazes de sintetizar ácidos orgânicos e bacteriocinas (MARTINEZ et al., 2013).

Os ácidos láctico e acético possuem efeito bactericida ou bacteriostático devido, em parte, à sua capacidade de redução do pH no trato gastrointestinal, inativando uma gama de bactérias Gram-negativas (VASILJEVIC; SHAH, 2008). Além disso, estes ácidos, quando na forma não dissociada, são capazes de atravessar a membrana celular, reduzindo o pH intracelular microbiano, interferindo nas funções metabólicas do microrganismo afetado (NAIDU; BIDLACK; CLEMENS, 1999).

As bacteriocinas são peptídeos antimicrobianos sintetizados pelos ribossomos das bactérias probióticas, sendo ativas contra outras bactérias, seja da mesma espécie ou de outros gêneros, mas sem atividade para a cepa probiótica produtora (MARTINEZ et al., 2013). Ozdemir et al. (2011) apontaram que a origem das bactérias probióticas não determina um espectro de inibição das bacteriocinas.

O modo de ação das bacteriocinas pode envolver atividades bactericidas ou bacteriostáticas (KARPINSKI; SZKARADKIEWICZ, 2016). A maioria delas demonstra interação com os fosfolipídios presentes na membrana plasmática das bactérias-alvo, apresentando maior atividade contra bactérias Gram-positivas, visto que estas se caracterizam por um alto teor lipídico na membrana (ZACHAROF; LOVITT, 2012;

GUILHELMELLI et al., 2013). Para atuação das bacteriocinas também em bactérias Gram-negativas, estas necessitam atravessar a parede celular externa para alcançar a membrana plasmática da célula-alvo (COTTER et al., 2013).

Após ligação com os fosfolipídios presentes na membrana plasmática, as bacteriocinas são inseridas na membrana, formando agregados proteicos que resultam na formação de poros e alteram a permeabilidade, favorecendo a saída de íons como potássio, magnésio e fósforo, aminoácidos e ATP. O baixo nível desses componentes na célula bacteriana resulta na inibição do DNA, da síntese de RNA e proteínas, provocando a morte da célula bacteriana (MONTVILLE; CHEN, 1998). A ligação com a membrana celular e formação desses poros pode levar também à despolarização da camada externa de peptídeoglicano, com conseqüente degradação e até mesmo inibição de sua síntese (KARPINSKI; SZKARADKIEWICZ, 2016).

Outro mecanismo de atividade das bacteriocinas envolve sua interação com outros componentes da membrana celular bacteriana, como ácidos teicoico, lipoteicoico e teicurônico, o que promove a liberação de enzimas autolíticas bacterianas que resultam na autólise celular (KARPINSKI; SZKARADKIEWICZ, 2016).

Esses peptídeos se diferenciam dos antimicrobianos visto que o espectro de morte é relativamente restrito, não apresentam toxicidade conhecida para células eucarióticas, geralmente são termorresistentes e são inativos quando na presença de enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal (RILEY; WERTZ, 2002; OGAKI, FURLANETO; MAIA, 2015). São produzidos tanto por gêneros Gram-positivos como Gram-negativos (KARPINSKI; SZKARADKIEWICZ, 2016), porém os provenientes de bactérias Gram-positivas têm recebido atenção devido ao seu status GRAS (*Generally Recognized as Safe*), no qual são reconhecidos como seguros pelo FDA (United States Food and Drug Administration), por isso seu potencial uso como aditivo na conservação de alimentos (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015).

A maior parte das pesquisas envolvendo bacteriocinas teve foco na produção e investigação de peptídeos produzidos por bactérias ácido lácticas (LAB) como *Lactococcus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Enterococcus spp.* e *Pediococcus spp.* (KLAENHAMMER, 1993), sendo a nisina o exemplo mais conhecido: descoberta em 1928, produzida por cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, aprovada em 1988 pela Food and Drug Administration (FDA) para utilização em vários alimentos processados (GALVEZ et al., 2008).

A produção de bacteriocinas por bifidobactérias não é muito documentada; porém algumas descobertas já são bem aceitas na comunidade científica, como a

bifidina e a bifidocina B isoladas de *B. bifidum* (ANAND et al., 1984; 1985; YILDIRIM; JOHNSON, 1999) bifidina I de *B. infantis* (CHEIKHYOUSSEF et al., 2010), bifilong e bisina de *B. longum* (KANG et al., 1989; LEE et al., 2011), termofilicina de *B. thermophilum* (vonAH, 2006) e bifilato de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (SALEH; EL-SAYED, 2004).

As bifidobactérias demonstram taxas de crescimento mais satisfatórias em meios sintéticos ricos, como extrato de levedura e caldo MRS (Man, Rogosa e Sharpe) (GOMES; MACATA, 1999), sendo que a produção de bacteriocinas ocorre em todas as fases de crescimento da bactéria produtora, com maior frequência nas fases exponencial tardia e início da fase estacionária, não sendo consideradas metabólitos secundários (TAGG; DAJANI; WANNAMAKER, 1976; SAVADOGO et al., 2006; RILEY, 2011).

As bacteriocinas de bifidobactérias são geralmente termoestáveis, são resistentes à refrigeração e congelamento e apresentam variações de estabilidade em diferentes faixas de pH; mas, infelizmente, as concentrações obtidas são regularmente baixas, dificultando sua purificação e posterior aplicação (MARTINEZ et al., 2013; SARKAR; MANDAL, 2016). A natureza proteica que apresentam as tornam resistentes à ação de algumas enzimas, como amilase e lipase, porém sensíveis a proteinases (COLLADO et al, 2005).

As técnicas de triagem mais comumente utilizadas para avaliar a atividade inibitória de bacteriocinas são os tradicionais ensaios de difusão em disco e de difusão em poço. Os organismos em teste são inoculados em meios “soft” ágar e o sobrenadante livre de células preparado por centrifugação é preenchido no disco ou poço. A inibição é determinada pela presença de zonas livres de crescimento ao redor das áreas de difusão após incubação (ZOU et al., 2018).

As bacteriocinas são aplicadas principalmente na preservação de alimentos contra microrganismos contaminantes, porém a resistência bacteriana frente a antibióticos demonstra uma oportunidade para melhor exploração do mecanismo de ação desses compostos e, assim, a realização de novos estudos sobre sua aplicação contra microrganismos resistentes e indesejáveis, como os presentes no ambiente hospitalar (CHIKINDAS et al., 2018, SARKAR; MANDAL, 2016).

### **3.5 Resistência bacteriana e infecções hospitalares**

Por muitos anos as drogas antibacterianas foram consideradas a panaceia na cura de infecções, com uso apropriado ou não, e independente se a infecção foi adquirida na comunidade ou em ambiente hospitalar; porém, em seu discurso no Prêmio Nobel em 1945, o descobridor da penicilina, Alexander Fleming, já alertava que as bactérias poderiam se tornar resistentes (WHO, 2014).

Os antimicrobianos se tornaram uma das intervenções médicas mais importantes no desenvolvimento de procedimentos mais complexos, como transplante de órgãos, cirurgias de alta complexidade, manejo de pacientes neoplásicos, entre outros, mas essas realizações terapêuticas são ameaçadas com o aumento de microrganismos resistentes, podendo colocar pacientes enfermos em risco (MUNITA; ARIAS, 2016).

Anualmente, milhares de mortes estão relacionadas com infecções por microrganismos resistentes e seu crescente permitiu com que a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhecesse a resistência microbiana como uma grande ameaça global à saúde (BENGTSSON-PALME et al., 2018).

A resistência é um processo evolutivo natural para os microrganismos, mas que é acelerado devido ao uso generalizado de drogas e à rápida proliferação destes seres por meio da transferência genética entre eles (WHO, 2014; SILVEIRA et al., 2006). Além disso, o uso extensivo e inapropriado de drogas, má-higiene, aumento de imunocomprometidos e, por vezes, a necessidade de tratamento empírico das infecções contribuem para o aumento da resistência (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Os patógenos multirresistentes retratam um alerta crescente à saúde pública, visto que as infecções multirresistentes a medicamentos são desafiadoras, de alto custo de tratamento e responsáveis por doenças infecciosas em altas taxas, especialmente hospitalares, o que estimula a busca por novos compostos - como as bacteriocinas - que possam ser utilizados no desenvolvimento e redesenho de antimicrobianos (CHANG et al., 2015; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; KON; RAI, 2016).

Infecções hospitalares ou nosocomiais (do Latim *nosocomium*, que significa hospital) são infecções adquiridas em pacientes durante atendimento em ambientes de assistência à saúde, que se apresentavam ausentes no período de admissão (JENKINS, 2017). Essas infecções podem se manifestar durante o atendimento ou mesmo após a alta do paciente e, ainda, podem acometer a equipe médica, caracterizando uma infecção ocupacional (KHAN; BAIG; MEHBOOB, 2017).

