UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA - EEL

MOYSÉS ESTEVÃO DE SOUZA FREITAS PEHRSON

**Avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias
sintetizadas por cepas de *Lactobacillus* sp. que
apresentam propriedades probióticas.**

LORENA - SP

2013

MOYSÉS ESTEVÃO DE SOUZA FREITAS PEHRSON

Avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias sintetizadas por cepas de *Lactobacillus* sp. que apresentam propriedades probióticas.

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha

Versão Original

LORENA – SP

2013

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

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Pehrson, Moysés Estevão de Souza Freitas

Avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias sintetizadas por cepas de *Lactobacillus* sp. que apresentam propriedades probióticas. / Moysés Estevão de Souza Freitas Pehrson. - 2013.

106 p.: il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2013.

Orientador: Ismael Maciel de Mancilha

1. *Lactobacillus* 2. *Escherichia coli* 3. Substâncias antimicrobianas 4. *Salmonella* 5. *Shigella*. I. Título. II. Mancilha, Ismael Maciel de, orient.

579.864 - CDU

BIOGRAFIA

Moysés Estevão de Souza Freitas Pehrson nasceu no dia 21 de Abril de 1988, na cidade de Volta Redonda – RJ, onde reside atualmente. Em 2006 ingressou no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do Centro Universitário Geraldo Di Biase – UGB, *campus* de Volta Redonda - RJ, onde focou seu TCC na produção de substâncias antimicrobianas por *Escherichia coli*. Neste período teve a oportunidade de realizar estágio no Laboratório de Análises Clínicas da Conmedh (Convênios Médico-Hospitalares), focando suas atividades nas áreas de bioquímica clínica e microbiologia clínica. Também realizou no decorrer deste curso atividades em nível de iniciação científica no Laboratório de Microbiologia do UGB. Realizou estágio no Parque Nacional do Itatiaia, atuando como coordenador de atividades relacionadas a educação e preservação ambiental.

Em 2010, iniciou seus estudos em nível de pós-graduação *latu sensu* em Bioquímica no Centro Universitário Geraldo Di Biase – UGB, *campus* de Volta Redonda – RJ, focando seu projeto de pesquisa na assimilação de substâncias prebióticas por cepas de *Lactobacillus* que apresentam propriedades probióticas.

No ano de 2011, iniciou seus estudos de pós-graduação, em nível de mestrado, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP, em Lorena - SP. Neste curso deu continuidade aos seus estudos tendo sua dissertação o objetivo de avaliar a produção de substâncias antimicrobianas sintetizadas por cepas de *Lactobacillus* que apresentam propriedades probióticas.

Dedico este trabalho ao meu pai, Carlos Pehrson, a quem o Senhor levou no decorrer deste curso, sem que eu pudesse me despedir. Descanse na paz do Senhor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças para enfrentar todas as dificuldades pelas quais passei no decorrer desta etapa de minha vida.

À minha família, pelo apoio que me deram. Amo vocês.

À minha namorada Nathália, que me apoiou em todas as minhas dificuldades e no nervosismo, sempre puxando minha orelha quando eu desanimava. Te amo. Vou parar de te enrolar, prometo.

Ao Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha, pela orientação técnica e principalmente pela paciência, confiança e respeito com os quais me tratou desde o princípio. É um exemplo que com certeza vou seguir na minha vida profissional.

Ao Prof Dr. Carlos Alberto Sanches Pereira, pelos conselhos, pelos incentivos que me deu desde a graduação e por acreditar em mim. Você tem uma qualidade que muitos professores deixam morrer no decorrer de suas carreiras, que é a de motivar seus alunos e dar-lhes oportunidades de melhorar. No final faz toda a diferença. Que Deus te abençoe.

Aos amigos Flávio, Cláudio, Aline e Juan pela camaradagem, pelas conversas, pelo apoio e pela hospitalidade.

Ao Zé cobrinha pelas risadas, simpatia e pelo café de primeira qualidade.

Ao Centro Universitário Geraldo Di Biase, por possibilitar que os experimentos fossem realizados em suas dependências.

A todos aqueles que, embora não citados aqui, contribuíram para que esta etapa fosse concluída.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

PEHRSON, M. E. S. F.; **Avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias sintetizadas por cepas de *Lactobacillus* sp. que apresentam propriedades probióticas.** 2013. 106p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

As infecções causadas por patógenos intestinais gram-negativos são importantes fontes de prejuízos na criação de animais domésticos como bovinos, ovinos, suínos e aves. Em muitos casos, opta-se pela administração de antibióticos de amplo espectro para prevenção destas infecções e atenuação das perdas. No entanto, esta prática apresenta risco para a saúde humana, bem como contribui para seleção de cepas resistentes. Nos últimos anos, muito tem se discutido a respeito de novas alternativas para atenuar os prejuízos mencionados sem apresentar o mesmo risco. Uma destas alternativas é a utilização de micro-organismos que apresentam propriedades probióticas que sintetizam substâncias inibitórias sobre espécies de patógenos intestinais. Esta abordagem praticamente elimina o risco de desenvolvimento de resistência aos antibióticos de uso clínico, além de evitar a presença de resíduos nos produtos de origem animal. O termo "probiótico" é utilizado atualmente para definir micro-organismos que, administrados em doses e frequências adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Nos últimos anos, diversos estudos têm sido desenvolvidos envolvendo quatro cepas de *Lactobacillus* (*L. acidophilus* ATCC 4356, *L. casei* ATCC 7469, *L. fermentum* ATCC 9338 e *L. plantarum* ATCC 8014) com resultados promissores no tocante às suas características probióticas. Desta forma, a proposta deste estudo foi avaliar a capacidade destas cepas em relação à produção de substâncias que apresentam atividade inibitória sobre espécies patogênicas, intestinais gram-negativas, especificamente *Escherichia coli* 0112, *Escherichia coli* 0124, *Escherichia coli* 0127, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Shigella dysenteriae* ATCC 13313, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076. Para tanto, foi avaliada a atividade inibitória de substâncias presentes no sobrenadante livre de células de cada cepa. Adicionalmente, foi realizada a caracterização presuntiva das substâncias responsáveis pela inibição do crescimento microbiano quando os respectivos sobrenadantes foram submetidos a diferentes tratamentos (catalase, enzimas proteolíticas, tratamento térmico e neutralização do pH). A estratégia adotada consistiu na avaliação do crescimento, determinado por turbidimetria, das cepas patogênicas na presença do sobrenadante *in natura* e tratado. Os valores de absorbância foram analisados estatisticamente pelos testes de ANOVA e Tukey e os resultados mostraram que os sobrenadantes *in natura* de *L. acidophilus* ATCC 4356 *L. casei* ATCC 7469 e *L. plantarum* ATCC 8014 foram capazes de inibir 5 das 6 cepas dos patógenos intestinais estudadas em níveis de inibição variando de 23% a 53%, sendo que a cepa *S. dysenteriae* ATCC 13313 não teve seu crescimento inibido pelas cepas de *Lactobacillus* avaliadas. Demonstrou-se também que apenas o sobrenadante *in natura* de *L. fermentum* ATCC 9338 apresentou atividade inibitória sobre esta cepa, cujo percentual de inibição variou entre 20% e 35% e entre 36% e 65% para as demais cepas patogênicas. A avaliação dos resultados relativos ao crescimento das cepas patogênicas na presença dos sobrenadantes *in natura* e tratados revelou que o efeito de inibição observado foi devido a presença de ácidos orgânicos que provocou o abaixamento do pH. Demonstrou-se ainda a ausência de substâncias peptídicas e termolábeis ativas contra as cepas patogênicas avaliadas, bem como peróxido de hidrogênio nos respectivos sobrenadantes.

Palavras-chave: *Lactobacillus*. *Escherichia coli*. Substâncias antimicrobianas. *Salmonella*. *Shigella*.

ABSTRACT

PEHRSON, M. E. S. F.; **Evaluation of antimicrobial activity of compounds synthesised by strains of *Lactobacillus* sp. which present probiotic properties.** 2013.106p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

Infectious diseases caused by gram-negative pathogens are important sources of losses in livestock, especially bovine, ovine and poultry. In many cases, subclinical administration of broad-spectrum antibiotics is chosen as an approach for the prevention of these infections, consequently decreasing these losses. However, this practice presents an important risk to human health, as well as it contributes to the selection of bacterial strains which are resistant to antibiotics usually employed in clinical practice. Therefore, special attention has been given to finding alternative procedures to decrease those losses while eliminating that risk. One of these alternatives consists of using microorganism species which present probiotic properties such as synthesis of inhibitory compounds that act on intestinal pathogen species. This alternative virtually eliminates the risk of developing resistance to broad-spectrum antibiotics, as well as avoids the presence of antibiotic residues in animal products. The term “probiotic” is currently used to define microorganism species which promote several benefits to the host, once they are administered frequently and in adequate amounts. In the last few years, several works have been carried out using four *Lactobacillus* strains (*L.acidophilus* ATCC 4356, *L.casei* ATCC 7469, *L. fermentum* ATCC 9338 and *L. plantarum* ATCC 8014), and the results have been satisfactory regarding to their probiotic characteristics. Therefore, the aim of this study was to evaluate the ability of these strains to produce inhibitory compounds which are active on gram-negative intestinal pathogen species, specifically *Escherichia coli* 0112, *Escherichia coli* 0124, *Escherichia coli* 0127, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Shigella dysenteriae* ATCC 13313 and *Salmonella enteritidis* ATCC 13076. So, antimicrobial activity of the cell-free supernatant of each strain was evaluated. Additionally, presumptive characterization of these compounds was undertaken by submitting the supernatants to different treatments (catalase, proteolytic enzymes, thermic treatments, pH neutralizing). The strategy consisted of evaluating the growth, estimated by turbidimetry, of the mentioned pathogenic strains in the presence of the original supernatants, as well as in the presence of treated supernatants. Absorbance values were statistically analyzed by means of ANOVA and Tukey's test. The results showed that the original supernatants of *L. acidophilus* ATCC 4356 *L. casei* ATCC 7469 and *L. plantarum* ATCC 8014 were capable of inhibiting five of six strains of enteric pathogens at levels varying from 23% to 53%. *S. dysenteriae* ATCC 13313 was not inhibited by the *Lactobacillus* strains evaluated. It was also demonstrated that only the original supernatant of *L. fermentum* ATCC 9338 showed inhibitory activity upon this strain varying from 15% to 32%, and between 36% and 65% regarding to the other strains. Growth evaluation of the pathogenic strains in the presence of the treated and original supernatants revealed that the inhibition effect observed occurred due to the presence of organic acids, which lowered the pH of the supernatants. It was also demonstrated the absence of hydrogen peroxide, peptidic and thermolabile compounds in the supernatants.

Keywords: *Lactobacillus*. *Escherichia coli*. Antimicrobial compounds. *Salmonella*. *Shigella*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Efeito de inibição do sobrenadante <i>in natura</i> do cultivo de <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 sobre as cepas patogênicas indicadoras.	49
Figura 2 - Valores médios de absorvância relativos ao crescimento das cepas patogênicas na presença de caldo MRS a pH 7,0 (A), do sobrenadante de <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356, <i>in natura</i> (B) e submetidos a diferentes tratamentos: 100 °C/15min (C); 121°C/15min (D): α -quimotripsina (E): Pronase (F): Tripsina (G): Catalase Caldo (H): MRS a pH 4,2 (I). (Continua).	50
Figura 3 - Efeito de inibição do sobrenadante <i>in natura</i> do cultivo de <i>L. casei</i> ATCC 7469 sobre as cepas patogênicas indicadoras.	53
Figura 4 - Valores médios de absorvância relativos ao crescimento das cepas patogênicas na presença de caldo MRS a pH 7,0 (A), do sobrenadante de <i>L. casei</i> ATCC 7469, <i>in natura</i> (B) e submetidos a diferentes tratamentos: 100 °C/15min (C); 121°C/15min (D): α -quimotripsina (E): Pronase (F): Tripsina (G): Catalase Caldo (H): MRS a pH 4,3 (I). (Continua).	54
Figura 5 - Efeito de inibição do sobrenadante <i>in natura</i> do cultivo de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 sobre as cepas patogênicas indicadoras avaliadas.	56
Figura 6 - Valores médios de absorvância relativos ao crescimento das cepas patogênicas na presença de caldo MRS a pH 7,0 (A), do sobrenadante de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014, <i>in natura</i> (B) e submetidos a diferentes tratamentos: 100 °C/15min (C); 121°C/15min (D): α -quimotripsina (E): Pronase (F): Tripsina (G): Catalase Caldo (H): MRS a pH 4,4. (I). (Continua).	57
Figura 7 - Efeito de inibição do sobrenadante <i>in natura</i> do cultivo de <i>L. fermentum</i> ATCC 9338 sobre as cepas patogênicas indicadoras avaliadas	59

Figura 8 - Valores médios de absorvência relativos ao crescimento das cepas patogênicas na presença de caldo MRS a pH 7,0 (**A**), do sobrenadante de *L. fermentum* ATCC 9338, *in natura* (**B**) e submetidos a diferentes tratamentos: 100 °C/15min (**C**); 121°C/15min (**D**); α-quimotripsina (**E**); Pronase (**F**); Tripsina (**G**); Catalase Caldo (**H**); MRS a pH 4,1. (**I**). (Continua).60

Figura 9 - Efeito do pH dos sobrenadantes *in natura* sobre o crescimento das cepas patogênicas. **LA**: *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 **LC**: *Lactobacillus casei* ATCC 7469 **LF**: *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338 **LP**: *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. **NS**: Não significante.....62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Definições de probióticos e respectivas publicações.....	28
Tabela 2 - Micro-organismos comercializados como probióticos.....	29
Tabela 3 - Etapas do isolamento à validação de um microrganismo probiótico	30
Tabela 4 - Propriedades benéficas e efeitos atribuídos a micro-organismos probióticos	31
Tabela 5 - Classificação de bacteriocinas proposta por Klaenhammer (1993).....	37
Tabela 6 - Classificação de bacteriocinas proposta por Cotter, Hill e Ross (2005)	38
Tabela 7 - Classificação de bacteriocinas proposta por Heng e Tagg (2006).....	39
Tabela 8 - Valores médios (*) de absorbância $\pm$ desvio padrão do cultivo das cepas patogênicas indicadoras em diferentes condições.	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 MICROBIOTA INTESTINAL	19
2.1.1 Composição da microbiota intestinal	20
2.1.2 Antagonismo bacteriano	22
2.2 BACTÉRIAS LÁCTICAS	23
2.2.1 Metabolismo	25
2.3 PROBIÓTICOS	26
2.3.1 Substâncias antimicrobianas sintetizadas por bactérias lácticas probióticas	32
2.3.1.1 Ácidos orgânicos	33
2.3.1.2 Peróxido de hidrogênio	33
2.3.1.3 Diacetil	35
2.3.1.4 Bacteriocinas	36
2.3.2 Probióticos e produtos de origem animal	40
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 MICRO-ORGANISMOS	43
3.2 OBTENÇÃO DO SOBRENADANTE	44
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	44
3.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana	44
3.3.2 Efeito do pH sobre a atividade antimicrobiana	45
3.3.3 Efeito do H ₂ O ₂ sobre a atividade antimicrobiana	46
3.3.4 Efeito de substâncias proteicas sobre a atividade antimicrobiana	47
3.3.5 Efeito de substâncias termo-lábeis sobre a atividade antimicrobiana	47
3.3.6 Caracterização das substâncias antimicrobianas	48
3.3.7 Avaliação do efeito de inibição	48

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5 CONCLUSÕES	70
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	71
REFERÊNCIAS	72
APÊNDICES.....	98

1 INTRODUÇÃO

Há mais de cem anos, Metchnikoff postulou que a vida humana poderia ser prolongada pela alteração da microbiota intestinal. Esta suposição se originou a partir da observação dos hábitos alimentares de populações cuja expectativa de vida era acima da média. Com o auxílio de pesquisas clínicas e microbiológicas, o conhecimento acerca de micro-organismos probióticos vem sendo construído sob a mesma perspectiva de Metchnikoff.

Probióticos podem ser definidos como micro-organismos que beneficiam hospedeiro quando administrados de forma correta, com frequência e dosagem adequadas. Seja qual for a via de administração, o estudo dos probióticos acompanha as relações interespecíficas entre micro-organismos e hospedeiro, e as relações intra e interespecíficas entre componentes da microbiota na qual os probióticos serão inseridos.

As bactérias lácticas formam o grupo que contem maior número de espécies com aplicabilidades probióticas comprovadas. Os micro-organismos deste grupo são cocos ou bastonetes gram-positivos, não esporuladores que produzem ácido láctico como principal metabólito. Algumas espécies deste grupo vêm sendo utilizados há centenas de anos com o objetivo de prolongar a vida útil de alimentos sem que suas propriedades nutricionais sejam perdidas.

A preservação destes alimentos acontece porque micro-organismos contaminantes e patogênicos do ambiente não se proliferam nas condições de meio geradas pela presença de metabólitos produzidos pelas bactérias lácticas. Metchnikoff observou que este efeito bioprotetor se mantinha no ambiente intestinal dos que ingeriam leite fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, promovendo efeitos benéficos à saúde dos que o consumiam regularmente. Estes últimos estavam diretamente relacionados à melhor absorção de nutrientes, à redução da atividade de micro-organismos nocivos bem como a neutralização de compostos tóxicos por estes produzidos.

A principais substâncias responsáveis pela redução da atividade de micro-organismos indesejáveis são os ácidos láctico e acético, que inibem o crescimento de micro-organismos patogênicos e oportunistas por meio da redução do pH. Além do efeito do pH, destacam-se também o peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, sendo estas últimas o foco de grande interesse atualmente.

Bacteriocinas são peptídeos catiônicos antibacterianos de síntese ribossomal e possuem diferentes características moleculares, que variam conforme a espécie que as

produz. A maioria das bacteriocinas de bactérias lácticas possui espectro de ação restrito a micro-organismos gram-positivos. No entanto, sabe-se que existem bacteriocinas que podem atuar também contra micro-organismos gram-negativos oportunistas ou patogênicos, embora sejam conhecidas em menor número. Tais bacteriocinas são de grande interesse na indústria de alimentos, pois podem ser utilizadas para aumentar a segurança dos alimentos ao inibir micro-organismos gram-negativos bem como gram-positivos.

Patógenos intestinais gram-negativos são fatores de grande preocupação na indústria de produtos de origem animal, uma vez que estes produtos podem atuar como veículos para sua disseminação. Eles podem ocasionar grandes perdas na cadeia produtiva por meio da debilitação ou óbito dos animais de produção. Além disso, caso sejam transmitidos a hospedeiros humanos, podem causar surtos de graves infecções intestinais, que por vezes podem ser letais.

Estes fatos tem impulsionado a busca por probióticos que produzam substâncias inibitórias contra micro-organismos gram-negativos causadores de patologias intestinais em humanos e animais de produção. Os probióticos com estas características podem ser utilizados como agentes profiláticos ou terapêuticos contra cepas patogênicas, reduzindo assim a necessidade do uso de antibióticos para este fim. Estes também podem ser empregados como bioconservantes de alimentos, bem como produtores de substâncias antimicrobianas a serem utilizadas para este fim.

Este trabalho teve como objetivo contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos nos efeitos bioprotetores que vem sendo observados na utilização de uma preparação probiótica constituída por espécies de *Lactobacillus*. Especificamente estudou-se a atividade antimicrobiana exercida por substâncias presentes nos sobrenadantes resultantes dos cultivos das referidas cepas probióticas, sobre espécies de bactérias gram-negativas patogênicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROBIOTA INTESTINAL

O lúmen intestinal é um ambiente rico em nutrientes, no qual se pode encontrar concentrações microbianas de até 10^{12} células/ml (WHITMAN et al., 1998). A microbiota intestinal humana é composta por espécies de três domínios da vida (Eubacteria, Eukarya e Archaeobacteria) (CAMP et al., 2009). Destes últimos, estão presentes principalmente os pertencentes ao filo *Euryarchaeota*. Relatos de isolamento de espécies como *Methanobrevibacter smithii*, *Methanosphaera stadtmaniae* são comuns (MILLER et al., 1982; MILLER; WOLIN, 1985; BRUSA et al., 1995; OXLEY et al., 2010), conforme revisado por Dridi et al. (2011). Em certos casos foram até implicados em patologias como a diverticulose e câncer de cólon (MACARIO; MACARIO, 2009).

