**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Leite humano como fonte de bactérias lácticas produtoras de
bacteriocinas e com potencial probiótico**

Fabiana Katia Helena de Souza Trento

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2012**

Fabiana Katia Helena de Souza Trento
Bacharel em Ciências Biológicas

**Leite humano como fonte de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e
com potencial probiótico**

Orientador:
Prof. Dr. **ERNANI PORTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Trento, Fabiana Katia Helena de Souza

Leite humano como fonte de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e com potencial probiótico / Fabiana Katia Helena de Souza Trento.- - Piracicaba, 2012.
82 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Bactérias lácticas 2. Bacteriocinas 3. Enterococcus 4. Leite humano 5. Probióticos
I. Título

CDD 612.644
T795L

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a duas pessoas Marcia e Manoel, que em nenhum momento mediram esforços para realização dos meus sonhos, que me guiaram pelos caminhos corretos, me ensinaram a fazer as melhores escolhas, me mostraram que a honestidade e o respeito são essenciais à vida, e que devemos sempre lutar pelo que queremos. A eles devo a pessoa que me tornei, sou extremamente feliz e tenho muito orgulho por chamá-los de mãe e pai. AMO VOCÊS!

Ao meu marido Fabiano, por todo apoio, amor, compreensão e pela companhia ao longo da trajetória que me levou à concretização deste sonho.

A minha amada filha Manuela, fonte de toda força e vontade que carrego comigo ao despertar de cada manhã.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Ao meu orientador Ernani Porto por acreditar no meu potencial, pela oportunidade oferecida, pela orientação e principalmente pelo bom convívio nestes anos de trabalho.

À minha co-orientadora e amiga Izildinha Moreno, por acreditar em mim, me mostrar o caminho da Ciência, fazer parte da minha vida nos momentos bons e ruins, por ser exemplo de profissional e de mulher, a qual sempre fará parte de minha história.

À toda minha família, agradeço pelo amor incondicional, pelo apoio e coragem que sempre me transmitiram. Aos meus irmãos Silvia, Richer e Dudu por sempre torcerem por mim. A minha cunhada Fernanda, minha sogra Tereza e meu sogro Hélio, pelo apoio em cuidar de minha filha nos momentos de ausência.

Aos pesquisadores do TecnoLat Adriana Torres Silva e Alves, Alcina Maria Liserre, Ariene Gimenes F. Van Dender, Darlila A. Gallina, Elza Teresinha Graef, Genevaldo de Souza, José Leonardo Eto do Valle, Leila M. Spadoti, Maria Izabel Merino de Medeiros, Manuel Carmo Vieira, Patrícia Blumer Z. Rodrigues de Sá e Renato Abeilar Romeiro Gomes pelas valiosas conversas e sugestões

A todos os amigos, funcionários e estagiários do TecnoLat, em especial a equipe do laboratório de microbiologia e também a secretária Mirela por toda a ajuda e pelos momentos de descontração durante essa empreitada.

Agradeço ainda e de maneira muito especial a querida aluna Juliana Carusi por toda sua dedicação e empenho na realização deste trabalho. Jú obrigada por tudo!

A todos vocês, meu muito obrigada!

MENSAGEM

“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice, colhe pois, a sabedoria. Armazena a suavidade para a vida”.

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Leite humano.....	21
2.2 A microbiota do leite humano.....	23
2.3 Bactérias lácticas.....	24
2.4 Bacteriocinas.....	26
2.5 Bactérias probióticas.....	27
2.5.1 Bactérias Probióticas em leite humano.....	29
2.6 <i>Enterococcus</i>	30
2.6.1 <i>Enterococcus</i> probióticos.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Origem e condições de conservação das linhagens utilizadas.....	35
3.2 Obtenção e conservação das amostras de leite humano.....	35
3.3 Contagem presuntiva e isolamento de bactérias lácticas.....	36
3.4 Determinação de algumas características probióticas e tecnológicas das culturas bacteriocinogênicas isoladas de leite humano.....	37
3.4.1 Detecção da produção de bacteriocinas pelas culturas isoladas de leite humano.....	37
3.4.2 Inibição de patógenos, deteriorantes e de outras bactérias lácticas.....	38
3.4.3 Tolerância a baixos valores de pH.....	39
3.4.4 Tolerância a sais biliares.....	40
3.4.5 Resistência a antibióticos de uso clínico.....	40
3.4.6 Capacidade de adesão.....	41
3.4.7 Crescimento e sobrevivência em leite.....	42
3.5 Identificação das culturas bacteriocinogênicas.....	43
3.5.1 Suspensão celular.....	43
3.5.2 Capacidade de multiplicação a 10 e 45°C, em concentração de 6,5% de NaCl e nos pHs 4,4 e 9,6.....	44

3.5.3 Produção de CO ₂ a partir da glicose.....	44
3.5.4 Caracterização bioquímica e enzimática pelo sistema miniaturizado BBL Crystal.....	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 Contagem presuntiva e isolamento de bactérias lácticas e probióticas.....	45
4.2 Características probióticas e tecnológicas das culturas isoladas de leite humano.....	48
4.2.1 Detecção da produção de bacteriocinas pelas culturas isoladas de leite humano.....	48
4.2.2 Inibição de patógenos, deteriorantes e outras bactérias lácticas.....	49
4.2.3 Tolerância a baixos valores de pH.....	53
4.2.4 Tolerância a sais biliares.....	56
4.2.5 Resistência à antibióticos de uso clínico.....	60
4.2.6 Capacidade de adesão.....	62
4.2.7 Capacidade de crescimento em leite e sobrevivência e pós-acidificação durante armazena-mento 28 dias a 4°C.....	63
4.3 Identificação das culturas bacteriocinogênicas isoladas de leite humano.....	64
4.3.1 Determinação das caracterísitcas fenotípicas e bioquímicas das linhages bacteriogênicas selecionadas.....	66
4.3.2 Caracterização bioquímica e enzimática por sistemas miniaturados.....	68
5 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS.....	73

RESUMO

Leite humano como fonte de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e com potencial probiótico

Além do aspecto nutricional de suma importância, é notória a contribuição do leite humano para o processo de desenvolvimento da microbiota intestinal do recém-nascido, um importante mecanismo de defesa do organismo contra doenças infecciosas. O papel do leite humano como fonte de bactérias probióticas, principais constituintes da microbiota intestinal, tem sido tópico de pesquisas recentes. Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de determinar e comparar a composição da microbiota de oito amostras de leite humano e verificar o potencial de utilização desse produto como fonte de bactérias probióticas. Para tanto, utilizaram-se cinco meios de cultivos seletivos para contagem presuntiva de gêneros normalmente encontrados em leite humano: lactococos, enterococos, bifidobactérias e propionibactérias. A análise quantitativa da microbiota demonstrou tendência de diminuição da contagem em função do aumento do tempo de lactação. A análise qualitativa confirmou a presença de distintos gêneros de bactérias lácticas potencialmente probióticas com algumas variações entre as amostras de leite humano. Na segunda etapa 800 colônias isoladas a partir dos cinco meios de cultivos e caracterizadas como bactérias lácticas foram selecionadas quanto às suas propriedades probióticas (produção de bacteriocina, tolerância à acidez e a sais biliares, resistência à antibióticos, capacidade de adesão a chapas de aço inoxidável) e tecnológicas (capacidade de crescimento e sobrevivência em leite). Verificou-se que apenas 15 (1,9%) linhagens produziram bacteriocinas com atividade contra *Listeria innocua* L11 e *Micrococcus luteus* ATCC® 4698, linhagens utilizadas como indicadoras, por meio do método de antagonismo simultâneo em poços, usando ágar MRS. Treze dessas linhagens também apresentaram atividade contra *Bacillus cereus* CTC 011, *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CTC 204 e *Lactobacillus helveticus* ATCC® 15009. As duas linhagens remanescentes demonstraram atividade principalmente contra *Listeria monocytogenes* ATCC® 7644. Nenhuma das quinze culturas produtoras de bacteriocinas apresentou atividade contra as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC® 2074 e *Salmonella thyphimurim* ATCC® 2364. Por outro lado, *Staphylococcus aureus* ATCC® 1602 foi resistente as quinze bacteriocinas selecionadas neste trabalho. Seis linhagens de bactérias lácticas (BALs) foram selecionadas para avaliação das demais propriedades probióticas. Observou-se que uma dessas linhagens diferenciou-se por apresentar sobrevivência a pH 2,0 e a pH 3,0, enquanto as demais mostraram tolerância apenas a pH 3,0. Todas as linhagens selecionadas apresentaram a capacidade de tolerância a 0,3% de sais biliares, de se aderir à superfície de aço inoxidável e de resistência à clindamicina, eritromicina e gentamicina. Quanto às propriedades tecnológicas, todas as seis linhagens apresentaram capacidade de crescimento em leite e não produziram odor desagradável ou pós-acidificação do leite fermentado durante a estocagem a 4°C por 28 dias. Notou-se, entretanto, diminuição, de, aproximadamente, 2,0 Log UFC.mL⁻¹, na contagem de células viáveis ao final do período de estocagem. Finalmente, por meio da avaliação dos perfis de fermentação de carboidratos e de outras reações bioquímicas, duas das linhagens isoladas de leite humano foram identificadas como *Enterococcus durans* e quatro como *Enterococcus avium*. Os

resultados permitem concluir que o leite humano é fonte potencial de bactérias com potencial probiótico para aplicação industrial.

Palavras-chave: Bactérias lácticas; Bacteriocinas; *Enterococcus*; Leite humano; Probióticos

ABSTRACT

Human milk as a source of lactic acid bacteria producing bacteriocins and probiotic potential

In addition to the nutritional aspect of paramount importance, it is clear the contribution of human milk for the development process of the intestinal tract of the newborn, an important mechanism of defense against infectious diseases. The role of human milk as a source of probiotic bacteria, major constituents of the intestinal microbiota, has been the topic of recent research. This work was carried out to determine and compare the composition of the microbiota of eight human milk samples and verify the potential use of this product as a source of probiotic bacteria. For this purpose, we used five selective culture media for counts of presumptive genera commonly found in human milk: lactococcal, enterococci, bifidobacteria and propionibacterias. The quantitative analysis of microbes showed a trend of decreasing counts as a function of time increased lactation. The qualitative analysis confirmed the presence of different kinds of potentially probiotic lactic acid bacteria with some variations between samples of human milk. In the second stage 800 colonies isolated from the five culture media and characterized as lactic acid bacteria were selected for their probiotic properties (bacteriocin production, tolerance to acid and bile salts, antibiotic resistance, adhesion to stainless steel plates) and technology (ability to grow and survive in milk). It was found that only 15 (1.9%) produced bacteriocin strains with activity against *Listeria innocua* L11 and *Micrococcus luteus* ATCC 4698[®], strains used as an indicator, by the method of antagonism wells simultaneously, using MRS agar. Thirteen of these strains also showed activity against *Bacillus cereus* CTC 011, *Listeria monocytogenes* ATCC[®] 7644, *Lactococcus lactis* subsp. CTC 204 *lactis* and *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009[®]. The two remaining strains showed activity mainly against *Listeria monocytogenes* ATCC 7644[®]. None of the fifteen cultures producing bacteriocins active against Gram-negative *Escherichia coli* ATCC 2074[®] and *Salmonella thyphimurim* ATCC 2364[®]. Moreover, *Staphylococcus aureus* ATCC 1602[®] was resistant the fifteen bacteriocins selected in this work. Six strains of lactic acid bacteria (BALs) were selected for analysis of other probiotic properties. It was observed that one of these strains distinguished by presenting survival at pH 2.0 and pH 3.0 while the other showed only tolerance to pH 3.0. All strains were selected for the ability tolerance of 0.3% bile salts, of adhering to stainless steel surface and resistance to clindamycin, erythromycin and gentamycin. The technological properties, all six strains were capable of growth in milk and produced no unpleasant odor or post-acidification of the fermented milk during storage at 4°C for 28 days. It was noted, however, decreased from approximately 2,0 Log UFC.mL⁻¹ in the viable cell count at the end of storage period. Finally, by evaluating the profiles of fermentation of carbohydrates and other biochemical reactions, two of the strains isolated from human milk have been identified as *Enterococcus durans* and *Enterococcus avium* as four. The results indicate that human milk is a potential source of probiotic bacteria with potential for industrial application

Keywords: Lactic acid bacteria; Bacteriocins; *Enterococcus*; Human milk; Probiotics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Inoculação de culturas para verificação da produção de bacteriocina em MRS pela técnica de antagonismo em poços (TAGG; MCGIVEN, 1971 modificado por BENKERROUM et al., 1993).....	38
Figura 2 - Sequência de materiais utilizados para avaliação da capacidade de adesão das bactérias lácticas produtoras de bacteriocina (BLPB).....	42
Figura 3 - Colônias presentes no meio MRS pH 6,5.....	46
Figura 4 - Crescimento de colônias em ágar M17.....	46
Figura 5 - Colônias presentes em placa contendo ágar MRS suplementado com soluções estoque de dicloxacilina, LiCl e de CyHCl.....	46
Figura 6 - Distribuição percentual entre os grupos de bactérias lácticas nas amostras de leite humano.....	48
Figuras 7a e 7b - Placa contendo <i>Bacillus cereus</i> para teste de inibição, nos quais foram inoculadas as bactérias lácticas produtora de bacteriocina.....	52
Figuras 8a e 8b - Placa contendo <i>Lactococcus lactis</i> para teste de inibição, nos quais foram inoculadas as bactérias lácticas produtora de bacteriocina.....	52
Figuras 9a e 9b - Placa contendo <i>Lactobacillus helveticus</i> para teste de inibição, nos quais foram inoculadas as bactérias lácticas produtora de bacteriocina.....	53
Figura 10 - Viabilidade celular das cepas de BLPB em pH 2 após 0, 1 e 3 horas de exposição.....	54
Figura 11 - Viabilidade celular das cepas de BLPB em pH 3 após 0, 1 e 3 horas de exposição.....	55
Figura 12 - Viabilidade celular das cepas de BLPB em pH 5 após 0, 1 e 3 horas de exposição.....	55
Figura 13 - Viabilidade celular das cepas de BLPB de número 1, 2, 5, 7, 9 e 10 quando expostas à concentração de 0,3% sais biliares.....	58
Figura 14 - Viabilidade celular das cepas de BLPB de número 1, 2, 5, 7, 9 e 10 na ausência de sais biliares.....	59
Figura 15 - Halos de inibição produzidos pela ação antagônica aos antibióticos de uso clínico frente à cepa testada.....	62

Figura 16 - Morfologia celular de linhagem bacteriogênica isolada a partir da amostra de leite humano "H" 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal do leite humano.....	23
Tabela 2 - Contagens presuntivas de bactérias lácticas e probióticas, obtidas em cinco meios de cultivo, de oito amostras de leite humano em diferentes estágios de lactação.....	45
Tabela 3 - Distribuição porcentual entre os grupos de bactérias lácticas nas amostras de leite humano.....	47
Tabela 4 - Inibição de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pelas bacteriocinas produzidas por 15 linhagens isoladas da amostra de leite humano H.....	50
Tabela 5 - Viabilidade celular $\log \text{UFC mL}^{-1}$ das bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas (BLPB) após exposição a condições ácidas nos tempos 0, 1 e 3 horas.....	53
Tabela 6 - Viabilidade celular $\log \text{UFC mL}^{-1}$ das BLPB testadas após exposição a sais biliares nos tempos 0, 2, 4 e 24 horas.....	57
Tabela 7- Suscetibilidade <i>in vitro</i> das culturas isoladas de leite humano às diferentes classes de antibióticos por difusão em Agar.....	61
Tabela 8 - Capacidade de adesão das culturas nas chapas de aço inoxidável.....	63
Tabela 9 - Contagem de células viáveis ($\log \text{UFC.mL}^{-1}$) e pós-acidificação das culturas isoladas de leite humano nos leites fermentados armazenados a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 28 dias.....	64
Tabela 10 - Resultados dos testes realizados com as 15 linhagens bacteriocinogênicas isoladas a partir da amostra de leite materno “H”.....	65
Tabela 11 - Características fenotípicas e bioquímicas das linhagens bacteriocinogênicas selecionadas (BLPB 1, BLPB 2, BLPB 5, BLPB 7, BLPB 9 e BLPB 10).....	67
Tabela 12 - Reações bioquímicas observadas para as linhagens isoladas de leite humano por meio do sistema de identificação BL CRYSTAL TM	68
Tabela 13 - Classificação taxonômica das linhagens de BLPB isoladas de leite humano.....	69

1 INTRODUÇÃO

O leite é o produto oriundo das glândulas mamárias, das espécies mamíferas no período de lactação. É o alimento exclusivo dos recém-nascidos das espécies de mamíferos, sendo, juntamente com o mel, as únicas substâncias produzidas pela natureza com finalidade exclusiva de servirem como alimento (OLIVEIRA, 1986).