As infecções nosocomiais geralmente acometem populações em Unidades de Terapia Intensiva (UTI's), de queimaduras, transplantados e neonatos (KHAN; BAIG; MEHBOOB, 2017). Geralmente se mostram associadas a dispositivos que alteram os mecanismos normais de proteção do hospedeiro, de pele e mucosas intactas, como os cateteres urinários, intravasculares e ventiladores mecânicos (SYDNOR; PERL, 2011). Além disso, bactérias patógenas em potencial que colonizam o trato gastrointestinal do paciente podem ser fonte de sepse quando a barreira intestinal funcional é violada, permitindo translocação bacteriana (JAIN et al., 2004).

Os tipos mais frequentes são de infecções do trato urinário, da corrente sanguínea, pneumonia associada à ventilação mecânica e de sítios cirúrgicos (EDWARDSON; CAIRNS, 2019). A condução dessas infecções normalmente demanda de permanência hospitalar prolongada, análises diagnósticas adicionais, cirurgias e tratamento antimicrobiano, que acarretam em um aumento do ônus da assistência médica (JENKINS, 2017).

As infecções hospitalares contribuem significativamente para o surgimento e a disseminação de microrganismos resistentes, que ocorrem principalmente em decorrência de pressões seletivas do uso corrente de antimicrobianos de amplo espectro, como vancomicina, cefalosporinas e carbapenêmicos. Estes selecionam e propiciam a evolução de bactérias existentes como resistentes, que, ao serem transmitidas de modo nosocomial, agravam a problemática das infecções hospitalares (JENKINS, 2017; EDWARDSON; CAIRNS, 2019).

Entre os microrganismos frequentemente isolados nos ambientes hospitalares destacam-se *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), enterococos resistentes à vancomicina (VRE) e Gram-negativos multirresistentes, como *Acinetobacter spp.* e membros da família *Enterobacteriaceae* resistentes à carbapenem, a penicilinas e cefalosporinas de espectro estendido, particularmente *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (JENKINS, 2017; EDWARDSON; CAIRNS, 2019).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Microrganismos

Neste trabalho foi utilizada a cepa da bactéria *Bifidobacterium animalis subsp lactis* INL1 isolada de leite materno na Universidad Nacional del Litoral, na cidade de Santa Fé, Argentina, como microrganismo probiótico. Foram utilizadas para os ensaios de suscetibilidade cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA), *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase e *Escherichia coli* produtora de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), isoladas e gentilmente cedidas pelo Hospital Universitário do Oeste do Paraná (HUOP), na cidade de Cascavel, Brasil.

### 4.2 Ativação de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1

A cepa de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 (200  $\mu$ L) estocada a  $-80^{\circ}\text{C}$  foi ativada em um tubo com 10 mL de caldo Man-Rogosa-Sharpe (MRS) acrescido de 0,1% de cisteína esterilizada por filtração (100  $\mu$ L) incubada em estufa bacteriológica por 24 h a  $37^{\circ}\text{C}$  em condições de microaerofilia em jarra de anaerobiose. Após verificação do crescimento pela turvação do meio, um repique foi realizado com transferência de 100  $\mu$ L do crescimento para um novo caldo MRS + 0,1% de cisteína, sob as mesmas condições de incubação e, posteriormente, um segundo repique foi realizado nas mesmas condições para obtenção do *overnight* de trabalho (Figura 2).

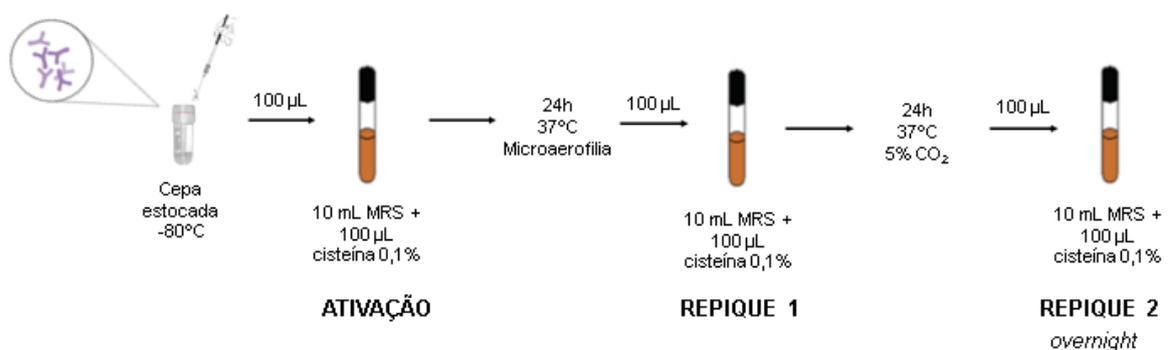


Figura 2 Representação esquemática da ativação de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1.

### 4.3 Ativação das cepas patogênicas

As cepas foram recebidas já com crescimento em colônias em placas de Petri e foram mantidas por repiques.

A cepa de *Staphylococcus aureus* MRSA foi repicada em placa de Petri contendo meio ágar sal manitol (CHAPMAN) e incubada em estufa bacteriológica durante 18 a 24 h a 35-37 °C.

As cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase e *Escherichia coli* ESBL foram repicadas em placa de Petri contendo ágar MacConkey e incubadas em estufa bacteriológica durante 18 a 24 h a 35-37 °C (Figura 3).

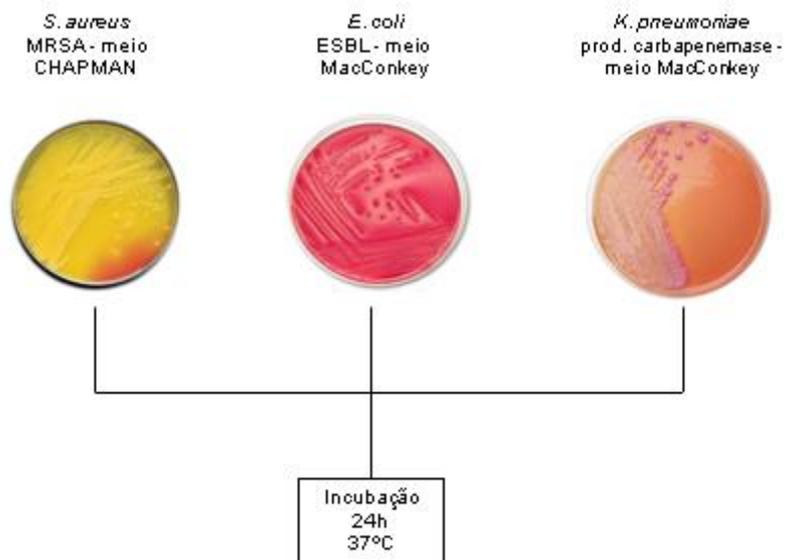


Figura 3 Representação esquemática da ativação das cepas patogênicas.

Após o crescimento das bactérias com formação de colônias, prosseguiu-se com os testes fenotípicos para confirmação das características de resistência.

#### 4.4 Testes fenotípicos das características de resistência

A resistência das cepas patogênicas utilizadas no estudo foi confirmada por testes fenotípicos, sendo a resistência à meticilina por *S. aureus* detectada pelo teste de disco-difusão com cefoxitina e a produção de ESBL para *E. coli* pelo teste de sinergismo do duplo disco (TSDD), ambas conforme orientações do Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BRCAST, 2018). Já a caracterização da produção de carbapenemase pela *K. pneumoniae* foi realizada pelo Teste de Hodge, de acordo com a Clinical and Laboratory Standards Institute com algumas modificações (CLSI, 2010).

Para a resistência de *S. aureus* à meticilina foi preparada uma suspensão a partir da cepa crescida no meio CHAPMAN do dia anterior, em solução salina estéril a 0,89% até a obtenção de uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland ( $10^8$  UFC/mL).

Foram preparadas placas de Petri contendo aproximadamente 25 mL de meio Mueller-Hinton (MH), no qual foi inoculada a suspensão de *S. aureus* em três direções diferentes com auxílio de um *swab*. Sobre o inóculo foi aplicado um disco de 30 µg de cefoxitina e posterior incubação da placa invertida a  $35\pm 1$  °C por 20 h. A resistência à meticilina é reportada quando a cepa em teste apresenta um halo de inibição < 22 mm para o disco de cefoxitina. Uma cepa de *S. aureus* ATCC 29213 sabidamente sensível à meticilina foi utilizada como controle negativo.