Espécies do filo *Firmicutes* (Eubacteria), formado pelas classes *Bacilli*, *Clostridia* e *Erysipelotrichi* apresentam maior prevalência na microbiota na porção intestinal terminal. Estas representando mais de 80% do total de micro-organismos isolados em amostras fecais. Cerca de 90% dos *Firmicutes* intestinais pertencem à ordem *Clostridiales*, da classe *Clostridia*, esta é representada predominantemente pelos gêneros *Clostridium*, *Ruminococcus* e *Eubacterium*. Espécies do filo *Actinobacteria*, formado pelas classes *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitrospirae*, *Rubrobacteria*, e *Thermoleophilia*, são as segundas em predominância. Neste filo as principais espécies representantes estão incluídas no gênero *Bifidobacterium*, que pertence à classe *Actinobacteria*, ordem *Bifidobacteriales*, família *Coriobacteriaceae*, classe *Coriobacteriia* e na ordem *Coriobacteriales*. Os demais integrantes estão compreendidos nos filos *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Fusobacteria* (ANDERSSON et al., 2008).

A microbiota intestinal começa a se desenvolver a partir do nascimento, na passagem pelo canal vaginal durante o parto e com a amamentação, e adquire novas espécies presentes naturalmente no leite materno e na microbiota vaginal (KORECKA; ARULAMPALAM, 2012). Esta hipótese é suportada pelo fato de que o perfil da microbiota fecal de recém-nascidos se mostra muito similar ao da microbiota vaginal e do leite materno (PALMER et al., 2007). O leite materno humano é possivelmente o responsável por contribuir para a colonização do trato gastrointestinal de neonatos por espécies do gênero *Bifidobacterium* (GUEIMONDE et al., 2007). Por outro lado, a

microbiota vaginal parece contribuir para a colonização do TGI por espécies do gênero *Lactobacillus* (VÁSQUEZ et al., 2002; HYMAN et al., 2005). Segundo Biasucci et al. (2010), a composição da microbiota que coloniza inicialmente o TGI de recém nascidos pode ser alterada até mesmo pela modalidade de parto.

Segundo de Filippo et al. (2010), os hábitos alimentares exercem grande influência sobre a composição da microbiota intestinal, mas outros fatores como etnia, saneamento básico, higiene, geografia e clima também influenciam a mesma. Wu et al. (2010) destacam que os fatores preponderantes que interferem na composição da microbiota são os hábitos alimentares de longo prazo, e não mudanças transitórias na alimentação. Segundo Ley et al. (2008) a composição da microbiota intestinal também muda de acordo com a espécie do hospedeiro, entretanto ressalta a grande influência dos hábitos alimentares. Os autores relacionam a predominância de diferentes tipos de alimentos, como os ricos em fibra, proteína animal ou carboidratos simples à prevalência de certos grupos de micro-organismos no TGI.

2.1.1 Composição da microbiota intestinal

As espécies de micro-organismos presentes no intestino humano recebem pressões tanto do sistema imunológico do hospedeiro quanto de micro-organismos competidores. Este fato impulsiona a microbiota do TGI a um estado particular de equilíbrio, no qual um pequeno número de espécies constituem a maior parte da microbiota, e uma diversidade maior de espécies constituem o restante (DETHLEFSEN et al., 2008).

Segundo Lyte (2010), a comunidade microbiana poderia ser definida como "órgão microbiano", pois semelhantemente aos órgãos do hospedeiro é composta por diferentes elementos celulares que desempenham funções especializadas. No entanto, diferentemente de órgãos funcionais, estas funções podem ser benéficas ou prejudiciais ao hospedeiro. Isto se deve à possibilidade de variação das proporções destes elementos celulares, cujas atividades nem sempre convergem para a manutenção da vida do hospedeiro.

Arumugam et al. (2011) selecionaram o termo "enterótipo" para classificar diferentes perfis de abundância filogenética de micro-organismos no TGI, cada um com distintas implicações na vida do hospedeiro. Os três perfis caracterizados pelos autores levam em conta a prevalência de três gêneros, *Bacteroides*, *Prevotella* e *Ruminococcus*. Todos eles perfis são amplamente encontrados em humanos, independentemente do país ou

continente de origem, indicando a existência de um número pequeno de enterótipos, nos quais as respostas à ingestão de nutrientes e fármacos podem ser diferenciadas.

De acordo com De Filippo (2010) a composição da microbiota varia inevitavelmente conforme a composição da dieta, que pode ser rica em carboidratos simples, fibras e oligossacarídeos bem como proteína. Segundo o autor, a manutenção de tais hábitos alimentares influencia a composição da microbiota intestinal de forma que a capacidade do hospedeiro de absorver nutrientes é alterada de acordo com a predominância/ausência de algumas espécies de micro-organismos.

Diversos estudos avaliaram a influência da composição da microbiota intestinal na absorção de nutrientes e suas possíveis consequências no ganho de peso, em animais de produção e humanos (LIMA et al., 2003; KHAKSEFIDI; GHORCHI, 2006; YOUSEFI; KARKOODI, 2007; SANTACRUZ et al., 2010; ANGELAKIS et al., 2012; MURPHY et al., 2012). Alguns encontraram associações positivas entre obesidade humana e maiores populações de *Faecalibacterium prausnitzii* (*Firmicutes*) (BALAMURUGAN et al., 2010) e do gênero *Lactobacillus* (ARMOUGOM et al., 2009). No entanto, outros encontraram associações positivas entre a presença do gênero *Lactobacillus* e processo de perda de peso (SANTACRUZ et al., 2009).

Estes estudos consideram que há uma contribuição por parte da microbiota intestinal, que produz enzimas digestivas e altera a degradação e aproveitamento de nutrientes. Estes estudos contribuem para o melhoramento do desempenho zootécnico de animais de produção, e vem sendo realizados também com objetivo de caracterizar os aspectos microbiológicos que contribuem para o desenvolvimento de certos casos de obesidade (BÄCKHED et al., 2004; TURNBAUGH et al., 2006; MURPHY et al., 2010; KOOTE et al., 2012).

O entendimento dos efeitos da composição da microbiota intestinal na conversão alimentar direcionou estudos com objetivo de elucidar as diferenças entre microbiotas de indivíduos obesos e indivíduos dentro da faixa normal de peso (TURNBAUGH et al., 2009). Estudos com camundongos evidenciam que as diferenças na composição da microbiota, juntamente com seus efeitos são completamente reversíveis por meio da modulação da microbiota intestinal (TURNBAUGH et al., 2008).

A composição da microbiota intestinal apresenta diversos efeitos fisiológicos no TGI, que podem ser locais ou sistêmicos. Estes efeitos podem ser benéficos ou prejudiciais à saúde (HE et al., 2008; ROUND; MAZMANIAN, 2009; SHEN et al., 2010; SOBHANI et al., 2011). Segundo Jia et al. (2008), a composição da microbiota pode influenciar

também a farmacocinética e a toxicidade de algumas drogas e compostos químicos por meio da alteração da capacidade de absorção ou da neutralização de compostos tóxicos.

Na concepção de Bäckhed et al. (2005), a microbiota intestinal é composta por uma associação de diferentes espécies e cepas, dotadas de capacidade de comunicação entre si e com as células do hospedeiro, consumindo e disponibilizando energia, mediando transformações químicas fisiologicamente importantes. Os autores também afirmam que a microbiota intestinal confere propriedades funcionais ao hospedeiro que não lhe são próprias, que podem contribuir para o melhor funcionamento do organismo do mesmo.

As espécies presentes na microbiota intestinal são distribuídas de forma heterogênea ao longo do trato gastrointestinal (AURELI et al., 2009). Estas, por meio de sua atividade metabólica, desempenham importante papel utilizando substratos como o fitato, que pode impedir a absorção de magnésio e cálcio. O consumo de fitato proporciona então maior disponibilidade destes íons, possibilitando assim maior absorção (HAROS et al., 2009) e na produção de certas vitaminas (POMPEI et al., 2007). Estas espécies também influenciam significativamente o desenvolvimento e o desempenho do sistema imunológico (OUWEHAND; ISOLARI; SALMINEN, 2002; SJÖGREN et al., 2009).

Segundo Corthier e Doré (2010) a microbiota intestinal também desempenha papéis fundamentais por meio de produtos formados em seu metabolismo. O equilíbrio entre diferentes espécies de bactérias com perfis metabólicos distintos é possivelmente crucial para manter a eficiência da degradação e fermentação da matéria orgânica no ambiente intestinal e a estabilidade da microbiota intestinal (CORTHIER; DORÉ, 2010).

2.1.2 Antagonismo bacteriano

Segundo Fredrickson e Stephanopoulos (1981) existem dois tipos básicos de interações interespecíficas negativas entre micro-organismos. No primeiro, as populações mais eficientes utilizam rapidamente os nutrientes do ambiente e a consequente redução da disponibilidade de nutrientes reduz a taxa de crescimento de populações menos favorecidas. Na segunda modalidade, produtos do metabolismo inibem o crescimento de espécies suscetíveis. Segundo Barthón e Northup (2011), a segunda modalidade pode ser denominada antagonismo ou amensalismo de acordo com a especificidade do produto responsável pela inibição do crescimento.

Czárán, Hoekstra e Pagie (2002) apresentam estas duas modalidades como sendo as responsáveis pela promoção e manutenção da diversidade microbiana. Os autores dividem a comunidade microbiana em três grupos, os Produtores de substâncias antimicrobianas (P) os Susceptíveis (S) e os Resistentes (R). Os autores fazem uma analogia entre a interação resultante e o jogo pedra-papel-tesoura, definindo as relações como se segue; P apresenta vantagem sobre S, S apresenta vantagem sobre R e R apresenta vantagem sobre P. Tal relação fundamenta-se principalmente no custo energético envolvido na síntese de substâncias antimicrobianas e de compostos responsáveis pela imunidade.

Esta dinâmica dá origem a ciclos, onde os três grupos de micro-organismos coexistem indefinidamente e a prevalência de cada um oscila. Desta forma nenhum dos grupos se sobressai e domina o ambiente, e a diversidade é então mantida (LENSKI; RILEY, 2002). Gillor, Giladi e Riley (2009) destacam, entretanto, que a produção de substâncias antimicrobianas por espécies de micro-organismos pode aumentar a persistência e prevalência destas espécies no trato gastrointestinal.

2.2 BACTÉRIAS LÁCTICAS

Bactérias lácticas compõem um grupo heterogêneo, que compartilha determinadas características fenotípicas. Segundo Von Wright e Axelsson (2011) o grupo é composto principalmente por bacilos ou cocos gram-positivos, aerotolerantes, cujo principal produto de fermentação de hexoses é o ácido láctico. Entretanto, estas características não se aplicam à ordem *Bifidobacteriales*, micro-organismos gram-positivos, pleomórficos, geralmente anaeróbios estritos (TANNOCK, 1999).

As bactérias lácticas não são um grupo monofilético, o critério para seu agrupamento leva em conta características fenotípicas. A maior parte das bactérias lácticas pertence à Ordem *Lactobacillales*, do filo *Firmicutes*, porém as bifidobactérias pertencem à ordem *Bifidobacteriales*, do filo *Actinobacteria* (WOOD; HOLZAPFEL, 1995; MAKAROVA; KOONIN, 2007). Micro-organismos deste grupo são encontrados em diversos ambientes como a superfície de vegetais (CAI et al., 2010; KIM; ROH; BAE, 2010 KAWASAKI et al., 2011; TODOROV et al., 2011), no leite cru (ESPECHE et al., 2012), na cavidade vaginal (ZHOU et al., 2004) e no trato gastrointestinal de humanos (MORITA et al., 2010), peixes (PÉREZ et al., 2011) e aves (VOLOKHOV et al., 2011).

Bactérias lácticas vem sendo utilizadas em alimentos há milhares de anos. Estes alimentos se tornaram parte da tradição de diversas populações. Como são consumidos regularmente e não apresentam registros de patologias associadas à sua ingestão, as espécies presentes nestes alimentos não são consideradas patogênicas, e recebem a denominação G.R.A.S. (Generally Regarded As Safe – Geralmente Considerada Segura). (BIROLLO; REINHEIMER; VINDEROLA, 2000; YOUSIF et al., 2010; YU et al., 2011; JIANG et al., 2012). Nesta denominação, alimentos que contenham estas espécies são considerados seguros com base na lógica da observação, em parte por serem abundantes no ambiente e por estarem presentes em altas concentrações nestes alimentos, que são comumente consumidos sem causar prejuízo para os que os consomem. Todavia, algumas espécies apresentam patogenicidade e sua ingestão pode trazer riscos à saúde.

A possibilidade de transferência de genes de resistência a antibióticos para micro-organismos patogênicos como *Listeria monocytogenes* e micro-organismos oportunistas também é uma característica que pode inviabilizar a presença de certas espécies em alimentos fermentados ou em preparações probióticas (POYART-SALMERON et al., 1990; NOBLE; VIRANI; CREE, 1992; NOBLE et al., 1996).

Entretanto, alguns casos de infecções moderadamente graves causadas por lactobacilos, bifidobactérias e outras espécies de bactérias lácticas foram reportados (STURDEE et al., 1998; SAARELA; MÄTTÖ; MATTILA-SANDHOLM, 2002; MEILE; LE BLAY; THIERRY, 2008). Segundo Aguirre e Collins (1993), ao longo do tempo a importância clínica de espécies de bactérias lácticas foi deixada de lado. Segundo os autores, a presença destes micro-organismos em amostras de alguns casos clínicos era erroneamente desconsiderada. Nestes casos, o isolamento destes micro-organismos era atribuído à contaminação de amostras com micro-organismos do ambiente.

Devido à popularização da utilização de probióticos e, o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias lácticas se tornou alvo de interesse. Isto ocorreu devido à possibilidade de transmissão horizontal de genes de resistência para micro-organismos patogênicos e oportunistas (KARAPETOV et al., 2011). De acordo com Franz et al. (2011), especial atenção deve ser dedicada a cepas de *Enterococcus* utilizados como probióticos e.g. *Enterococcus faecium* SF68. Segundo os autores, a mobilidade de informações genéticas para fatores de virulência e resistência a antibióticos, aliadas à existência de espécies do gênero *Enterococcus* causadores de infecções oportunistas constituem importantes fatores de risco a serem considerados.

Esta discussão se estende a outros grupos de bactérias lácticas, como espécies do gênero *Lactobacillus*, que também apresentam genes de resistência contra diferentes antimicrobianos (BERNADEAU, et al., 2008). Segundo Cannon et al., (2005) mais de 200 casos clínicos de infecção foram atribuídos a espécies de *Lactobacillus*. Segundo Bernadeau, Gugen e Vernoux (2006), a ocorrência de casos clínicos comprovados gera a necessidade de maiores e mais rígidas regulamentações de segurança para o uso de espécies probióticas de *Lactobacillus*.

2.2.1 Metabolismo

As bactérias lácticas são subdivididas em dois grupos, de acordo com os principais produtos do metabolismo de carboidratos em homofermentativas e heterofermentativas. Os carboidratos assimilados por homofermentativas convergem para a via glicolítica Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP), tendo como produto principal e mais abundante o lactato (MOZZI; RAYA; VIGNOLO, 2010).

Contudo, segundo Garriguez et al. (1997), em condições nas quais a relação NADH/NAD⁺ é alta, ou seja, intenso fluxo glicolítico, acontece um aumento da concentração de gliceraldeído 3-fosfato (G3P) além da capacidade catalítica da Lactato Desidrogenase (LDH). O consequente acúmulo G3P, bem como de dihidroxicetona-fosfato (DHP) inibem alostericamente a atividade da Piruvato Formato Liase (PFL), que compete com a LDH. Nesta condição o lactato é virtualmente o único produto de fermentação de carboidratos, sendo denominada homoláctica. Por outro lado, quando o fluxo metabólico é menos intenso, a regulação da PFL é menos intensa uma vez que não há acúmulo significativo de G3P e DHP. Assim, com a PFL e LDH atuando simultaneamente são formados etanol, formato, acetato, lactato e CO₂ pela ação da enzima piruvato desidrogenase. Neste caso emprega-se o nome fermentação ácido-mista.

As bactérias lácticas heterofermentativas degradam hexoses e pentoses não por meio da via EMP, mas por meio da via da D-xilulose 5-fosfato fosfocetolase, enzima específica da via heterofermentativa. Os produtos, assim como na fermentação ácido-mista são etanol, lactato, acetato, formato e CO₂, no entanto a produção de CO₂ também ocorre no momento da conversão de 6-fosfogluconato a ribulose 5-fosfato. O etanol também pode ser produzido, com menor velocidade utilizando NADPH reduzido na etapa inicial da via, que é comum à via das pentoses fosfato (MOZZI; RAYA; VIGNOLO, 2010).

Outros compostos comumente sintetizados por bactérias lácticas são a acetoina, 2,3 butanodiol e diacetil, produzidas na via da acetoina/diacetil, sendo que o α -acetolactato é precursor de todos estes. Contudo, a produção destes metabólitos somente se torna significativa caso haja um acúmulo de piruvato. Isto acontece quando piruvato é fornecido de forma exógena ou quando outro composto que pode ser convertido a piruvato, como o citrato, é fornecido juntamente com carboidratos (AXELSSON, 2004). Outra forma para que se provocar um acúmulo significativo de piruvato, que resultará em um desvio do fluxo metabólico para a produção do intermediário fundamental da via, α -acetolactato, é o emprego da engenharia genética. Conforme reportado por Monnet et al. (2000), é possível conseguir suficiente acúmulo de piruvato para direcionar o fluxo metabólico para esta via utilizando mutantes deficientes em atividade da PDH.

Os metabólitos mencionados são produzidos em menor quantidade quando bactérias lácticas são cultivadas em presença de oxigênio. Segundo Marty et al. (2000), a concentração final de ácido láctico cai de 24 mM/l para 14 mM/l quando *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* é cultivado sob aeração. Segundo os autores a atividade de uma NADH oxidase é responsável pela reoxidação do NADH nestes casos, com o oxigênio como aceptor de elétrons, produzindo peróxido de hidrogênio. Isto aumenta a concentração de H_2O_2 no meio, o que provoca uma entrada prematura na fase estacionária de crescimento, diminuindo consideravelmente a concentração final de biomassa.

2.3 PROBIÓTICOS

Antes da criação do termo "probiótico", Metchnikoff (1909) publicou no livro "The prolongation of life: Optimistic studies" a hipótese de que a composição da microbiota intestinal poderia provocar efeitos prejudiciais sobre a saúde humana.

Sua hipótese era de que a putrefação causada por uma composição inadequada da microbiota, oriunda de um prolongamento desnecessário no trânsito intestinal e da consequente proliferação de micro-organismos nocivos, originaria compostos químicos responsáveis por reduzir a longevidade em animais e humanos.

Observando a longevidade de povos que consumiam leites fermentados e estudando as propriedades do então denominado "*Bacillus bulgariano*", Metchnikoff acreditou na existência de alguma relação entre a fermentação láctica e a diminuição da "putrefação intestinal", com a consequente ampliação da expectativa de vida.

A partir destas observações, concluiu que a partir da modificação de hábitos alimentares era possível modificar a composição desta microbiota, substituindo micro-organismos prejudiciais à saúde por micro-organismos benéficos, consequentemente aumentando a longevidade de seu hospedeiro.