Segundo Heine (1992), citado por Scarso (2008), o leite humano é um alimento adequado à espécie humana. Seus componentes bioquímicos e celulares, assim como a sua composição de nutrientes são essenciais para o desenvolvimento do recém – nascido.

O leite humano possui bactérias de diferentes grupos, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiela*, *Enterobacter*, *Serratia* (SERAFINI et al., 2003) e bactérias do ácido láctico ou lácticas, que se destacam no alimento em questão. Estas últimas correspondem a um grupo heterogêneo de bactérias Gram-positivas com diferentes características morfológicas, metabólicas, fisiológicas e taxonômicas. A principal função metabólica destas bactérias é produzir ácido láctico como principal produto da fermentação de açúcares (LERAYER et al., 2009).

Dentre as bactérias lácticas mais estudadas provenientes do leite humano estão os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, originando espécies comercialmente empregadas em produtos probióticos (SERAFINI et al., 2003).

Probióticos são "micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro" (FAO/WHO, 2002). Além de ação local no intestino, os probióticos devem apresentar certas características fisiológicas e tecnológicas. Dentre as características fisiológicas encontram-se a resistência a antibióticos, sobrevivência às condições ácidas no estômago e a presença de sais biliares no intestino delgado. Quanto as características tecnológicas, destacam-se a manutenção da viabilidade no processamento e estocagem do produto e sua resistência aos procedimentos de produção de culturas comerciais.

As bactérias probióticas vêm sendo extensivamente exploradas pela indústria de alimentos (VASILJEVIC; SHAH, 2008). Entretanto, verifica-se a existência de um número irrisório de linhagens comprovadamente probióticas e comercialmente disponíveis para suprir esta demanda industrial. Sendo assim, a busca por essas

bactérias a partir do leite humano, amplia o nicho de obtenção das cepas potencialmente probióticas.

Além das propriedades tecnológicas, as bactérias lácticas possuem a característica de produzir bacteriocinas – termo utilizado para designar pequenas proteínas biologicamente ativas que apresentam pequeno ou amplo espectro de ação antimicrobiana contra outros micro-organismos, incluindo patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (GARCIA-GARCERA et al., 1993). As culturas produtoras de bacteriocinas podem ser usadas em alimentos de modo a melhorar sua segurança e qualidade.

O presente trabalho foi desenvolvido visando obter dados sobre a microbiota do leite humano, tendo em vista a possibilidade de este ser uma fonte de probióticos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leite humano

A composição do leite humano varia entre as mulheres, grupos étnicos, diferentes períodos de lactação ou durante a mesma mamada. O leite humano é classificado de acordo com a fase em que é produzido em colostro, leite de transição e leite maduro (PICCIANO, 2001).

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2001), o colostro é o primeiro produto da secreção láctica da nutriz e é produzido, em média, até o sétimo dia pós-parto. É um líquido amarelado, denso, produzido em pequeno volume, com alto conteúdo de proteínas e minerais, baixa concentração de gordura e lactose, refletindo as necessidades do recém-nascido durante a sua primeira semana de vida (NASCIMENTO; ISSLER, 2003). Além disso, é rico em anticorpos, conferindo proteção aos recém-nascidos contra infecções, e contém oligossacarídeos, facilitando o estabelecimento de uma microbiota intestinal composta predominantemente por *Bifidobacterium*. Paralelamente propicia efeito laxativo, auxiliando na eliminação do mecônio (EUCLYDES, 2000).

A fase do leite de transição compreende o intervalo do oitavo ao décimo quarto dia pós-parto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Nesse período a composição do colostro muda, com a diminuição da concentração de imunoglobulinas e proteínas e o aumento dos teores de lactose, gordura e do conteúdo energético (NASCIMENTO; ISSLER, 2003).

O leite maduro é considerado aquele produzido após o décimo quinto dia pós-parto. Sua composição é variável em cada mãe e durante a mamada. Além disso, a composição do leite maduro varia de acordo com as necessidades da idade em que se encontra o bebê (Tabela 1). Este leite é rico em lactose e relativamente pobre em proteínas e minerais, quando comparado ao leite de outros mamíferos (CHAN, 2005).

A proteína do leite humano (cerca de 8-9 g/L) possui relativamente baixo conteúdo de caseína (20% da proteína total) e uma grande fração protéica de soro que inclui α -lacto-lactoferrina, albumina e imunoglobulina A (IgA), sendo que as duas

últimas estão envolvidas na proteção contra infecções gastrointestinais nos bebês (MICHAELSEN, 1990).

O teor de gordura do leite humano é de aproximadamente 3,8%, sendo que este macronutriente é o mais variável, podendo haver diferenças inclusive nas mamadas ao longo do decorrer do dia, para uma mesma mulher (CARIAS, 1997).

Os carboidratos do leite humano consistem principalmente de lactose, mas estão presentes também pequenas quantidades de galactose, frutose e oligossacarídeos. A lactose é um açúcar encontrado apenas no leite. No leite materno sua concentração é considerada elevada, estando em média a 4% no colostro, aumentando para 7% no leite maduro (CARIAS, 1997).

O teor de vitaminas no leite humano depende da dieta materna e é geralmente bem adaptado às necessidades da criança. O leite materno é uma fonte natural de vitamina "A", contém retinol e carotenóides. O leite materno satisfaz as necessidades desta vitamina no bebê e será suficiente para atender às necessidades da criança durante os primeiros seis meses de vida, se o mesmo for alimentado exclusivamente com leite materno. O colostro, bem como o leite de transição (duas primeiras semanas) contém o dobro de vitamina "A" do que o leite maduro, por isso é importante que a criança receba o colostro visto que isso compensa as baixas reservas hepáticas dessa vitamina (CARIAS, 1997).

O conteúdo mineral do leite humano é relativamente baixo (2 g/L) em comparação com leite de vaca. Isso é fisiologicamente importante porque fornece uma carga mais baixa de solutos relativamente mais baixa para o rim imaturo do recém-nascido. O conteúdo de ferro no leite humano também é baixo (0,3-0,5 mmol.L⁻¹), porém sua taxa de disponibilidade é alta (75% é absorvido no intestino) e, combinado com as reservas de ferro do próprio recém-nascido (cerca de 1,34 mmol.kg⁻¹), parece ser adequado para a proteção da criança contra a deficiência férrica durante os primeiros quatro a seis meses (LÓPEZ, 1999).

Além de nutrir e saciar a necessidade hídrica, o leite humano fornece um aporte adicional de anticorpos, outras proteínas e células imunológicas que, por diferentes modos de ação, auxiliam na proteção do recém-nascido contra agentes infecciosos durante seus primeiros meses de vida, quando ele ainda não consegue produzir uma resposta imune efetiva contra organismos estranhos (NEWMAN,

1995). Pelo leite humano são transportadas e passadas para os recém-nascidos: imunoglobulinas, A (principalmente), G, M, D e E, linfócitos (B e T), macrófagos, neutrófilos, ácidos graxos essenciais, fator Bifidus, gama interferon, lactoferrina, entre outros.

Dentre os componentes citados acima, o fator bífido é um carboidrato nitrogenado que estimula a multiplicação do *Bifidobacterium bifidus*, o qual está presente no intestino do recém – nascido. Este micro-organismo fermenta açúcares, produzindo ácido láctico, ácido acético e pequenas quantidades de ácido fórmico e succínico. Estas substâncias tornam o conteúdo gastrointestinal ácido e impedem o desenvolvimento de bactérias patogênicas, fungos e parasitas (XANTHOU, 1998).

Tabela 1 - Composição centesimal do leite humano

Leite Humano	
Proteína (g/100 mL)	1,5
Gordura (g/100 mL)	3,5
Lactose (g/100 mL)	7,0
Cinzas (g/100 mL)	0,2
Umidade (g/100 mL)	87,8

Fonte: Oliveira (1986)

2.2 A microbiota do leite humano

Estudos recentes têm demonstrado que o leite humano, longe de ser um líquido estéril, constitui uma excelente e contínua fonte de bactérias comensais para o intestino infantil. Estas bactérias podem também desempenhar um papel importante na redução da incidência e severidade de doenças infecciosas em crianças amamentadas com leite humano (VILLOSLADA et al., 2007). Esta hipótese é apoiada por estudos relativamente antigos que notificam a perda de atividade antimicrobiana em leite humano pasteurizado (FORD et al., 1977).

A composição do leite humano varia consideravelmente entre as mulheres, grupos étnicos, diferentes amostras de leite de uma mesma mulher no decorrer da

lactação e durante a mamada. O leite humano é classificado em três fases: colostro, leite de transição e leite maduro (EUCLYDES, 2000).

A microbiota do leite humano é constituída por bactérias comensais dos grupos *Staphylococci*, *Streptococci*, *Corynebacteria*, *Lactobacilli*, *Propionibacteria* e *Bifidobacteria*, que são frequentemente encontradas no mamilo, auréola e tecidos adjacentes, bem como nos dutos lactíferos que foram colonizados (MACKIE et al., 1999). Destes grupos, *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. são os mais estudados, sendo que determinadas espécies já são comercialmente empregadas como probióticos.

Nos recém nascidos saudáveis, a microbiota intestinal é predominantemente constituída por *Bifidobacterium* spp., que representa cerca de 80% das bactérias fecais cultiváveis (PICARD et al., 2005). Por apresentar características similares a das bifidobactérias, o potencial probiótico de *Propionibacterium* também vem sendo avaliado.

2.3 Bactérias lácticas

As bactérias lácticas são as principais bactérias presentes nos alimentos fermentados (BATTCOCK; AZAM-ALI, 1998). São células vivas, procariontes e heterotróficas, pois necessitam de fontes de carbono relativamente complexas (DELLAGLIO et al., 1994). Pertencem a um grupo de bactérias Gram positivas, geralmente imóveis, não formadoras de esporos, na forma de cocos ou bacilos, e que produzem ácido láctico como principal produto da fermentação de carboidratos. Este grupo é composto de espécies dos gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Carnobacterium*. São estritamente fermentativas, anaeróbicas, porém, aerotolerantes, e geralmente são catalase-negativas (SCHLEIFER; LUDWIG, 1995).

Originalmente, o gênero *Bifidobacterium* era considerado um membro do grupo das bactérias lácticas, mas devido ao elevado conteúdo de guanina (G) e citosina (C) no DNA e dados da subunidade 16S do RNA ribossomal, fica claro que espécies deste gênero pertencem ao ramo dos actinomicetes. Contudo, o termo bactérias lácticas pode referenciar gêneros importantes como *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Atopobium* e *Probionibacterium* (SCHLEIFER; LUDWIG, 1995).

Em geral, as bactérias lácticas são mesofílicas podendo, porém se desenvolver em temperaturas de 5°C ou 45°C. Enquanto a maioria das linhagens se multiplicam em valores de pH entre 4,0 e 4,5, algumas são ativas a pH 9,6 e outras a pH 3,2. De uma forma geral, este grupo de bactérias apresenta-se como fracamente proteolítico e lipolítico, sendo que necessitam para seu crescimento de aminoácidos pré-formados, vitamina B, bases purídicas e pirimídicas. Todas as bactérias lácticas produzem ácido láctico a partir das hexoses, obtendo energia via fosforilação ao nível do substrato. As vias pelas quais ocorre o metabolismo das hexoses dividem as bactérias lácticas em dois grupos, homofermentativo e heterofermentativo (DELLAGLIO et al., 1994).

As bactérias homofermentativas, como *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e alguns *Lactobacillus*, produzem ácido láctico como produto final único da fermentação da glicose, utilizando a via Embden-Meyerhof-Parnas para produzir dois moles de lactato por mol de glicose e gerar, aproximadamente, duas vezes mais energia por mol de glicose do que os heterofermentadores. As bactérias heterofermentadoras, como *Weissella*, *Leuconostoc* e alguns *Lactobacillus*, produzem quantidades equimolares de lactato, dióxido de carbono e etanol a partir da glicose, via hexose monofosfato ou pentose (DELLAGLIO et al., 1994).

As bactérias lácticas são encontradas em diversos ambientes na natureza sendo capazes de se desenvolver sob diferentes condições. Normalmente são associadas a *habitats* ricos em nutrientes, sendo frequentemente encontradas em alimentos fermentados, como leite, carnes, vegetais, grãos, frutas e bebidas. Algumas delas também fazem parte da microbiota natural dos tratos respiratório e intestinal e de cavidades naturais como boca e vagina de humanos e animais. Também são encontradas em forragens e outros vegetais (POT et al., 1993).

Devido a sua adaptação fisiológica, as bactérias lácticas são capazes de colonizar meios extremamente diferentes do ponto de vista físico-químico e biológico. Em determinados ecossistemas elas são dominantes, enquanto em outros são minoritárias, mas capazes de exercer seus efeitos benéficos ou, mais raramente, iniciar alterações biológicas (DELLAGLIO et al., 1994).

Estes micro-organismos são utilizados naturalmente ou como culturas selecionadas para fermentação de alimentos, através da acidificação com ácido láctico e formação de sabor ácido nos alimentos (RODRIGUEZ et al., 2000). Além

disso, as bactérias lácticas conferem proteção contra micro-organismos deteriorantes e patogênicos através da produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, diacetil, compostos antifúngicos tais como ácidos graxos e também bacteriocinas (MESSENS & DE VUGST, 2002)

As bactérias lácticas desempenham um papel importante na produção de alimentos fermentados, visto que os produtos obtidos possuem características de segurança, higiene, estabilidade no armazenamento, além de atraentes propriedades sensoriais (SAVADOGO et al., 2006).

2.4 Bacteriocinas

Dentre os compostos antimicrobianos produzidos pelas bactérias lácticas, as bacteriocinas têm se mostrado muito eficientes. Uma definição a respeito de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas sugere que estes compostos devem ser considerados como produtos primários extracelulares, sintetizados no ribossomo bacteriano, os quais podem apresentar um espectro de atividade limitado (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

Tais bacteriocinas têm se mostrado eficientes na inibição de micro-organismos deteriorantes como *Clostridium*, lactobacilos heterofermentativos e de patógenos de origem alimentar como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* spp., *Clostridium* spp. e *Bacillus* spp. Muitas bacteriocinas apresentam atividade melhor sob baixos valores de pH (GARCIA-GARCERA et al., 1993)

Com base nas propriedades estruturais, físico-químicas e moleculares, as bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas podem ser divididas em classes. No entanto, esta classificação é continuamente revisada e modificações podem ser sugeridas em função dos estudos relacionados e da descoberta de novas bacteriocinas (JAVED, 2009).

A produção de bacteriocinas geralmente está codificada no material genético presente em plasmídeos, e tem como objetivo principal eliminar ou inibir diferentes espécies, ou mesmo diferentes cepas da mesma espécie. Esta propriedade é semelhante à dos genes de resistência a antibióticos que também são codificados por plasmídeos, no entanto as bacteriocinas são muito mais específicas em sua ação. As bacteriocinas são nomeadas de acordo com as espécies que as produzem.

Assim, bacteriocinas produzidas por *E. coli*, recebem o nome “colicinas”, aquelas produzidas por *Enterococcus* spp. são chamadas de “enterocinas”, *S. mutans* “mutacinas”, *S. epidermidis* “epiderminas”, entre outros (JAVED, 2009).

2.5 Bactérias probióticas

Probióticos são "micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro" (FAO/WHO, 2002). As bactérias probióticas tradicionalmente usadas para consumo humano pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* oriundas do intestino humano, em sua maioria. Existem centenas de linhagens de lactobacilos e bifidobactérias que poderiam ser usadas na fermentação do leite. No entanto, para que os micro-organismos sejam capazes de exercer efeitos profiláticos e terapêuticos ao consumidor é preciso que as linhagens possuam algumas características importantes e específicas. Destas características estão a resistência a antibióticos e a sobrevivência nas condições ácidas do estômago e na presença de sais biliares no intestino delgado. Também é preciso que possuam efeitos benéficos ao hospedeiro demonstrados *in vivo* e *in vitro* por meio de uma dose conhecida, tenham capacidade de adesão ao muco ou epitélio intestinal e estes micro-organismos devem apresentar segurança comprovada isto é, baixo risco de infecção sistêmica e de produção de toxinas deletérias, não oferecer estímulo excessivo à resposta imunológica e não possibilitar a transferência de genes entre micro-organismos e possuir a garantia da manutenção da viabilidade até o momento do consumo na forma de cápsula, pó ou quando adicionada a produtos lácteos (VASILJEVIC; SHAH, 2008; PINEIRO; STANTON, 2007; ZUCCOTTI et al., 2008).