A produção de ESBL pela cepa de *E. coli* foi verificada pelo TSDD. Para tal, a partir da cepa de *E. coli*, repicada em meio MacConkey no dia anterior, foi preparada uma suspensão em solução salina estéril a 0,89% até a obtenção de uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland ( $10^8$  UFC/mL). A suspensão foi inoculada em uma placa de Petri contendo meio MH em três direções diferentes com auxílio de um *swab*. Foram aplicados à placa discos de cefotaxima, ceftadizima, cefepima e de aztreonam distribuídos ao redor de um disco central de amoxicilina + ácido clavulânico, com 20 mm de distanciamento entre os discos. A placa foi incubada a  $37\pm 2$  °C por 20 h. Quando qualquer expansão do halo de inibição de qualquer disco for aumentada em direção ao disco de amoxicilina + ácido clavulânico, o teste é considerado positivo para cepa produtora de ESBL.

Para a confirmação da presença de carbapenemase, uma cepa padrão *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada para o preparo de uma suspensão em solução salina estéril a 0,89% até a obtenção de uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland ( $10^8$  UFC/mL) e inoculada em uma placa de Petri com meio MH, com auxílio de *swab*, em três direções diferentes. Discos de ertapenem, meropenem e imipenem foram aplicados e então foi feita inoculação das cepas de *K. pneumoniae* com uma alça de 10 µL em forma de linhas, partindo dos discos em direção à borda da placa. A placa foi incubada a  $37\pm 2$  °C por 20 h. A produção de carbapenemase é considerada positiva para qualquer deformação no halo de inibição.

Os testes foram realizados semanalmente, conforme andamento dos experimentos.

#### 4.5 Obtenção do sobrenadante livre de células (CFS) da cultura de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1

Utilizou-se o *overnight* (Figura 2) de trabalho de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 para preparação do sobrenadante livre de células (CFS), conforme preparo descrito no item 4.2. O cultivo foi centrifugado a 4.000 rpm por 8 min e o sobrenadante livre de células transferido para um tubo de poliestireno estéril. O pH final do cultivo celular não foi mensurado neste estudo, porém o CFS foi ajustado ao pH de 6,5 com NaOH 1N, eliminando a possibilidade de interferência de ácido no teste de antagonismo. Na sequência foi esterilizado por filtração em membrana com poros de 0,22  $\mu\text{m}$  (Figura 4).

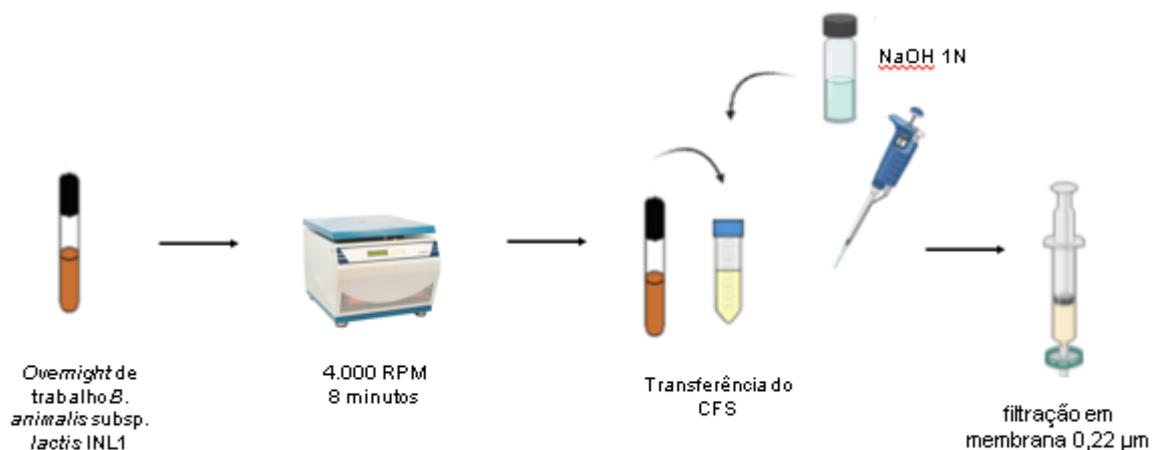


Figura 4 Representação esquemática da obtenção do sobrenadante livre de células (CFS) da cultura de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1.

#### 4.6 Atividade antibacteriana do sobrenadante livre de células da cultura de *B. animalis* subsp. *lactis*

Para investigar a ação antimicrobiana de extratos naturais, frações ou produtos bacterianos os métodos mais comumente empregados em laboratório envolvem a difusão do agente em teste em meio ágar (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Para verificar a atividade antibacteriana do sobrenadante livre de células da cultura de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 foram utilizados os métodos de difusão em ágar e disco difusão, bem como a microdiluição em caldo, conforme apresentados a seguir.

#### 4.6.1 Atividade antibacteriana por difusão em ágar

Após o crescimento das cepas patogênicas com formação de colônias, foram preparadas suspensões em solução salina estéril a 0,89% até a obtenção de uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland ( $10^8$  UFC/mL) de cada uma. Em placas de Petri contendo 20 mL de meio Brain Heart Infusion (BHI) *soft-ágar* (semi-sólido 0,8%) solidificado foi feita a semeadura com a suspensão de cada cepa patogênica por toda a superfície do ágar em três direções diferentes com auxílio de um *swab*. As placas permaneceram por 5 min à temperatura ambiente para que a suspensão fosse completamente absorvida pelo ágar. Em seguida, cinco poços de 6 mm de diâmetro foram preparados em cada placa, sendo que em quatro poços foram introduzidos 40  $\mu$ L do sobrenadante probiótico livre de células (CFS) em teste e em um poço central adicionou-se 40  $\mu$ L de solução salina estéril a 0,89% como controle negativo. As placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C (Figura 5). Os testes foram realizados em triplicata. Para confirmação da atividade, foi verificada a formação de halos de inibição ao redor dos poços.

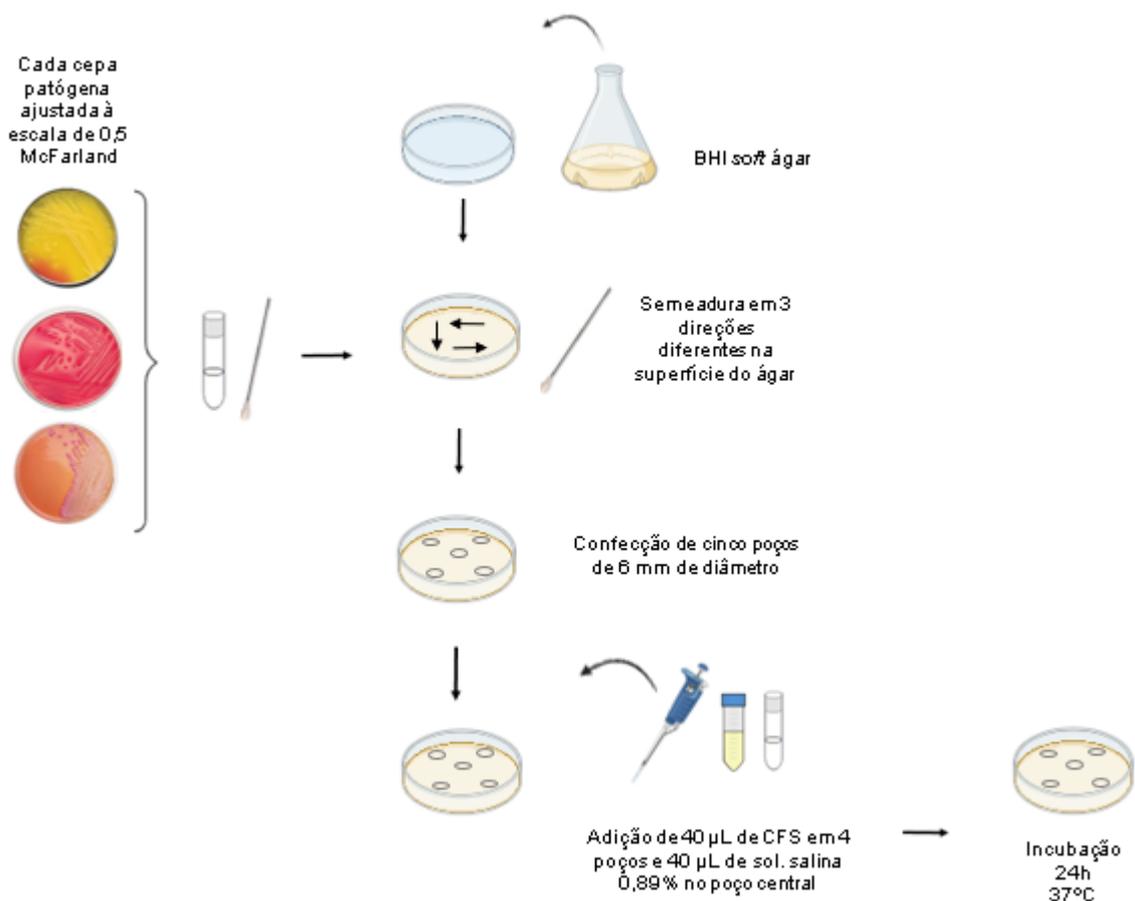


Figura 5 Representação esquemática do método de difusão em ágar.