Entre 1908 e 1954, pouca atenção foi direcionada ao conceito de Metchnikoff acerca da modulação da microbiota, sendo este resgatado por Vergin (1954), que utilizou o termo "probióticos" para definir o que seria a antítese dos antibióticos. Após Vergin, Lilly e Stillwell (1965) descreveram probióticos como sendo substâncias promotoras de crescimento secretadas por determinados micro-organismos, que tinham capacidade de estimular o crescimento de outros micro-organismos.

Fuller (1989, p.366) definiu o termo probiótico como "Um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro melhorando o equilíbrio microbiano intestinal". Esta definição seria a primeira a vincular o termo à presença de micro-organismos vivos, desconsiderando os produtos do metabolismo ou componentes celulares de micro-organismos.

Havenaar e Huis in't Veld (1992), definiram probióticos como “uma cultura viável mista ou pura de micro-organismos que, aplicada a animais ou ao homem, produz efeitos benéficos ao melhorar as propriedades da microbiota selvagem”. Schrezenmeir e De Vrese (2001) propuseram uma melhoria de alguns pontos desta definição para maior clareza, sem se distanciar da mesma. Segundo os autores, os seguintes pontos deveriam ser observados:

- a) A necessidade da substituição de “cultura viável mista ou pura de micro-organismos” por "produto contendo micro-organismos", ou "preparação de micro-organismos";
- b) A inclusão da sentença "números suficientes de micro-organismos" para a manifestação dos efeitos benéficos;
- c) A substituição da frase "melhorando as propriedades da microbiota" por "alteração da microbiota";
- d) A definição do termo "microbiota selvagem" como "mistura complexa de populações microbianas que colonizam uma dada área no hospedeiro que não foi influenciada por intervenções médicas, experimentais, ou por enfermidade";
- e) O uso do termo "colonização" para descrever a ação de uma população microbiana que se estabelece em quantidade com o passar do tempo sem a necessidade repetidas doses. Bem como a definição do termo “implantação” para se referir aos casos em que a administração deveria ser periódica.

Observando estes pontos, Schrezenmeir e De Vrese (2001, p.362) definiram probióticos como “uma preparação de ou produto contendo micro-organismos viáveis e definidos em números suficientes, que alteram a microbiota (por implantação ou colonização) em um compartimento do hospedeiro e, por meio disto exerce efeitos benéficos ao mesmo”. As definições de probióticos variam conforme a ênfase e ponto de vista dos autores, estas definições se encontram reproduzidas na Tabela 1.

Tabela 1- Definições de probióticos e respectivas publicações

Probióticos são comuns em alimentos vegetais como as vitaminas, substâncias aromáticas, enzimas e possivelmente outras substâncias associadas a processos vitais	KOLLATH (1953)
Alimentos que podem ser utilizados para restaurar o desequilíbrio causado pelo uso de antibióticos	VERGIN (1954)
Uma substância secretada por um microrganismo, que estimula o crescimento de outro	LILLY; STILLWELL (1965)
Extratos de tecidos que estimulam o crescimento microbiano	SPERTI (1971)
Compostos que estimulam o desenvolvimento de resistência às infecções no hospedeiro, mas não inibem o crescimento de micro-organismos <i>in vitro</i>	FUJI; COOK (1973)
Organismos ou substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal	PARKER (1974)
Um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro melhorando o equilíbrio microbiano intestinal	FULLER (1989)
Suplemento alimentar composto de micro-organismos vivos que afeta benéficamente o animal hospedeiro promovendo o equilíbrio da microbiota	FULLER (1992)
Cultura viável mista ou pura de micro-organismos vivos que, aplicada a animais ou ao homem, produz efeitos benéficos no hospedeiro ao melhorar as propriedades da microbiota normal (selvagem).	HAVENAAR AND HUIS IN'T VELD (1992)
Cultura microbiana viável ou laticínio fermentado que influencia benéficamente a saúde e o estado nutricional do hospedeiro	SALMINEN (1996)
Micro-organismos vivos que, quando ingeridos em certos números exercem benefícios à saúde além dos inerentes benefícios nutricionais	SCHAAFSMA (1996)
Preparações de células microbianas ou componentes de células microbianas que exercem benefícios à saúde ou ao bem-estar do hospedeiro	SALMINEN et al. (1999)
Uma preparação de ou produto contendo micro-organismos viáveis e definidos em números suficientes, que alteram a microbiota (por implantação ou colonização) em um compartimento do hospedeiro e, por meio disto exerce efeitos benéficos no mesmo	SCHREZENMEIR; DE VRESE (2001)
Micro-organismos vivos que quando administrado em quantidades adequadas conferem benefícios ao hospedeiro	FAO/WHO (2002)

Adaptado de VASILJEVIC; SHAH (2008).

Em virtude da necessidade de uma definição mais amplamente aceita e abrangente, em uma publicação da FAO (Food and Agriculture Organization) e a WHO (World Health Organization), probióticos foram definidos como "micro-organismos vivos, que quando administrados na dosagem adequada, conferem benefícios à saúde do hospedeiro" (FAO/WHO, 2002).

A maioria das espécies de micro-organismos probióticos são procariotos, no entanto existem diversas espécies de micro-organismos eucariotos que apresentam propriedades probióticas, estas espécies englobam principalmente leveduras (*Saccharomyces boulardii*, *Pichia anomala*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces ictis*) fungos filamentosos (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Cryptococcus mujuensis*, *Cryptococcus cuniculi*) (NAYAK, 2011).

A maior parte das espécies de bactérias probióticas são bactérias lácticas, pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010), entretanto algumas espécies de *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, *Saccharomyces* e *Escherichia* são consideradas probióticas por apresentarem efeitos benéficos à saúde (SANDERS; HUIS IN'T VELD, 1999; BLANDINO ET AL., 2003; VINDEROLA; REINHEIMER, 2003; TROMM et al., 2004).

Encontram-se representadas na Tabela 2 as espécies de micro-organismos mais comumente empregados em produtos comercializados como probióticos.

Tabela 2 - Micro-organismos comercializados como probióticos

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Outras bactérias lácticas	Outras espécies
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. paracasei</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Fonte: Holzapfel et al. (1998)

Fuller (1989) destacou as características preliminares que uma cepa deve apresentar para que seja considerada probiótica. Para este fim, a cepa em questão deve: a) ser uma cepa capaz de exercer um ou mais efeitos benéficos no animal hospedeiro b) não ser patogênico ou produzir substâncias tóxicas; c) estar presente como células viáveis, em alta concentração; d) ser capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, portanto deve ser resistente ao pH baixo do estômago e a ácidos orgânicos; e) Ser estável e capaz de permanecer viável por longos períodos sob condições de armazenamento e transporte.

Hozapfel e Schilinger (2002) destacaram algumas características adicionais como a resistência a sais biliares, capacidade de persistir no intestino, ter especificidade ao hospedeiro e apresentar resistência a bacteriófagos.

Segundo Del Piano et. al. (2006), a validação de uma espécie de microrganismo como probiótica, e sua consequente introdução no mercado como parte de um produto probiótico deve passar por etapas como o isolamento da cepa, sua total caracterização baseado em referências atuais, avaliação de suas propriedades fisiológicas, segurança e viabilidade de utilização em escala comercial, conforme os procedimentos apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Etapas do isolamento à validação de um microrganismo probiótico

Coleta da amostra
Isolamento do microrganismo
Identificação da espécie
Identificação das cepas
Seleção da cepa desejada
Determinação da capacidade de crescimento
Resistência ao pH estomacal
Resistência aos sais biliares
Resistência às secreções pancreáticas
Avaliação de riscos à saúde
Resistência à liofilização
Estabilidade da cepa liofilizada
Microencapsulação
Estudos <i>in vitro</i>
Investigações em animais
Investigações clínicas em humanos
Fonte: Del Piano (2006)

Segundo Guarner et al. (2005) as espécies presentes no iogurte tradicional, composto por *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subesp. *bulgaricus*, apesar de não atenderem ao critério de resistência ao pH estomacal não podem deixar de ser considerados probióticos.

Esta afirmação se baseia em diversos estudos, como o de Rizkalla et al. (2000), que demonstram que o consumo de iogurte com micro-organismos inviáveis não produz os efeitos benéficos sobre a saúde do consumidor. Portanto, concluem que a preparação na qual elas se encontram (iogurte) pode sim enquadrar-se na definição de produto probiótico.

De acordo com Holzapfel e Schillinger (2002), diversos benefícios à saúde e à nutrição foram sugeridos como sendo atribuídos à atividade de bactérias probióticas, ainda que alguns necessitem maiores investigações, com modelos mais adequados e em condições mais controladas. Segundo Sherman, Ossa e Johnson-Henry (2012) os mecanismos de ação de espécies probióticas podem ser distintos entre cepas, mesmo que o benefício à saúde do hospedeiro seja o mesmo. Diversos efeitos benéficos e propriedades têm sido reportados em micro-organismos probióticos, os mais comumente relatados encontram-se representados na Tabela 4.

Tabela 4 - Propriedades benéficas e efeitos atribuídos a micro-organismos probióticos

Propriedades e efeitos	Referência
Produção de vitaminas, aumento da biodisponibilidade de minerais	(NARVA et al., 2004; POMPEI et al., 2007)
Diminuição da colesterolemia ou trigliceridemia	(RODAS; GILILAND; MAXWELL, 1996 ;LIONG; SHAH, 2005; GUO et al., 2011)
Imunomodulação	(TSAI et al., 2008b; TSAI et al., 2010a; TSAI et al., 2010b)
Aumento da motilidade intestinal/atenuação de quadros de constipação	(GUERRA et al., 2010; RIEZZO et al., 2012)
Aderência ao epitélio intestinal e manutenção da integridade de mucosa	(UCHIDA; KURAKASU, 2004; LAM et al., 2007)
Produção de enzimas digestivas	(HONDA et al., 2007)
Antagonismo a patógenos e modulação da composição da microbiota intestinal por meio da produção de bacteriocinas.	(AVONTS; UYTVEN; DE VUYST, 2004; CURSINO et al., 2006; PINGITORE et al., 2009; TODOROV et al., 2011)
Diminuição do acúmulo de gordura (obesidade) por meio de indução da redução do tamanho dos adipócitos.	(CHOI et al., 2007; TAKEMURA et al., 2009; KADOOKA et al., 2010)
Atenuação de manifestações alérgicas intestinais.	(YOSHIDA et al., 2011)
Aceleração do processo de cicatrização de cortes e queimaduras (Uso tópico).	(PERAL; MARTINEZ; VALDEZ, 2009; NASRABADI et al., 2011; ZAHEDI et al., 2011; HUSEINI et al., 2012;)

Apesar do grande número de produtos probióticos presentes no mercado, a pesquisa por cepas probióticas e funcionalidades continua a ser impulsionada pelo crescente interesse nos benefícios conferidos por estes produtos (DIVYA; VARSHA; NAMPOOTHIRI, 2012).

A indústria de laticínios tem utilizado culturas probióticas extensivamente no desenvolvimento de novos produtos funcionais (VASILJEVIC; SHAH, 2008). Em 2004 estimava-se a existência de 70 produtos probióticos presentes no mercado mundial, com grande potencial de expansão. Contudo, grande parte destes produtos atuam apenas como veículos para cepas probióticas, que são adicionadas em concentração adequada mas não participam das etapas de produção dos alimentos (SHAH, 2004).

2.3.1 Substâncias antimicrobianas sintetizadas por bactérias lácticas probióticas

Segundo O'brien e Wright (2011), o principal motivo pelo qual micro-organismos produzem compostos antimicrobianos é a vantagem adaptativa que os mesmos oferecem em ambientes onde há alta competição ou poucos nutrientes. Nestes casos, o amensalismo constitui importante meio pelo qual uma espécie ganha vantagem sobre outras que competem no ambiente (MARÓTI et al., 2011).

Alimentos fermentados por bactérias lácticas são consumidos há milhares de anos por populações humanas distintas. Sua função primordial era prolongar a vida útil destes alimentos e preservar suas características nutricionais (WOOD, 1998). A fermentação do meio reduz a disponibilidade de carboidratos e resulta na formação de metabólitos que apresentam atividade antimicrobiana, sendo os principais os ácidos láctico, acético e propiônico (BLOM; MØRTVEDT, 1991). Além destes metabólitos primários inibitórios, muitos outros componentes inibitórios podem ser produzidos por diferentes bactérias lácticas (OUEHAND; VESTERLUND, 2004).

A produção de ácidos orgânicos, em especial o ácido láctico, tem sido reportada como a principal responsável pela atividade antimicrobiana de bactérias probióticas contra micro-organismos patogênicos (OGAWA et al., 2001; TSAI et al., 2005; TSAI et al., 2008a; ZHANG et al., 2011). No entanto, outras substâncias como diacetil, reuterina e bacteriocinas são frequentemente associadas à atividade antimicrobiana de probióticos (LANCIOTTI et al., 2003; MARTÍN et al., 2005; XIE et al., 2011; JIANG et al., 2012).

2.3.1.1 Ácidos orgânicos

Os principais produtos de fermentação das bactérias lácticas são ácidos orgânicos, em especial o ácido láctico. A proporção e concentração dos ácidos e outros metabólitos produzidos dependem de suas características genéticas (NEVES et al., 2000; KIM et al., 2010; ZOTTA et al., 2012), condições de meio (KRISHNAN et al., 2001; TANAKA et al., 2002; LEVERING et al., 2012), relação entre NADH/NAD⁺. (GARRIGUES et al., 1997).

Os ácidos orgânicos inibem a atividade microbiana ao diminuir o pH do meio. Nestas condições, os ácidos orgânicos em sua forma não dissociada penetram no citoplasma, onde então se dissociam e diminuem o pH intracelular, interferindo negativamente nos processos metabólicos celulares (YOUNG; FOEGEDING, 1993; OSTLING; LINDGREN, 1993; ESGALHADO; ROSEIRO; COLLACO, 1996).

O ácido láctico apresenta a propriedade de aumentar a permeabilidade da membrana externa de bactérias gram-negativas, além da intrínseca queda de pH ocasionada por sua presença no meio. Portanto, pode potencializar a ação de outras substâncias antimicrobianas como bacteriocinas ao comprometer a integridade da membrana, (ALAKOMI et al., 2000).

Entretanto, a resistência de algumas espécies de micro-organismos aos ácidos orgânicos pode ser maior após o crescimento em meios de cultura levemente ácidos. Isto pode acontecer em decorrência da gradual adaptação a esta condição do meio (BARKER; PARK, 2001; TETTEH; BEUCHAT, 2001).

De acordo com Wang et al. (2001), em ambientes com alta diversidade de micro-organismos como resíduos orgânicos domiciliares, os produtos do metabolismo de bactérias lácticas naturalmente presentes nos alimentos tem capacidade de inibir o crescimento de diversas espécies de micro-organismos, incluindo patógenos. Os autores constataam a queda de pH devido à produção de ácido láctico é o principal fator responsável pela eliminação de agentes que causam a putrefação alimentar.

2.3.1.2 Peróxido de hidrogênio

Diversas espécies de bactérias lácticas apresentam a capacidade de produzir peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na presença de oxigênio. Estas espécies não são capazes de sintetizar hemoproteínas, portanto, não apresentam capacidade de sintetizar catalase.

Apesar de apresentarem outras enzimas que degradam peróxido de hidrogênio, sua atividade não é suficiente para degradar todo o H_2O_2 produzido, causando seu acúmulo no meio (CONDON, 1987; RYAN; KLEINBERG, 1995). Apesar de apresentar atividade antimicrobiana contra diversas espécies patogênicas, a degradação de H_2O_2 por enzimas presentes em mucosas como as paredes intestinais pode não favorecer o acúmulo em concentrações significativas nestes ambientes (FONTAINE, CLAYDON; TAYLOR-ROBINSON, 1996). Além disso, como mencionado previamente, a produção de peróxido de hidrogênio acontece na presença de oxigênio como aceptor de elétrons por ação de uma NADH oxidase. Portanto, em ambientes anaeróbios sua formação é virtualmente nenhuma (MARTY et al., 2000)

A toxicidade do peróxido de hidrogênio é atribuída à sua capacidade de oxidar componentes celulares como DNA, lipídeos de membrana e proteínas. Aparentemente o mecanismo de ação mais importante envolve a formação de radicais $OH^\cdot$ a partir do H_2O_2 (IMLAY; CHIN; LINN, 1988).

Segundo Dave e Shah (1997), em alimentos probióticos, a produção de peróxido de hidrogênio pode ser responsável pelo caráter autolimitante do crescimento microbiano. Em decorrência do crescimento microbiano, o acúmulo de H_2O_2 provoca um decréscimo na viabilidade de espécies probióticas no decorrer do tempo. Segundo os autores, esta característica deixa de ser uma vantagem e se torna um obstáculo técnico para a manutenção da viabilidade celular de espécies probióticas em certos alimentos.

No trato respiratório, a atividade antimicrobiana do peróxido de hidrogênio parece ser importante fator na colonização por *Streptococcus pneumoniae*, que inibe o crescimento de outras por meio da produção de H_2O_2 o que elimina parte da competição por sítios de ligação e nutrientes. (PERICONE et al., 2000).

A ação das substâncias produzidas por espécies de *Lactobacillus* que apresentam atividade contra *Staphylococcus aureus* parece ser em decorrência principalmente da produção de peróxido de hidrogênio, uma vez que a adição de catalase em testes de inibição praticamente elimina o efeito inibitório (OTERO; NADER-MACÍAS, 2006).

Contudo, estudos da inibição de patógenos por peróxido de hidrogênio usualmente são conduzidos em condições de cultivo na presença de oxigênio, o que não ocorre no principal ambiente de utilização de probióticos, o intestino. Portanto, a ocorrência e a importância da produção de peróxido de hidrogênio no antagonismo a patógenos *in vivo*, considerando ambientes pobres em oxigênio como o intestino e a cavidade vaginal, ainda

necessitam avaliação (OCAÑA; HOLGADO; NADER-MACÍAS, 1999; OTERO; NADER-MACÍAS, 2006).

2.3.1.3 Diacetil

Segundo Ramos et al., (1995) o diacetil (2,3 Butanodiona) pode ser originado pela descarboxilação espontânea do α -acetolactato na presença de oxigênio, sendo um dos vários compostos formados no metabolismo de carboidratos e citrato. O α -acetolactato pode ser descarboxilado lenta e espontaneamente na presença de oxigênio formando diacetil, ou convertido enzimaticamente a acetoína, que por sua vez é convertida a 2,3 Butanodiol.

Segundo García-Quintáns et al. (2008), a produção de diacetil pode ser desencadeada em resposta à acidificação causada por produtos de fermentação. Como este se forma espontaneamente na presença de oxigênio, sua produção não pode ser estimulada diretamente ao nível transcricional nos casos em que sua formação é espontânea. No entanto, a produção de compostos como o 2,3 Butanodiol pode ser estimulada diretamente ao nível transcricional usando a redução do pH como estímulo. Isto ocasiona maior formação de α -acetolactato, e consequentemente maior formação de diacetil quando na presença de oxigênio. Em alguns casos, como reportado por Jordan et al. (1996), elementos presentes no sobrenadante de algumas espécies podem aumentar de 4 a 6 vezes a produção de diacetil, mesmo em baixas concentrações de oxigênio. Os autores afirmam que em virtude deste fato, a formação de diacetil pode ser enzimática em algumas espécies. A presença do diacetil pode ser indesejável em alguns casos, dependendo do alimento em questão. Em vinhos sua presença é aceitável em diferentes concentrações, de acordo com o tipo de vinho (MARTINEAU; ACREE; HENICK-KLING, 1995). Segundo de Revel et al. (1999) em vinhos o diacetil é originado principalmente pelo consumo de ácido cítrico presente no mosto.

A atividade antimicrobiana do diacetil é mais comum em micro-organismos gram-negativos, nos quais a concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$ é suficiente para provocar a inibição do crescimento de espécies suscetíveis. Sua ação é bacteriostática, e, apesar de não estar totalmente esclarecido, foi proposto que seu mecanismo de ação está relacionado ao bloqueio da utilização de arginina (JAY, 1982; LANCIOTTI 2003). No entanto, segundo Archer et al., (1996) a concentração necessária de diacetil varia de muito de acordo com a

espécie e tamanho do inóculo. Os autores observaram em seu estudo que uma concentração de 86 µg/ml era suficiente para diminuir a velocidade específica de crescimento de *salmonella thyphimurium* em até 64%.