A tolerância à bile e a condições ácidas são duas propriedades fundamentais que conferem a habilidade de um micro-organismo probiótico sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, resistindo às condições ácidas no estômago e à ação de sais biliares no início do intestino delgado (PARK et al., 2002).

A sobrevivência da bactéria ao suco gástrico depende de sua tolerância a baixos valores de pH. O pH do HCl secretado no estômago é de 0,9, mas a presença de alimentos aumenta este valor para 3,0. Após a ingestão alimentar, o esvaziamento gástrico se dá de 2 a 4 horas. As bactérias que sobrevivem à acidez estomacal seguem pelo trato gastrointestinal devendo resistir à secreção de bile e à

presença de sais biliares no duodeno. Os sais biliares são liberados no intestino delgado após a ingestão de alimentos gordurosos, apresentando função detergente (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000).

Como a membrana celular dos micro-organismos é composta de lipídeos e ácidos graxos, os sais biliares representam uma condição crítica a sua sobrevivência. Entretanto, alguns micro-organismos reduzem o efeito detergente dos sais biliares devido à sua capacidade de hidrolisar esses sais pela ação da enzima BSH (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000). A enzima BSH é encontrada em muitos gêneros, incluindo *Lactobacillus* (GILLILAND; SPECK, 1977). A resistência à ação de sais biliares varia entre as espécies de *Lactobacillus* (ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000).

Apesar da concentração de sais biliares variar ao longo do trato gastrointestinal, a concentração majoritária para os testes de resistência de cepas probióticas a bile é de 0,3% (GILLILAND et al., 1984).

Além da capacidade de sobreviver durante a passagem pelo trato gastrintestinal, a adesão nas células do epitélio intestinal para a colonização e a capacidade de crescimento na presença de carboidratos prebióticos são importantes características para a seleção de cepas com potencial probiótico (PENNACCHIA et al., 2004).

As bactérias probióticas vêm sendo extensivamente exploradas pela indústria de alimentos. Com a tecnologia disponível atualmente, células de culturas selecionadas podem ser preparadas para suplementação de dieta com elevados níveis de viabilidade e atividades metabólicas especiais. Qualidades como especificidade e compatibilidade com o hospedeiro, atividade de β -galactosidase e interações com outras espécies da microbiota intestinal, podem ser importantes e devem ser consideradas (LERAYER et al., 2009).

As propionibactérias adquiriram recentemente o *status* de probióticas devido aos benefícios que podem trazer à saúde humana. Assim como as bifidobactérias, as propionibactérias pertencem ao grupo de “alto conteúdo de Guanina+Citosina” (67%) das bactérias Gram positivas, estando agrupadas muito próximas dentro das actinobactérias. A quantidade das bases nitrogenadas Guanina e Citosina na molécula de DNA varia entre as espécies sendo útil para a separação de grandes grupos bacterianos e de gêneros. Apresentam, assim, várias características em

comum e possuem importância tecnológica e funcional. Por muitas décadas foram reconhecidamente indispensáveis para a produção de queijos tipo Emental e atualmente sabe-se que auxiliam na fermentação de vegetais e na preparação de silagens. As propionibactérias apresentam-se na forma de cocos pleiomorfos, sendo aerotolerantes, imóveis e não formadoras de esporos. Elas produzem ácido láctico a partir de glicose ou lactose, ácido propiônico, ácido acético, CO₂ e compostos aromáticos. Linhagens específicas de *Propionibacterium*, como *P. freudenreichii* ATCC 6207 e JS e *P. jensenii* 702 são capazes de sintetizar grandes quantidades de vitamina B12, cuja importância para homens e animais tem incentivado pesquisas para a otimização de sua produção por vias química e biológica. São preferidas as linhagens de *P. freudenreichii* por não produzirem endotoxinas (SAFAEI, 2004).

2.5.1 Bactérias probióticas em leite humano

A descrição da presença de bactéria em leite humano data de 60 anos atrás. Porém, posteriormente, declarou-se que esses micro-organismos estavam presentes por contaminação no momento de retirada do leite (GAVIN; OSTOVR, 1977).

No início do século 21, dois grupos europeus independentes demonstraram a presença de bactérias lácticas no leite humano e seu potencial probiótico. Assim, Hekkila & Saris (2003) informaram que essas bactérias do leite humano poderiam proteger a mãe e o recém-nascido de infecções causadas por *Staphylococcus aureus*. De um modo semelhante Martín et al., (2003) descreveram o isolamento das seguintes bactérias lácticas do leite humano: *Lactobacillus gasseri* CECT571423, *L. salivarius* CECT571324 e *L. fermentum* CECT571623.

Além das linhagens descritas anteriormente, existem outras cepas comerciais relacionadas ao leite humano. São exemplos *Lactobacillus reuteri* ATCC55730 (HEKKILA; SARIS, 2003) e *Lactobacillus rhamnosus* LGG, que embora originalmente tenham sido isolados do trato gastrointestinal (CONWAY et al., 1987), também foram encontrados no leite humano por pesquisadores finlandeses (HEKKILÄ; SARIS 2003).

Martin et al. (2003) ao isolarem bactérias lácticas de amostras de leite humano, auréola mamária e pele de oito mães saudáveis, além de *swab* da boca e

fezes dos respectivos bebês alimentados, detectaram perfis genéticos idênticos entre as cepas isoladas destas diferentes fontes, o que comprova a capacidade de resistência desses micro-organismos às condições adversas do trato gastrointestinal do bebê, característica essencial para um micro-organismos probiótico.

Um estudo semelhante ao anterior foi realizado por Martin et al. (2009). Nele, os autores tinham como objetivo verificar a existência de bifidobactérias no leite humano, além de comprovar a capacidade de transmissão desses micro-organismos para o intestino infantil através da amamentação. Vinte e três mulheres e seus respectivos bebês forneceram amostras de leite materno e fezes. Meios seletivos foram utilizados para o isolamento de *Bifidobacterium* spp. e colônias típicas foram submetidas a identificação do gênero através de técnicas moleculares. *Bifidobacterium* spp. estavam presentes em oito amostras de leite e 21 amostras fecais. *Bifidobacterium breve*, *B. adolescentis* e *B. bifidum* foram isoladas de amostras de leite e as fezes dos bebês continham ainda *B. longum* e *B. pseudocatenulatum*. Assim como evidenciado no estudo de 2003, houve uma grande similaridade entre as bifidobactérias isoladas nas amostras de leite e aquelas encontradas nas fezes dos respectivos bebês alimentados.

Gueimondea et al. (2007) ao avaliar a presença de *Bifidobacterium* sp em 20 amostras de leite humano através de técnicas moleculares, constatou que as amostras continham esses micro-organismos, e as principais espécies encontradas foram *Bifidobacterium longum*, *B. animalis*, *B. bifidum* e *B. catenulatum*.

2.6 Enterococcus

Diversos gêneros e espécies de micro-organismos têm apresentado características necessárias para uso como culturas probióticas, inclusive leveduras como *Saccharomyces* spp. Dentre as bactérias lácticas estão *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Bifidobacterium* spp. (NOGUEIRA, 2010).

Dentre os citados acima, os *Enterococcus* compreendem um grupo de micro-organismos que apresentam forma de cocos Gram positivos e catalase negativos sendo pertencentes à família *Enterocaceae*. Crescem a uma temperatura ótima de 35°C, embora a maioria das espécies deste gênero cresça entre 10 e 45°C. Além disso, a minoria apresenta crescimento em concentrações de até 6,5% de NaCl, pH

em torno de 9,6 e a capacidade de sobreviver a 60°C durante 30 minutos, sendo por isto, uma bactéria termodúrica. (FOULQUIE-MORENO, 2006). Estes micro-organismos podem ser isolados de diversos nichos como plantas, água e leite, além do trato intestinal humano (ARAÚJO, 2008).

Anteriormente, os *Enterococcus* eram classificados como um grupo pertencente ao gênero *Streptococcus*. Entretanto, técnicas modernas de classificação como o seqüenciamento do 16s rDNA resultaram em transferência de alguns membros do gênero *Streptococcus*, como alguns *Streptococcus* do grupo D de Lancefield, ao novo gênero *Enterococcus* (GIRAFFA et al., 1997) que pertencem à família *Enterococaceae*, composta pelos gêneros *Atopobacter*, *Catellibacter*, *Melissococcus*, *Pilobacter*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus* (EUZÉBY, 2011)

Atualmente são conhecidas mais de 41 espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* spp: *Enterococcus avium*, *E. devriesei*, *E. gilvus*, *E. hermannienseis*, *E. maloduratus*, *E. pallens*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. asini*, *E. faecalis*, *E. haemoperoxydus*, *E. moravienseis*, *E. ratti*, *E. faecium*, *E. canis*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. villorum*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. phoeniculicola*, *E. saccharolyticus*, *E. sulfureus*, *E. camelliae*, *E. italicus*, *E. aquimarinus*, *E. caccae*, *E. canistestini*, *E. flavescens*, *E. porcinus*, *E. saccharominimus*, *E. seriolicida*, *E. silesiacus*, *E. solitarius*, *E. termitis*, *E. thailandicus*, *E. viikkienseis* (EUZÉBY, 2011).

Enterococcus também são capazes de produzir enterocinas (bacteriocinas), apresentando ação antagônica frente a patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, sendo de extrema importância na inocuidade de alimentos. Ademais, produzem compostos carbônicos, atividade proteolítica e compostos aromáticos, que contribuem na maturação e segurança de queijos artesanais (ARAÚJO, 2008).

2.6.1 *Enterococcus* probióticos

A maioria das culturas probióticas é de origem intestinal e pertence aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, enquanto *Enterococcus* spp. são apenas ocasionalmente utilizados como probióticos (FRANZ et al., 2003; TEMMERMAN et al., 2003). No entanto, o crescente interesse pelo uso de probióticos tem sugerido

algumas cepas de enterococos como candidatos seguros, juntamente com as linhagens mais comumente utilizada de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e vários estudos estão sendo feitos com esses micro-organismos (SHARMA et al, 2012; KURITZA et al., 2012; POLLMANN et al., 2005; MANLEY et al., 2007).

Linhagens de *Enterococcus faecium* têm sido isoladas com frequência de queijos tipo Minas Frescal artesanais, geralmente fabricados com leite cru. Nestes queijos, como em alguns outros de origem européia, este micro-organismo contribui para o desenvolvimento de sabor e aroma, tendo sido isoladas linhagens produtoras de diacetil (BROLAZO et al., 2002).

Algumas linhagens, como *Enterococcus faecium* SF68, são consideradas probióticas e têm sido adicionadas em alguns produtos comercializados no exterior por apresentarem efeitos benéficos ao homem, tais como: inibição *in vitro* de bactérias enteropatogênicas sendo uma alternativa de uso para os antibióticos no tratamento e prevenção de diarreias e mucosites e equilíbrio da microbiota intestinal de pacientes tuberculosos submetidos a longos tratamentos de antibioticoterapia (FRANZ et al., 2003).

Enterococcus faecium PR88 foi utilizado em queijo Cheddar em estudos realizados por Hunter et al. (1996) e Gardiner et al. (1999). Nestes estudos, *E. faecium* PR88, que possui propriedades exigidas para ser considerado um micro-organismo probiótico, incluindo a capacidade de aliviar a síndrome do intestino irritável, não patogenicidade, e tolerância aos sais biliares e também às condições ácidas, foi utilizado como uma cultura adjunta. Hunter et al. (1996) observaram que o queijo Cheddar produzido com a estirpe adjunta apresentou aceleração da proteólise e o aumento na produção de alguns compostos voláteis quando comparado ao queijo controle (sem *E. faecium* PR88) durante toda a maturação. No estudo de Gardiner et al. (1999), a viabilidade celular da cultura adicionada em queijo Cheddar foi mantida durante 9 - 15 meses de maturação a 8°C. As evidências sugerem, portanto, que o queijo Cheddar foi um bom carreador para *E. faecium* PR88, e que a estirpe não só beneficiaria a saúde humana, mas também melhoraria as características intrínsecas do queijo Cheddar.

Lertworapreecha et al. (2011), em um estudo no qual foram isoladas 66 linhagens de *Enterococcus faecium*, concluíram que duas delas (EFMI 47 e EFMI 49) demonstraram potencial para utilização como probióticos, visto que apresentaram

resistência à ácido e bile, aderência ao muco intestinal, capacidade de inibição de bactérias patogênicas e produção de bacteriocina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem e condições de conservação das linhagens utilizadas

As linhagens sensíveis à nisina, *Listeria innocua* (L11) (Pasteur Institute, França) e *Micrococcus luteus* ATCC[®]4698, foram utilizadas como indicadoras da produção de bacteriocinas (BROMBERG et al., 2006; MORENO, 1995, 2003; MORENO et al., 1999).

L. innocua (L11) foi fornecida pelo Dr. Jean Richard do Institute National de Recherches Agronomiques – INRA, França. Na determinação do espectro de atividade foram avaliadas *Listeria monocytogenes* ATCC7644, *Escherichia coli* ATCC[®]2074, *Salmonella thyphimurium* ATCC[®]2364, *Staphylococcus aureus* ATCC[®]1602, *Lactobacillus helveticus* ATCC[®]15009, *Bacillus cereus* CTC011 e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CTC204, estas duas são pertencentes a Coleção de Culturas do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), Campinas, São Paulo, Brasil.

As linhagens foram conservadas a -80°C nos meios de cultura suplementados de 15% (p/v) de glicerol (Synth, Brasil). Antes dos experimentos, cada linhagem foi descongelada e ativada (três vezes consecutivas) em meios de cultivo e condições específicas de incubação. O caldo MRS (de Man Rososa e Sarpe) a 37±1°C por 24 horas foi utilizado para as linhagens do grupo láctico e o caldo TS (Trypticase de soja) a 37±1°C por 24 horas para as demais linhagens. Quando empregado para *L. innocua* (L11) e *L. monocytogenes* ATCC 7644, o caldo TS foi suplementado de 0,6% de extrato de levedura (p/v) (MORENO, 1995).

3.2 Obtenção e conservação das amostras de leite humano

As 8 amostras de leite humano foram voluntariamente doadas por 8 nutrízes da região de Campinas, São Paulo, Brasil. De acordo com a fase de lactação as amostras foram designadas das seguintes formas: Amostra A: 1 ano, Amostras B, D e H: 45 dias, Amostra C: 5 meses, Amostra E: sem informação, Amostras F e G: 21 dias).

As nutrizes receberam as seguintes informações para procederem a coleta asséptica do leite: (i) realizar a ordenha em um local limpo e tranquilo; (ii) prender os cabelos; (i) lavar cuidadosamente as mãos e antebraços e secar com uma toalha limpa ou de papel; (iv) limpar a pele da aréola e da mama com um pano limpo umedecido e secar com uma toalha limpa ou de papel; (v) posicionar o recipiente estéril próximo ao seio; (vi) massagear delicadamente a mama como movimentos circulares da base em direção à aréola; (vi) procurar estar relaxada, sentada ou em pé, em posição confortável; (vii) curvar o tórax sobre o abdômen, para facilitar a saída do leite e aumentar o fluxo; (viii) com os dedos da mão em forma de “C”, colocar o polegar na aréola acima do mamilo e o dedo indicador abaixo do mamilo na transição aréola-mama, em oposição ao polegar, sustentando o seio com os outros dedos; (ix) pressionar e soltar suavemente o polegar e o dedo indicador, um em direção ao outro, e levemente para dentro em direção à parte torácica; (x) desprezar os primeiros jatos e proceder a coleta.

Os frascos contendo as amostras de leite foram imediatamente armazenados em refrigeradores domésticos com temperatura ao redor de 7°C. O transporte das amostras até o laboratório de microbiologia do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Laticínios (TecnoLat), do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) foi realizado em caixas térmicas refrigeradas com gelo reciclável.

3.3 Contagem presuntiva e isolamento de bactérias lácticas

Os grupos de micro-organismos de interesse, os meios de cultura e condições de cultivo utilizados para enumeração e isolamento de bactérias lácticas e probióticas, foram determinados através de diferentes metodologias (SAXAELIN et al., 1999; FAVARO et al., 2004; BENJELLOUN et al., 2007).

A contagem de *Lactococcus* e *Lactobacillus* foi adaptada de acordo com Saxaelin et al. (1999). Para contagem de bactérias do grupo *Lactobacillus* foi utilizado meio MRS pH 6,5 e também MRS acidificado pela adição de ácido acético até pH 5,4, propícios para o crescimento de diferentes linhagens de micro-organismos do grupo *Lactobacillus*. O período de incubação foi de 72 horas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ em atmosfera de anaerobiose (Anaerogen, Oxoid). Para contagem de micro-organismos do grupo *Lactococcus* foi utilizado meio M17 substituindo-se a lactose

por 5% de glicose, com incubação a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas em condições de aerobiose.