#### 4.6.2 Atividade antibacteriana por disco-difusão

Para a atividade por disco-difusão foram preparadas suspensões das cepas conforme descrito no item 4.6.1.

Sobre placas de Petri contendo 20 mL de BHI *soft-ágar* já solidificado foi realizada a semeadura de cada patógeno em teste por toda a superfície do ágar em três direções diferentes com auxílio de um swab. As placas permaneceram por 5 min à temperatura ambiente para a completa absorção da suspensão pelo ágar. Na sequência, 3 discos de papel-filtro de aproximadamente 6 mm de diâmetro previamente autoclavados foram dispostos sobre a superfície de cada meio, sendo que em dois discos foram adicionados 40 µL do sobrenadante probiótico livre de células em teste e em um disco adicionou-se 40 µL de solução salina estéril a 0,89% como controle negativo. As placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C (Figura 6). Após este período de tempo, foi verificada a formação de halos de inibição.

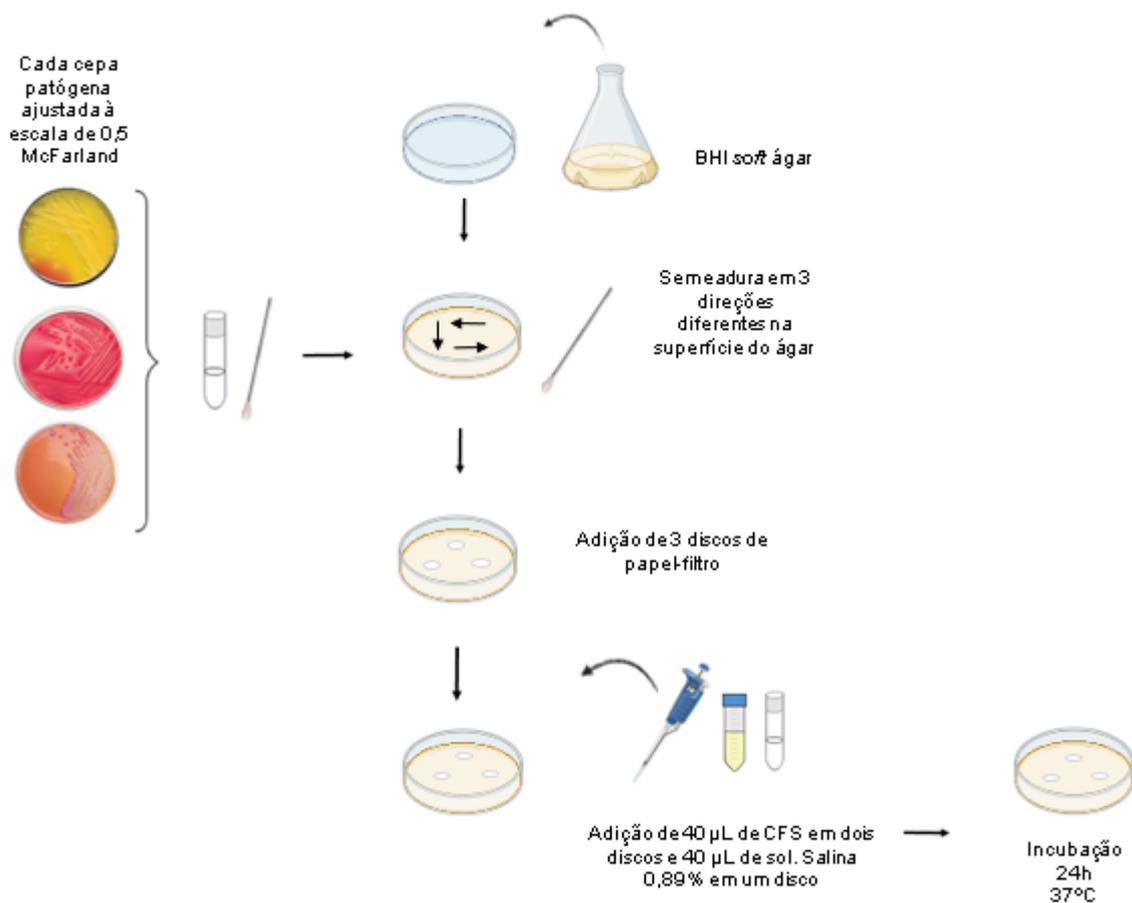


Figura 6 Representação esquemática do método de disco-difusão.

### 4.6.3 Atividade antibacteriana por microdiluição em caldo

O teste de microdiluição baseou-se no método M7-A6 – National Committee for Clinical Laboratory Standards com adaptações (NCCLS, 2003). Foram utilizadas microplacas de 96 poços e testadas as 3 cepas patógenas: *S. aureus* MRSA, *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase e *E. coli* ESBL.

Primeiramente as três cepas foram ajustadas à escala de McFarland nas mesmas condições descritas em 4.6.1 e 4.6.2. e distribuídos 100 µL na linha A, seguindo a ordem: coluna 1 para *S. aureus* MRSA, coluna 2 para *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase e coluna 3 para *E. coli* ESBL. Esta mesma linha recebeu também 100 µL de caldo BHI, caracterizando-se, assim, a linha de controle de crescimento.

A linha B recebeu apenas 100 µL do caldo BHI sendo a linha de controle de esterilidade.

Na linha C foram adicionados 100 µL da solução ajustada de cada cepa patógena na mesma ordem de colunas que A, além de 100 µL do caldo BHI e 100 µL do CFS, sendo então a linha teste (Tabela 1).

Tabela 1 Distribuição dos tratamentos ou inoculações do teste por microdiluição em caldo.

	Coluna 1	Coluna 2	Coluna 3
Linha A (controle de crescimento)	<i>S. aureus</i> MRSA + 100 µL BHI	<i>K. pneumoniae</i> produtora de carbapenemase + 100 µL BHI	<i>E. coli</i> ESBL + 100 µL BHI
Linha B (controle de esterilidade)	100 µL BHI	100 µL BHI	100 µL BHI
Linha C (teste)	<i>S. aureus</i> MRSA + 100 µL BHI + 100 µL CFS	<i>K. pneumoniae</i> produtora de carbapenemase + 100 µL BHI + 100 µL CFS	<i>E. coli</i> ESBL + 100 µL BHI + 100 µL CFS

Após o procedimento, as placas foram lacradas e mantidas em incubação a 36 °C por 24 h (Figura 7). O teste foi realizado em triplicata e, por meio de leitura visual, observou-se turvação ou formação de precipitado para os casos de crescimento e ausência dessas características nos casos de não crescimento das cepas patógenas.

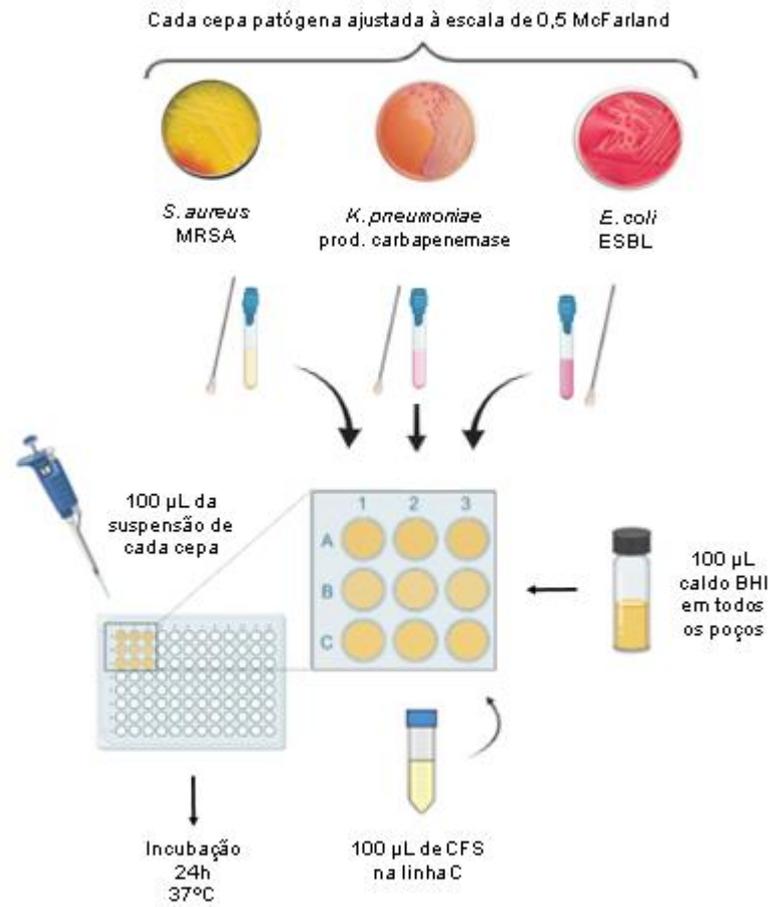


Figura 7 Esquematização do método de microdiluição em caldo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Testes fenotípicos das características de resistência