A atividade do diacetil sobre *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* também foi documentada por Lanciotti et al. (2003). Estes micro-organismos apresentam maior resistência ao diacetil do que bactérias Gram-negativas, e requerem concentrações maiores que 300 µg/ml. Neste mesmo estudo foi constatado que a adição de 300 µg/ml de diacetil aumentou a duração da fase Lag em 4.23, 2.48 e 1.52 vezes em *E.coli*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*, respectivamente.

Segundo Birkenhauer e Oliver (2003), o diacetil também apresenta aplicações na redução da concentração de *Vibrio vulnificus* em ostras cruas. Esta espécie causa infecções graves e invasivas em humanos quando ingeridas por meio do consumo de ostras cruas da espécie *Crassostrea virginica*.

No entanto, alimentos com odores amanteigados apresentam concentração de diacetil que varia de 2 a 6,5 µg/g (NURSTEN, 1997; MALLIA; ESCHER; SCHLICHTERLE-CERNY, 2008; LANCIOTTI 2003). Considerando este fato, Lanciotti et al. (2003) comentam que a aplicabilidade do diacetil como conservante pode estar limitada a alimentos que apresentem perfis sensoriais compatíveis com sua presença.

2.3.1.4 Bacteriocinas

Considera-se o primeiro relato da atividade antimicrobiana de bacteriocinas a publicação de Gratia (1925) envolvendo antagonismo bacteriano mediado por uma substância termolábil produzida por *Escherichia coli*, capaz de inibir somente outras cepas de *Escherichia coli*. Posteriormente, Gratia e Fredericq (1946) criaram o termo “colicina” para classificar a substância responsável pelo antagonismo observado, descrevendo também sua natureza proteica.

O estreito espectro de ação apresentado por estas substâncias deve-se à natureza dos receptores utilizados por estas substâncias para exercer sua ação. Estes são em sua maioria proteínas localizadas na membrana externa de bactérias gram-negativas. Estas proteínas-alvo normalmente são as responsáveis pelo transporte de sideróforos, vitaminas e outros componentes para o espaço periplásmico (CAO; KLEBBA, 2002; KURISU et al., 2003; CHENG et al., 2006).

Contudo, substâncias com características similares haviam sido identificadas em outras espécies (ROGERS, 1928), portanto, havia a necessidade de uma classificar adequadamente estas novas substâncias antimicrobianas. Posteriormente, Jacob et al. (1953) atribuíram a estas substâncias o nome bacteriocina.

A principal aplicação de bacteriocinas é a conservação de alimentos. Segundo Zacharof e Lovvit (2012) as bacteriocinas de bactérias lácticas são as que ganharam maior destaque neste contexto. Isto acontece por seu espectro de ação abranger boa parte dos micro-organismos que deterioram alimentos e causam intoxicações alimentares. Os autores destacam que a adição de bacteriocinas não certifica completamente a segurança dos alimentos, especialmente no caso de bactérias gram-negativas. Neste caso estratégias especiais podem ser utilizadas para que estas se tornem susceptíveis à ação antimicrobiana das bacteriocinas.

Segundo Klaenhammer (1988), bacteriocinas podem ser definidas como peptídeos bacterianos dotados de atividade antibacteriana de espectro variável. Mills et al., (2011) destacam que sua síntese é ribossomal e suas características estruturais e físico-químicas são diversificadas. Inicialmente, Klaenhammer (1993) sugeriu a classificação de diferentes tipos de bacteriocinas em três classes principais conforme apresentado na Tabela 5:

Tabela 5 - Classificação de bacteriocinas proposta por Klaenhammer (1993)

Classe I (Lantibióticos)

Pequenos peptídeos modificados após sua tradução (>5kDa) que atuam sobre as membranas contendo os aminoácidos lantionina e β -metil lantionina. (Nisina e Lactacina S).

Classe II

Peptídeos pequenos (>10kDa) que não contenham lantionina nem β -metil lantionina, termoestáveis, sintetizados inicialmente como pré-peptídeos contendo uma sequência de dois resíduos de glicina como sua porção C-terminal (Curvacina A, Lactacina F, Leucocina A).

Classe III

Grandes peptídeos (>30kDa) termolábeis. (Lactacina A e B, Colicinas)

Classe IV

Bacteriocinas complexas, compostas de uma porção peptídica associada a um lipídeo ou a um carboidrato (Pediocina SJ-1, Plantaricina S).

Segundo Cleveland et al. (2001) a criação da classe IV foi um equívoco, pois até então nenhuma bacteriocina desta classe havia sido isolada e purificada com sucesso. A formação dos complexos mencionados deve-se ao fato das bacteriocinas serem peptídeos catiônicos hidrofóbicos, o que favorece a sua associação com macromoléculas presentes nas soluções quando não são devidamente purificadas.

Cotter, Hill e Ross (2005) propuseram uma nova classificação para bacteriocinas (Tabela 5), reduzindo o número de classes a dois, excluindo as moléculas integrantes da classe III e IV. Neste trabalho também foi proposto o estreitamento do termo bacteriocina para englobar apenas “substâncias peptídicas termoestáveis”.

Tabela 6 - Classificação de bacteriocinas proposta por Cotter, Hill e Ross (2005)

Classificação	Observações/sugestões	Exemplos
Classe I – Bacteriocinas contendo o aminoácido lantionina	Incluem bacteriocinas compostas por um ou mais peptídeos contendo lantionina.	Monopeptídicas: Nisina, mersacidina e lacticina 481, Dipeptídicas: Lacticina 3147, citolisina
Classe II – Bacteriocinas que não contém o aminoácido lantionina	Classe heterogênea de pequenos peptídeos; inclui bacteriocinas semelhantes à pediocina (subclasse a); dipeptídeos (subclasse b); peptídeos cíclicos (subclasse c – extinta classe V proposta em 2003 por Kemperman et al.); mono-peptídeos lineares diferentes da pediocina (subclasse d)	Classe IIa: Pediocina PA1, leucocina A; classe IIb: lactacina F; classe IIc: enterocina AS48, reuterina 6; classe IId: lactococcina A, diergicina A
Bacteriolisinas – Proteínas líticas.	Grandes peptídeos termo-lábeis.	Lisostafina, enterolisina A

Heng e Tagg (2006) consideraram problemática a redefinição proposta por Cotter Hill e Ross (2005), pois a maioria das colicinas termolábeis deixaria de se enquadrar na definição de bacteriocinas. Segundo os autores este fato deixaria de conferir a devida significância histórica das colicinas como os primeiros exemplares de bacteriocinas.

Partindo da classificação proposta por Klaenhammer (1993) e incorporando pontos da classificação proposta por Cotter, Hill e Ross (2005), Heng e Tagg propuseram uma nova classificação que consiste na subdivisão dos lantibióticos (Classe I) em subclasses; na

reorganização da Classe II; os grandes peptídeos (>30kDa) termolábeis continuariam sendo considerados bacteriocinas; e os peptídeos cíclicos (Classe IIb proposta em 2005) seriam alocados em uma classe distinta (Classe IV), conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 - Classificação de bacteriocinas proposta por Heng e Tagg (2006)

Classe I – Lantibióticos
Ia - Lineares
Ib - Globulares
Ic – Multicomponentes
Classe II – Peptídeos sem modificações pós traducionais (sem lantionina)
IIa – Semelhantes à pediocina
IIb - Diversificados
IIc - Multicomponentes
Classe III – Grandes proteínas (incluindo termo-lábeis)
IIIa - Bacteriolíticas
IIIb – Não líticas
Classe IV – Peptídeos cíclicos

As aplicações biotecnológicas das bacteriocinas variam. Algumas delas são indiretas como a utilização dos mecanismos de transporte das colicinas para o meio extracelular para aumentar a recuperação de proteínas heterólogas produzidas por *Escherichia coli* (VAN DER WAL; LUIRINK; OUDEGA, 1995; SOMMER; FRIEHS; FLASCHEL, 2010; ZAKARIA; RAHMAN; BASRI, 2011) .

Segundo Field et al. (2010), o potencial das bacteriocinas na bioconservação de alimentos pode ser exemplificada pela utilização da nisina, que apresenta longo histórico de aplicação em alimentos em virtude de seu amplo espectro de ação. Os autores também destacam que esta bacteriocina pode apresentar aplicações contra infecções bacterianas multirresistentes, apesar de limitações inerentes à sua natureza peptídica. Estas aplicações tem atraído atenção para a tentativas de identificação de mecanismos de ação responsáveis pela resistência à nisina (SUN et al., 2009; COLLINS et al, 2012), bem como para a transferência de genes de resistência em algumas espécies (HOANG et al., 2011). Cepas que produzem bacteriocinas também são avaliadas quanto à sua capacidade de modular a microbiota intestinal por meio da produção destas substâncias antimicrobianas (O'SHEA et al., 2009).

Segundo Timmerman et al. (2004), a produção de substâncias antimicrobianas tem implicações em preparações compostas por múltiplas cepas ou múltiplas espécies. Estas devem ser avaliadas com o objetivo de se estabelecer uma combinação de cepas ou espécies, que apresentem melhores resultados em sinergismo do que individualmente. Os autores direcionam especial atenção para se evitar a associação de cepas ou espécies probióticas que apresentem atividades inibitórias mútuas devido à produção de substâncias antimicrobianas.

Walsh et al. (2008) demonstraram que em uma preparação composta por cinco espécies de bactérias probióticas, uma cepa bacteriocinogênica de *Lactobacillus salivarius* se adaptou melhor em relação às demais cepas em experimentos com suínos, atribuindo esta predominância à vantagem adaptativa conferida pela capacidade de produzir bacteriocinas.

A atividade antimicrobiana pode ser mediada por substâncias peptídicas que não são bacteriocinas, como antibióticos (HÖLTZEL et al., 2000; SCHAEFER et al., 2010), enzimas antibacterianas (LEE; LEE, 2011; ZHANG et al., 2012a), bacteriófagos (PROENÇA et al., 2012). Segundo Settani e Corsetti (2008), apenas o sequenciamento dos aminoácidos que compõem o peptídeo pode fornecer informações suficientes para constatar que se trata de uma bacteriocina. Substâncias antimicrobianas peptídicas parcialmente caracterizadas são denominadas BLIS (Bacteriocin-Like Inhibitory Substance) até que seja realizada sua caracterização molecular.

2.3.2 Probióticos e produtos de origem animal

Segundo Milleman (2009), a ocorrência de diarreia causada por patógenos gram-negativos nas seis primeiras semanas de vida é uma das principais causas de mortalidade e morbidez em bezerros. O tratamento destas infecções é dispendioso e demanda tempo para que seja concluído. Muitas vezes, após o tratamento os animais manifestam quadros de má absorção de nutrientes, o que reduz sua taxa de crescimento e aumenta os prejuízos.

De acordo com Barrington et al. (2002) a diarreia neonatal em bezerros é uma condição complexa e multifatorial. Neste contexto, a exposição aos patógenos, condições ambientais, manejo, estado nutricional e imunológico são fatores que interagem entre si no desenvolvimento desta condição. Estes patógenos são transmitidos por via ora-fecal e são

mais facilmente transmitidos quando em regime de confinamento, devido à proximidade entre os animais e à constante exposição ao material fecal.

Segundo Seiffert et al. (2013), além destas implicações, que valem para os demais animais de produção, existe a crescente preocupação com relação à transmissão destes patógenos mediante o consumo de produtos de origem animal. Estes animais podem desempenhar o papel de reservatórios de cepas resistentes aos antibióticos de amplo espectro, comumente utilizados na prática clínica. Segundo os autores *Salmonella* spp., *Escherichia coli* são importantes agentes de transmissão de genes de resistência que podem ser disseminados por meio de produtos animais. Segundo Schwarz et al. (2001), a utilização de antibióticos em animais é a principal causa da seleção de cepas resistentes, e sua disseminação para humanos uma das importantes causas da ineficácia dos antibióticos mais utilizados.

A utilização de probióticos é considerada uma alternativa ao uso de antibióticos como promotores de crescimento em animais de produção, e é empregada visando minimizar ou eliminar as perdas em decorrência da ação de patógenos. Segundo Le Bon (2011), a suplementação alimentar a base de probióticos produz resultados positivos em porcos no período de desmame. Neste estudo, foi observado aumento significativo da taxa de conversão alimentar e uma diminuição expressiva na concentração de *Escherichia coli* recuperada nas fezes. Taras et al. (2007) observaram significativa diminuição nos casos de diarreia pós-desmame em porcos, o que consequentemente pode diminuir os custos com tratamento e a diminuição da conversão alimentar.

Tsai et al (2005) observaram significativa redução da invasão de células intestinais por *Salmonella typhimurium* por meio da ação de duas cepas de *Lactobacillus*. Neste estudo também observaram a inibição significativa do crescimento de *Salmonella typhimurium*, o que foi atribuído à produção de ácidos orgânicos.

Chen et al. (2007) estudaram o potencial de *Lactobacillus crispatum* como agente profilático contra infecções por *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* O157:H7. Obsearam maior efeito inibitório com *Lactobacillus crispatum* do que com *Lactobacillus plantarum* ATCC 4356, o que foi atribuído à maior produção de ácidos orgânicos por *Lactobacillus crispatum*. Neste mesmo estudo, observaram que a habilidade de adesão às células intestinais também é um aspecto importante para que este efeito aconteça.

Tejero-Sariñena et al. (2012) estudaram quinze espécies potencialmente probióticas de bactérias lácticas com relação a sua capacidade de inibir diferentes patógenos, incluindo *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*. Os autores constataram que o principal fator

que contribuiu para a inibição dos patógenos foi a produção de ácidos orgânicos (acético e láctico). A vantagem deste mecanismo de inibição é sua influência virtualmente nula no desenvolvimento e seleção de cepas resistentes a antibióticos.

Além da abordagem direta junto aos animais, a segurança dos alimentos de origem animal pode ser melhorada por meio da utilização de micro-organismos probióticos. Segundo Aymerich et al. (2008), a utilização de bactérias lácticas como agentes de biopreservação em carnes é uma boa alternativa à utilização de aditivos químicos. Esta é utilizada como método de biopreservação dos produtos por meio da inoculação dos mesmos com espécies produtoras de substâncias antimicrobianas (ácidos orgânicos, bacteriocinas, CO₂, diacetil). Segundo os autores, estas técnicas podem ser utilizadas até em produtos não fermentados, desde que não alterem as características sensoriais dos mesmos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Probióticos da Escola de Engenharia de Lorena - EEL - Universidade de São Paulo - USP e no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Geraldo Di Biase - UGB - Volta Redonda, RJ.

3.1 MICRO-ORGANISMOS

No presente trabalho foram avaliadas 4 cepas de *Lactobacillus*, a saber: *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. casei* ATCC 7469, *L. fermentum* ATCC 9338 e *L. plantarum* ATCC 8014, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Probióticos da Escola de Engenharia de Lorena – USP.

Estas cepas foram ativadas por meio de repicagens sucessivas a 37 °C/18 horas em caldo MRS (de MAN, ROGOSA E SHARPE 1960), constituído de 10g/L peptona de caseína, 10 g/L de extrato de carne, 5 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de glicose, 5 g/L de citrato de sódio, 2 g/L de fosfato dipotássico, 2 g/L de citrato de amônio, 0,2 g/L de sulfato de magnésio, 0,05 g/L de sulfato de manganês. Uma vez ativadas, foram conservadas a -20 °C em caldo MRS adicionado de glicerol (20%) como crioprotetor (VALDEZ, 2001).

Como cepas patogênicas indicadoras foram avaliadas as cepas *Escherichia coli* Enteropatogênica 0112, *E. coli* Enteropatogênica 0124, *E. coli* Enteropatogênica 0127, *Shigella sonnei* ATCC 25931, *Shigella dysenteriae* ATCC 13313 e *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, provenientes do Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário Geraldo Di Biase – Volta Redonda – RJ. Estas cepas foram ativadas em caldo BHI, constituído de 5 g/L de infusão de cérebro bovino, 12,5 g/L de infusão de cérebro de bezerro, 2,5 g/L de fosfato dipotássico, 10 g/L de peptona, 2 g/L de glicose e 5 g/L de cloreto de sódio, incubadas a 37 °C/18 horas e mantidas sob refrigeração a 5 °C em tubos contendo ágar, constituído de 23 g/L de ágar bacteriológico (Biosystems), 5 g/L de cloreto de sódio e 2 g/L de fosfato de sódio dibásico, esterilizado a 121 °C por 20 minutos.

Suspensões contendo as cepas indicadoras foram preparadas a partir das células armazenadas em ágar que foram devidamente ativadas por meio de 3 repicagens sucessivas a 37 °C por 24 horas. Em seguida foram preparadas diluições seriadas decimais em tubos contendo 4,5 ml de caldo BHI para se atingir a concentração de 10⁸ UFC/ml.

A estimativa da concentração em UFC/ml foi realizada por meio de curva de calibração em leitora de microplacas a 630 nm (DO x UFC/ml). Desta forma, determinou-se um fator de diluição da suspensão das células crescidas em caldo BHI, para se atingir a população de 10^8 UFC/ml. Periodicamente a população de células (UFC/mL) foi confirmada por meio de contagem em placas pela técnica de pour plate em caldo BHI. Em paralelo aos ensaios para avaliação dos sobrenadantes tratados procedeu-se a confirmação da população das cepas indicadoras por meio de contagem em placas, conforme descrito anteriormente. Os resultados estimados por meio da densidade óptica e referentes a contagem em placas foram analisados estatisticamente por meio de ANOVA e teste de Tukey com 95% de confiança.

3.2 OBTENÇÃO DO SOBRENADANTE

O sobrenadante livre de células foi obtido por centrifugação a 7000x g por 15 minutos a 4° C, a partir de alíquotas de 7 mL de uma suspensão de células das respectivas cepas de *Lactobacillus* cultivadas em caldo MRS por 48 horas a 37 °C em estufa bacteriológica. O sobrenadante foi esterilizado por meio de filtração em membrana Millex® de 0,22 µm (JBR610209).

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 Avaliação da atividade antimicrobiana

A determinação da atividade antimicrobiana apresentada pelas respectivas cepas de *Lactobacillus* foi realizada segundo o método MODA (Microscale Optical Density Array), descrito por Lash et al. (2002). Este método consiste em se verificar o crescimento das cepas indicadoras no período de 24 horas a 37°C, na presença dos respectivos sobrenadantes na forma original e submetidos a diferentes tratamentos, em microplacas para cultura de células contendo 96 poços. Em seguida, o crescimento é avaliado por meio de leitura da absorbância com auxílio de uma leitora de microplacas Tp-Reader (Thermo

Plate). Os sobrenadantes de cada cepa de *Lactobacillus*, originais e submetidos a diferentes tratamentos, foram testados individualmente com cada cepa patogênica indicadora.

Primeiramente, em 24 poços (6 cepas patogênicas x 4 cepas de *Lactobacillus*) 30 µl do sobrenadante original das respectivas cepas de *Lactobacillus* foram adicionados a 100 µl de caldo BHI com 10^8 UFC/ml das respectivas cepas patogênicas indicadoras. Adicionalmente, como controles, foram realizados dois ensaios com objetivo de se verificar o efeito de inibição do sobrenadante sobre as cepas indicadoras. No primeiro ensaio avaliou-se apenas o crescimento das cepas indicadoras em caldo BHI e no segundo verificou-se o efeito do caldo MRS (pH 7.0) sobre as cepas indicadoras. Para tanto, em 6 poços, correspondentes às 6 cepas patogênicas, foram adicionados 30 µl de caldo MRS a pH 7.0 e 100 µl da suspensão de células das respectivas cepas indicadoras contendo 10^8 UFC/ml (controle MRS), e no segundo (controle negativo), de forma semelhante, em outros 6 poços foram adicionados apenas 100 µl da suspensão de células das respectivas cepas indicadoras.