Para contagem de bactérias do grupo *Bifidobacterium* utilizou-se meio MRS ágar adicionado de 5 mL de soluções estoque de Dicloxacilina (Sigma), 10 mL de solução estoque de Cloreto de Lítio (LiCl) (Ecibra) e 5 mL de solução estoque de Cloridrato de Cisteína (CyHCl) (Vetec) por litro de meio. A semeadura foi feita por profundidade e incubação anaeróbica (Anaerogen, Oxoid) a $37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ por 72 horas (FAVARO et al., 2004).

Para a quantificação do grupo *Propionibacterium* seguiu-se a metodologia descrita por Benjelloun et al. (2007) e o meio utilizado para contagem desses micro-organismos foi ágar lactato, com incubação a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ por 5 dias em condições de anaerobiose (Anaerogen, Oxoid).

3.4 Determinação de características probióticas e tecnológicas das culturas bacteriocinogênicas isoladas de leite humano

3.4.1 Detecção da produção de bacteriocinas pelas culturas isoladas de leite humano

A produção de bacteriocinas pelas culturas lácticas isoladas foi verificada pelo método de antagonismo simultâneo em poços segundo Tagg e Mcgiven (1971), modificado por Benkerroum et al. (1993). Para tanto, cultivos ativos da cultura sensível em fase estacionária de crescimento (10^8 UFC/mL) foram inoculados a 1% em 20 mL de ágar MRS suplementado com glicerofosfato de sódio (2%) e catalase (100 UI/mL). Os meios de cultura previamente inoculados foram vertidos sobre placas de Petri estéreis, de modo a se obter uma camada de 5 mm de altura.

Após a solidificação e secagem do ágar, foram perfurados vários poços com o auxílio de uma pipeta Pasteur esterilizada com boca de 4 mm de diâmetro (Figura 1). Cada poço foi inoculado com 50 μL de cada cultura isolada do leite humano, previamente incubada a 30°C por 16 a 18 horas de crescimento. As placas contendo os meios inoculados permaneceram semi-abertas em câmara de fluxo horizontal para permitir a secagem do inóculo e, a seguir, incubadas a 30°C durante um

período de 24 a 48 horas. Em intervalos regulares de 24 horas, os meios foram analisados quanto à presença de halos de inibição do crescimento do micro-organismo indicador ao redor dos poços, indicativo da presença de bacteriocinas.

O ágar MRS foi suplementado com uma solução de catalase na concentração final de 100 UI/mL (unidades internacionais por mililitro) para excluir a possibilidade da inibição observada nos testes ser devido à produção de peróxido de hidrogênio (TAGG et al., 1976; GUPTA; BATISH, 1990). Do mesmo modo, para excluir a possibilidade da inibição da cultura indicadora ser ocasionada pela redução do pH, devido à produção de ácidos orgânicos, o ágar MRS foi suplementado também com 2% de glicerofosfato de sódio (MRS tamponado) (YANG; RAY, 1994).

Figura 1 - Inoculação de culturas para verificação da produção de bacteriocina em MRS pela técnica de antagonismo em poços (TAGG; MCGIVEN, 1971 modificado por BENKERROUM et al., 1993)

3.4.2 Inibição de patógenos, deteriorantes e de outras bactérias lácticas

Para a determinação do espectro de atividade das bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas (BLPB) contra diferentes gêneros e espécies de bactérias patogênicas, deteriorantes e de bactérias lácticas, utilizou-se o método de antagonismo simultâneo em poços realizado conforme descrito por Tagg e McGiven (1971), modificado por Benkerroum et al. (1993).

Os micro-organismos utilizados como sensíveis nestes testes foram: *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Bacillus cereus*,

Staphylococcus aureus, *Salmonella* spp., *Lactococcus lactis* subespécie *cremoris* e *Lactobacillus helveticus*.

Esses micro-organismos sensíveis foram cultivados nos meios de cultura específicos a cada espécie. O caldo MRS (de Man Rososa e Sarpe) a 37°C por 24 horas foi utilizado para as linhagens do grupo láctico e o caldo TS (Trypticase de soja) a 37°C por 24 horas para as demais linhagens. Para *L. innocua* (L11) e *L. monocytogenes* ATCC 7644, o caldo TS foi suplementado de 0,6% de extrato de levedura (p/v). Em seguida, essas culturas foram inoculadas a 2% em 20mL de ágar MRS suplementado com β -glicerofosfato de sódio a 2%.

Os meios de cultura previamente inoculados foram vertidos sobre placas de Petri estéreis, de modo a se obter uma camada de 5mm de altura. Após a solidificação e secagem do ágar, foram feitas perfurações de vários poços com o auxílio da extremidade mais larga (de 4mm de diâmetro) de uma pipeta Pasteur. Cada poço foi inoculado com 50 μ L de cada cultura de BLPB, previamente incubada a 37°C por 18 horas de crescimento. As placas contendo os meios inoculados permaneceram semi-abertas em câmara de fluxo vertical para permitir a secagem do inóculo e, em seguida, estas foram incubadas em temperatura adequada para cada espécie durante 24 horas. Os meios foram analisados quanto à presença de halos de inibição ao redor dos poços de crescimento do micro-organismo sensível.

3.4.3 Tolerância a baixos valores de pH

Para avaliar a resistência à acidez, as cepas de BLPB foram reativadas por dois cultivos sucessivos com incubação a 37°C durante 24 horas. Primeiramente utilizou-se tubos contendo 5 mL de caldo MRS e em seguida 1 mL da cultura ativa foi transferido para 40 mL de caldo MRS, sendo incubado por 12-14 horas a 37°C. Após a incubação o conteúdo (40 mL) foi centrifugado a 6000 rpm durante 15 minutos a 4°C. A massa celular obtida foi lavada por duas vezes consecutivas com solução salina 0,85% e ressuspensa em 10 mL da mesma solução, originando uma suspensão ativa contendo cerca de 10⁹ UFCmL⁻¹. Uma alíquota de 1 mL dessa suspensão foi utilizada para inocular tubos com 9 mL de caldo MRS com pH ajustado a 2,0 e 3,0 utilizando HCl 5 mol.L⁻¹. Como controle para verificação da viabilidade celular utilizou-se tubo de caldo MRS com pH ajustado a 5 utilizando-se

HCl 5 mol L⁻¹ (adaptado de ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000). A suspensão celular foi inoculada nos tubos ajustados para os diferentes pHs e alíquotas de 1mL foram diluídas em água peptonada 0,1%. A viabilidade celular foi verificada no tempo 0 e após incubação em estufa por 1 e 3 horas a 37°C.

A quantidade de BAL foi determinada pela técnica de semeadura em profundidade (pour plate), em placas com Ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS), sendo incubado por 48h a 37°C.

3.4.4 Tolerância a sais biliares

Para avaliar a tolerância à bile, as cepas das BLPB foram reativadas por dois cultivos sucessivos com incubação a 37°C durante 24 horas. Primeiramente utilizou-se tubos contendo 5 mL de caldo MRS e em seguida 1 mL da cultura ativa foi transferido para 40 mL de caldo MRS, sendo incubado por 12 - 14 horas a 37°C. Após a incubação o conteúdo (40 mL) foi centrifugado a 6000 rpm durante 15 minutos a 4°C. A massa celular obtida foi lavada por duas vezes consecutivas com solução salina 0,85% e finalmente ressuspensa em 10 mL da mesma solução, originando uma suspensão ativa contendo ao redor de 10⁹ UFC.mL⁻¹. Em seguida, 1 mL da suspensão ativa foi utilizado para inocular tubos com 9 mL de caldo MRS adicionado de 0,3% de sais biliares. Tubos contendo 9 mL de caldo MRS sem sais biliares foram inoculados com a cultura BLPB, servindo como controle para realização do teste. Os tubos controle e teste foram monitorados após 0, 2 horas, 4 e 24 horas de incubação a 37°C através do plaqueamento em Agar MRS, sendo incubados por 48h a 37°C (PENNACCHIA et al., 2004).

3.4.5 Resistência a antibióticos de uso clínico

A resistência das culturas a antibióticos de uso clínico foi determinada segundo a técnica disco-difusão em ágar (NCCLS, 2003; HOSSEINI et al., 2009), com modificações. As soluções de antibióticos foram obtidas em água destilada estéril, para obter as seguintes concentrações (TODOROV et al., 2008): ampicilina (10 µg), clindamicina (2µg), cloranfenicol (30 µg) , doxicilina (30 µg), eritromicina (5 µg),

gentamicina (10 µg) e tetraciclina (30 µg). Cada solução foi esterilizada em filtro Millipore de 0,22 µm.

Cada cultura foi inoculada (1%) em caldo MRS e incubada a 37°C até alcançar ou exceder a turbidez de uma solução padrão de McFarland 0,5. Quando necessário, a turbidez do meio foi ajustada com a adição de caldo MRS. Em seguida, cada cultura padronizada foi inoculada em placas de ágar MRS. Depois de 15 minutos de espera para secagem dos inóculos, cada disco, previamente impregnado à solução de antibiótico, foi disposto no ágar MRS. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Durante este período, a formação de um halo de inibição ao redor do disco indicou à sensibilidade da cultura na concentração de antibiótico utilizada (HOSSEINI et al., 2009). De acordo com o tamanho do halo de inibição formado, a cultura foi classificada como sensível, intermediária ou resistente aos antibióticos avaliados NCCLS (2003).

3.4.6 Capacidade de adesão

Para a realização do teste, chapas de aço inoxidável (2,0 cm x 0,8 cm x 0,5 mm) foram mantidas *overnight* (após 24 horas de incubação) em acetona. Posteriormente, as placas foram imersas por 45 minutos em uma solução detergente (1,5 mL de detergente comercial diluído em 150 mL de água) a 50°C sob agitação. As placas foram cuidadosamente lavadas em água corrente seguida de várias lavagens em água destilada e secas ao ar livre. As placas secas foram autoclavadas a 121°C por 15 minutos. Uma quantidade de 0,5 mL da cultura *overnight* (após 24 horas de incubação) das BLPB foi transferida para um tubo de vidro contendo 4,5 mL de caldo MRS e uma placa de aço inoxidável. Após 24 horas de incubação a 37°C cada placa de aço inoxidável foi assepticamente retirada, lavada com 10 mL de água peptonada estéril 1% durante 5 minutos e colocada em um tubo de vidro estéril, contendo 5 mL de água peptonada 1%, a fim de remover as bactérias pouco aderidas.

As placas de aço inoxidável foram lavadas novamente com 10 mL de água peptonada 1% estéril, colocadas dentro de um tubo de vidro contendo 6 mL de água peptonada 1% estéril e agitadas em vortex durante 3 minutos, a fim de criar uma suspensão das células de bactérias lácticas aderidas à superfície da chapa. O

número de células desta suspensão foi determinado em Agar MRS após incubação por 24 horas sob temperatura apropriada. Os resultados foram comparados com a quantidade inicial de células e expressos como a porcentagem de células aderidas para cada cultura (HOSSEINI et al., 2009).

A sequência dos materiais utilizados são verificados na Figura 2.

Figura 2 - Sequência de materiais utilizados para avaliação da capacidade de adesão das bactérias lácticas produtoras de bacteriocina (BLPB)

3.4.7 Crescimento e sobrevivência em leite

A capacidade de crescimento e sobrevivência das culturas em leite foi determinada segundo Saxelin et al. (1999).

Uma suspensão celular foi obtida após centrifugação ($7.500 \times g$ por 10 minutos a 4°C), de cada cultura em crescimento exponencial no caldo MRS. Após descarte do sobrenadante, a massa celular resultante foi lavada (duas vezes consecutivas) e ressuspendida em um pequeno volume de leite 10% estéril. Alíquota suficiente para se obter concentração inicial de 10^7 UFC.mL^{-1} foi inoculada em leite 1,5% de gordura tratado a 95°C por 5 minutos, previamente suplementado de 2% de glicose e 0,038% de extrato de levedura. Após 24 horas a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$, o leite fermentado foi armazenado a $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Ao final da fermentação e, semanalmente, durante 28 dias de armazenamento, amostras foram avaliadas quanto ao pH e contagem de células viáveis em ágar MRS a 37°C por 24 horas e de bolores e

leveduras em ágar DRBC a 25 °C por 5 dias. As características visuais e odoríferas do leite fermentado também foram observadas.

3.5 Identificação das culturas bacteriocinogênicas

As culturas foram avaliadas quanto as suas características morfológicas, reação em Gram e atividade de catalase (YANG; RAY, 1994). A morfologia celular e a coloração de Gram foram examinadas em um microscópio Zeiss com objetiva 100 x e ocular 10 x (HARRIGAN, 1998). A presença da enzima catalase nas culturas foi determinada misturando-se 1,0 mL de solução de peróxido de hidrogênio 3,0% (v/v) a 1,0 mL da cultura ativada em caldo MRS a 37 ±1°C por 16 - 18 horas. O aparecimento imediato de bolhas, devido ao oxigênio produzido por meio da reação $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ é indicativo da atividade da catalase (HARRIGAN, 1998).

As culturas que se apresentaram como Gram-positivas, não produtoras de catalase e com bom desempenho frente aos testes de verificação do potencial probiótico, tiveram suas características fenotípicas (capacidade de multiplicação a 10 e 45°C, em 6,5% de cloreto de sódio e em pH 4,4 e 9,6) e bioquímica (produção de CO₂ a partir de glicose) determinadas para identificação do gênero a que pertenciam (HARRIGAN, 1998).

3.5.1 Suspensão celular

Para realização dos testes de identificação fenotípica das BLPB isoladas foram utilizadas suspensões de células obtidas através de culturas semeadas por esgotamento em placas de MRS ágar, as quais foram incubadas a 37°C por 16 - 18 horas. Após este período, uma porção de massa de células foi suspensa em 1 mL de solução salina na concentração de 0,85% e transferida para um tubo contendo 10 mL da mesma solução, em quantidade suficiente para se alcançar uma densidade igual à escala de McFarland número 5 (MORENO, 2003).

3.5.2 Capacidade de multiplicação a 10 e 45°C, em concentração de 6,5% de NaCl e nos pHs 4,4 e 9,6

Para a realização dos testes de capacidade de multiplicação em diferentes condições, tubos contendo 5 mL de MRS suplementado com púrpura de bromocresol (0,2 g/L) foram adicionados de 0,5 mL da suspensão celular, os quais foram incubados a 10 e 45°C por 72 horas. O crescimento das culturas foi observado pela alteração da coloração do meio (adaptado de MORENO, 2003). Da mesma forma, tubos contendo 6,5% de NaCl e com pH ajustado para 4,4 e 9,6 foram incubados a 35°C por 48 horas. O crescimento das culturas foi observado pela alteração da coloração do meio de cultivo (MORENO, 2003).

3.5.3 Produção de CO₂ a partir da glicose

Segundo Harrigan (1998), para a verificação da produção de gás a partir da fermentação da glicose, utiliza-se o meio semi-sólido de Gibson. A produção de dióxido de carbono é indicada pela ruptura do ágar selo e pela presença de bolhas no meio adicionado de 0,5 mL da suspensão celular após incubação a 35°C por 14 dias.

3.5.4 Caracterização bioquímica e enzimática pelo sistema miniaturizado BBL Crystal

As culturas avaliadas foram submetidas à identificação através do sistema BBL Crystal Gram Positive (Becton Dickinson, França). As culturas foram semeadas por esgotamento em ágar MRS e incubadas por 24 horas a 37°C. As colônias foram transferidas para o tubo com fluido de inóculo até a concentração final atingir a escala de McFaland número 0,5.

Esta suspensão foi vertida na base do sistema, que foi fechada com a tampa contendo os substratos. Os painéis contendo as culturas estudadas foram incubados por 24 horas a 37°C. A leitura dos resultados foi feita de acordo com as indicações do fabricante e a identificação com um programa de software acompanhante do BBL Crystal.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Contagem presuntiva e isolamento de bactérias lácticas e probióticas

A Tabela 2 e Figuras 3, 4 e 5 apresentam as contagens presuntivas de bactérias lácticas e probióticas obtidas para as oito amostras de leite humano nos cinco meios de cultivo. As contagens variaram de $< 1,00$ a $8,24 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$, entre as diferentes amostras de leite e meios de cultivo avaliados. Ao avaliar a média das contagens dos cinco meios de cultivo para cada amostra observa-se que aquelas com maior tempo de lactação apresentaram menor população (A: 1 ano; C: 5 meses) comparativamente as demais amostras (B, D, H: 45 dias; F, G: 21 dias). Esses resultados sugerem a diminuição da população de bactérias lácticas e probióticas em função do período de lactação.