Para verificar se as cepas patogênicas cedidas para o estudo apresentavam as características de resistência, realizaram-se testes fenotípicos padrão de suscetibilidade a antimicrobianos. Para *S. aureus* e *E. coli* foram realizados ensaios de acordo com o Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BRCAST, 2018) e para a *K. pneumoniae*, segundo orientações da Clinical and Laboratory Standards Institute com algumas modificações (CLSI, 2010), conforme descrito no item 4.4.

A cepa de *S. aureus* em teste apresentou halo de inibição < 22 mm, ponto de corte que caracteriza a resistência à metilina. A cepa de *S. aureus* ATCC 29213 demonstrou alta sensibilidade ao antibiótico, conforme esperado (Tabela 2).

Tabela 2 Leitura dos halos de inibição do teste fenotípico de resistência das cepas de *S. aureus* à metilina. Interpretação conforme orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica (BRCAST, 2018).

Cepa	Halo de inibição (em mm)	Interpretação
<i>S. aureus</i> em teste	10 mm	Resistente à metilina
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	32 mm	Sensível à metilina

Em relação às Gram-negativas, no teste de TSDD, para avaliar a característica de resistência ESBL para a *E. coli* avaliada, foi possível identificar uma expansão na zona dos halos de inibição dos discos das cefalosporinas cefotaxima, ceftadizima e cefepima em direção ao disco central, associado ao ácido clavulânico (Figura 8a). Também foi realizado o teste de Hodge para a confirmação da produção de carbapenemase, em que a cepa em teste se mostrou positiva, com a deformação presente no halo de inibição (Figura 8b).

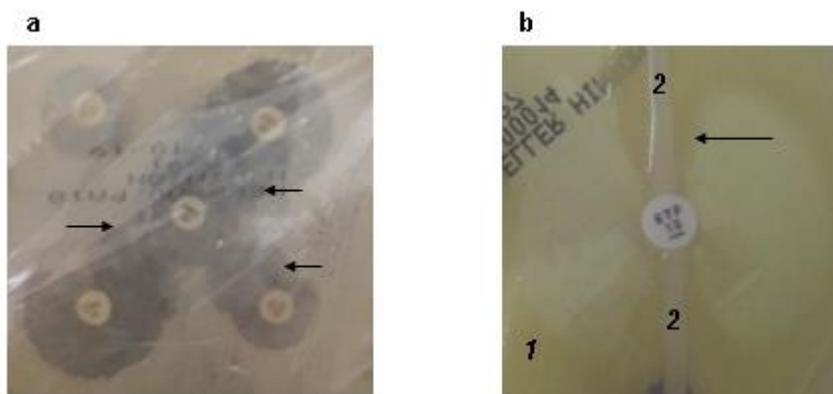


Figura 8 Confirmação fenotípica das resistências das cepas Gram-negativas: a – *E. coli* ESBL (o teste TSDD se mostra positivo quando há aumento no halo de inibição de qualquer disco em direção ao disco com ácido clavulânico, conforme indicado pelas setas na figura) e b – *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase; 1 - *E. coli* ATCC 25922; 2 – cepa teste (o teste de Hogde confirma a produção de carbapenemase quando há distorção no halo de inibição, conforme seta indicativa na figura).

## 5.2 Atividade antibacteriana do CSF sobre as bactérias

Os mecanismos de atividade antimicrobiana de bifidobactérias têm sido sugeridos como multifatoriais, entre eles a presença de compostos antimicrobianos produzidas por elas (TOURÉ et al., 2003).

### 5.2.1 Atividade antibacteriana por difusão em ágar

Para avaliar a eficiência da ação inibitória *in vitro* dos produtos de cultivo da cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, pela produção de compostos antimicrobianos, foi utilizada inicialmente a técnica de difusão em ágar, conforme realizado por Schueler (2018) com algumas modificações.

O CFS da cepa probiótica utilizada no presente trabalho não apresentou atividade contra as cepas patógenas testadas - *S. aureus* MRSA (Figura 9a), *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (Figura 9b) e *E. coli* ESBL (Figura 9c) -, com ausência de halos de inibição de crescimento.

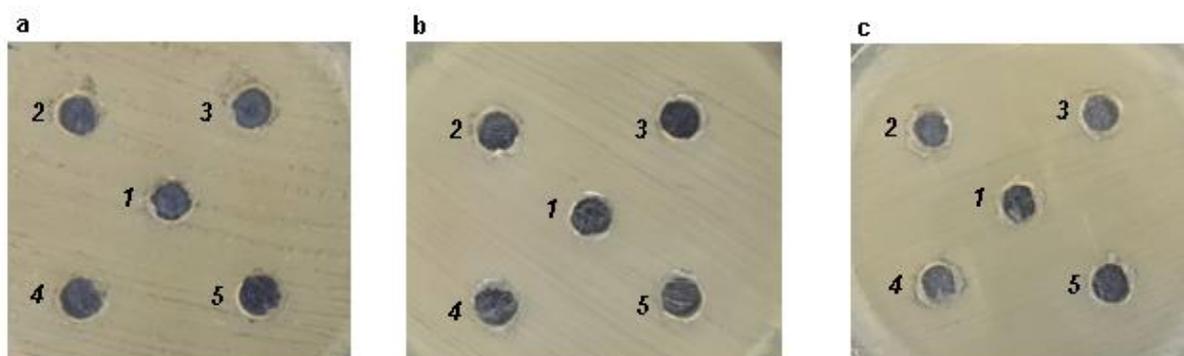


Figura 9 Difusão em ágar: a – *S. aureus* MRSA; a – *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase; c – *E. coli* ESBL; 1 – poço controle com solução salina; 2, 3, 4 e 5 – poços teste com CFS.

Essa metodologia pode ser utilizada para a detecção do efeito inibitório de bacteriocinas, assim como avaliado por Abdelhamid, Esaam e Hazaa (2018), que comprovaram que espécies de *B. longum* e *B. bifidum* reduziram o crescimento de duas cepas de *E. coli* multirresistentes (ABDELHAMID; ESAAM; HAZAA, 2018). Tejero-Sariñena e colaboradores (2012), utilizando a mesma metodologia com algumas modificações, investigaram quinze cepas de bactérias probióticas, sendo quatro pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*. Nesses casos, a atividade antimicrobiana foi testada frente a bactérias patógenas, entre elas *S. aureus* e *E. coli*, com sobrenadante livre de células neutralizado com NaOH e esterilizado, como no nosso trabalho, e também com sobrenadante concentrado por liofilização e sobrenadante sem tratamentos. Os resultados mostraram que o sobrenadante de três cepas de bifidobactérias foi capaz de inibir significativamente o crescimento das bactérias patógenas, porém quando neutralizado, o efeito antagônico foi bastante reduzido, sugerindo que um dos principais mecanismos de inibição poderia ser resultado da produção de ácidos orgânicos pelas cepas probióticas, que teria favorecido anteriormente um ambiente inóspito ao desenvolvimento de *S. aureus* e *E. coli* (TEJERO-SARIÑENA et al., 2012).

Ainda, um experimento realizado anteriormente por Zacarías e colaboradores (2014) mostrou que a cepa *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 apresenta efeito protetor em modelo *in vivo* de infecção intestinal por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium. Doses da cepa probiótica foram administrados em cobaias por 10 dias de modo preventivo à infecção por *Salmonella* e os resultados mostraram uma redução significativa da incidência e da gravidade da infecção (ZACARÍAS et al., 2014).

As condições *in vivo* podem favorecer a otimização da produção de compostos antimicrobianos e imunomodulatórios, como sugerido no estudo citado e até mesmo

uma exclusão competitiva da probiótica com o microrganismo patogênico, propiciando a atividade inibitória. Schneitz (2005) aponta que a exclusão competitiva se trata de um evento predominantemente físico, de maior relevância do que a produção de ácidos orgânicos ou outros metabólitos, como as bacteriocinas, porém são características que não são passíveis de observação nas técnicas *in vitro* aplicadas neste estudo (SCHNEITZ, 2005).