Após estes procedimentos as microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas em estufa bacteriológica, e em seguida, as absorbâncias foram mensuradas a 630 nm com auxílio de leitora automática de microplacas, utilizando 100 µl de BHI esterilizado como branco. Estes experimentos foram realizados em 3 repetições.

Para se verificar a existência de inibição, os valores de absorbância obtidos foram analisados estatisticamente por meio de ANOVA e teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%. Desta forma, constatou-se o efeito de inibição quando os respectivos sobrenadantes apresentaram leituras de absorbância significativamente menores que ambos os ensaios controle. Posteriormente, os sobrenadantes que apresentaram efeito de inibição significativo foram submetidos a diferentes tratamentos visando determinar a causa dos respectivos efeitos de inibição, conforme detalhado a seguir.

3.3.2 Efeito do pH sobre a atividade antimicrobiana

Os sobrenadantes que apresentaram atividade antimicrobiana verificada na etapa anterior foram submetidos à nova avaliação, nas mesmas condições, para se verificar a influência do pH no efeito de inibição dos sobrenadantes sobre as cepas indicadoras.

Para tanto, avaliou-se 2 tratamentos distintos, tendo como parâmetros controle o crescimento das cepas indicadoras em caldo BHI, na presença do sobrenadante original e na presença de MRS a pH 7.0, verificados na etapa anterior. No primeiro tratamento, o sobrenadante das respectivas cepas de *Lactobacillus* foi neutralizado por meio de adição de solução de NaOH a 0,1M. No segundo tratamento 100 ml de caldo MRS foram acidificados por meio da adição de ácido acético glacial em 4 frascos Erlenmeyer, de modo a tornar o pH do caldo MRS equivalente ao dos respectivos sobrenadantes, a saber: *Lactobacillus acidophilus* (pH 4.2); *Lactobacillus casei* (pH 4.3); *Lactobacillus fermentum* (pH 4.1); *Lactobacillus plantarum* (pH 4.4). Os sobrenadantes e o caldo MRS com pH ajustado foram então esterilizados em membranas Millex® de 0,22 µm (JBR610209) e mantidos a -20 °C em criotubos na quantidade de 1,5 ml.

Na sequência, nos poços (6 cepas patogênicas x n° de cepas de *Lactobacillus* selecionadas na etapa anterior) das microplacas contendo 100 µL das suspensões de células das cepas indicadoras com 10⁸ UFC/ml em caldo BHI, foram adicionados 30 µL dos referidos sobrenadantes neutralizados ou caldo MRS com pH ajustado e incubadas a 37 °C/24 h. Em seguida, procedeu-se a leitura das absorbâncias a 630 nm em leitora de microplacas (Tp-Reader - Thermoplate®) utilizando caldo BHI esterilizado como branco. Estes experimentos foram realizados em 3 repetições.

3.3.3 Efeito do H₂O₂ sobre a atividade antimicrobiana

Para avaliar a influência do peróxido de hidrogênio sobre o efeito de inibição dos sobrenadantes sobre as cepas indicadoras, os respectivos sobrenadantes foram tratados com catalase e então submetidos à nova avaliação. Para tanto, adicionou-se 10 mg de Catalase de fígado bovino (Sigma) a tubos contendo 10 ml dos respectivos sobrenadantes (1 mg/ml), sendo em seguida homogeneizados por inversão e incubados em banho-maria por 1,5h/37 °C, esterilizadas por meio de filtração em membrana Millex® de 0,22 µm (JBR610209), separados em alíquotas de 1,5 ml e armazenados em criotubos a -20 °C para posterior utilização.

Na sequência estas soluções foram descongeladas à temperatura ambiente e submetidas a uma nova avaliação, adicionando-se nos poços, (6 cepas patogênicas x n° de cepas de *Lactobacillus*) das microplacas 30 µL do sobrenadante tratado e 100 µL das suspensões de células das cepas indicadoras em caldo BHI com 10⁸ UFC/ml sendo então

incubadas por 24 h/37 °C. Em seguida procedeu-se à leitura das absorvâncias a 630 nm em leitora de microplacas (Tp-Reader - Thermoplate®) utilizando caldo BHI esterilizado como branco. Estes experimentos foram realizados em 3 repetições.

3.3.4 Efeito de substâncias proteicas sobre a atividade antimicrobiana

O efeito inibitório de substâncias antimicrobianas de natureza proteica presentes nos sobrenadantes foi avaliado por meio do tratamento dos mesmos com as enzimas proteolíticas Pronase (Sigma), Tripsina (Sigma) α -Quimotripsina (Sigma), individualmente. Para tanto, aos tubos contendo 10 ml de sobrenadante adicionou-se 10 mg das respectivas enzimas (1mg/ml) seguido de incubação, em banho-maria, a 37 °C por 1,5 horas, esterilizadas por meio de filtração em membrana Millex® de 0,22 μ m (JBR610209), separados em alíquotas de 1,5 ml e então armazenados em criotubos a -20 °C para posterior utilização.

Em seguida, os sobrenadantes devidamente tratados foram descongelados à temperatura ambiente e submetidos a uma nova avaliação, adicionando-se nos poços (6 cepas patogênicas x n° de cepas de *Lactobacillu* das microplacas contendo 100 μ l das suspensões de células das cepas indicadoras em caldo BHI com 10⁸ UFC/ml, adicionou-se 30 μ l dos respectivos sobrenadantes, sendo incubadas por 24 h/37 °C, após o que procedeu-se a leitura da absorvância a 630 nm em leitora de microplacas (Tp-Reader - Thermoplate®) utilizando caldo BHI esterilizado como branco. Estes experimentos foram realizados em 3 repetições.

3.3.5 Efeito de substâncias termo-lábeis sobre a atividade antimicrobiana

Para avaliar o efeito de substâncias antimicrobianas sensíveis a altas temperaturas presentes nos sobrenadantes, 2 procedimentos foram realizados em triplicata, que consistiram no tratamento de 1,5 ml dos sobrenadantes originais em criotubos a 100 °C/15 minutos e 121 °C/15 minutos. Em seguida, nos poços (6 cepas patogênicas x n° de cepas de *Lactobacillus*) das microplacas contendo 100 μ l das suspensões de células das cepas indicadoras em caldo BHI com 10⁸ UFC/ml, adicionou-se 30 μ l dos respectivos sobrenadantes sendo então incubadas por 24 h/37 °C. Na sequência, procedeu-se a leitura

das absorvâncias a 630 nm em leitora de microplacas (Tp-Reader - Thermoplate®) utilizando caldo BHI esterilizado como branco. Estes experimentos foram realizados em 3 repetições.

3.3.6 Caracterização das substâncias antimicrobianas

Para se determinar o agente causador do efeito de inibição, as leituras de absorvância obtidas nos tratamentos descritos anteriormente, foram analisadas estatisticamente por meio de ANOVA e teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%. Como referência utilizou-se as leituras de absorvância relativas a avaliação do efeito de inibição dos sobrenadantes originais obtidas no item 3.3.1. Desta forma, em cada tratamento, foi possível verificar a permanência ou a redução do efeito inibitório dos sobrenadantes após o tratamento.

Como resposta, quando as leituras se mostraram estatisticamente semelhantes às observadas com o sobrenadante original considerou-se que o efeito de inibição do sobrenadante persistiu após o tratamento. Por outro lado, considerou-se que o efeito de inibição dos sobrenadantes foi reduzido pelos tratamentos aplicados aos mesmos quando as respectivas leituras de absorvância foram significativamente maiores nos respectivos tratamentos em relação ao sobrenadante original.

3.3.7 Avaliação do efeito de inibição

O efeito de inibição referente aos respectivos sobrenadantes foi determinado por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = 100 \times \left\{ 1 - \left(\frac{DOs}{DOc} \right) \right\}$$

DOs - Densidade óptica referente ao sobrenadante original

DOc - Densidade óptica referente ao controle negativo

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito de inibição de compostos presentes no sobrenadante original obtido do cultivo da cepa *L. acidophilus* ATCC 4356 sobre as cepas patogênicas indicadoras, representado na Figura 1, foi verificado por meio da análise estatística (ANOVA) e teste de Tukey, com intervalo de confiança de 95%, dos valores de absorbância obtidos. Observa-se que das 6 cepas indicadoras avaliadas apenas a cepa *S. dysenteriae* ATCC 13313 não sofreu inibição, sendo que as demais foram significativamente ($P < 0,01$) inibidas em diferentes níveis pelo respectivo sobrenadante.

Observa-se que o efeito de inibição variou entre 24 e 51%, com destaque para as cepas *E. coli* 0124, *S. enteritidis* ATCC 13076 e *S. sonnei* ATCC 25931 que tiveram o crescimento inibido com maior intensidade correspondendo a 46, 51 e 45%, respectivamente.

Figura 1 – Efeito de inibição do sobrenadante *in natura* do cultivo de *L. acidophilus* ATCC 4356 sobre as cepas patogênicas indicadoras.

Com o objetivo de se caracterizar a origem do efeito de inibição observado submeteu-se o referido sobrenadante a diferentes tratamentos valendo destacar que a metodologia empregada consistiu em se avaliar o crescimento das cepas patogênicas na presença do sobrenadante tratado para eliminação de possíveis compostos antimicrobianos. Desta forma, a análise estatística dos respectivos valores de absorbância obtidos (Figura 2), demonstrou que os tratamentos aplicados ao sobrenadante do cultivo de *L. acidophilus* ATCC 4356, não foram capazes de eliminar o agente responsável pelo efeito de inibição, uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre as leituras de absorbância relativas aos sobrenadantes tratados e o controle. Esta ausência de significância demonstra que não houve efeito de inibição de substâncias termolábeis, proteicas ou de peróxido de hidrogênio sobre as cepas patogênicas avaliadas.

Figura 2 - Valores médios de absorbância relativos ao crescimento das cepas patogênicas na presença de caldo MRS a pH 7,0 (A), do sobrenadante de *L. acidophilus* ATCC 4356, *in natura* (B) e submetidos a diferentes tratamentos: 100 °C/15min (C); 121 °C/15min (D); α -quimotripsina (E); Pronase (F); Tripsina (G); Catalase Caldo (H); MRS a pH 4,2 (I). (Continua).

Figura 2 – (Continuação) Valores médios de absorbância relativos ao crescimento das cepas patogênicas na presença de caldo MRS a pH 7,0 (A), do sobrenadante de *L. acidophilus* ATCC 4356, *in natura* (B) e submetidos a diferentes tratamentos: 100 °C/15min (C); 121 °C/15min (D): α -quimotripsina (E): Pronase (F): Tripsina (G): Catalase Caldo (H): MRS a pH 4,2 (I).

Verifica-se também que as leituras de absorbância obtidas no ensaio com MRS pH 4,2 (I) sobre o crescimento das cepas patogênicas, após submetidas à análise estatística (ANOVA e teste de TUKEY), se mostraram equivalentes às do sobrenadante *in natura* (B). Vale salientar que este ensaio foi realizado com o objetivo de se verificar a possível existência de outras substâncias antimicrobianas presentes no sobrenadante e que poderiam estar atuando em sinergia com o efeito do pH. A presença destas substâncias acarretaria em um efeito de inibição do sobrenadante original significativamente maior em relação ao observado com caldo MRS, cujo pH foi corrigido para um valor equivalente ao sobrenadante original. Desta forma, como os efeitos de inibição foram estatisticamente semelhantes, concluiu-se que o efeito de inibição observado se deve ao pH.

No tocante ao efeito de inibição de *L. casei* ATCC 7469 sobre as respectivas cepas patogênicas, observa-se nos resultados representados na Figura 3 que o sobrenadante *in natura* apresentou efeito inibitório significativo ($P < 0,01$), em diferentes níveis, sobre as 6 cepas patogênicas indicadoras avaliadas. Nota-se ainda, que somente a cepa *S. dysenteriae* ATCC 13313 não foi inibida pelos supostos compostos presentes no referido sobrenadante. Os valores de inibição sobre as demais cepas variaram entre 23 e 54%, sendo a cepa *E. coli* 0127 a que sofreu menor efeito de inibição em seu crescimento (23%). Por outro lado, as cepas *E. coli* 0124 e *S. enteritidis* ATCC 13076 tiveram seu crescimento inibido com maior intensidade, correspondendo a 49 e 54%, respectivamente.

Figura 3 - Efeito de inibição do sobrenadante *in natura* do cultivo de *L. casei* ATCC 7469 sobre as cepas patogênicas indicadoras.

Na etapa que consistiu na caracterização da origem do efeito de inibição, cujos resultados encontram-se representados na Figura 4, foi possível constatar por meio de análise estatística dos valores de absorbância obtidos, que os tratamentos aplicados ao sobrenadante do cultivo de *L. casei* ATCC 7469, não interferiram significativamente no efeito inibitório observado. Desta forma, esta análise revelou que as leituras de absorbância correspondentes ao sobrenadante submetido aos diferentes tratamentos foram semelhantes ao sobrenadante original. Estes resultados demonstram que o efeito de inibição exercido pela cepa *L. casei* ATCC 7469 não se deve à presença de substâncias antimicrobianas proteicas, termolábeis ou peróxido de hidrogênio.

Verifica-se também que o tratamento I, correspondente ao caldo MRS pH 4,3, não interferiu significativamente no efeito inibitório observado com o sobrenadante original do cultivo de *L. casei* ATCC 7469. Este resultado permite atribuir ao pH o efeito de inibição

Figura 4 - Valores médios de absorbância relativos ao crescimento das cepas patogênicas na presença de caldo MRS a pH 7,0 (A), do sobrenadante de *L. casei* ATCC 7469, *in natura* (B) e submetidos a diferentes tratamentos: 100 °C/15min (C); 121 °C/15min (D); α -quimotripsina (E); Pronase (F); Tripsina (G); Catalase Caldo (H); MRS a pH 4,3 (I). (Continua).

Figura 4 – (Continuação) Valores médios de absorbância relativos ao crescimento das cepas patogênicas na presença de caldo MRS a pH 7,0 (A), do sobrenadante de *L. casei* ATCC 7469, *in natura* (B) e submetidos a diferentes tratamentos: 100 °C/15min (C); 121°C/15min (D): α -quimotripsina (E): Pronase (F): Tripsina (G): Catalase Caldo (H): MRS a pH 4,3 (I).

No que se refere a avaliação do efeito de inibição do sobrenadante original obtido do cultivo de *L. plantarum* ATCC 8014, cujos resultados encontram-se representados na Figura 5, observa-se efeito inibitório significativo ($P < 0,01$) sobre 5 das 6 cepas patogênicas avaliadas, destacando-s a cepa *S. dysenteriae* ATCC 13313, que não teve seu crescimento significativamente inibido por substâncias presentes no referido sobrenadante.

Em relação às demais cepas, nota-se que estas tiveram seu crescimento inibido em diferentes níveis, variando entre 30 e 53% de inibição, com destaque para as cepas *E. coli* 0124 e *S. enteritidis* ATCC 13076, que tiveram, respectivamente, 45 e 53% de seu crescimento inibido pelo sobrenadante de *L. plantarum* ATCC 8014

Figura 5 - Efeito de inibição do sobrenadante *in natura* do cultivo de *L. plantarum* ATCC 8014 sobre as cepas patogênicas indicadoras avaliadas.

É relevante ressaltar que após efetuada a análise estatística, o efeito de inibição apresentado pelo sobrenadante do cultivo de *L. plantarum* ATCC 8014 se mostrou semelhante aos observados com os sobrenadantes do cultivo de *L. casei* ATCC 7469 e *L. acidophilus* ATCC 4356.

Os resultados representados na Figura 6, são referentes ao estudo do efeito de inibição quando o sobrenadante do cultivo de *L. plantarum* ATCC 8014 foi submetido aos diferentes tratamentos. Estes revelam que os tratamentos aplicados ao sobrenadante não foram capazes de anular o efeito antimicrobiano observado sobre as cepas patogênicas indicadoras uma vez que as leituras de absorbância referentes ao sobrenadante original e tratados não se mostraram significativamente diferentes. Assim, verifica-se que o efeito de inibição observado não se deve a presença de substâncias termolábeis, proteicas ou peróxido de hidrogênio no referido sobrenadante.

Figura 6 - Valores médios de absorbância relativos ao crescimento das cepas patogênicas na presença de caldo MRS a pH 7,0 (A), do sobrenadante de *L. plantarum* ATCC 8014, *in natura* (B) e submetidos a diferentes tratamentos: 100 °C/15min (C); 121 °C/15min (D); α -quimotripsina (E); Pronase (F); Tripsina (G); Catalase Caldo (H); MRS a pH 4,4. (I). (Continua).

Figura 6 – (Continuação) Valores médios de absorbância relativos ao crescimento das cepas patogênicas na presença de caldo MRS a pH 7,0 (A), do sobrenadante de *L. plantarum* ATCC 8014, *in natura* (B) e submetidos a diferentes tratamentos: 100 °C/15min (C); 121 °C/15min (D); α -quimotripsina (E); Pronase (F); Tripsina (G); Catalase Caldo (H); MRS a pH 4,4. (I).

Observa-se também, que o tratamento (I) relativo ao MRS acidificado a pH 4.4 resultou no mesmo efeito de inibição observado com o sobrenadante original (B), demonstrando que, dentre as variáveis estudadas, o pH do sobrenadante foi o único fator responsável pelo efeito de inibição exercido por *L. plantarum* ATCC 8014 sobre as cepas patogênicas testadas.

Com relação ao efeito de inibição exercido pelo sobrenadante *in natura*, obtido do cultivo de *L. fermentum* ATCC 9338, sobre as cepas patogênicas, demonstrado na Figura 7, verifica-se que este também ocorreu em diferentes níveis. Nota-se que, ao contrário das observações anteriores, dentre as 4 cepas de *Lactobacillus* estudadas no presente trabalho,

L. fermentum ATCC 9338 foi a única cujo sobrenadante apresentou efeito inibitório significativo sobre a cepa *S. dysenteriae* ATCC 13313, correspondendo a 21% de inibição.

Verifica-se ainda que, as demais cepas patogênicas indicadoras tiveram seu crescimento inibido em diferentes níveis, variando de 43 a 57%,. Assim, observou-se que as cepas *E. coli* 0112, *E. coli* 0124, *E. coli* 0127 e *S. sonnei* ATCC 25931 tiveram seu crescimento inibido em níveis significativamente superiores ($P < 0,05$) pelo sobrenadante *in natura* de *L. fermentum* ATCC 9338 em relação às demais cepas de *Lactobacillus*.

Figura 7 - Efeito de inibição do sobrenadante *in natura* do cultivo de *L. fermentum* ATCC 9338 sobre as cepas patogênicas indicadoras avaliadas

Com o objetivo de se identificar a origem do efeito de inibição observado, submeteu-se o referido sobrenadante a diferentes tratamentos, cujos resultados encontram-se representados na Figura 8. Observou-se que não houve diferença estatística entre os efeitos de inibição observados com o sobrenadante original e tratado, o que demonstra que o efeito de inibição observado não ocorreu em decorrência da presença de substâncias termolábeis, proteicas ou peróxido de hidrogênio.

Figura 8 - Valores médios de absorbância relativos ao crescimento das cepas patogênicas na presença de caldo MRS a pH 7,0 (A), do sobrenadante de *L. fermentum* ATCC 9338, *in natura* (B) e submetidos a diferentes tratamentos: 100 °C/15min (C); 121°C/15min (D); α -quimotripsina (E); Pronase (F); Tripsina (G); Catalase Caldo (H); MRS a pH 4,1. (I). (Continua).

Figura 8 – (Continuação) Valores médios de absorbância relativos ao crescimento das cepas patogênicas na presença de caldo MRS a pH 7,0 (A), do sobrenadante de *L. fermentum* ATCC 9338, *in natura* (B) e submetidos a diferentes tratamentos: 100 °C/15min (C); 121 °C/15min (D); α -quimotripsina (E); Pronase (F); Tripsina (G); Catalase Caldo (H); MRS a pH 4,1. (I).