Zacarias et al. (2011) observaram variação nas contagens de amostras de leite de 16 lactantes avaliadas entre o 1º e o 12º dia pós-parto. No ágar de Elliker a contagem variou de 1,0 a $5,0 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ e no ágar MRS pH 5,0 suplementado de 0,1% de L-cisteína de 1,4 e $2,8 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$. Da mesma maneira, Solís et al. (2010) também verificaram redução nas contagens de 20 amostras de leite humano no ágar MRS suplementado de 0,25% de L-cisteína, de $5,0 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ a $3,7 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ no 10º e 90º dia de lactação, respectivamente.

Tabela 2 - Contagens presuntivas de bactérias lácticas e probióticas, obtidas em cinco meios de cultivo, de oito amostras de leite humano em diferentes estágios de lactação

Meios de cultura	Log UFC mL^{-1} nas amostras de leite humano							
	A 1 ano	B 45d	C 5 meses	D 45d	E -	F 21 d	G 21 d	H 45d
Ágar lactato de sódio	4,10	$<1,00$	4,54	7,05	8,23	6,99	8,22	7,03
Ágar MRS pH 5,4	$<1,00$	5,51	1,62	5,57	7,31	4,00	$<1,00$	5,22
Ágar MRS pH 6,5	2,47	6,13	4,45	6,53	7,66	7,09	6,47	8,24
Ágar MRS + LiCl + CyHCl	1,50	5,00	2,57	6,81	6,43	$<1,00$	4,57	6,91
Ágar M17 + glucose	3,41	5,45	$<1,00$	6,91	6,55	7,03	6,37	7,05
Contagem média (n=5)	2,48	4,62	2,84	6,57	7,24	5,22	5,33	6,89

- não informado

Figura 3 - Colônias presentes no meio MRS pH 6,5

Figura 4 - Crescimento de colônias em ágar M17

Figura 5 - Colônias presentes em placa contendo ágar MRS suplementado com soluções estoque de dicloxacilina, LiCl e de CyHCl

Os resultados das análises microbiológicas das amostras de leite humano (Tabela 2) revelaram uma variação nas contagens no Ágar Lactato de 4,12 a 8,80 log UFC.mL⁻¹, com média de 6,89 log UFC.mL⁻¹. Das 8 amostras analisadas, 6 apresentaram contagens no ágar MRS pH 5,4 variando de 1,62 a 7,43 log UFC.mL⁻¹, com média de 5,03 log UFC.mL⁻¹. Ainda para a contagem em MRS pH 6,5, houve variação de 2,36 a 8,27 log UFC.mL⁻¹, com média de 6,25 log UFC.mL⁻¹.

Quando realizada a contagem em agar MRS adicionado de 5 mL de soluções estoque de dicloxacilina, 10 mL de solução estoque de LiCl e 5 mL de solução estoque de CyHCl, observou-se variação de 1,59 a 7,89, com média de 5,53 log UFC.mL⁻¹.

Das 8 amostras de leite materno obtidas das nutrízes doadoras, sete apresentaram após o plaqueamento em Agar M17 adicionado de glicose, contagens variando de 2,33 a 7,03 log UFC.mL⁻¹, sendo a média de 6,09 log UFC.mL⁻¹.

Os meios utilizados nos isolamentos foram selecionados por sua seletividade para os gêneros mais frequentes encontrados no leite humano: *Propionibacterium* (Ágar lactato de sódio), *Lactobacillus* (Ágar MRS pH 5,4 e pH 6,5), *Bifidobacterium* (Ágar MRS + LiCl + CyHCl) e *Enterococcus* / *Lactococcus* (Ágar M17 + glicose).

A Tabela 3 e Figura 6 apresentam a distribuição porcentual dos gêneros nas amostras de leite humano. Verifica-se não existir relação das amostras A e C com menor tempo de lactação e as demais amostras com maior tempo de lactação. As principais diferenças observadas entre as amostras são a menor população de lactobacilos (meio MRS pH 5,4) e de propionibactérias, lactococos e bifidobactérias nas amostras B, C, F e G.

A variação nas contagens apresentadas na Tabela 3 pode ser explicada, como colocado por Morgano et al. (2005) pela individualidade genética, pelos diferentes ciclos de amamentação e pela alimentação e idade da nutriz. Estes autores citam ainda que diferenças podem ser causadas também por variações entre grupos étnicos e entre mulheres.

Um total de 800 culturas foi isolado a partir das oito amostras de leite humano. Essas culturas foram purificadas e submetidas a verificação da síntese de bacteriocinas.

Tabela 3 - Distribuição porcentual entre os grupos de bactérias lácticas nas amostras de leite humano

Gêneros	Amostras de leite humano							
	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>Propionibacterium</i>	32,85	4,33	32,02	21,45	22,75	26,77	30,87	20,41
<i>Lactobacillus</i> (pH 5,4)	8,01	23,86	11,42	16,95	20,20	15,32	3,76	15,15
<i>Lactobacillus</i> (pH 6,5)	19,79	26,55	31,38	19,87	21,17	27,15	24,30	23,92
<i>Bifidobacterium</i>	12,02	21,65	18,12	20,72	17,77	3,83	17,16	20,06
<i>Lactococcus</i> / <i>Streptococcus</i>	27,32	23,60	7,05	21,02	18,10	26,92	23,92	20,46

Figura 6 - Distribuição percentual entre os grupos de bactérias lácticas nas amostras de leite humano

4.2 Características probióticas e tecnológicas das culturas isoladas de leite humano

As propriedades utilizadas na seleção das culturas foi fundamentada em alguns critérios de funcionalidade (produção de bacteriocinas dirigidas a patógenos, tolerância às condições ácidas e sais biliares e adesão), segurança (resistência à antibióticos de uso clínico) e tecnológicos (estabilidade no leite fermentado durante a estocagem e produção de *flavour* e textura agradáveis (REENEN; DICKS, 2011; MISHA; PRASSAD, 2005; SAARELA et al., 2000; SAXELIN et al., 1999).

4.2.1 Detecção da produção de bacteriocinas pelas culturas isoladas de leite humano

Os micro-organismos indesejáveis podem ser inibidos por meio de vários mecanismos atribuídos às culturas probióticas. Um desses mecanismos é a produção de bacteriocinas, compostos de natureza protéica produzidos durante o seu crescimento. O espectro de atividade antimicrobiana desses compostos é um critério importante a ser considerado na seleção de culturas probióticas para utilização industrial.

Das 800 culturas isoladas de oito amostras de leite humano, apenas 15 (1,9%) apresentaram a capacidade de inibir o crescimento das linhagens *L. innocua* L11 e/ou *M. luteus* ATCC® 4698 utilizadas como indicadores da produção de

bacteriocinas. A possibilidade da atividade antimicrobiana dessas culturas ser devido ao baixo valor do pH do meio e a produção de peróxido de hidrogênio foi descartada pela incorporação, ao ágar MRS, de catalase e β -glicerofosfato, respectivamente. As 15 linhagens bacteriocinogênicas foram isoladas apenas da amostra H.

4.2.2 Inibição de patógenos, deteriorantes e outras bactérias lácticas

A Tabela 4 e Figuras 7a, 7b, 8a, 8b, 9a e 9b, apresentam a atividade das culturas produtoras de bacteriocinas contra alguns micro-organismos Gram positivos e Gram negativos. Esses micro-organismos apresentaram diferentes graus de sensibilidade às bacteriocinas, conforme se observa pelos diâmetros dos halos de inibição. Nenhuma das culturas produtoras de bacteriocinas apresentou atividade contra as linhagens *E. coli* ATCC® 2074 e *S. typhimurim* ATCC® 2364, indicando espectro de ação limitado às bactérias Gram positivas. A linhagem *L. monocytogenes* ATCC®7644 apresentou maior grau de sensibilidade que as demais, formando halos de inibição de 16 e 22 mm. Ao contrário, o *S. aureus* ATCC® 1602 apresentou resistência às 15 bacteriocinas avaliadas. O espectro de atividade das bacteriocinas das culturas BLPB12 e BLPB15 diferenciou-se das demais por não apresentar atividade frente a *Bacillus cereus* CTC 011. Ambas as culturas inibiram especificamente *L. monocytogenes* ATCC®7644, enquanto a LM5 também inibiu a linhagem *L. lactis subsp. lactis* CTC 204.

Tabela 4 - Inibição de bactérias Gram positivas e Gram negativas pelas bacteriocinas produzidas por 15 linhagens isoladas da amostra de leite humano H

	Micro-organismo sensível							
	<i>B. cereus</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lb. helveticus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella thyphimurium</i>
Linhagens isoladas a partir da amostra do leite humano H.	1	¹ 13mm	15mm	21mm	11mm	11mm	- ²	-
	2	13mm	16mm	19mm	10mm	10mm	-	-
	3	13mm	15mm	20mm	9mm	10mm	-	-
	4	14mm	15mm	20mm	9mm	10mm	-	-
	5	14mm	14mm	19mm	10mm	9mm	-	-
	6	11mm	14mm	16mm	9mm	8mm	-	-
	7	14mm	17mm	19mm	10mm	11mm	-	-
	8	11mm	14mm	16mm	8mm	8mm	-	-
	9	09mm	14mm	21mm	11mm	10mm	-	-
	10	13mm	14mm	20mm	11mm	11mm	-	-
	11	13mm	14mm	21mm	10mm	11mm	-	-
	12	-	-	16mm	-	-	-	-
	13	13mm	12mm	20mm	10mm	8mm	-	-
	14	11mm	14mm	19mm	11mm	1mm	-	-
	15	-	13mm	18mm	8mm	-	-	-

¹Resultados expressos em milímetros de diâmetro do halo formado; ² Resultado negativo (não houve a formação de halos de inibição).

Outros compostos antimicrobianos, tais como ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, produzidos pelas culturas bacteriocinogênicas, podem ampliar o seu espectro de atividade antimicrobiana, principalmente contra micro-organismos Gram negativos. Da mesma forma outros mecanismos de ação podem complementar essa atividade, como por exemplo, a competição por nutrientes orgânicos e por sítios de adesão nas células epiteliais.

A inibição de patógenos e deteriorantes por ação do baixo pH do meio decorrente da produção de ácido é descrita na literatura especializada. Pereira & Gómez (2007) observaram a inibição das culturas patogênicas de origem humana *E. coli* e *S. aureus*, por um sobrenadante a pH 3,9 obtido da linhagem *L. acidophilus* La5. Olivares et al. (2006) demonstraram a inibição das culturas patogênicas *Salmonella choleraesuis* CECT4155, CECT409 e CECT443, *E. coli* CECT439 e *E. coli* O157:H7 CECT4076, *S. aureus* CECT4013 e CECT976 e *L. monocytogenes* Scott A e da cultura deteriorante *Clotridium tyrobutyricum* CECT401 por

sobrenadantes (pH 3,86 e 4,40) recuperados das culturas *L. gasseri* CECT5714, *L. gasseri* CECT5716, *L. salivarius* CECT5713 e *L. coryniformes* CECT5711.

Diversos estudos (RACCACH et al., 1989; ZAMFIR et al., 2000; PRASAD; GHODEKER, 1991) verificam a ação de bactérias probióticas contra determinados patógenos.

Pereira e Gómez (2007), ao avaliarem a atividade antimicrobiana de uma cultura probiótica comercial (*Lactobacillus acidophilus* La5) frente ao crescimento de dois micro-organismos patogênicos veiculados por alimentos, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, concluíram que a cepa testada foi capaz de inibir os patogênicos e, segundo eles, a atividade inibidora observada foi, provavelmente, decorrente do baixo pH e da ação do ácido láctico, obtido a partir do crescimento do *Lactobacillus acidophilus* La5.

Olivarez et al. (2006), ao avaliarem o potencial antimicrobiano de quatro cepas de *Lactobacillus* isoladas de amostras de leite humano, concluíram que esses micro-organismos foram capazes de inibir o crescimento dos patógenos *Salmonella choleraesui*, *Escherichia. Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp e *Clostridium* spp.

Hosseini et al. (2009) em um estudo abrangente sobre a caracterização de quatro novas bacteriocinas produzidas por enterococos isolados de alimentos não fermentados, verificaram a atividade antimicrobiana destas substâncias frente a espécies deteriorantes e patogênicas, como por exemplo *Bacillus cereus* ATCC 11040, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*.

Porém, semelhante aos resultados observados, Hosseini et al. (2009) verificaram que um dos micro-organismos testados (*E. faecium* LHICA 46) apresentou atividade antimicrobiana contra outras cepas de *Bacillus cereus* e *B. subtilis*, mas essa característica não foi evidenciada para as outras cepas de *Enterococcus* testadas. Considerando essas informações, é possível concluir que nem todas as cepas probióticas possuem ação antagonica semelhante frente a diversos micro-organismos deteriorantes e patogênicos.

Após avaliação dos resultados obtidos no teste de antagonismo, determinou-se a continuação dos demais testes previstos a partir das BLPB 1, BLPB 2, BLPB 5,

BLPB 7, BLPB 9 e BLPB 10 que apresentaram maior e/ou mais amplo espectro de ação contra os micro-organismos deteriorantes e patogênicos avaliados.

Figuras 7a e 7b - Placa contendo *Bacillus cereus* para teste de inibição, nos quais foram inoculadas as bactérias lácticas produtora de bacteriocina

Figuras 8a e 8b - Placa contendo *Lactococcus lactis* para teste de inibição, nos quais foram inoculadas as bactérias lácticas produtora de bacteriocina

Figuras 9a e 9b - Placa contendo *Lactobacillus helveticus* para teste de inibição, nos quais foram inoculadas as bactérias lácticas produtora de bacteriocina

4.2.3 Tolerância a baixos valores de pH

Uma das características atribuídas a uma bactéria probiótica é a capacidade de sobrevivência em condições ácidas.

Para a realização do teste de resistência à acidez partiu-se das culturas ativas de BLPB cujas viabilidades são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Viabilidade celular log UFC mL⁻¹ das bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas (BLPB) após exposição a condições ácidas nos tempos 0, 1 e 3 horas

(continua)

BLPB	Contagem inicial (Log UFCmL ⁻¹)	Tempo de exposição	pH 2 (Log UFCmL ⁻¹)	pH 3 (Log UFCmL ⁻¹)	pH 5 (Log UFCmL ⁻¹)
1	10,64	0 hora	10,59	10,57	10,43
		1 hora	<1	4,64	10,72
		3 horas	<1	< 1	10,62
2	10,53	0 hora	10,64	10,52	10,61
		1 hora	<1	4,65	10,60
		3 horas	<1	<1	10,62
5	10,62	0 hora	10,69	10,46	10,54
		1 hora	<1	4,59	10,71
		3 horas	<1	<1	10,63

Tabela 5 - Viabilidade celular log UFC mL⁻¹ das bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas (BLPB) após exposição a condições ácidas nos tempos 0, 1 e 3 horas

(conclusão)					
BLPB	Contagem inicial (Log UFCmL ⁻¹)	Tempo de exposição	pH 2 (Log UFCmL ⁻¹)	pH 3 (Log UFCmL ⁻¹)	pH 5 (Log UFCmL ⁻¹)
7	10,63	0 hora	10,67	10,67	10,78
		1 hora	<1	4,7	10,75
		3 horas	<1	<1	10,72
9	9,75	0 hora	9,36	9,69	9,71
		1 hora	1,3	5,09	9,70
		3 horas	< 1	< 1	9,78
10	10,23	0 hora	10,56	10,58	10,41
		1 hora	<1	4,65	10,71
		3 horas	<1	<1	10,67

Os resultados observados na Tabela 5 apontam que as cepas de BLPB 1, 2, 5, 7 e 10 ao serem expostas a pH 2,0 durante 1 hora apresentam total inativação dos micro-organismos avaliados. Apenas a BLPB 9, ao ser exposta a pH 2,0 durante 60 minutos apresentou viabilidade celular de 1,3 ciclo logarítmico (Figura 10).

Figura 10 - Viabilidade celular das cepas de BLPB em pH 2 após 0, 1 e 3 horas de exposição

Quando expostas a pH 3,0 por 1 hora, observa-se um decréscimo na viabilidade celular variando de 4,6 a 5,97 log UFC.mL⁻¹ para as cepas testadas (Figura 11). Após 180 minutos de exposição a pH 3,0, não se observa a sobrevivência das cepas de BLPB.