### 5.2.2 Atividade antibacteriana por disco-difusão

Além da investigação por difusão em ágar (item 4.6.1), a metodologia de disco-difusão também foi utilizada para avaliar a atividade antimicrobiana da *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, conforme Prosekov et al. (2015) com algumas adaptações.

O CFS não demonstrou atividade inibitória sobre as cepas de *S. aureus* MRSA (Figura 10a), *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (Figura 10b) e *E. coli* ESBL (Figura 10c), havendo ausência de halos de inibição de crescimento ao redor dos discos.

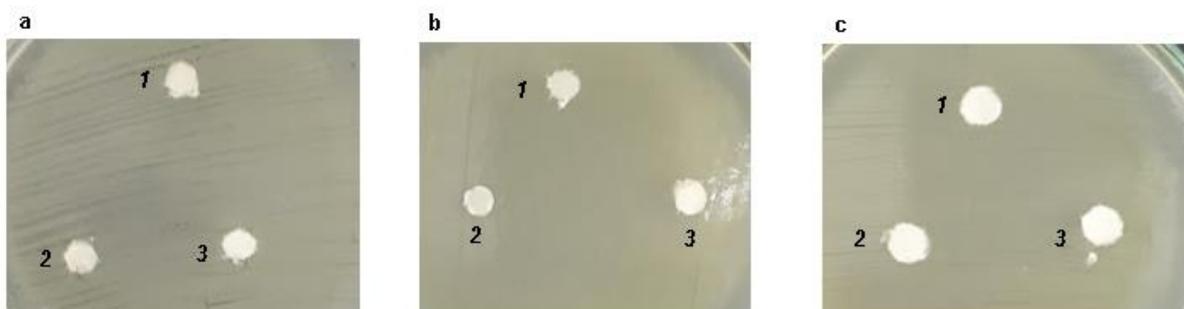


Figura 10 Disco-difusão: a – *S. aureus* MRSA; b – *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase; c – *E. coli* ESBL; 1 – poços controle com solução salina; 2 e 3 – poços teste com CFS.

Quando avaliado por Ouda e colaboradores (2018) pela mesma metodologia, o sobrenadante da cepa de *B. animalis* subsp. *lactis* testado pelo grupo inibiu o crescimento de nove indicadores patógenos, os quais incluíam espécies de interesse médico, como *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *S. aureus*, *S. haemolyticus* e *E. coli* O157:H7. A formação de zonas de inibição ao redor dos discos foi evidente também para a espécie *B. longum* subsp. *infantis*, com algumas variações em relação ao tamanho dos halos (OUDA et al., 2018). Os pesquisadores indicaram que não há um padrão específico de atividade antimicrobiana entre cepas do mesmo gênero e nem mesmo entre espécies, característica que observamos ao contrastar com a

ausência de inibição pelo metabólito da cepa de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 avaliada neste estudo.

### 5.2.3 Atividade antibacteriana por microdiluição em caldo

Na avaliação por microdiluição em caldo, o sobrenadante livre de células da cultura de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, na linha A, de controle de crescimento, apresentou os resultados esperados de desenvolvimento das cepas patógenas, havendo turvação e formação de precipitado. Na linha B, de controle de esterilidade, não demonstrou características de turvação e/ou precipitado, indicando ausência de contaminação do caldo BHI. Na linha C, caracterizada como teste, apresentou turvação e formação de precipitado para todas as cepas patógenas, *S. aureus* MRSA, *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase e *E. coli* ESBL, indicando que o CFS não impediu o desenvolvimento das mesmas (Figura 11).

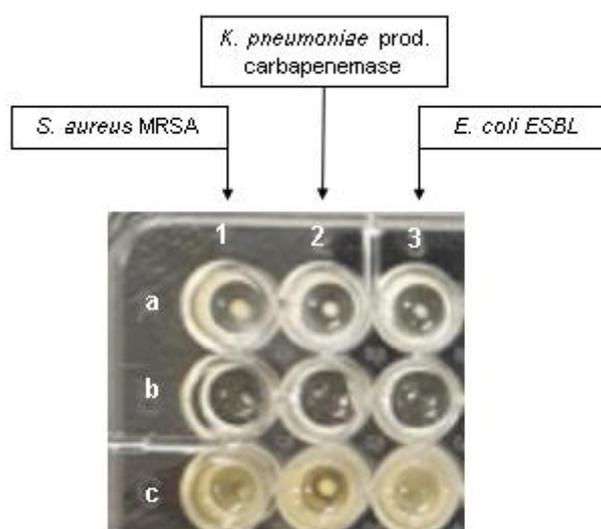


Figura 11 Susceptibilidade das cepas patógenas frente aplicação do CFS em microdiluição: a – controle de crescimento (constituído de BHI e cepa patógena); b – controle de esterilidade (constituído apenas de BHI); c – teste (constituído de BHI, cepa patógena e CFS); 1 – coluna de *S. aureus* MRSA; 2 – coluna de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase; 3 – coluna de *E. coli* ESBL.

Lahtinen e colaboradores (2007) também avaliaram a atividade antimicrobiana do sobrenadante de 38 cepas de *Bifidobacterium spp.* isolados de idosos juntamente com a conhecida *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 pelo método de microdiluição em caldo. O grupo de pesquisa testou o sobrenadante frente às cepas de *S. aureus* RN4220, *Escherichia coli* K-12 e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028. Inicialmente os resultados mostraram que todas as cepas de bifidobactérias testadas inibiram o crescimento de *S. aureus* RN4220, porém os dados foram ajustados após tratamento de neutralização dos sobrenadantes, e então somente três

cepas nomeadas *B. longum* 46, *B. longum* 56 e *B. breve* 116 demonstraram inibição contra *S. aureus*. A cepa de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 não mostrou inibição estatisticamente significativa contra *S. aureus*, sugerindo que a atividade antimicrobiana é uma característica única mesmo entre cepas probióticas conhecidas.

Em relação às Gram-negativas, nenhuma bifidobactéria teve efeito inibitório sobre o crescimento das mesmas (LAHTINEN et al., 2007).

Alguns pesquisadores sugerem que a produção de ácidos orgânicos tem parcial responsabilidade na atividade inibitória das bifidobactérias (BRUNO; SHAH, 2002; IBRAHIM; SALAMEH, 2001). A aplicação de tratamentos ao sobrenadante, como o ajuste do pH com NaOH realizado neste trabalho, pode reduzir o efeito antimicrobiano, situações percebidas por pesquisadores como Tejero-Sariñena e colaboradores (2012), conforme descrito no item 5.2.1 da metodologia de difusão em ágar, e por Lahtinen e colaboradores (2007) no ensaio por microdiluição em caldo. Apesar da significativa redução e ajuste nos resultados dos experimentos, o procedimento de neutralização deve ser levado em consideração para não subestimar a hipotética produção de compostos antimicrobianos específicos, como bacteriocinas, e evitar falsas interpretações sobre sua produção (OGAKI; FURLANETO; MAIA, 2015).

Os ensaios de difusão em ágar, disco-difusão e microdiluição em caldo estão entre os métodos de triagem disponíveis para detectar a atividade inibidora de bacteriocinas (PINGITORE et al., 2007). Para Zou e colaboradores (2018), os três métodos são adequados e de fácil interpretação de resultados, porém podem ser demorados, visto que inúmeras cepas normalmente devem ser rastreadas para identificação da ação eficiente de bacteriocinas (ZOU et al., 2018).

Há um consenso em relação à importância da fase de crescimento da probiótica e a produção das bacteriocinas, entretanto um conhecimento preciso da produção ótima durante as fases pode ser crítico (MARTINÉZ et al., 2013). Por exemplo, a produção de antimicrobianos pela cepa *B. bifidum* NCDC 1452 ocorreu após 30 h de incubação do cultivo (Anand et al., 1985), porém a bacteriocina bifidocina B da mesma cepa foi produzida já entre 12-18 h de crescimento (CHEIKHYOUSSEF et al., 2008), com diminuição na concentração ao longo das horas seguintes (YILDIRIM; JOHNSON, 1998). Além destes, Collado e colaboradores (2005) observaram que várias espécies de *Bifidobacterium* atingiram produção máxima de bacteriocinas com cerca de 16 h de crescimento, que diminuiu ou esteve ausente depois deste período.

Com isso, percebe-se que o tempo de duração de uma específica cepa produtora de bacteriocina pode ser bastante variável.