Observa-se também que os resultados referentes ao tratamento I, representado pelo caldo MRS a pH 4,2 (equivalente ao pH do sobrenadante original) revelaram que não houve diferença significativa no tocante ao efeito de inibição observado em relação ao

sobrenadante original (B). Desta forma, constata-se que, dentre as variáveis estudadas, o pH do sobrenadante é o responsável pelo efeito de inibição exercido por *L. fermentum* ATCC 9338 sobre as cepas patogênicas estudadas.

Os resultados reportados anteriormente revelaram que o efeito de inibição apresentado pelas diferentes cepas de *Lactobacillus* sobre as cepas patogênicas indicadoras foi atribuído ao pH e que os sobrenadantes *in natura* das respectivas cepas de *Lactobacillus* apresentaram valores distintos de pH. Desta forma, com o objetivo de se verificar a significância desta variável sobre o efeito de inibição observado, procedeu-se uma análise estatística considerando os valores de pH dos sobrenadantes *in natura*, cujos resultados encontram-se apresentados na Figura 9.. Esta análise revelou que os sobrenadantes com valores de pH entre 4.2 e 4.4 não diferiram entre si (NS) no tocante ao efeito de inibição observado. Por outro lado, os resultados revelaram que o sobrenadante a pH 4.1 (*L. fermentum* ATCC 9338) apresentou efeito de inibição significativamente maior ($P<0,01$) quando comparado aos demais.

Figura 9 - Efeito do pH dos sobrenadantes *in natura* sobre o crescimento das cepas patogênicas. **LA:** *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 **LC:** *Lactobacillus casei* ATCC 7469 **LF:** *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338 **LP:** *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. **NS:** Não significativo.

Vale salientar que efeitos de inibição estatisticamente semelhantes foram observados quando se avaliou o caldo MRS a pH equivalente aos respectivos sobrenadantes *in natura* (Figuras 2, 4, 6 e 8) o que reforça a importância do pH no efeito de inibição observado. Com o objetivo de se confirmar essa premissa, ensaios foram realizados avaliando-se os respectivos sobrenadantes com pH corrigido para 7,0, tendo o caldo MRS pH 7,0 e sobrenadante *in natura* como controles, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 8.

Observou-se que as leituras de absorbância relativas aos sobrenadantes com pH corrigido para 7,0 foram estatisticamente semelhantes aos valores obtidos com caldo MRS pH 7,0 e superiores aos valores obtidos com os sobrenadantes originais, o que demonstra que o efeito de inibição foi removido por meio da neutralização dos respectivos sobrenadantes. Assim fica comprovado que o efeito de inibição observado se deve ao pH do sobrenadante.

Tabela 8 - Valores médios (*) de absorvância $\pm$ desvio padrão do cultivo das cepas patogênicas indicadoras em diferentes condições.

	<i>E. coli</i> 0112			<i>E. coli</i> 0124			<i>E. coli</i> 0127		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
<i>L. acidophilus</i>	0,70 $\pm$ 0,05	0,67 $\pm$ 0,05	0,47 $\pm$ 0,06	0,61 $\pm$ 0,04	0,62 $\pm$ 0,03	0,39 $\pm$ 0,04	0,82 $\pm$ 0,03	0,83 $\pm$ 0,05	0,64 $\pm$ 0,05
<i>L. casei</i>	0,68 $\pm$ 0,03	0,67 $\pm$ 0,04	0,43 $\pm$ 0,03	0,61 $\pm$ 0,05	0,61 $\pm$ 0,04	0,36 $\pm$ 0,02	0,80 $\pm$ 0,04	0,83 $\pm$ 0,02	0,63 $\pm$ 0,04
<i>L. fermentum</i>	0,69 $\pm$ 0,05	0,66 $\pm$ 0,04	0,37 $\pm$ 0,07	0,60 $\pm$ 0,05	0,61 $\pm$ 0,04	0,30 $\pm$ 0,07	0,81 $\pm$ 0,04	0,82 $\pm$ 0,03	0,48 $\pm$ 0,03
<i>L. plantarum</i>	0,72 $\pm$ 0,04	0,70 $\pm$ 0,06	0,47 $\pm$ 0,07	0,63 $\pm$ 0,03	0,62 $\pm$ 0,03	0,39 $\pm$ 0,03	0,82 $\pm$ 0,04	0,80 $\pm$ 0,04	0,60 $\pm$ 0,03

A: MRS pH 7.0 B: Sobrenadante neutralizado C: Sobrenadante *in natura* (*): 3 leituras x 3 repetições

Tabela 8 - Continuação

	<i>S. dysenteriae</i> ATCC 13313			<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076			<i>S. sonnei</i> ATCC 25931		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
<i>L. acidophilus</i>	1,07 $\pm$ 0,05	1,04 $\pm$ 0,05	0,82 $\pm$ 0,03	0,67 $\pm$ 0,07	0,66 $\pm$ 0,05	0,41 $\pm$ 0,06	0,51 $\pm$ 0,04	0,52 $\pm$ 0,05	0,31 $\pm$ 0,04
<i>L. casei</i>	1,12 $\pm$ 0,03	1,14 $\pm$ 0,05	0,81 $\pm$ 0,03	0,67 $\pm$ 0,06	0,66 $\pm$ 0,05	0,40 $\pm$ 0,04	0,54 $\pm$ 0,04	0,51 $\pm$ 0,05	0,3 $\pm$ 0,03
<i>L. fermentum</i>	1,03 $\pm$ 0,03	1,04 $\pm$ 0,05	0,65 $\pm$ 0,06	0,67 $\pm$ 0,08	0,71 $\pm$ 0,04	0,38 $\pm$ 0,08	0,54 $\pm$ 0,05	0,53 $\pm$ 0,05	0,30 $\pm$ 0,03
<i>L. plantarum</i>	1,21 $\pm$ 0,07	1,19 $\pm$ 0,08	0,90 $\pm$ 0,1	0,68 $\pm$ 0,06	0,71 $\pm$ 0,06	0,41 $\pm$ 0,05	0,59 $\pm$ 0,05	0,55 $\pm$ 0,05	0,35 $\pm$ 0,03

A: MRS pH 7.0 B: Sobrenadante neutralizado C: Sobrenadante *in natura* (*): 3 leituras x 3 repetições

No presente trabalho demonstrou-se que dentre as cepas patogênicas indicadoras estudadas, *Shigella dysenteriae* ATCC 13313 teve seu crescimento inibido em menor intensidade na presença dos sobrenadantes com pH original. Por outro lado, os resultados mostraram também que *Shigella sonnei* ATCC 25937 foi mais susceptível ao efeito do pH dos sobrenadantes, demonstrando que o efeito de inibição observado é espécie dependente. Segundo Gorden e Small (1993) existe grande variabilidade no tocante a resistência ao pH ácido entre espécies do gênero *Shigella*. Estes autores encontraram variações de susceptibilidade ao pH em cerca 80% entre cepas da mesma espécie (*Shigella flexneri*) e até 99% entre diferentes espécies. Resultados semelhantes foram observados no presente trabalho uma vez que as duas cepas do gênero *Shigella* avaliadas apresentaram suscetibilidades significativamente diferentes ($P < 0,01$) em relação ao efeito do pH dos sobrenadantes das cepas de *Lactobacillus* estudadas (Figura 9).

Os resultados observados no presente trabalho revelaram que a inibição do crescimento das cepas patogênicas indicadoras avaliadas é resultante da queda de pH devido à produção de ácidos orgânicos pelas cepas de *Lactobacillus*. Zhang et al., (2011) encontraram resultados semelhantes em relação ao efeito inibitório de substâncias presentes no sobrenadante do cultivo de quatro cepas de *Lactobacillus* sobre *Shigella sonnei* e *Escherichia coli*. Os autores observaram que o efeito inibitório observado não foi alterado após tratamento dos sobrenadantes com enzimas proteolíticas, bem como após tratamento a 100 °C por 15 minutos à semelhança do observado no presente trabalho. Os autores demonstraram também que após a neutralização do pH dos sobrenadantes o efeito inibitório foi completamente eliminado.

Zhang et al. (2012b) também selecionaram 15 cepas de *Lactobacillus* que apresentaram atividade inibitória sobre *Shigella sonnei* ATCC 25931. À semelhança do presente trabalho, observaram também que a neutralização do pH eliminou completamente o efeito inibitório dos sobrenadantes. Os autores observaram ainda que o efeito inibitório persistiu nas condições em que os sobrenadantes foram tratados com proteinase K, bem como aquecidos a 100 °C/15 min.

No presente estudo, os resultados demonstraram que a ação de α -quimiotripsina, tripsina, pronase e catalase, bem como os tratamentos a 100 °C/15 minutos e 121 °C/15 minutos não foram capazes de eliminar o efeito de inibição dos sobrenadantes do cultivo de *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. casei* ATCC 7469, *L. fermentum* ATCC 9338 e *L. plantarum* ATCC 8014 sobre as cepas patogênicas indicadoras avaliadas. Desta forma, em

ambos os trabalhos ficou demonstrado que o efeito de inibição foi atribuído à produção de ácidos orgânicos, acarretando no abaixamento do pH dos sobrenadantes.

No tocante ao efeito de inibição de crescimento celular causado por substâncias proteicas, é sabido que bactérias gram-negativas são intrinsecamente resistentes às bacteriocinas produzidas por bactérias gram-positivas devido à barreira física oferecida pela membrana externa. Contudo, casos são reportados em que a desestabilização da membrana externa pode torná-las susceptíveis à ação destas bacteriocinas (KALCHAYANAND et al., 1992; KALCHAYANAND et al., 1998; BELFIORE et al., 2007). Os resultados do presente trabalho demonstraram a ausência de substâncias proteicas nos sobredantes resultantes do cultivo das cepas de *Lactobacillus* avaliadas.

Segundo Alakomi et al., (2000), o ácido láctico exerce intenso efeito na membrana externa de bactérias gram-negativas, em muitos casos ocasionando sua ruptura. Corroborando com este fato, na literatura pertinente são reposrtados casos nos quais a atividade de bacteriocinas, sintetizadas por bactérias lácticas, somente é significativa sobre bactérias gram-negativas quando estas são expostas a pH baixo (MESSI et al., 2001; LASH et al., 2005). Especificamente, Lash et al. (2005) observaram que o pH baixo do sobrenadante (<5.0) foi uma condição fundamental para que ocorresse inibição dos patógenos gram-negativos avaliados mediada por uma substância proteica sintetizada por *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. Contudo, no presente trabalho não foi observada a interferência de qualquer substância peptídica no efeito de inibição dos sobrenadantes, embora o pH destes tenha sido baixo. Desta forma, considerando que não foi encontrada diferença significativa entre os efeitos de inibição de MRS a pH ácido e dos sobrenadantes a pH original, bem como o fato de que o efeito inibitório foi eliminado pela neutralização dos sobrenadantes, sustenta-se a hipótese de que o efeito de inibição ocorreu como consequência da produção de ácidos orgânicos e consequente queda do pH.

De acordo com Makras e De Vuyst (2006), os ácidos orgânicos, em particular os ácidos láctico e acético apresentam forte efeito inibitório sobre espécies gram- negativas. Fooks e Gibson (2001) observaram que o efeito de inibição, sobre o crescimento de *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis* exercido por cepas probióticas, aumenta proporcionalmente à concentração de ácidos orgânicos no meio. Estes autores verificaram efeitos inibitórios mais intensos quando fontes de carbono mais facilmente metabolizadas por *Lactobacillus* e *Bifidobacteriu* foram avaliadas. Salientaram ainda que, o pH ácido pode não ser o fator principal para que o efeito de inibição aconteça. Porém, ressaltaram

que o baixo pH do meio externo pode ser uma condição fundamental para que os ácidos orgânicos atravessem a membrana da célula bacteriana e exerçam o efeito inibitório em seu interior.

A atividade antimicrobiana apresentada pelos ácidos orgânicos segundo Kashket (1987) se deve à diminuição do pH intracelular devido à dissociação cíclica dos ácidos orgânicos. Neste mecanismo, os ácidos orgânicos atuam como carreadores de íons hidrogênio do meio extracelular para o ambiente intracelular, em seguida, são excretados para o meio extracelular na sua forma aniônica, a qual adquire novamente no meio extracelular um íon H^+ e o processo se repete indefinidamente. Desta forma o aumento da concentração de íons hidrogênio no interior da célula é mais rápido que sua capacidade celular de excreção de íons H^+ , então o gradiente eletroquímico da membrana se dissipa, impossibilitando suas atividades metabólicas. Adicionalmente existe o gasto de ATP envolvido na exportação de íons H^+ , causando um déficit energético que compromete as funções normais da célula.

No entanto, outro mecanismo foi proposto, neste, o acúmulo dos ânions dos ácidos orgânicos no citoplasma seria o principal responsável pelo efeito letal dos mesmos. Neste modo de ação, a baixa lipossolubilidade do ânion lactato seria responsável pelo seu acúmulo no interior celular (RUSSEL, 1991; RUSSEL; DIEZ-GONZALEZ, 1998). Segundo Carpenter e Broadbent (2009) o acúmulo de ânions lactato ou acetato e promove o aumento da osmolaridade intracelular após sua associação com íons K^+ e Na^+ aumentando a pressão de turgor celular. A célula pode compensar isto expelindo estes ou outros ânions intracelulares, principalmente glutamato segundo Roe et al. (1998). Assim, de acordo com Roe et al. (1998) no tocante à espécie *Escherichia coli*, a célula pode compensar este efeito expelindo estes ou outros ânions, principalmente glutamato. Desta forma, segundo os autores, a depleção de glutamato intracelular compromete a síntese de metionina, uma vez que glutamato é precursor do tetrahidrofolato, juntamente com 6-metilpterina e p-aminobenzoato. A síntese de metionina depende da doação de um radical metil por intermédio do 5,10-metil-tetrahidrofolato, sem o qual ocorre o acúmulo do precursor homocisteína, que apresenta toxicidade para a célula. Os autores ressaltam ainda que este acúmulo contribui de forma significativa, juntamente com a queda do pH intracelular, para aumentar o efeito inibitório de ácido acético sobre *Escherichia coli*.

Corroborando a afirmação de Ogawa et al. (2001), Tsai et al. (2005), Tsai et al. (2008a) e Zhang et al. (2011) de que os ácidos orgânicos são as principais substâncias responsáveis pela atividade antimicrobiana de bactérias lácticas, os resultados do presente

estudo demonstraram que o abaixamento do pH foi o único fator responsável pelo efeito de inibição das cepas de *Lactobacillus* avaliadas sobre as cepas patogênicas indicadoras. No entanto é importante ressaltar que a ausência de interferência de substâncias proteicas no efeito de inibição observada neste estudo não elimina a possibilidade de que as cepas de *Lactobacillus* avaliadas produzam compostos antimicrobianos de natureza proteica sobre outras espécies, pois segundo Cotter, Hill e Ross (2005), estes compostos apresentam espectro de ação variável. Considerando-se que a estratégia adotada, no presente trabalho, para a caracterização da causa do efeito de inibição consistiu na verificação de sua manutenção ou eliminação após os tratamentos dos sobrenadantes, a afirmação de que estas cepas de *Lactobacillus* não produzem substâncias antimicrobianas proteicas se restringe apenas às cepas indicadoras avaliadas. Esta observação se deve ao fato que a presença de substâncias antimicrobianas proteicas só é detectada por esta metodologia caso as mesmas apresentem efeito de inibição estatisticamente significativo. Assim, sua interferência no efeito de inibição do sobrenadante original é detectada após o tratamento do mesmo com enzimas proteolíticas. Por consequência, as cepas avaliadas apresentam potencial de produção de substâncias antimicrobianas proteicas que atuem sobre outras espécies indicadoras.

A premissa da modulação da microbiota intestinal por meio da administração de espécies produtoras de compostos antimicrobianos tem sido considerada promissora. Neste contexto, vale destacar que segundo Claesson et al. (2009) esta microbiota é composta por aprox. 1000 espécies, sendo que a maior parte da diversidade microbiana é encontrada a partir desta categoria taxonômica, apresentando relativamente poucos gêneros predominantes. Desta forma é pouco provável que a administração de probióticos com a finalidade de modular a microbiota intestinal interfira significativamente na estrutura taxonômica da mesma. Esta afirmativa é sustentada pelos resultados reportados por Kim et al. (2013), que demonstram que a administração de probióticos virtualmente não altera a estrutura da microbiota de adultos saudáveis no tocante às espécies que a compõem. No entanto, os autores demonstram que, de um total de 1175 espécies/cepas detectadas na microbiota intestinal, 88 destas foram estatisticamente diferentes (≥ 3 vezes) após terapia com probióticos. Destas, 7 destas tiveram seu número reduzido em até 10 vezes após a administração com *Lactobacillus* probióticos e 4 após administração com *Bifidobacterium*.

No presente estudo não foi observado efeito de inibição total sobre nenhuma das cepas patogênicas a partir de uma população inicial de 10^8 UFC/ml. No entanto, a literatura pertinente reporta doses infectantes diferentes para cepas das mesmas espécies avaliadas no presente estudo correspondentes à 5×10^2 UFC para *Shigella sonnei* 53G (MUNOZ et al., 1995), 10^2 – 10^4 UFC para *Shigella dysenteriae* M 131 (LEVINE et al., 1973), aproximadamente 10^6 UFC para cepas de *Echerichia coli* enteropatogênicas (EPEC) e Enterotoxigênicas (ETEC) (FDA, 2012) e de 10^2 – 10^8 para *Salmonella* spp (HUMPHREY, 2004). Com base nestes dados constata-se que os níveis de inibição observados pelo sobrenadante das cepas de *Lactobacillus* avaliadas sobre uma população de 10^8 CFU/ml das cepas patogênicas indicadoras, atestam seu potencial como agentes bioprotetores contra espécies patogênicas gram-negativas.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

Os sobrenadantes resultantes do cultivo de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356; *Lactobacillus casei* ATCC 7469 e *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 inibiram significativamente o crescimento de 5 das 6 cepas patogênicas indicadoras, a saber: *Escherichia coli* 0112, *Escherichia coli* 0124, *Escherichia coli* 0127, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076 e *Shigella sonnei* ATCC 25931.

Lactobacillus fermentum ATCC 9338 apresentou efeito de inibição significativo sobre o crescimento das 6 cepas patogênicas indicadoras avaliadas, incluindo *Shigella dysenteriae* ATCC 13313.

O efeito de inibição exercido pelas cepas de *Lactobacillus* sobre as cepas patogênicas foi sustentado pelo pH ácido dos respectivos sobrenadantes

Não foi observado efeito significativo sobre o crescimento das cepas patogênicas devido a presença de peróxido de hidrogênio, substâncias peptídicas ou termolábeis presentes nos sobrenadantes das cepas de *Lactobacillus*.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Avaliar o efeito bioprotetor das cepas de *Lactobacillus in vivo* utilizando animais experimentalmente infectados com os patógenos estudados neste trabalho.

Avaliar a produção de substâncias antimicrobianas pelas cepas de *Lactobacillus* sobre patógenos intestinais gram-positivos e.g. *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*.

Avaliar a produção de substâncias antimicrobianas pelas cepas de *Lactobacillus* sobre espécies de micro-organismos responsáveis pela deterioração de alimentos de origem animal.

REFERÊNCIAS

AGUIRRE, M.; COLLINS, M. D. Lactic acid bacteria and human clinical infection. **Journal of Applied Bacteriology**, v.75, n.1, p.95-107, 1993.

ALAKOMI, H. L.; SKYTTÄ, E.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; LATVA-KALA, K.; HELANDER, I. M. Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.5, p.2001-2005, 2000.