Figura 11 - Viabilidade celular das cepas de BLPB em pH 3 após 0, 1 e 3 horas de exposição

Em pH 5,0 (condição de controle para avaliação da sobrevivência do micro-organismo), verifica-se a manutenção da viabilidade celular durante o período de incubação para todas as cepas testadas (Figura 12).

Figura 12 - Viabilidade celular das cepas de BLPB em pH 5 após 0, 1 e 3 horas de exposição

Através da análise dos resultados obtidos infere-se que o comportamento das seis culturas avaliadas frente aos diferentes valores de pH é similar, sendo que apenas a BLPB 9 foi capaz de tolerar à exposição em solução com pH 2,0.

Erkkilä e Petäjä (2000) ao avaliarem a capacidade de oito cepas de bactérias lácticas isoladas a partir de carne, quanto a resistência às condições gastrointestinais, verificaram que as contagens iniciais das culturas (todas ao redor de $7,5 \log \text{UFC.mL}^{-1}$) decaíram para $< 4 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ quando as cepas foram expostas a pH 1 e pH 2, durante 1 hora. Já no teste com pH 3, observou-se um declínio nas contagens, mas todas foram tolerantes e as contagens ao final do testes variaram de 4,4 a $7,1 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ após 4 horas de exposição. Em pH 4 e pH 5 a quantidade total das bactérias lácticas permaneceu a mesma daquela inoculada no início do teste.

Huang e Adams (2004), em um estudo sobre a avaliação da resistência de 13 cepas de propionibactérias em suco gástrico simulado com valores de pH 2, 3 e 4, bem como da influência da adição de alimentos sobre a viabilidade dessas cepas em suco gástrico simulado com pH 2,0, constataram uma variabilidade de resistência entre as cepas testadas. Além disso, os autores comprovaram o aumento na viabilidade de todas as cepas quando o teste foi realizado com suco gástrico pH 2 na presença de diferentes tipos de alimentos.

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* INL1, uma cepa isolada a partir do leite materno (ZACARÍAS et al., 2011) foi cultivada em caldo MRS em um biofermentador a 37°C. A cultura atingiu a fase estacionária mais rapidamente quando cultivada em pH 6,5, em comparação com uma cultura cultivada em pH 5,0. No entanto, quando a cepa foi submetida a um teste resistência gástrico (solução com pH 2,0 adicionado de 0,3% de pepsina) apresentou um decréscimo na ordem de 4 ciclos logarítmicos quando cultivada em pH 6,5, enquanto a perda de viabilidade foi desprezível durante o teste de resistência gástrica com a cultura multiplicada em pH 5.

4.2.4 Tolerância a sais biliares

O colesterol presente no fígado é utilizado para a síntese de sais biliares, sendo armazenados na vesícula biliar. Estes sais biliares são lançados no início do intestino delgado após a ingestão de alimentos gordurosos e funcionam como um

detergente, emulsificando as gorduras e facilitando a digestão. Contudo, como a membrana celular dos micro-organismos conta com a presença de lipídeos e ácidos graxos em sua composição, segundo Valdez et al. (1997), a exposição de micro-organismos à bile pode provocar a desorganização celular, sendo prejudicial aos micro-organismos.

Avaliando os resultados obtidos no teste de tolerância aos sais biliares, apresentados na Tabela 6, é possível observar que as cepas de BLPB isoladas de número 1, 2, 5, 7, 9 e 10, ao serem expostas a 0,3% de sais biliares pelo período de 2 e 4 horas, apresentaram população microbiana próxima à concentração inicial, assemelhando-se ao observado na situação controle (ausência de sais biliares).

A diminuição da viabilidade celular pela concentração de 0,3% de sais biliares foi verificada somente após 24 horas de incubação, observando-se redução na ordem de 5,23 a 7,55 ciclos logarítmicos em relação à viabilidade inicial, como mostra a Figura 13.

Tabela 6 - Viabilidade celular log UFC mL⁻¹ das BLPB testadas após exposição a sais biliares nos tempos 0, 2, 4 e 24 horas

(continua)

BLPB	Contagem inicial (Log UFCmL ⁻¹)	Tempo de exposição	Viabilidade na concentração de 0,3% de sais biliares (Log UFC.mL ⁻¹)	Viabilidade em ausência de sais biliares (Log UFC.mL ⁻¹)
1	10,62	0 hora	10,61	10,34
		2 horas	10,56	10,61
		4 horas	10,76	10,61
		24 horas	4,36	10,38
2	10,77	0 hora	10,79	10,25
		2 horas	10,7	10,73
		4 horas	10,82	10,81
		24 horas	3,49	10,49
5	10,71	0 hora	10,79	10,25
		2 horas	10,7	10,73
		4 horas	10,82	10,81
		24 horas	3,49	10,49
7	10,38	0 hora	10,8	10,51
		2 horas	10,74	10,73
		4 horas	10,58	10,79
		24 horas	3,25	10,49

Tabela 6 - Viabilidade celular log UFC mL⁻¹ das BLPB testadas após exposição a sais biliares nos tempos 0, 2, 4 e 24 horas

(conclusão)

BLPB	Contagem inicial (Log UFCmL ⁻¹)	Tempo de exposição	Viabilidade na concentração de 0,3% de sais biliares (Log UFC.mL ⁻¹)	Viabilidade em ausência de sais biliares (Log UFC.mL ⁻¹)
9	9,75	0 hora	9,62	9,74
		2 horas	9,68	9,79
		4 horas	9,69	9,80
		24 horas	4,38	9,91
10	10,58	0 hora	10,68	10,44
		2 horas	10,46	10,53
		4 horas	10,51	10,81
		24 horas	4,39	10,81

Figura 13 - Viabilidade celular das cepas de BLPB de número 1, 2, 5, 7, 9 e 10 quando expostas à concentração de 0,3% sais biliares

Na ausência de sais biliares, com incubação do caldo MRS a 37°C, a viabilidade celular permanece praticamente inalterada, conforme apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Viabilidade celular das cepas de BLPB de número 1, 2, 5, 7, 9 e 10 na ausência aos sais biliares

Sendo assim, em relação à resistência aos sais biliares, as bactérias testadas possuem essa característica probiótica, pois sobrevivem na concentração média de bile encontrada no trato gastrointestinal humano.

O efeito da presença de bile sobre a sobrevivência de bactérias lácticas tem sido investigado por vários autores (ZACARIAS et al., 2011; SETYAWARDANI et al., 2011; NOGUEIRA, 2010; REDONDO, 2008; PENACCHIA et al., 2004; GOTCHEVA et al., 2002; ERKKILÄ; PETÄJÄ, 2000; Du TOIT et al., 1998).

Segundo Erkkilä e Petäjä (2000), a resistência dos micro-organismos à presença de sais biliares, está relacionada com a capacidade que certas espécies de micro-organismos possuem em reduzir o efeito desse detergente, pela produção de enzimas capazes de hidrolisar os sais biliares

O resultado obtido foi semelhante ao demonstrado no estudo de Pennacchia et al. (2004), no qual todas as 28 culturas testadas apresentaram resistência à concentração de 0,3% de sais biliares adicionado em meio MRS. Porém, após 24 horas os autores detectaram a inativação de quatro das cepas testadas expostas a esta concentração de sais biliares.

Setyawardani et al. (2011), ao avaliarem o potencial probiótico de 18 cepas de bactérias lácticas isoladas a partir de leite de cabra, constataram a sobrevivência de todas elas quando testadas em diferentes valores de pH (2; 2,5 e 3,5). Porém, de

todas as cepas testadas, apenas 7 foram capazes de sobreviver na presença de 0,3% de sais biliares.

Em um estudo semelhante, Bakari et al. (2011) ao avaliarem as propriedades fisiológicas e o potencial probiótico de bactérias lácticas isoladas de intestino de frango, observaram que todas as cepas isoladas resistiram aos sais biliares (0,4%) após 6 e 24 horas de exposição.

A resistência aos sais biliares é uma característica importante para a sobrevivência e crescimento das bactérias no trato gastrointestinal, e, portanto, é um pré-requisito para que as bactérias sejam consideradas probióticas (HAVENAAR et al., 1992).

A concentração média de bile é ao redor de 0,3%, e pode variar até ao extremo de 2,0% durante a primeira hora da digestão (GOTCHEVA et al., 2002). A resistência à bile é muito variável entre as espécies de bactérias lácticas e também entre as próprias linhagens (ERKKILA; PETAJA, 2000).

A resistência de algumas cepas aos sais biliares pode estar relacionada com a atividade de uma enzima específica conhecida como BSH que ajuda a hidrolisar aos sais biliares conjugados, assim, reduzindo o seu efeito tóxico (Du TOIT et al., 1998).

4.2.5 Resistência à antibióticos de uso clínico

A resistência consiste na capacidade adquirida por uma população bacteriana de resistir a um determinado antibiótico, ao qual esta é normalmente susceptível, devido a mutação cromossômica (resistência intrínseca) ou por aquisição de genes de resistência (*plasmídeos R*), codificados em plasmídeos conjugativos, a partir de bactérias doadoras, independentemente da espécie ou gênero (van REENEN; DICKS, 2011; KHACHATRYAN et al., 2004).

Os resultados apresentados na Tabela 7 demonstram que, com exceção da cultura BLPB7 que apresentaram sensibilidade à Gentamicina, as demais apresentam padrão similar de resistência à clindamicina, eritromicina e gentamicina e sensibilidade à tetraciclina, doxiciclina e cloranfenicol.

De acordo com Hosseini et al. (2009), as cepas da cultura probiótica de *E. faecium* estudadas são resistentes a ação do antibiótico clindamicina, sendo algumas espécies resistentes e outras sensíveis ou parcialmente sensíveis ao

antibiótico eritromicina. Quanto à resistência à gentamicina, as cepas testadas por estes pesquisadores mostraram-se sensíveis ou parcialmente sensíveis à ação deste antibiótico. Em relação aos demais antibióticos de uso clínico testados, as cepas de *E. faecium* foram igualmente sensíveis à exposição quanto a BLPB 9.

O fenótipo resistência à clindamicina foi detectado em *E. faecium* LHICA 28:4, 34:5, e LHICA 40:4 isoladas de carne e *E. faecium* LHICA46 isolada de peixe (HOSSEINI et al., 2009), enquanto o de resistência a eritromicina foi detectada em sete linhagens isoladas de fezes humanas, quatro de fezes de porco e quatro de embutidos fermentados secos (RUIZ-MOYANO et al., 2009). Por outro lado, a sensibilidade ao cloranfenicol foi detectada para dez linhagens de *Enterococcus* spp. isoladas de ambiente de laticínio (MIRHOSSEINI et al., 2008).

Portanto, deve-se determinar a origem do fenótipo de resistência à Clindamicina, Eritromicina e Gentamicina apresentada pelas culturas isoladas de leite humano. Esta determinação é importante para se definir o potencial de utilização dessas bactérias para o consumo humano (VASILJEVIC; SHAH, 2008). Linhagens que carregam genes de resistência adquirida a antimicrobianos não devem ser usadas em alimentos, ao menos que possa ser demonstrado que esse fenótipo é resultante de mutação cromossômica (KLARE et al., 2007).

Tabela 7 - Suscetibilidade *in vitro* das culturas isoladas de leite humano as diferentes classes de antibióticos por difusão em ágar

Antibióticos	Culturas						Diâmetros (mm)*	
	LM1	LM2	LM5	LM7	LM9	LM10	S	R
Tetraciclina	S	S	S	S	S	S	≥19	<17
Doxiciclina	S	S	S	S	S	S	≥19	<17
Ampicilina	S	S	S	S	S	S	≥19	<14
Cloranfenicol	S	S	S	S	S	S	≥23	<19
Clindamicina	R	R	R	R	R	R	≥15	<15
Eritromicina	R	R	R	R	R	R	≥22	<17
Gentamicina	R	R	R	S	R	R	≥10	-

*Diâmetros dos halos de inibição considerados para os fenótipos resistência (R) e sensibilidade (S), segundo NCCLS (2003). Culturas apresentando halos de inibição maiores que os valores de referência foram consideradas como sensíveis aos antibióticos. Culturas apresentando zonas de inibição menores que os valores de referência foram consideradas como resistentes. Culturas apresentando halos de inibição entre a faixa R e S foram considerados como parcialmente sensíveis.

Na Figura 15 são demonstrados os halos de inibição produzidos pela ação antagonica aos antibióticos de uso clínico frente à cepa testada.

Figura 15 - Halos de inibição produzidos pela ação antagonica aos antibióticos de uso clínico frente à cepa testada

4.2.6 Capacidade de adesão

Além da capacidade de sobreviver durante a passagem pelo trato gastrointestinal, a adesão nas células do epitélio intestinal para a colonização e a capacidade de crescimento na presença de carboidratos prebióticos são importantes características para a seleção de cepas com potencial probiótico (PENNACCHIA et al., 2004). Neste estudo, a capacidade de adesão, por meio da síntese e secreção de polissacarídeos, das seis culturas isoladas de leite humano foi determinada *in vitro* usando chapa de aço inoxidável (HOSSEIN, 2009). Os resultados (Tabela 8) demonstram pouca variabilidade na capacidade de adesão das seis linhagens na superfície do aço inoxidável. A porcentagem de células aderidas variou de 68,66 e 85,04%.

Por meio da mesma metodologia utilizada nesse estudo, Hossein (2009) observou a capacidade de adesão de 43,6% e 59,1% para as linhagens bacteriocinogênicas *E. faecium* LHICA 28:4, 34:5, e LHICA 40:4 isoladas de carnes *in natura* e de *E. faecium* LHICA46 isolada de um tipo de peixe.

Tabela 8 - Capacidade de adesão das culturas nas chapas de aço inoxidável

Culturas	Contagem inicial (Log UFC.mL ⁻¹)	Contagem final (Log UFC.mL ⁻¹)	Células aderidas (%)
BLPB1	10,64	2,84	82,99
BLPB 2	10,56	2,81	82,36
BLPB 5	10,63	2,63	85,04
BLPB 7	10,50	2,77	81,16
BLPB 9	9,74	2,69	68,66
BLPB10	10,44	2,86	79,13

4.2.7 Capacidade de crescimento em leite e sobrevivência e pós-acidificação durante armazenamento por 28 dias a 4°C

A capacidade de crescimento em leite contendo 1,5% de gordura, suplementado com fatores de crescimento (2% de glicose e 0,038% de extrato de levedura) e a estabilidade das culturas no leite fermentado durante o período de estocagem a 4 °C por 28 dias foram determinadas neste estudo. Após o período de fermentação a 37°C por 24 horas, a contagem de células viáveis variou de 8,20 e 8,25 Log UFC.mL⁻¹ e o pH ficou entre 4,7 e 4,9. As seis culturas avaliadas promoveram a formação de um coágulo frágil, mas com odor característico de leite acidificado. A contagem de bolores e leveduras, realizada para indicar possível contaminação, se manteve a < 1,0 Log UFC.mL⁻¹ em todas as amostras de leite fermentado.

A Tabela 9 apresenta a contagem de células viáveis (Log UFC.mL⁻¹) e a pós-acidificação das culturas isoladas de leite humano nos leites fermentados armazenados a 4 °C durante 28 dias. Observa-se que as contagens iniciais das culturas diminuíram em 1,97 a 2,19 ciclos logarítmicos ao longo do período de armazenamento. Com relação a pós-acidificação, todas as culturas apresentam uma diferença, entre o início e o final do período de armazenamento, menor de 0,5 unidades de pH.

Tabela 9 - Contagem de viáveis (Log UFC.mL⁻¹) e pós-acidificação das culturas isoladas de leite humano nos leites fermentados armazenados a 4 ± 1°C durante 28 dias

Linhagens	Determinações	Dias de estocagem a 4±1°C				
		1	7	14	21	28
BLPB1	Log UFC.mL ⁻¹	8,23	8,17	7,43	7,30	6,04
	pH	4,90	4,70	4,50	4,50	4,50
BLPB2	Log UFC.mL ⁻¹	8,27	8,20	7,54	7,44	6,36
	pH	4,80	4,70	4,50	4,50	4,50
BLPB5	Log UFC.mL ⁻¹	8,20	8,20	7,38	7,27	6,23
	pH	4,90	4,80	4,60	4,50	4,40
BLPB7	Log UFC.mL ⁻¹	8,23	8,14	6,30	7,25	6,15
	pH	4,70	4,60	4,60	4,60	4,60
BLPB9	Log UFC.mL ⁻¹	8,25	8,23	7,27	7,17	6,15
	pH	4,80	4,70	4,50	4,40	4,40
BLPB10	Log UFC.mL ⁻¹	8,23	8,20	7,17	7,17	6,15
	pH	4,80	4,80	4,70	4,60	4,50

4.3 Identificação das culturas bacteriocinogênicas isoladas de leite humano

As 15 linhagens bacteriocinogênicas isoladas foram previamente caracterizadas como bactérias lácticas. A reação à coloração de Gram foi positiva e a morfologia celular revelou a presença de cadeias curtas de células em forma de cocos arranjados em pares e alongados em direção à cadeia. Da mesma forma, todas essas linhagens são desprovidas da enzima catalase (que destrói o O₂ tóxico nos anaeróbios aerotolerantes), uma característica que as diferenciam de outras bactérias Gram positivas. Os resultados estão na Tabela 10 e Figura 16.