Chikindas e colaboradores (2018) apontam que a atividade das bacteriocinas pode ocorrer em concentrações consideravelmente diferentes para diferentes bacteriocinas; situação evidenciada quando concentrações micromolares da bacteriocina salivaricina B (de *Streptococcus salivarius*) foram necessárias para interferir no desenvolvimento de *Micrococcus luteus* e *Streptococcus pyogenes*, em contraste à necessidade de concentrações nanomolares de nisina A para a mesma função (BARBOUR et al., 2016).

Ainda, muitas bacteriocinas não são produzidas em grandes quantidades pela cepa probiótica produtora (PINGITORE et al., 2007). Para alguns pesquisadores, a indução muitas vezes ocorre em situações de estresse, como aumento populacional e escassez de nutrientes (RILEY, 2011; SAVADOGO et al., 2006), porém as condições de produção e crescimento *in vitro*, como realizado neste estudo, são carentes de fatores estressantes, podendo não induzir processos de defesa ou resposta a condições adversas (IBRAHIM; SALAMEH, 2001), sendo possível que a produção de bacteriocinas pela cepa de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1 tenha sido muito baixa ou inexistente.

Quando esta mesma cepa, avaliada por Zacarías e colaboradores (2014) no modelo *in vivo*, foi considerada capaz de reduzir a incidência e gravidade de infecção por *Salmonella*, os mecanismos sugeridos relacionavam-se principalmente com a produção de outros componentes, não antimicrobianos, mas sim imunomodulatórios (ZACARÍAS et al., 2014).

## 6 CONCLUSÕES

Ao avaliar a ação do sobrenadante livre de células da cepa de *B. animalis* subsp. *lactis* INL1, conclui-se que a mesma não apresentou efeito inibitório sobre o crescimento *in vitro* de *S. aureus* MRSA, *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase e *E. coli* ESBL isoladas de ambiente hospitalar nas metodologias aplicadas.

Sendo assim, faz-se necessária a realização de novos estudos que possam melhor investigar e caracterizar se a cepa apresenta ação antimicrobiana *in vitro* por meio da otimização de seu crescimento e produção de bacteriocinas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELHAMID, A. G.; ESAAM, A.; HAZAA, M. M. Cell free preparations of probiotics exerted antibacterial and antibiofilm activities against multidrug resistant *E. coli*. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n., 5, p. 603-607, 2018.

AMARAL, M. A. **Net-work Meta-análise do Uso de Probióticos na Prevenção de Infecções Respiratórias em Crianças e Adolescentes**. (2015). Dissertação (Mestrado em Medicina e Ciências da Saúde) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ANAND, S. K.; SRINIVASAN, R. A.; RAO, L., K. Antibacterial activity associated with *Bifidobacterium bifidum*-I. **Cult Dairy Prod J.**, v. 2, p. 6-7, 1984.

ANAND, S. K.; SRINIVASAN, R. A.; RAO, L., K. Antibacterial activity associated with *Bifidobacterium bifidum*-II. **Cult Dairy Prod J.**, v. 2, p. 21-23, 1985.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, p. 71-79, 2016.

BARBOUR, A.; TAGG, J.; ABOU-ZIED, O. K.; PHILIP, K. New insights into the mode of action of the lantibiotic salivaricin B. **Sci Rep.**, v. 6, p. 1-14, 2018.

BENGTSSON-PALME, J.; KRISTIANSSON, E.; LARSSON, D. G. J. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 1, p. 68-80, 2018.

BIAVATI, B.; VESCOVO, M.; TORRIANI, S.; BOTTAZZI, V. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. **Annals of Microbiology**, v. 50, p. 117-131, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 2, de 07 de janeiro de 2002. **Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde**. DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 jan. 2002.

BRCAS. **Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica**. Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade Antibacteriana.

BUNESOVA, V.; KILLER, J.; JAVURKOVA, B.; VLKOVA, E.; TEJNECKY, V.; MUSILOVA, S.; RADA, V. Diversity of the subspecies *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. **Anaerobe**, v. 44, p. 40-47, 2017.

CHANG, H-H., COHEN, T., GRAD, Y. H., HANAGE, W. P., O'BRIEN, T. F., LIPSITCH, M. Origin and Proliferation of Multiple-Drug Resistance in Bacterial Pathogens. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 1, p. 101-116, 2015.

CHEIKHYOUSSEF, A.; CHEIKHYOUSSEF, N.; CHEN, H.; ZHAO, J.; TANG, J.; ZHANG, H. Bifidin I – a new bacteriocin produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC

14602: purification and partial amino acid sequence. **Food Control**, v. 21, p; 746-753, 2010.

CHEIKHYOUSSEF, A.; POGORI, N.; CHEN, W.; ZHANG, H. Antimicrobial proteinaceous compounds obtained from bifidobacteria: from production to their application. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 3, p. 215-222, 2008.

CHIKINDAS, M. L., WEEKS, R., DRIDER, D., CHISTYAKOV, V. A., DICKS, L. M. T. Functions and emerging applications of bacteriocins. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 23-28, 2018.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**; 20th informational supplement. CLSI document M100-S20-U. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2010.

COLLADO, C. M.; HERNÁNDEZ, M.; SANZ, Y. Production of bacteriocin-like inhibitory compounds by human fecal *Bifidobacterium* strains. **J Food Prot**, v. 68, p. 1034-1040, 2005.

COTTER, P. D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Bacteriocins: a viable alternative to antibiotics? **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 95-105, 2013.

Council for Agricultural Science and Technology (CAST). 2007. **Probiotics: Their Potential to Impact Human Health**. Issue Paper 36. CAST, Ames, Iowa.

DALIRI, R. B-M., LEE, B. H. New perspectives on probiotics in health and disease. **Food Science and Human Wellness**, v. 4, p. 56-65, 2015.

DOBROGOSZ, W. J.; CASAS, I. A.; PAGANO, G. A.; TALARICO, T. L.; 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.

EDWARDSON, S.; CAIRNS, C. Nosocomial infections in the ICU. *Anaesthesia and Intensive Care Medicine*, v. 20, p. 14-18, 2019.

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

FIJAN, S. Microorganisms with Claimed Probiotic Properties: An Overview of Recent Literature. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, p. 4745-4767, 2014.

GALVEZ, A.; LOPEZ, R. L.; ABRIOUEL, H.; VALDIVIA, E.; OMAR, N. B. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical reviews in biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 125-152, 2008.

GILL, H. S.; RUTHERFURD, K. J.; CROSS, M. L.; GOPAL, P. K. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. **Am J Clin Nutr**, v. 74, p. 833-839, 2001.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 139-157, 1999.

GÓMEZ-ZAVAGLIA, A.; KOCIUBINSKI, G.; PÉREZ, P.; DISALVO, E.; DE ANTONI, G. Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. *Jornal of Applied Microbiology*, v. 93, p. 794-799, 2002.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, v. 360, p. 512-519, 2003.

GUILHELMELLI, F.; VILELA, N.; ALBUQUERQUE, P.; DERENGOWSKI, L. S.; SILVA-PEREIRA, I.; KYAW, C. M. Antibiotic development challenges: the various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-12, 2013.

GUIMARÃES, D. O., MOMESSO, L. D., PUPO, M. T. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos Agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

IBRAHIM, S.; SALAMEH, M. Simple and rapid method for screening Antimicrobial activities of *Bifidobacterium* species of human isolates. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, v. 9, p. 53-62, 2001.

JAIN, P. K.; MCNAUGHT, C. E.; ANDERSON, A. D. G.; MACFIE, J.; MITCHELL, C. J. Influence of synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium lactis* Bb 12, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and oligofructose on gut barrier function and sepsis in critically ill patients: a randomised controlled trial. **Clinical Nutrition**, v. 23, p. 467-475, 2004.

JENKINS, D. R. Nosocomial infections and infection control. **Prevention and Control of Infection**, v. 45, n. 10, p. 629-633, 2017.

JUNGERSEN, M., WIND, A., JOHANSEN, E., CHRISRTENSEN, J. E., STUER-LAURIDSEN, B., ESKESEN, D. The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12. **Microorganisms**, v. 2, p. 92-110, 2014.

KAILASAPATHY, K.; HARMSTORF, I.; PHILLIPS, M. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts. **Swiss Society of Food Science and Technology**, v. 41, p. 1317-1322, 2008.

KARPINSKI, T, M.; SZKARADKIEWICZ, A. K. **Bacteriocins**. In: Encyclopedia of Food and Health, p. 312-319, 2016.

KHAN, H. A.; BAIG, F. K.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections: epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian-Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 7, n. 5, p. 478-482, 2017.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, p. 39-83, 1993.