ANDERSSON, A. F.; LINDBERG, M.; JAKOBSSON, H.; BÄCKHED, F.; NYRÉN, P.; ENGSTRAND, L. Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. **Public Library of Science One**, v.3, n.7, 2008. doi:10.1371/journal.pone.0002836

ANGELAKIS, E.; ARMOUGOM, F.; MILLIOM, M.; RAOULT, D. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. **Future Microbiology**, v.7, n.1, p.91-109, 2012.

ARCHER, M. H.; DILLON, V. M.; CAMPBELL-PLATT, G.; OWENS, J. D. Effect of diacetyl on growth rate of *Salmonella typhimurium* determined from detection times measured in a micro-well plate photometer. **Food Control**, v.7, n.2, p.65-67, 1996.

ARMOUGOM, F.; HENRY, M.; VIALETES, B.; RACCAH, D. RAOULT, D. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and methanogens in anorexic patients. **Public Library of Science One**, v.4, n.9, 2009. doi:10.1371/journal.pone.0007125.

ARUMUGAM, M.; RAES, J.; PELLETIER, E. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. **Nature**, v.473, n.7346, 2011. doi:10.1038/nature09944.

AURELI, P.; CAPURSO, L.; CASTELLAZZI, A. M.; CLERICI, M.; GIOVANNINI, M.; MORELLI, L.; POLI, A.; PREGIASCIO, F.; SALVINI, F.; ZUCCOTTI, G. V. Probiotics and health: an evidence-based review. **Pharmacological Research**, v.63, n.9, p.366-376, 2011.

AVONTS, L.; UYTVEN, E. V.; DE VUYST, L. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. **International Dairy Journal**, v.14, n.11 p.947-955, 2004.

AXELLSON, 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. 442 p.

AYMERICH, T.; PICOUET, P. A.; MONFORT, J. M. Decontamination technologies for meat products. **Meat Science**, v.78, n.1, p.114-129, 2008.

BÄCKHED, F.; DING, H.; WANG, T.; HOOPER, L. V.; KOH, G. Y.; NAGY, A.; SEMENKOVICH, C. F.; GORSON, J. I. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.44, p.15718–15723, 2004.

BÄCKHED, F.; LEY, R. E.; SONNENBURG, J. L.; PETERSON, D. A.; GORDON, J. I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. **Science**, v.307, n.5717, p.1915-1920, 2005.

BALAMURUGAN, R.; GEORGE, G.; KABEERDOSS, J.; HEPSIBA, J.; CHANDRAGUNASEKARAN, A. M.; RAMAKRISHNA, B. S. Quantitative differences in intestinal *Faecalibacterium prausnitzii* in obese Indian children. **The British Journal of Nutrition**, v.103, n.3, p.335-338, 2010.

BARKER, C.; PARK, S. F. Sensitization of *Listeria monocytogenes* to low pH, organic acids, and osmotic stress by ethanol. **Applied Environmental Microbiology**, v.67, n.4, p.1594-1600, 2001.

BARRINGTON, G. M.; GAY, J. M.; EVERMANN, J. F. Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. **Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.18, n.1, p.7-34, 2002.

BARTHON, L. L.; NORTHUP, D. E.; **Microbial Ecology**. New Jersey: John Wiley, 2011. 407p.

BELFIORE, C.; CASTELLANO, P.; VIGNOLO, G. Reduction of *Escherichia coli* population following treatment with bacteriocins from lactic acid bacteria and chelators. **Food Microbiology**, v.24, n.3, p.223-229, 2007.

BERNADEAU, M.; VERNOUX, J. P.; HENRI-DUBERNET, S.; GUÉGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, n.3, p.278-285, 2008.

BERNADEAU, M.; GUGUEN, M.; VERNOUX, J. P. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. **FEMS Microbiology Reviews**, v.30, n.4, p.487-513, 2006.

BIASUCCI, G.; RUBINI, M.; RIBONI, S.; MORELLI, L.; BESSI, E.; RETETANGOS, C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. **Early Human Development**, v.86, p.13-15, 2010. Supplement 1.

BIRKENHAUER, J. M.; OLIVER, J. D. Use of diacetyl to reduce the load of *Vibrio vulnificus* in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. **Journal of Food Protection**, v.66, n.1, p.38-43, 2003.

BIROLLO, G. A.; REINHEIMER, J. A.; VINDEROLA, C. G. Viability of lactic acid microflora in different types of yoghurt. **Food Research International**, v.33, n.9, p.799-805, 2000.

BLANDINO, A.; AL-ASEERI, M. E.; PANDIELLA, S. S.; CANTERO, D.; WEBB, C. Review. Cereal-based fermented foods and beverages. **Food Research International**, v.36, n.6, p.523-543, 2003.

BLOM, H.; MØRTVEDT, C. Anti-microbial substances produced by food associated micro-organisms. **Biochemical Society Transactions**, v.19, n.3, p.694-698, 1991.

BRUSA, T.; CANZI, E.; ALLIEVI, L.; PUPPO, E. D.; FERRARI, A. Methanogens in the human intestinal tract and oral cavity. **Current microbiology**, v.27, n.5, p.261-265, 1993.

CAI, Y.; YANG, J.; PANG, H.; KITAHARA, M. *Lactococcus fujiensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from vegetable matter. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.61, n.7, p.1590-1594, 2010.

CAMP, J. G.; KANTHER, M.; SEMOVA, I.; RAWLS, J. F. Patterns and scales in gastrointestinal microbial ecology. **Gastroenterology**, v.136, n.6, p.1989-2002, 2009.

CANNON, J. P.; LEE, T. A.; BOLANOS, J. T.; DANZIGER, L. H. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: A retrospective review of over 200 cases. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.24, n.1, p.31-40, 2005.

CARPENTER, C. E.; BROADBENT, J. R. External concentration of organic acid anions and pH: key independent variables for studying how organic acids inhibit growth of

bacteria in mildly acidic foods. **Journal of Food Science**, v.74, n.1, 2009. doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00994.x.

CAO, Z.; KLEBBA, P. E. Mechanisms of colicin binding and transport through outer membrane porins. **Biochimie**, v.84, n.5, p.399-412, 2002.

CHEN, X.; XU, J.; SHUAI, J.; CHEN, J.; ZHANG, Z.; FANG, W. The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, n.3, p.307-312, 2007.

CHENG, Y.; SHI, Z.; DOUDEVA, L. G.; YANG, W.; CHAK, K.; YUAN, H. High-resolution crystal structure of a truncated ColE7 translocation domain: Implications for colicin transport across membranes. **Journal of Molecular Biology**, v.356, n.1, p.22-31, 2006.

CHOI, I.; KIM, Y.; PARK, Y.; SEOG, H.; CHOI, H. Anti-obesity activities of fermented soygerm isoflavones by *Bifidobacterium breve*. **Biofactors**, v.29, n.2-3, p.105-112, 2007.

CLAESSON, M. J.; O'SULLIVAN, O.; WANG, Q.; NIKKILÄ, J.; MARCHESI, J. R.; SMIDT, H.; VOS, W. M.; ROSS, R. P.; O'TOOLEP. W. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. **Public Library of Science One**, v.4, n.8, 2009. doi:10.1371/journal.pone.0006669.

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

COLLINS, B.; GUINANI, C. M.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. R.; Assessing the contribution of the LiaS histidine kinase to the innate resistance of *Listeria monocytogenes* to nisin, cephalosporins and disinfectants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.8, p.2923-2929, 2012. doi: 10.1128/AEM.07402-11.

CONDON, S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. **FEMS Microbiology Letters**, v.46, n.3, p.269-280, 1987.

CORTHER, G.; DORÉ, J. A new era in gut research concerning interactions between microbiota and human health. **Gastroentérologie Clinique et Biologique**, v.34, p.1-6, 2010. Supplement 1.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, n.10, p.777-788, 2005.

CURSINO, L.; SMAJS, D.; SMARDA, J.; NARDI, R. M.; NICOLI, J.R.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A.M. Exoproducts of the *Escherichia coli* strain H22 inhibiting some enteric pathogens both in vitro and in vivo. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, n.4, p.821-829, 2006.

CZÁRÁN, T. L.; HOEKSTRA, R. F.; PAGIE, L. Chemical warfare between microbes promotes biodiversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, n.2, p.786-790, 2002.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v.7, n.1, p.31-41, 1997.

DE FILIPPO, C.; CAVALIERI, D.; DI PAOLA, M.; RAMAZZOTTI, M.; POULLET, J. B.; MASSART, S.; COLLINI, S.; PIERACCINI, G.; LIONETTI, P. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.107, p.14691-14696, 2010. doi: 10.1073/pnas.1005963107.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v.23, n.1, p.130-135, 1960.

DE REVEL, G.; MARTIN, N.; PRIPIS-NICOLAU, L.; LONVAUD-FUNEL, A.; BERTRAND, A. Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, n.10, p.4003-4008, 1999.

DE RODAS, B. Z.; GILILAND, S. E.; MAXWELL, C. V. Hypocholesterolemic action of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 and calcium in swine with hypercholesterolemia induced by diet. **Journal of Dairy Science**, v.79, n.12, p.2121-2128, 1996.

DEL PIANO, M.; MORELLI, L.; STROZZI, G. P.; ALLESINA, S.; BARBA, M.; DEIDDA, F.; LORENZINI, P.; BALLARÉ, M.; MONTINO, F.; ORSELLO, M.; SARTORI, M.; GARELLO, E.; CARMAGNOLA, S.; PAGLIARULO, M.; CAPURSO, L. Probiotics: From research to consumer. **Digestive And Liver Disease**, v.38, p.248-255, 2006. Supplement 2.

DETHLEFSEN, L.; HUSE, S.; SOGIN, M. S.; RELMAN, D. A. The pervasive effects of an antibiotic on the human gut microbiota, as revealed by deep 16S rRNA sequencing. **Public Library of Science Biology**, v.6, n.11, p.2383-2400, 2008.

DIVYA, J.B.; VARSHA, K.K.; NAMPOOTHIRI, K.M. Newly Isolated Lactic Acid Bacteria with probiotic features for potential application in food industry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.167, n.5, p.1314-1324, 2012.

DRIDI, B.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. Archaea as emerging organisms in complex human microbiomes. **Anaerobe**, v.17, n.2, p.56-63, 2011.

ESGALHADO, M. E.; ROSEIRO, J. C.; COLLACO, A. M. T. Kinetics of acid toxicity in cultures of *Xanthomonas campestris*. **Food Microbiology**, v.13, n.6, p.441-446, 1996.

ESPECHE, M. C.; PELLEGRINO, M.; FROLA, I.; LARRIESTRA, A.; BOGNI, C.; NADER-MACÍAS, M. E. Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. **Anaerobe**, v.18, n.1, p.103-109, 2012.

FAO/WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Londres, Ontario, Canadá. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report, 2002.

FIELD, D.; QUIGLEY, L.; O'CONNOR, P. M.; REA, M. C.; DALY, K.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Studies with bioengineered Nisin peptides highlight the broad-spectrum potency of Nisin V. **Microbial Biotechnology**, v.3, n.4, p.473-486, 2010.

FRANZ, C. M. A. P.; HUCH, M.; ABRIOUEL, H.; HOLZAPFEL, W.; GÁLVEZ, A. Enterococci as probiotics and their implications on food safety. **International Journal of Food Safety**, v.151, n.1, p.125-140, 2011.

FUJI, A.; COOK, E. S. Probiotics. Antistaphylococcal and antifibrinolytic activities of omega-guanidine acids and omega-guanidinoacyl-L-histidines. **Journal of Medical Chemistry**, v.16, n.12, p.1409-1411, 1973.

FONTAINE, E. A. CLAYDON, E.; TAYLOR-ROBINSON, D. Lactobacilli from women with or without bacterial vaginosis and observations on the significance of hydrogen peroxide. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.9, n.4, p.135-141, 1996.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Pathogenic *Escherichia coli* Group. In: **Bad Bug Book, Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook**, 2ed. Center for Food Safety and Applied Nutrition. 2012.

FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R. *In vitro* investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. **FEMS Microbiology Ecology**, v.39, n.1, p.67-75, 2002.

FREDRICKSON, A. G.; STEPHANOPOULOS, G. Microbial competition. **Science**, v.213, n.4511, p.972-979, 1981.

FULLER, R. A review: Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, n. 5, p. 365-378, 1989.

FULLER, R. History and development of probiotics. In: FULLER, R.; **Probiotics: The scientific basis**. Londres: Chapman & Hall. 1992. v.1. 398p.

GARCÍA-QUINTÁNS, N.; REPIZO, G.; MARTÍN, M.; MAGNI, C.; LÓPEZ, P. Activation of the diacetyl/acetoin pathway in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. diacetylactis CRL264 by acidic growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.7, p.1988-1996, 2008.

GARRIGUES, C.; LOUBIERE, P.; LINDLEY, N. D.; COCAIGN-BOUSQUET, M. Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio. **Journal of Bacteriology**, v.179, n.17, p.5282-5287, 1997.

GILLOR, O.; GILADI, I.; RILEY, M. A. Persistence of colicinogenic *Escherichia coli* in the mouse gastrointestinal tract. **BMC Microbiology**, v.9, p.165, 2009. doi:10.1186/1471-2180-9-165.

GORDEN, J.; SMALL, P. L. Acid resistance in enteric bacteria. **Infection and Immunity**, v.61, n.1, p.364-367, 1993.

GRATIA, A. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de Colibacille. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales**, v.93, p.1040-1041, 1925.

GRATIA, A.; FREDERICQ, P. Diversité des souches antibiotiques de *Bacterium coli* et étendue variable de leur champ d'action. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie**, v.140, p.1032-1033, 1946.

GUARNER, F.; PERDIGON, G.; CORTIER, G.; SALMINEN, S.; KOLETZKO, B.; MORELLI, L. Should yoghurt cultures be considered probiotic? **The British Journal of Nutrition**, v.93, n.6, p.783-786, 2005.

GUEIMONDE, M.; LAITINEN, K.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? **Neonatology**, v.92, n.1, p.64-66, 2007.

GUERRA, P. V.; LIMA, L. N.; SOUZA, T. C.; MAZOCHI, V.; PENNA, F. J.; SILVA, A. M.; NICOLI, J. R.; GUIMARÃES, E. V. Pediatric functional constipation treatment with Bifidobacterium-containing yogurt: a crossover, double-blind, controlled trial. **World Journal of Gastroenterology**, v.17, n.34, p.3916-3921, 2010.

GUO, Z.; LIU, X. M.; ZHANG, Q. X.; SHEN, Z.; TIAN, F. W.; ZHANG, H.; ZUN, Z. H.; ZHANG, P.; CHEN, W. Influence of consumption of probiotics on the plasma lipid profile: A meta-analysis of randomised controlled trials. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v.21, n.11, p.844-850, 2011.

HAROS, M.; CARLSSON, M.; ALMGREN, A.; LARSSON-ALMINGER, M.; SANDBERG, A.; ANDLID, T. Phytate degradation by human gut isolated *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ATCC27919 and its probiotic potential. **International Journal of Food Microbiology**, v.153, n.1, p.7-14, 2009.

HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, E. M. J. Probiotics: a general view. In: WOOD, B. J. **Lactic acid bacteria in health and disease**. Amsterdam: Elsevier Applied Science Publishers. 1992. Vol.1. 512p.

HE, T.; PRIEBE, M. G.; ZHONG, Y.; HUANG, C.; HARMSSEN, H. J.; RAANGS, G. C.; ANTOINE, J. M.; WELLING, G. W.; VONK, R. J. Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, n.2, p.595-604, 2008.

HENG, N. C. K.; TAGG, J. R. What's in a name? Class distinction for bacteriocins. **Nature Reviews Microbiology**, v.4, n.1, 2006. doi:10.1038/nrmicro1273-c1.

HÖLTZEL, A.; GÄNZLE, M. G.; NICHOLSON, G. J.; HAMMES, W. P.; JUNG, G. The first low molecular weight antibiotic from lactic acid bacteria: Reutericyclin, a new

tetramic acid. **Angewandte Chemie International Edition**, v.39, n.15, p.2766-2768, 2000.

HOANG, K. V.; STERN, N. J.; SAXTON, A. M.; XU, F.; ZENG, X.; LIN, J. Prevalence, development, and molecular mechanisms of bacteriocin resistance in *Campylobacter*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.7, p.2309-2316, 2011.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, v.35, n.2-3, p.109-116, 2002.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; SNEL, J. SCHILLINGER, U.; HUIS IN'T VELD, J. H. J.; Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, n.1, p.85-105, 1998.

HONDA, H.; KATAOKA, F.; NAGAOKA, S.; KAWAI, Y.; KITAZAWA, H.; ITOH, H.; KIMURA, K.; TAKETOMO, N.; YAMAZAKI, Y.; TATENO, Y.; SAITO, T. β -Galactosidase, phospho- β -galactosidase and phospho- β -glucosidase activities in lactobacilli strains isolated from human faeces. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, n.5, p.461-466, 2007.

HUMPHREY, T. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, n.1, p.504-509, 2004.

HUSEINI, H. F.; RAHIMZADEH, G.; FAZELI, M. R.; MEHRAZMA, M.; SALEHI, M. Evaluation of wound healing activities of kefir products. **Burns**, v.38, n.5, p.719-723, 2012.

HYMAN, R. W.; FUKUSHIMA, M.; DIAMOND, L.; KUMM, J.; GIUDICE, L. C.; DAVIS, R. W. Microbes on the human vaginal epithelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.102, n.22, p.7952-7957, 2005.

IMLAY, J. A.; CHIN, S. M.; LINN, S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. **Science**, v.240, n.4852, p.640-642, 1988.

JACOB, F.; LWOFF, A.; SIMINOVICH, A.; WOLLMAN, E. Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. **Annales de l'Institut Pasteur**, v.84 n.1, p. 222-224, 1953.

JAY, J. M. Antimicrobial properties of diacetyl. **Applied and Environmental Microbiology**, v.44, n.3, p.525-532, 1982.

JIA, W.; LI, H.; ZHAO, L.; NICHOLSON, J. K. Gut microbiota: A potential new territory for drug targeting. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.7, p.123-129, 2008.

JIANG, J.; SHI, B.; ZHU, D.; CAI, Q.; CHEN, Y.; LI, J.; QI, K.; ZHANG, M. Characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* LSJ618 isolated from traditional Chinese fermented radish. **Food Control**, v.23, n.2, p.338-344, 2012.

JIE, J.; SHI, B.; ZHU, D.; CAI, Q.; CHEN, Y. ; LI, J.; QI, K.; ZHANG, M. Characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* LSJ618 isolated from traditional Chinese fermented radish. **Food Control**, v.23, n.2, p.338-334, 2012.

JORDAN, K. N.; O'DONOGHUE, M.; CONDON, S.; COGAN, T. M. Formation of diacetyl by cell-free extracts of *Leuconostoc lactis*. **FEMS Microbiology Letters**, v.143, n.2, p.291-297, 1996.

KADOOKA, Y.; SATO, M.; IMAIZUMI, K.; OGAWA, A.; IKUYAMA, K.; AKAI, Y.; OKANO, M.; KAGOSHIMA, M.; TSUCHIDA, T. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomised controlled trial. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.64, n.6, p.636-643, 2010.

KASHKET, E. R. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. **FEMS Microbiology Letters**, v.43, n.3, p.233-244, 1987.

KALCHAYANAND, N.; HANLIN, M. B.; RAY, B. Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. **Letters in Applied Microbiology**, v.15, n.6, p.239-243, 1992.

KALCHAYANAND, N.; SIKES, A.; DUNNE, C. P.; RAY, B. Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. **Journal of Food Protection**, v.61, n.4, p.425-431, 1998.

KARAPETOV, N.; GEORGIEVA, R.; RUMYAN, N.; KARAIIVANOVA, E. Antibiotic susceptibility of different lactic acid bacteria strains. **Beneficial Microbes**. v.2, n.4, p.335-339, 2011.