Tabela 10 - Resultados dos testes realizados com as 15 linhagens bacteriocinogênicas isoladas a partir da amostra de leite materno “H”

Meio de cultura e condições de análise	Colônias isoladas	Coloração de Gram	Teste de catalase
Agar MRS pH 6,5 37°C/72 horas em anaerobiose	01	Cocos, Diplococos e cocos em cadeia curta Gram +	Negativo
	02	Cocos, Diplococos e cocos em cadeia curta Gram +	Negativo
	03	Cocos, Diplococos e cocos em cadeia curta Gram +	Negativo
	04	Cocos, Diplococos e cocos em cadeia curta Gram +	Negativo
	05	Cocos, Diplococos e cocos em cadeia curta Gram +	Negativo
	06	Cocos, Diplococos e cocos em cadeia curta Gram +	Negativo
	07	Cocos, Diplococos e cocos em cadeia curta Gram +	Negativo
	08	Cocos, Diplococos e cocos em cadeia curta Gram +	Negativo
	09	Cocos, Diplococos e cocos em cadeia curta Gram +	Negativo
	10	Cocos, Diplococos e cocos em cadeia curta Gram +	Negativo
	11	Cocos, Diplococos e cocos em cadeia curta Gram +	Negativo
	12	Cocos, Diplococos e cocos em cadeia curta Gram +	Negativo
	13	Cocos, Diplococos e cocos em cadeia curta Gram +	Negativo
	14	Cocos, Diplococos e cocos em cadeia curta Gram +	Negativo
	15	Cocos, Diplococos e cocos em cadeia curta Gram +	Negativo

Figura 16 - Morfologia celular de linhagem bacteriogênica isolada a partir da amostra de leite humano “H”

Esses resultados indicam que as linhagens isoladas podem pertencer a um dos seguintes gêneros: *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp. *Streptococcus* spp. ou *Enterococcus* spp. A ausência de bactérias apresentando a morfologia de cocos arranjados em forma de tétrades excluiu a possibilidade da classificação dessas linhagens no gênero *Pediococcus* spp (HARRIGAN, 1998).

Solís et al. (2010) observaram a predominância do gênero *Streptococcus*, principalmente representado pela espécie *S. salivarius*, com alta frequência, 35% e 65%, de acordo com a amostra, entre os isolados de amostras de leite humano entre o 10º e 90º dia pós-parto.

4.3.1 Determinação das características fenotípicas e bioquímicas das linhagens bacteriogênicas selecionadas

Os resultados dos testes fenotípicos e bioquímicos realizados com as linhagens bacteriogênicas selecionadas (BLPB 1, BLPB 2, BLPB 5, BLPB 7, BLPB 9 e BLPB 10) estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Características fenotípicas e bioquímicas das linhagens bacteriogênicas selecionadas (BLPB 1, BLPB 2, BLPB 5, BLPB 7, BLPB 9 e BLPB 10)

	BLPB					
	1	2	5	7	9	10
Crescimento a 10°C	+	+	+	+	+	+
Crescimento a 45°C	+	+	+	+	+	+
Crescimento na presença de 6,5% NaCl	-	-	-	-	-	-
Crescimento em pH 4,4	-	+	+	+	+	+
Crescimento em pH 9,6	+	+	+	+	+	+
Produção de CO ₂ a partir da glicose	-	-	-	-	-	-
Formação de tétrade	-	-	-	-	-	-

Verifica-se que, com exceção das culturas BLPB1 e BLPB9 que não apresentam crescimento a pH 4,4, assim como a cultura LM9 não apresentou crescimento a pH 9,6, as demais culturas apresentam resultados similares. Todas as linhagens não apresentaram a capacidade de produção de CO₂ a partir da glicose, indicando a sua natureza homofermentativa. Portanto, de acordo com Harrigan (1998), essas culturas podem ser incluídas em um dos seguintes gêneros *Streptococcus*, *Lactococcus* / *Vagococcus* ou *Enterococcus*.

A multiplicação à certas temperaturas é especialmente utilizado para a diferenciação entre estes gêneros. Os *Enterococcus* clássicos multiplicam-se a 10 e a 45°C, enquanto *Streptococcus* não o fazem a 10°C e a 45°C depende da espécie. *Lactococcus/Vagococcus* multiplicam-se somente a 10°C (AXELSSON, 2004). A tolerância na presença de 6,5% de NaCl pode também ser usada para a diferenciação desses gêneros, embora reações variáveis possam ocorrer entre os *Streptococcus* (AXELSSON, 2004).

Contudo em decorrência da diversidade genética das bactérias lácticas, algumas espécies podem apresentar características diferentes daquelas das linhagens clássicas. Por exemplo, *Enterococcus* e algumas espécies de *Lactococcus* / *Vagococcus* crescem a pH 4,4, mas somente *Enterococcus* são caracterizados pelo crescimento a pH alto, embora nem todos possam crescer no teste padrão a pH 9,6. (AXELSSON, 2004). As espécies *E. avium*, *E. cecorum* e *E. columbae*

(DEVRIESE et al., 1993), *E. asini* (VAUX et al., 1998) e *E. italicus* (FORTINA et al, 2004) não apresentaram crescimento em 6,5% de NaCL.

4.3.2 Caracterização bioquímica e enzimática por sistemas miniaturados

A Tabela 12 apresenta os perfis de fermentação de carboidratos e de outras reações apresentadas pelas linhagens isoladas de leite materno, utilizando o sistema de identificação BBL CRYSTAL™. A avaliação desses perfis permitiu a identificação das linhagens em dois grupos de espécies de *Enterococcus*: grupo *E. durans* e grupo *E. avium* (Tabela 13).

Tabela 12 - Reações bioquímicas observadas para as linhagens isoladas de leite humano por meio do sistema de identificação BL CRYSTAL™

Testes	Linhagens					
	LM1	LM2	LM5	LM7	LM9	LM10
4MU-β-D-glicosídeo	+	+	+	+	+	+
L-valina-AMC	-	-	-	-	-	-
L-fenilalanina-AMC	+	+	+	+	+	+
4MU-α-D-glicosídeo	-	-	-	-	-	-
L-ácido piroglutâmico-AMC	+	+	+	+	+	+
L-triptofano-AMC	+	+	+	+	+	+
L-arginina-AMC	-	-	-	-	-	-
4MU-N-acetil-β-D-glicosamina	-	-	-	-	-	-
4MU-fosfato	-	-	-	-	-	-
4MU-β-D-glicoronida	-	-	-	-	-	-
L-isoleucina-AMC	-	-	-	-	-	+
Trealose	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-
Metil-α e β-glicosídeo	+	+	+	+	+	+
Sacarose	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	-	+	+	+	+
Maltotriose	+	+	+	+	+	+
Arabinose	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	-	-	-	-	-
Frutose	+	+	+	+	+	+
p-nitrofenil-β-D-glicosídeo	+	+	+	+	+	+
p-nitrofenil-β-celobiosídeo	+	-	+	+	+	+
Prolina & leucina-p-nitroanilida	+	+	+	+	+	+
p-nitrofenil-fosfato	-	+	-	-	-	-
p-nitrofenil-α-D-maltosídeo	-	-	-	-	-	-
o-nitrofenil-β-D-galactosídeo&p-nitrofenil-α-D-galactosídeo	-	-	-	-	-	-
Uréia	+	+	+	+	+	+
Esculina	-	+	-	+	-	-
Arginina	-	-	-	-	-	-

Tabela 13 - Classificação taxonômica das linhagens de BLPB isoladas de leite humano

BLPB	Espécie identificada	Código do sistema	Probabilidade
1	<i>Enterococcus avium</i>	2540131702	80,54%
2	<i>Enterococcus durans</i>	2540111543	99,99%
5	<i>Enterococcus avium</i>	2540131702	80,54%
7	<i>Enterococcus durans</i>	2540131703	99,99%
9	<i>Enterococcus avium</i>	2540131702	80,54%
10	<i>Enterococcus avium</i>	2540131702	80,54%

Devido à capacidade de desenvolvimento em condições adversas, os *Enterococcus* encontram-se disseminados por toda a natureza, podendo ser encontrados na água, solo, alimentos plantas e animais (FACKLAN et al., 2002; MARTIN DA COSTA et al., 2006). Em seres humanos podem ser encontrados no trato gastrointestinal e geniturinário, bem como na cavidade oral, uretra masculina e vesícula biliar, porém com menor frequência (KONEMAM et al., 2001).

Este gênero apresenta-se naturalmente nas carnes, por contaminação no abate, e apresenta importantes propriedades tecnológicas na produção dos fermentados cárneos. Como resultado de sua associação benéfica com o trato gastrintestinal, determinadas linhagens são também utilizadas como probióticos (FRANZ; HOLZAPFEL, 2004).

Portanto, o isolamento destas bactérias a partir da amostra de leite humano pode ser explicado pelo fato desses micro-organismos estarem disseminados na natureza e também na microbiota humana.

5 CONCLUSÕES

A contagem de bactérias lácticas e probióticas nas amostras de leite humano variou em função do tempo de lactação, de 2,48 e 7,24 Log UFC.mL⁻¹. A população decresce ao longo do tempo de lactação.

De um total de 800 culturas isoladas, apenas 15 (1,9%) apresentaram capacidade de produzir bacteriocinas contra micro-organismos Gram-positivos. Os patogênicos *Listeria monocytogenes* ATCC®7644 e *Bacillus cereus* CTC011 apresentaram sensibilidade e *Staphylococcus aureus* ATCC®1602 apresentou resistência.

Com exceção da linhagem BLPB9 que apresenta 14% de células tolerantes a pH 2,0 e 52% a pH 3,0, todas apresentaram propriedades probióticas similares: sensibilidade a pH 2,0 e 44% de células tolerantes a pH 3,0, tolerância na presença de 0,30% de sais biliares durante 4 horas, adesão à chapa de aço inoxidável de 68,66 e 85,04%, resistência à clindamicina, eritromicina e gentamicina.

Da mesma maneira, essas linhagens apresentam comportamento similar de crescimento em leite, não influenciam negativamente no odor e nem na pós-acidificação do leite fermentado armazenado a 4°C durante 28 dias. Contudo, a contagem de células viáveis diminuiu, aproximadamente 2,0 Log UFC.mL⁻¹.

Por meio dos perfis de fermentação de carboidratos e de outras reações bioquímicas, as seis linhagens isoladas de leite materno foram identificadas como *Enterococcus durans* e *Enterococcus avium*.

Atualmente, existem linhagens de *Enterococcus* sendo pesquisadas para utilização como probiótico de uso humano, especialmente para tratamento de diarreias. Estas constatações, aliadas ao fato das linhagens de *Enterococcus* estudadas nesse trabalho terem sido obtidas a partir de leite humano, permitem afirmar que o leite humano, além de toda a sua importância já conhecida, pode também ser uma fonte de probióticos.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, T.F. **Caracterização e identificação de *Enterococcus* spp. Isolados do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo minas artesanal da região da Canastra, Minas Gerais**. 2008. 74 p. Dissertação (Magister Scientiae em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- AVADOGO, A.; OUATTARA, C.A.T.; BASSOLE, I.H.N.; TRAORE, S.A. Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 5, n. 9, p. 678-683, 2006.
- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; WRIGHT A.; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 2004. p. 1-66.
- BAKARI, D.; TATSADJIEU, N.L.; MBAWALA, A.; MBOFUNG, C.M. Assessment of physiological properties of some lactic acid bacteria isolated from the intestine of chickens use as probiotics and antimicrobial agents against enteropathogenic bacteria. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, Galati, v. 8, p. 33-40, Mar. 2011.
- BATTCKOCK, M.; AZAM-ALI, S. **Fermented fruits and vegetables: a global perspective**. Rome: FAO, 1998. 96 p. (FAO Agricultural Services Bulletin, 134).
- BENJELLOUN, H.; RAVELONA, M.R.; LEBEAULT, J.M. Characterization of growth and metabolism of commercial strains of propionic acid bacteria by pressure measurement. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 7, n. 2, p. 143-148, Mar. 2007.
- BENKERROUM, N.; GHOUATI, Y.; SANDINE, W.E.; TANTAOUI-ELARAKI, A. Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins. **Letters in Applied Microbiology**, Morocco, v.17, n. 2, p. 78-81, Aug. 1993.
- BERNADEAU, M.; VERNOUX, J.P.; GUEGUEN, M. Probiotic properties of two *Lactobacillus* strains in vitro. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 56, n. 12, p. 663-667, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Recomendações técnicas para funcionamento do banco de leite humano**. 4. ed. Brasília: Secretaria de Políticas de Saúde, 2001. 48 p.
- BROLAZO, E.; LERAYER, A.L.S.; MORENO, I.; MARASCA, E.T.G. Characterization of diacetyl producing enterococci isolated from fresh Minas type cheese produced by artisans. In: IDF WORLD DAIRY CONGRESS, 26., 2002, Paris. Paris: Congrilait, 2002.

BROMBERG, R.; MORENO, I.; DELBONI, R.R.; CINTRA, H.C. Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC 484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n.1, p. 135-144, jan./mar. 2006.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, n. 1/2, p. 131-149, 1999.

CARIAS, D. Variaciones temporales en la composición y aporte de macro nutrientes y minerales en leches maternas de mujeres venezolanas. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 47, n. 2, p. 115-117, 1997.

CONWAY, P.L.; GORBACH, S.L.; GOLDIN, B.R. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 70, p. 1-12, Jan. 1987.

CHAN, M.L.T. **Efecto del consumo de *Euphorbia lancifolia schlecht* sobre la densidad y el volumen de la leche materna**. 2005. 101 p. Guatemala. Monografia (Trabalho para obtenção do título de Nutricionista) – Facultad de Ciencias Químicas y Farmácia, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, 2005.

DELLAGLIO F.; DE ROISSART, H.; TORRIANI, S.; LURK, M.C.; JANSSENS, D. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: DE ROISSART, H.; LUQUET, F.M. (Ed.). **Bactéries lactiques**. Saint Georges: Lorica, 1994. v. 1, p. 25-116.

DEVRIESE, L.A.; POT, B.; COLLINS, M.D. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species group. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 75, n. 5, p. 399-408, May 1993.

Du TOIT, M.; FRANZ, C.; SCHILLINGER, U.; WARLES, B.; HOLZAPFEL W. Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary mini pig-feeding trail and their effect on serum cholesterol level, faeces pH and faeces moisture contents. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 40, p. 93-104, Jan. 1998.

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

EUCLYDES, M.P. **Nutrição do lactente**: base científica para uma alimentação adequada. 2. ed. Viçosa: Suprema, 2000. 488 p.

EUZÉBY, J.P. List of Bacterial names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 590-592. Disponível em:
<<http://www.bacterio.cict.fr/classifgenerafamilies.html#Enterococcaceae>>. Acesso em: 15 maio 2011.

FAO / WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food.** London; Ontario: World Health Organization, 2002. 17 p.

FOULQUIE–MORENO, M.R.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. The role and application of enterocci in food health. **International Journals of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, p. 1-24, Jan. 2006.

FORD, J.E.; LAW, B.A.; MARSHALL, V.M.E.; REITER, B. Influence of the heat treatment of human milk on some of its protective constituents. **The Journal of Pediatrics**, Saint Louis, v. 91, p. 29-35, 1977.

FORTINA, M.G.; RICCI, G.; MORA, D.; MANACHINI, P.L. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 1717-1721, 2004.

FRANZ, C.M.; STILES, M.E.; SCHLEIFER, K.H.; HOLZAPFEL, W.H. *Enterococci* in foods a conundrum for food safety. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 21, n. 11, p. 491-497, 2003.

FRANS, C.M.A.P.; HOLZAPFEL, W.H. The genus *Enterococcus*: Biotechnological and safety issues. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A.V.; OUWEHAND, A. **The lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects**. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 2004. p. 199-247.

GAVIN, A.; OSTOVR, K. Microbiological characterization of human milk. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 40, p. 614-616, 1977.