KON, K., RAI, M. **Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches**, 1<sup>a</sup> ed. Academic Press, p. 329-349, 2016.

KUMAR, R. S.; BRANNIGAN, J. A.; PRABHUNE, A. A.; PUNDLE, A. V.; DODSON, G.; SURESH, C. G. Structural and Functional Analysis of a Conjugated Bile Salt Hydrolase from *Bifidobacterium longum* Reveals an Evolutionary Relationship with Penicillin V Acylase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 43, p. 32516-32525, 2006.

LAHTINEN, S. J.; JALONEN, L.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. J. Specific *Bifidobacterium* strains isolated from elderly subjects inhibit growth of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 125-128, 2007.

LEAHY, S. C., HIGGINS, D. G., FITZGERALD, G. F., van SINDEREN, D. Getting better with bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1303-1315, 2005.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Host interactions of probiotics bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 171-184, 2010.

LINARES, D. M., ROSS, P., STANTON, C. Beneficial Microbes: The pharmacy in the gut. **Bioengineered**, v. 7, n. 1, p. 11-20, 2016.

MARGOLLES, A.; e SANCHÉZ, B. Selection of a *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Strain with a Decreased Ability To Produce Acetic Acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 9, p. 3338-3342, 2012.

MARTINEZ, F. A.C., BALCIUNAS, E. M., CONVERTI, A., COTTER, P. D., OLIVEIRA, R. P. S. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. **Biotechnology Advances**, v.31, p. 482-488, 2013.

MASCO, L.; VENTURA, M.; ZINK, R.; HUYS, G.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1137-1143, 2004.

MATOS, P. M. S. Probióticos. (2010) Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) Universidade do Porto, Porto.

MEILE, L.; LUDWIG, W.; RUEGER, U.; GUT, C. *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. **Systematic and Applied Microbiology, Stuttgart**, v. 20, n. 1, p. 57-64, 1997.

MONTVILLE, T.; CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recente progress and unresolved questions. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 50, p. 511-519, 1998.

MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Jornal de Pediatria**, v. 82, p. 189-197, 2006.

MUNITAS, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. **Microbiol Spectr**, v. 4, n. 2, p. 1-37, 2016.

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit Rev Food Sci Nutri*, v. 39, p. 13-126, 1999.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486- 4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NOGUEIRA, J. C. R.; GONÇALVES, M. C. R. Probióticos – Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, p. 487-492, 2011.

OGAKI, M. B., FURLANETO, M. C., MAIA, L. F. Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 18, n. 4, p. 267-276, 2015.

OLIVEIRA, J. L., ALMEIDA, C., BOMFIM, N. S. A importância do uso de probióticos na saúde humana. **Unoesc & Ciência**, v. 8, n. 1, p. 7-12, 2017.

OUDA, S. M.; EL-WAFAI, N. A.; HEGAZY, M. I.; AHMADY, M. M. G. Characterization of Probiotic isolates of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and *Lactobacillus acidophilus* as affected by Manan Oligosaccharide and Lignin Additives. **Wulfenia Journal**, v. 25, p. 1-20, 2018.

OZDEMIR, G. B.; ORYASIN, E.; BIYIK, H. H.; ÖZTEBER, M.; BOZDOGAN, B. Phenotypic and genotypic characterization of bacteriocins in enterococcal isolates of different sources. **Indian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 182–187, 2011.

PEREIRA, B. S. Seleção de Meio de Cultura para Determinação da Viabilidade de Bifidobactérias Durante a Vida de Prateleira de Bebida Láctea Fermentada com Soro de Leite Nanofiltrado. (2012). Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PINGITORE, E. V.; SALVUCCI, E.; SESMA, F.; NADER-MACÍAS, M. E. Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB). **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, p. 557-568, 2007.

PROSEKOV, A.; DYSHLYUK, L.; MILENTYEVA, I.; SUKHIH, S.; BABICH, O.; IVANOVA, S.; PAVSKYI, V.; SHISHIN, M.; MATSKOVA, L. Antioxidant, antimicrobial and antitumor activity of bacteria of the genus *Bifidobacterium*, selected from the gastrointestinal tract of human. **Integrative Molecular Medicine**, v. 2, p. 295-303, 2015.

RILEY, M. **Bacteriocin-Mediated Competitive Interactions of Bacterial Populations and Communities**. In: Drider, Rebuffat S (eds) Prokaryotic Antimicrobial Peptides. Springer, New York, 2011.

RILEY, M., A.; WERTZ, J. E. BACTERIOCINS: Evolution, Ecology, and Application. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 56, p. 117-137, 2002.

RUIZ, L., MARGOLLES, A., SÁNCHEZ, B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-8, 2013.

RUIZ, L.; O'CONNELL-MOTHERWAY, M.; ZOMER, A.; REYES-GAVILÁN, C., G., I.; MARGOLLES, A.; VAN SINDEREN, D. A bile-inducible membrane protein mediates bifidobacterial bile resistance. **Microbial Biotechnology**, v. 5, n. 4, p. 523-535, 2012.

SALEH, F. A.; EL-SAYED, E. M. Isolation and characterization of bacteriocins produced by *Bifidobacterium lactis* BB-12 and *Bifidobacterium longum* BB-46. 9th Egyptian Conference for Dairy Science and Technology. Cairo: Research Papers; 2004. p. 323-337.

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

SARKAR, A.; MANDAL, S. Bifidobacteria—Insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action. **Microbiological Research**, v. 192, p. 159-171, 2016.

SAVADOGO, A.; OUATTARA, C. A. T.; BASSOLE, I. H. N.; TRAORE, S. A. Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 678-683, 2006.

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

SCHUELER, J. Produção de enterocina em soro de leite parcialmente desmineralizado e água de maceração de milho. (2018). Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná.

SILVEIRA, G. P., NOME, F., GESSER, J. C., SÁ, M. M. Estratégias Utilizadas no Combate a Resistência Bacteriana. **Química Nova**, v.29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SINGH, R. P.; DAMLE, S. G.; CHAWLA, A. Salivary mutans streptococci and lactobacilli modulations in young children on consumption of probiotic ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb12 and *Lactobacillus acidophilus* La5. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 69, p. 389-394, 2011.

SOUZA, T. C. Seleção de bifidobactéria de origem humana para uso como probiótico em alimento funcional: avaliação do efeito protetor na infecção experimental com *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium. (2012). Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SYDNOR, E, R. M.; PERL, T. M. Hospital Epidemiology and Infection Control in Acute-Care Settings. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 141-173, 2011.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 40, n. 3, p. 722-756, 1976.

TEJERO-SARIÑENA, S.; BARLOW, J.; COSTABILE, A.; GIBSON, G. R.; ROWLAND, I. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. **Anaerobe**, v. 18, p. 530-538, 2012.

THOMAS, D. W., GREER, F. R., Committee on Nutrition. Probiotics and Prebiotics in Pediatrics. **Pediatrics**, v. 126, n. 6, p. 1217-1231, 2010.

TOIVIAINEN, A.; JALASVUORI, H.; LAHTI, E.; GURSOY, U.; SALMINEN, S.; FONTANA, M.; FLANNAGAN, S.; ECKERT, G.; KOKARAS, A.; PASTER, B.; SÖDERLING, E. Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. **Clin Oral Investig**, v. 19, p. 77-83, 2015.

TOURÉ, R.; KHEADR, E.; LACROIX, C.; MORONI, O.; FLISS, I. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1058-1069, 2003.

VARAVALLO, M. A.; THOMÉ, J. N.; TESHIMA, E. Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 83-104, 2008.

VASILJEVIC, T., SHAH, N. P. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 714-728, 2008.

World Health Organization Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Geneva, Switzerland: WHO; 2014.

YILDIRIM, Z.; JOHNSON, M. Characterization and Antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocina produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. **J Food Prot**, v. 61, p. 47-51, 1988.

YILDIRIN, Z.; WINTERS, D.; JOHNSON, M. Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. **J App Microbiolol**, v. 86, p. 45-54, 1999.

ZACARÍAS, M. F.; REINHEIMER, J.; FORZANI, L.; GRANGETTE, C.; VINDEROLA, G. Mortality and translocation assay to study the protective capacity of *Bifidobacterium lactis* INL1 against *Salmonella typhimurium* infection in mice. **Beneficial Microbes**, v. 5, p. 427-436, 2014.

ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: a review article. **Asia-Pacific Chemical Biological and Environmental Engineering Society**, v. 2, p. 50-56, 2012.

ZOU, J.; JIANG, H.; CHENG, H.; FANG, J.; HUANG, G. Strategies for screening, purification and characterization of bacteriocins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 781-789, 2018.