GARCIA-GARCERA, M.J.; ELFERINK, M.G.L.; DRIESSEN, A.J.M.; KONINGS, W.N. In vitro pore-forming activity of the lantibiotic nisin. Role of proton motive force and lipid composition. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 212, p. 417-422, 1993.

GARDINER, G.E.; ROSS, R.P.; WALLACE, J.M.; SCANLAN, F.P.; JAGERS, P.; FITZGERALD, G.F.; COLLINS, J.K.; STANTON, C. Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of cheddar cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 12, p. 4907-4916, 1999.

GILLILAND, S.E.; SPECK, M.L. Deconjugation of bile acids by intestinal lactobacilli. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 33, n. 1, p. 15-18, 1977.

GILLILAND, S.E.; STALEY, T.E.; BUSH, L.J. Importance of bile tolerance of *Lact. acidophilus* used as a dietary adjunct. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, p. 3045-3051, 1984.

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 60, p. 732-738, 1997.

GÓMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J.; INGLIS, V. A review on the use of microorganisms as probiotics. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, Mexico, v. 40, p. 166-172, 1998.

GOTCHEVA, V.; HRISTOZOVA, E.; HRISTOZOVA, T.; GUO, M.; ROSHKOVA, Z.; ANGELOV, A. Assessment of potential probiotic properties of lactic acid bacteria and yeast strains. **Food Biotechnology**, New York, v. 16, p. 211-225, 2002.

GROSSO, C.R.F.; FÁVARO-TRINDADE, C.S. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. Lactis* in yoghurt. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, p. 151-156, Mar. 2004.

GUEIMONDEA, M.; LAITINENA, K.; SALMINENA, S.; ISOLAURIC, E. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? **Neonatology**, Basel, v. 92, n. 1, p. 64-66, 2007.

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

GUPTA, R.K.; BATISH, V.K. Screening of lactic streptococci for antibacterial activity, plasmid profiles and biochemical performance. **Microbiologie, Aliments, Nutrition**, Chatenay-Malabry, v. 8, p. 45-52, 1990.

HARRIGAN, W.F. **Laboratory methods in food and dairy microbiology**. 3rd ed. San Diego: Academic Press, 1998. 532 p.

HAVENAAR, R.; BRINK, B.T.; HUIS INT'VELD, J.H.J. Selection of strains for probiotic use. In: FULLER, R. (Ed.). **Probiotics: the scientific basis**. London: Chapman and Hall, 1992. p. 209-224.

HEKKILA, M.P.; SARIS, P.E.J. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, p. 471-478, 2003.

HOSSEINI, S.V.; ARLINDO, S.; BÖHME, C.; FERNÁNDEZ, N.; CALO-MATA, P.; BARROS-VELÁZQUEZ, J. Molecular and probiotic characterization of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 107, n. 4, p. 1-12, 2009.

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, n. 3, p. 253-260, 2004.

HUNTER, J.O.; LEE, A.J.; BARRATT, M.E.J.; LINGGOOD, M.A.; BLADES, J.A. *Enterococcus faecium* strain PR88 - an effective probiotic. **Gut**, London, v. 38, p. 62a, 1996.

JAVED, I. **Characterization of bacteriocin produced by lactic acid bacteria isolated from dairy products**. 2009. 167 p. Thesis (Doctor of Philosophy in Microbiology) - Quaid-i-Azam University, Islamabad, 2009.

KHACHATRYAN, A.R.; HANCOCK, D.D.; BESSER, T.E.; CALL, D.R. Role of calf-adapted *Escherichia coli* in maintenance of antimicrobial drug resistance in dairy calves. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 2, p. 752-757, 2004.

KLARE, I.; KONSTABEL, C.; WERNER, G.; HUYS, G.; VANKERCKHOVEN, V.; KAHLMEIER, G.; HILDEBRANDT, B.; MÜLLER-BERTLING, S.; WITTE, W.; GOOSSENS, H. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 59, n. 5, p. 900-912, 2007.

KONEMAN, E.; ALLEN, S.; JANDA, W.; SCHRECKENBERGER, P.; WINN, W. **Diagnóstico microbiológico: texto y atlas color**. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 2004. 1432 p.

KURITZA, L.N.; PICKLER, L.; MIGLINO, L.B.; WESTPHAL, P.; LOURENÇO, M.C.; TOLEDO, M.; MUNIZ, E.C.; SANTIN, E. Probiotics based on *Enterococcus Faecium* NCIMB 10415 for the control of *Salmonella* Minnesota in broiler chickens. In: LATIN AMERICAN POULTRY CONGRESS, 22., 2011, Buenos Aires. Disponível em: <<http://en.engormix.com/MA-poultry-industry/health/articles/probiotics-based-enterococcus-faecium-t1948/165-p0.htm>>. Acesso em: 15 mar. 2012.

LERAYER, A.L.S.; MARASCA, E.T.G.; MORENO, I.; VIALTA, A. Culturas lácticas e probióticas: identificação, classificação, detecção e aplicação tecnológica. In: OLIVEIRA, M.N. **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. São Paulo: Atheneu, 2009. cap. 4, p. 125-186.

LERTWORAPREECHA, L.; POONSUK, K.; CHALERMCHIAKIT, T. Selection of potential *Enterococcus faecium* isolated from Thai native chicken for probiotic use according to the in vitro properties. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Hat Yai, v. 33, n. 1, p. 9-14, 2011.

LÓPEZ, A. Nutrición en mujeres embarazadas y lactando: nutrition review. **Mead Johnson Nutricionales**, México, v. 2, n. 3, p. 6, 1999.

MACKIE, R.I.; SGHIR, A.; GASKINS, H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 69, n. 5, p. 1035S-1045S, 1999.

MANLEY, K.J.; FRAENKEL, M.B.; MAYALL, B.C.; POWER, D.A. Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci: a randomised controlled trial. **The Medical Journal of Australia**, Sydney, v. 186, n. 9, p. 454-457, 2007.

MARTEAU, P.; POCHART, P.; BOUHNİK, Y.; RAMBAUD, J.C. The fate and effects of transiting, nonpathogenic micro-organisms in the human intestine. **World Review of Nutrition and Dietetics**, Basel, v. 74, p. 1-21, 1993.

- MARTIN, R.; JIMÉNEZ, E.; HEILIG, H.; FERNÁNDEZ, L.; MARÍN, M.L.; ZOETENDAL, E.G.; RODRÍGUEZ, J M. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 4, p. 965–969, 2009.
- MARTIN, R.; LANGA, S.; REVIRIEGO, C.; JIMENEZ, E.; MARIN, M.L.; XAUS, J.; FERNANDEZ, L.; RODRIGUEZ, J.M. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. **The Journal of Pediatrics**, Saint Louis, v. 143, p. 754-758, 2003.
- MARTINS DA COSTA, P.; VAZ-PIRES, P.; BERNARDO, F. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. **Water Research**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 1735-1740, 2006.
- MENSSENS, W.; DE VUGST, L. Inhibitory substances produced by *Lactocilli* isolated from sourdoughs. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 72, p. 31-43, 2002.
- MICHAELSEN, K.F. Variation in macronutrients in human bank milk: influencing factors and implications for human milk banking. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, Philadelphia, v. 11, n. 2, p. 229–239, 1990.
- MIRHOSSEINI, M.; NAHVI, I.; EMTIAZI, G.; TAVASOLI, M. Incidence and antibiotic susceptibility of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 61, p. 391–396, 2008.
- MISHRA, V.; PRASAD, D.N. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 103, p. 109-115, 2005.
- MORENO, I. **Efeito da autólise na proteólise de queijo prato**. 1995. 180 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.
- _____. **Efeito da autólise de culturas lácticas na proteólise do queijo prato**. 2003. 180 p. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- MORENO, I.; LERAYER, A.L.S.; BALDINI, V.L.S.; LEITÃO, M.F.F. Efeito e modo de ação das bacteriocinas produzidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ITAL 383, ATCC 11454 e CNRZ 150 contra *Listeria innocua* LIN 11. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 1, p. 23-28, jan./abr. 1999.
- MORGANO, M.A.; SOUZA, L.A.; NETO, J.M.; RONDÓ, P.H.C. Composição mineral do leite materno de bancos de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 819-824, out./dez. 2005.

NASCIMENTO, M.B. do; ISSLER, H. Breastfeeding: making the difference in the development, health and nutrition of term and preterm newborns. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 58, n. 1, p. 49-60, 2003.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests**: approved standard. 8th ed. Wayne, 2003. 10 p. (NCCLS. Document, M2-A8).

NEWMAN, J. How breast milk protects new-borns. **Scientific American**, New York, v. 273, n. 6, p. 76, 1995.

NOGUEIRA, V.C. **Culturas de bactérias lácticas com propriedades probióticas e tecnológicas para aplicação como bioconservantes**. 2010. 104 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

OLIVARES, M.; DÍAZ-ROPERO, M.P.; MARTÍN, R.; RODRÍGUEZ, J.M.; XAUS, J. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast Milk. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 101, n. 1, p. 72-79, 2006.

OLIVEIRA, J.S. **Queijo**: fundamentos tecnológicos, ciência e tecnologia. 2. ed. Campinas: UNICAMP, 1986. 149 p.

PARK, Y.S.; LEE, J.Y.; KIM, Y.S.; SHIN, D.H. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from feces of newborn baby and from dongchimi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 2531–2536, 2002.

PARK, S.C.; HWANG, M.H.; KIM, 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 Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 22, n. 1, p. 35-37, 2006.

PENNACCHIA, C.; ERCOLINI, D.; BLAIOTTA, G.; MAURIELLO, G.; VILLANI, F. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. **Meat Science**, Barking, v. 67, p. 309-317, 2004.

PEREIRA, V.G.; GÓMEZ, R.J.H.C. Antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* against foodborne pathogens. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 229-240, abr./jun. 2007.

PICARD, C.; FIORAMONT, J.; FRANÇOIS, A.; ROBINSON, T.; NEANT, F.; MATUCHANSKY, C. Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 22, n. 6, p. 495-512, 2005.

PICCIANO, M.F. Nutrient composition of human milk. **Pediatric Clinics of North America**, Philadelphia, v. 48, n. 1, p. 53-67, 2001.

PINEIRO, M.; STANTON, C. Probiotic bacteria: legislative framework – requirements to evidence basis. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 137, n. 3, p. 850-853, 2007.

POLLMANN, M.; NORDHOFF, M.; POSPISCHIL, A.; TEDIN, K.; WIELER, L. H. Effects of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on the rate of natural chlamydia infection in swine. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 7, p. 4346–4353, 2005.

POT, B.; LUDWIG, W.; KERSTERS, K.; SCHLEIFER, K.H. Taxonomy of lactic acid bacteria. In: VUYST, L. de; VANDAMME, E.J. (Ed.). **Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications**. New York: Blackie Academic & Professionals, 1993. p. 13-90.

PRASAD, M.M.; GHODEKER, D.R. Antimicrobial activity of lactobacilli isolated from fermented milk products. **Cultured Dairy Products Journal**, Washington, v. 26, n. 2, p. 22-28, 1991.

RACCACH, M.; McGRATH, R.; DAFTARIAN, H. Antibiosis of some lactic acid bacteria including *Lactobacillus acidophilus* toward *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 9, n. 1, p. 25-32, 1989.

REDONDO, N.C. **Avaliação *in vitro* de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416**. 2008. 109 p. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Araraquara, 2008.

REENEN, C.A. Van; DICKS, L.M. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 193, n. 3, p. 157-168, 2011.

RODRIGUEZ, E.; GONZALIS, B.; GAYA, P.; NUNEZ, M.; MEDINA, M. Diversity of bacteriocins prod y lactic acid bacteria isolated from raw milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 10, p. 7-15, 2000.

RUIZ-MOYANO, S.; MARTÍN, A.; BENITO, M.J.; ARANDA, E.; CASQUETE, R.; CÓRDOBA, M.G. Safety and functional aspects of preselected Enterococci for probiotic use in Iberian dry-fermented sausages. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 74, n. 7, p. 398–404, 2009.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDE, R.; MALTTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 84, p. 197-215, 2000.

SAFAEI, E. Biotechnological production of Vit. B12 by *Propionibacterium freudenreichii*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PROPIONIBACTERIA AND BIFIDOBACTERIA: DAIRY AND PROBIOTIC APPLICATIONS, 2004, Saint-Malo. Saint-Malo: EDP Sciences, 2004. p. 12-19.

SAXELIN, M.; GRENOV, B.; SVENSSON, U.; FONDÉN, R.; RENIERO, R.; MATTILA-SANDHOLM, T. The technology of probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 10, p. 387-392, 1999.

SCARSO, I.S. **Estudo dos fatores que condicionam acidez elevada em Leite Humano: aspectos microbiológicos e nutricionais**. 2008. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SCHLEIFER, K.H.; LUDWIG, W. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. **Systematic and Applied Microbiology**, Washington, v. 18, p. 461-467, 1995.

SERAFINI, A.B.; ANDRÉ, M.C.D.P.B.; RODRIGUES, M.A.V.; KIPNIS, A.; CARVALHO, C.O.; CAMPOS, M.R.H.; MONTEIRO, E.C.; MARTINS, F.; JUBE, T.F.N. Qualidade microbiológica de leite humano obtido em banco de leite. **Saúde Pública**, Goiânia, v. 37, n. 6, p. 775-779, 2003.

SETYAWARDANI, T.; RAHAYU, W.P.; MAHESWARI, R.; PALUPI, N.H.S. Identification and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from indigenous goat milk. **Journal of Animal Production**, Purwokerto, v. 13, n. 1, p. 57-63, 2011.

SHARMA, S.; CHATURVEDI, J.; CHAUDHARI, B.P.; SINGH, R.L.; KAKKAR, P. Probiotic *Enterococcus lactis* IITRHR1 protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Nutrition**, New York, v. 28, n. 2, p. 173-181, 2012.

SOLÍS, G.; REYES-GAVILANB, C.G. de los; FERNÁNDEZA, N.; MARGOLLESB, A.; GUEIMONDEB, M. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. **Anaerobe**, London, v. 16, n. 3, p. 307-310, 2010.

TAGG, J.R.; MCGIVEN, A.R. Assay system for bacteriocins. **Applied Microbiology**, Washington, v. 21, p. 943, 1971.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 40, p. 722-756, 1976.

TAKIGUCHI, R.; SUZUKI, Y. Survival of lactic acid bacteria in simulated digestive juice. **Journal of Intestinal Microbiology**, Tokyo, v. 14, n. 1, p. 11-18, 2000.

TEMMERMAN, R.; POT, B.; HUYS, G.; SWINGS, J. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 1-10, 2003.

TODOROV, S.D.; BOTES, M.; GUIGAS, C.; SCHILLINGER, U.; WIID, I.; WACHSMAN, M.B.; HOLZAPPFEL, W.H. Boza a natural source of probiotic lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, p. 465-477, 2008.

VALDEZ, G.F.; MARTOS, G.; TARANTO, M.P.; LORCA, G.L.; OLIVER, G.; DE RUIZ, H. Influence of bile on beta-galactosidase activity and cell viability of *Lactobacillus reuteri* when subjected to freeze-drying. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 9, p. 1955-1958, 1997.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics-from metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, Melbourne, v. 18, p. 714-728, 2008.

VAUX, A.; LAGUERRE, G.; DIVIÈS, D.; PRÉVOST, H. *Enterococcus asini* sp. nov. isolated from the caecum of donkeys (*Equus asinus*). **International Journal Systematic Bacteriology**, Reading, v. 48, p. 383-387, 1998.

VILLOSLADA, F.L.; OLIVARES, M.; , SIERRA, S.; RODRIGUEZ, J.M.; BOZA, J.; XAUS, J. Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 98, Suppl. 1, p. 96-100, 2007.

YANG, R.; RAY, B. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, London, v. 11, p. 281-291, 1994.

XANTHOU, M. Immune protection of human milk. **Biol Neonate**, Basel, v. 74, p. 121-33, 1998.

ZACARÍAS, M.F.; BINETTI, A.; LACO, M.; REINHEIMER, J.; VINDEROLA, G. Preliminary technological and probiotic characterization of bifidobacteria isolated from breast milk for use in dairy products. **International Dairy Journal**, Barking, v. 21, p. 548-555, 2011.

ZAMFIR, M.; CALLEWAERT, R.; CORNEA, P.C.; De VUYST, L. Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. **FEMS: Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 190, n. 2, p. 305-308, 2000.

ZUCCOTTI, G.V.; MENECHIN, F.; RAIMONDI, C.; DILILLO, D.; AGOSTONI, C.; RIVA Probiotics in clinical practice: an overview. **The Journal of International Medical Research**, Worthing, v. 36, p. 1-53, 2008.