KAWASAKI, S.; KUROSAWA, K.; MIYASAKI, M.; YAGI, C.; KITAJIMA, Y.; TANAKA, S.; IRISAWA, T.; OKADA, S.; SAKAMOTO, M.; OHKUMA, .M.; NIIMURA, Y. *Lactobacillus floricola* sp. nov., lactic acid bacteria isolated from mountain

flowers. **International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology**, v.61, n.6, p.1356-1359, 2011.

KEMPERMAN, R.; KUIPERS, A.; KARSENS, H.; NAUTA, A.; KUIPERS, O.; KOK, J. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, Circularin A and Closticin 574. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.3, p.1589-1597, 2003.

KHAKSEFIDI, A.; GHOORCHI, T. Effect of probiotic on performance and immunocompetence in broiler chicks. **The Journal of Poultry Science**, v.43, n.3, p.296-300, 2006.

KIM, J. H.; BLOCK, D. E.; SHOEMAKER, S. P.; MILLS, D. A. Atypical ethanol production by carbon catabolite derepressed lactobacilli. **Bioresource Technology**, v.101, n.22, p.8790-8797, 2010.

KIM, M.; ROH, S. W.; BAE, J. *Bifidobacterium stercoris* sp. nov., isolated from human faeces. **International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology**, v.60, n.12, p.2823-2827, 2010.

KIM, S. W.; SUDA, W.; KIM, S.; OSHIMA, K.; FUKUDA, S.; OHNO, H.; MORITA, H.; HATTORI, M. Robustness of gut microbiota of healthy adults in response to probiotic intervention revealed by high-throughput pyrosequencing. **DNA Research**, v.20, n.3, p.241-253, 2013.

KLAENHAMMER, T. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie**, v.70, n.3, p.337-349, 1988.

KOLLATH, W. Nutrition and the tooth system; a general review with special reference to vitamins. **Deutsche Zahnarztliche Zeitschrift**, v.8, n.11, p.7-16, 1953.

KOOTE, R. S.; VRIEZE, A.; HOLLEMAN, F.; DALLINGA-THIE, T. M.; ZOETENDAL, E. G.; VOS, W. M.; GROEN, A. K.; HOEKSTRA, J. B. L.; STROES, E. S.; NIEUWDORP, M. The therapeutic potential of manipulating gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.14, n.2, p.112-120, 2012.

KORECKA, A.; ARULAMPALAM, V. The gut microbiome: scourge, sentinel or spectator? **Journal of Oral Microbiology**, v.4, n.9267, doi: 2012. 10.3402/jom.v4i0.9367.

KRISHNAN, S.; GOWDA, L. R.; MISRA, M. C.; KARANTH, N. C. Physiological and morphological changes in immobilized *L. Plantarum* NCIM 2084 cells during repeated batch fermentation for production of lactic acid. **Food Biotechnology**, v.15, n.3, p.193-202, 2001.

KURISU, G.; ZAKHAROV, S. D.; ZHALNINA, M. V. ; BANO, S.; EROUKOVA, V. Y.; ROKITSKAYA, T. I.; ANTONENKO, Y. N.; WIENER, M. C.; CRAMER, W. A. The structure of BtuB with bound colicin E3 R-domain implies a translocon. **Nature Structural Biology**, v.10, n.1, p.948-954, 2003.

LAM, E. K.; YU, L.; WONG, H. P.; WU, W. K.; SHIN, V. Y.; TAI, E. K.; SO, W. H.; WOO, P. C.; CHO, C. H. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG enhances gastric ulcer healing in rats. **European Journal of Pharmacology**, v.565, n.1-3, p.171-179, 2007.

LASH, B. W.; GOURAMA, H.; MYSLIWIEC, T. H. Microscale assay for screening of inhibitory activity of *Lactobacillus*. **Biotechniques**, v.33, n.6, p.1224-1226, 2002.

LASH, B. W.; MYSLIWIEC, T. H.; GOURAMA, H. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). **Food Microbiology**, v.22, n.2, p.199-204, 2005.

LANCIOTTI, R.; PATRIGNANI, F.; BAGNOLINI, F.; GUERZONI, M. E.; GARDINI, F. Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. **Food Microbiology**, v.20, n.5, p.537-543, 2003.

LE BON, M.; DAVIES, H. E.; GLYN, C.; THOMPSON, C.; MADDEN, M.; WISEMAN, J.; DODD, C. E. R.; HURDIDGE, L.; PAYNE, G.; TREUT, Y. L.; CRAIGON, J.; TÖTEMEYER, S.; MELLITS, K. H. Influence of probiotics on gut health in the weaned pig. **Livestock Science**, v.133, n.1, p.179-181, 2010.

LEE, H.; LEE, H. Purification and biochemical characterization of bacteriolytic enzyme from *Bacillus subtilis* YU-1432 active against *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v.54, n.4, p.600-605, 2011.

LENSKI, R. E.; RILEY, M. A. Chemical warfare from an ecological perspective. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.99, n.2, p.786-790, 2002.

LEVERING, J.; MUSTERS, M. W. J. M.; BEKKER, M.; BELLOMO, D.; FIEDLER, T.; VOS, W. M.; HUGENHOLTZ, J.; KREIKEMEYER, B.; KUMMER, U.; TEUSKIN, B.

Role of phosphate in the central metabolism of two lactic acid bacteria – a comparative systems biology approach. **The FEBS Journal**, v.279, n.7, p.1274-1290, 2012.

LEVINE, M. M.; DUPONT, H. L.; FORMAL, S. B.; HORNICK, R. B.; TAKEUCHI, A.; GANGAROSA, E. J.; SNYDER, M. J. LIBONATI, J. P. Pathogenesis of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) dysentery. **The Journal of Infectious Diseases**, v.127, n.3, p.261-270, 1973.

LEY, R. E.; HAMADY, M.; LOZUPONE, C.; TURNBAUGH, P. J.; RAMEY, R. R.; BIRCHER, J. S.; SCHLEGEL, M. L.; TUCKER, T. A.; SCHRENZEL, M. D.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. Evolution of mammals and their gut microbes. **Science**, v.320, n.5883, p.1647-1651, 2008.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.147, n.3659, p.747-748, 1965.

LIMA, A. C. F.; JÚNIOR, J. M. C.; MACARI, M.; MALHEIROS, E. B. Efeito do uso de probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.1, p.200-207, 2003.

LIONG, M. T.; SHAH, N. P. Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. **International Dairy Journal**, v.15, n.4, p.391-398, 2002.

LYTE, M. The microbial organ in the gut as a driver of homeostasis and disease. **Medical Hypotheses**, v.74, n.4, p.634-638, 2010.

MACARIO, E. C.; MACARIO, A. J. L. Methanogenic archaea in health and disease: A novel paradigm of microbial pathogenesis. **International Journal of Medical Microbiology**, v.299, n.2, p.99-108, 2009.

MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. **Journal of Bacteriology**, v.189, n.4, p.1199-1208, 2007.

MAKRAS, L.; DE VUYST, L. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. **International Dairy Journal**, v.16, n.9, p.1049-1057, 2006.

MALLIA, S.; ESCHER, F.; SCHLICHTERLE-CERNY, H. Aroma-active compounds of butter: a review. **European Food Research and Technology**, v.226, n.3, p.315-325, 2008.

MARTÍN, R.; OLIVARES, M.; MARÍN, M. L.; XAUS, J.; FERNÁNDEZ, L.; RODRÍGUEZ, J. M. Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.104, n.3, p.267-277, 2005.

MARTINEAU, B.; ACREE, T. E.; HENICK-KLING, T. Effect of wine type on the detection threshold for diacetyl. **Food Research International**, v.28, n.2, p.139-143, 1995.

MAYO, B.; ALEKSANDRZAK-PIEKARCZYK, T.; FERNÁNDEZ, M.; KOWALCZYK, M.; ÁLVAREZ-MARTÍN, P.; BARDOWSKI, J. Updates in the metabolism of lactic acid bacteria In: MOZZI, F.; RAYA, R. R.; VIGNOLO, G. M. **Biotechnology of lactic acid bacteria : novel applications**. Iowa: Wiley-Blackwell. 2010. 393p.

MARÓTI, G.; KERESZT, A.; KONDOROSI, E.; MERGAERT, P. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. **Research in Microbiology**, v.162, n.4, p.363-374, 2011.

MARTY, C.; TEYSSET, F. T.; GAREL, J. R. Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon aeration: Involvement of an NADH oxidase in oxidative stress. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.1, p.262-267, 2000.

MEILE, L.; LE BLAY, G.; THIERRY, A. Safety assessment of dairy microorganisms: *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, n.3, p.316-320, 2008.

MESSI, P.; BONDI, M.; SABIA, C.; BATTINI, R.; MANICARDI, G. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. **International Journal of Food Microbiology**, v.64, n.1, p.193-198, 2001.

METCHNIKOFF, E. **The prolongation of life: optimistic studies**. New York & London : G.P. Putnam's Sons. 1908. 343p.

MILLEMANN, Y. Diagnosis of neonatal calf diarrhea. **Revue de Medecine Veterinaire**, v.160, n.1, p.404-409, 2009.

MILLER, T. L.; WOLIN, M. J.; CONWAY, M. E.; MACARIO A.J. Isolation of *Methanobrevibacter smithii* from human feces. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, n.1, p.227-232, 1982.

MILLER, TL. L.; WOLIN, M. J. *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. **Archives of microbiology**, v.141, n.2, p.116-122, 1985.

MILLS, S.; STANTON, C.; HILL, C.; ROSS, R. P. New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.2, n.1, p.299-329, 2011.

MORITA, H.; NAKANO, A.; ONODA, H.; TOH, H.; OSHIMA, K.; TAKAMI, H.; MURAKAMI, M.; FUKUDA, S.; TAKIZAWA, T.; KUWAHARA, T.; OHNO, H.; TANABE, S.; HATTOURI, M. *Bifidobacterium kashiwanohense* sp. nov., isolated from healthy infant faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.61, n.11, p.2610-2615, 2010.

MONNET, C.; AYMES, F.; CORRIEU, G. Diacetyl and α -acetolactate overproduction by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* mutants that are deficient in α -acetolactate decarboxylase and have a low lactate dehydrogenase activity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.12, p.5518-5520, 2000.

MUNOZ, C.; BAGAR, S.; VAN DE VERG, L.; THUPARI, J.; GOLDBLUM, S.; OLSON, J. G.; TAYLOR, D. N.; HERESI, G. P.; MURPHY, J. R. Characteristics of *Shigella sonnei* infection of volunteers: signs, symptoms, immune responses, changes in selected cytokines and acute-phase substances. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.53, n.1, p.47-54, 1995.

MURPHY, E. F.; COTTER, P. D.; HEALY, S.; MARQUES, T. M.; O'SULLIVAN, O.; FOUHY, F.; CLARKE, S. F.; O'TOOLE, P. W.; QUIGLEY, E. M.; STANTON, C.; ROSS, P. R.; O'DOHERTY, R. M.; SHANANAN, F. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. **Gut**, v.52, n.12, p.1635-1642, 2010.

MURPHY, E. F.; COTTER, P. D.; HOGAN, A.; O'SULLIVAN, O.; JOYCE, A.; FOUHY, F.; CLARKE, S. F.; MARQUES, T. M.; O'TOOLE, P. W.; STANTON, C.; QUIGLEY, E. M. M.; DALY, C.; ROSS, P. R.; O'DOHERTY, R. M.; SHANANAN, F. Divergent metabolic outcomes arising from targeted manipulation of the gut microbiota in diet-induced obesity. **Gut**, v.62 n.2, 2012. doi:10.1136/gutjnl-2011-300705.

NARVA, M.; COLLIN, M.; LAMBERG-ALLARDT, C.; KÄRKKÄINEN, M.; POUSSA, T.; VAPAATALO, H.; KORPELA, R. Effects of long-term intervention with *Lactobacillus helveticus*-fermented milk on bone mineral density and bone mineral content in growing rats. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.48, n.4, p.228-234, 2004.

NASRABADI, H. M.; EBRAHMINI, M. T.; BANADAKI, D. S.; KAJOUSANGI, T. M.; ZAHEDI, F. Study of cutaneous wound healing in rats treated with *Lactobacillus plantarum* on days 1, 3, 7, 14 and 21. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.5, n.21, p. 2395-2401, 2011.

NAYAK, S. K. Biology of eukaryotic probiotics. **Microbiology Monographs**, v.21, n.1, p.29-55, 2011.

NEVES, A. R.; RAMOS, A.; SHEARMAN, C.; GASSON, M. J.; ALMEIDA, J. S.; SANTOS, H. Metabolic characterization of *Lactococcus lactis* deficient in lactate dehydrogenase using *in vivo* ^{13}C -NMR. **European Journal of Biochemistry**, v.267, n.12, p.3859-3868, 2000.

NOBLE, W. C.; VIRANI, Z.; CREE, R. G. A. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.93, n.2, p.195-198, 1992.

NOBLE, W. C.; RAHMAN, M.; KARADEK, T.; SCHARZ, S. Gentamicin resistance gene transfer from *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* to *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus*. **Veterinary Microbiology**, v.52, n1-2, p.143-152, 1996.

NURSTEN, H. E. The flavour of milk and dairy products: I. Milk of different kinds, milk powder, butter and cream. **Dairy Technology**, v.50, n.2, p.48-56, 1997.

O'BRIEN, J.; WRIGHT, G. D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v.22, n.4, p.552-558, 2011.

O'SHEA, E. F.; GARDINER, G. E.; O'CONNOR, P. M. MILLS, S.; ROSS, R. P.; HILL, C. Characterization of enterocin- and salivaricin-producing lactic acid bacteria from the mammalian gastrointestinal tract. **FEMS Microbiology Letters**, v.291, n.1, p.24-34, 2009.

OCAÑA, V. S.; HOLGADO, A. A. P. R.; NADER-MACÍAS, M. E. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by H_2O_2 -producing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* isolated from the human vagina. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.23, n.2, p.87-92, 1999.

OGAWA, M.; SHIMIZU, K.; NOMOTO, K.; TANAKA, R.; HAMABATA, T.; YAMASAKI S.; TAKEDA, T.; TAKEDA, Y. Inhibition of *in vitro* growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v.68, n.1, p.135-140, 2001.

OSTLING, C. E.; LINDGREN, S. E. Inhibition of enterobacteria and *Listeria* growth by lactic, acetic and formic acids. **The journal of Applied Bacteriology**, v.75, n.1, p.18-24, 1993.

OTERO, M. C.; NADER-MACÍAS, M. E. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. **Animal Reproduction Science**, v.96, n1-2, p.53-46, 2006.

OUWEHAND, A.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. The role of the intestinal microflora for the development of the immune system in early childhood. **European Journal of Nutrition**, v.41, p.132-137, 2002. Supplement 1.

OUWEHAND, A. C.; VESTERLUND, S.; Antimicrobial components from lactic acid bacteria In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3.ed New York: Marcel Dekker, 2004. 442 p.

OXLEY, A. P.; LANFRANCONI, M. P.; WÜRDEMAN, D.; OTT, S.; SCHREIBER, S.; MCGENITY, T. J.; TIMMYS, K. N.; NOGALES, B. Halophilic archaea in the human intestinal mucosa. **Environmental microbiology**, v.12, n.9, p.2398-2410, 2010.

PALMER, C.; BIK, E. M.; DIGIULIO, D. B.; RELMAN, D. A.; BROWN, P. O. Development of the human infant intestinal microbiota. **Public Library of Science Biology**, v.5, n.7, 2007. doi:10.1371/journal.pbio.0050177.

PARKER, R. B. Probiotics. The other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition and Health**, v. 29, n.1, p.4-8, 1974.

PERAL, M. C.; MARTINEZ, M. A. H.; VALDEZ, J. C. Bacteriotherapy with *Lactobacillus plantarum* in burns. **International Wound Journal**, v.6, n.1, p.73-81, 2009.

PÉREZ, T.; BALCÁZAR, J. L.; PEIX, A.; VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; BLAS, I.; RUIZ-ZARZUELA, I. *Lactococcus lactis* subsp. *tractae* subsp. nov. isolated from the intestinal mucus of brown trout (*Salmo trutta*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology**, v.61, n.8, p.1894-1898, 2011.

PERICONE, C. D.; OVERWEG, K.; WERMANS, P. W. M.; WEISER, J. N. Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. **Infection and Immunity**, v.68, n.7, p.3990-3997, 2000.

PINGITORE, E. V.; HÉBERT, E. M.; NADER-MACÍAS, M. E.; SESMA, F. Characterization of salivaricin CRL 1328, a two-peptide bacteriocin produced by *Lactobacillus salivarius* CRL 1328 isolated from the human vagina. **Research in Microbiology**, v.160, n.1, p.401-408, 2009.

POMPEI, A.; CORDISCO, L.; AMARETTI, A.; ZANONI, S.; MATTEUZZI, D.; ROSSI, M. Folate production by bifidobacteria as a potential probiotic property. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.1, p.179-185, 2007.

POYART-SALMERON, C.; CARLIER, C.; TRIEU-CUOT, P.; COURVALIN, P.; COURTIEU, A. L. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. **The Lancet**, v.335, n.8703, p.1422-1426, 1990.

PROENÇA, D. FERNANDES, S.; LEANDRO, C.; SILVA, F. A.; SANTOS, S.; LOPES, F.; MATO, R.; CAVACO-SILVA, P.; PIMENTEL, M.; SÃO-JOSÉ, C. Phage endolysins with broad antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis* clinical strains. **Microbial Drug Resistance**, v.18, n.3, p.322-332, 2012. doi:10.1089/mdr.2012.0024

RAMOS, A.; LOLKEMA, J. S.; KONINGS, W. N.; SANTOS, H. Enzyme basis for pH regulation of citrate and pyruvate metabolism by *Leuconostoc oenos*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.4, p.1303-1310, 1995.

RIEZZO, G.; ORLANDO, A.; D'ATTOMA, B.; GUERRA, V.; VALERIO, F.; LAVERMICOCCA, P.; DE CANDIA, S.; RUSSO, F. Randomised clinical trial: efficacy of *Lactobacillus paracasei* enriched artichokes in the treatment of patients with functional constipation – a double-blind, controlled, crossover study. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.35, n.4, p.441-450, 2012.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food microbiology**, v.27, n.1, p.1-11, 2010.

RIZKALLA, S. W.; LUO, J.; KABIR, M.; CHEVALIER, A.; PACHER, N.; SLAMA, G. Chronic consumption of fresh but not heated yogurt improves breath-hydrogen status and short-chain fatty acid profiles: a controlled study in healthy men with or without lactose maldigestion. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.72, n.6, p.1474-1479, 2000.

ROE, A. J.; MCLAGGA, D.; DAVIDSON, I.; O'BYRNE, C.; BOOTH, I. R. Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids. **The Journal of Bacteriology**, v.180, n.4, p.767-772, 1998.

ROE, A. J.; O'BYRNE, C.; MCLAGGAN, D.; BOOTH, I. R. Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. **Microbiology**, v.148, n.7, p.2215-2222, 2002.

ROGERS, L. A. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Bacteriology**, v.16, n.5, p.321-325, 1928.

ROUND, J. L.; MAZMANIAN, S. K. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v.9, p.313-323, 2009.

RUSSEL, J. B. Resistance of *Streptococcus bovis* to acetic acid at low pH: relationship between intracellular pH and anion accumulation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.1, p.255-259, 1991.

RUSSEL, J. B.; DIEZ-GONZALEZ, F. The effects of fermentation acids on bacterial growth. **Advances in Microbial Physiology**, v.39, n.1, p.205-234, 1998.

RYAN, C. S.; KLEINBERG, I. Bacteria in human mouths involved in the production and utilization of hydrogen peroxide. **Archives of Oral Biology**, v.40, n.8, p.753-763, 1995.

SAARELA, M.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Safety Aspects of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species originating from human oro-gastrointestinal tract or from probiotic products. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v.14, n.4, p.233-240, 2002.

SALMINEN, S. Uniqueness of probiotic strains. **IDF Nutrition Newsletter**, v.5, p.16-18, 1996.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; BENNO, Y.; LEE, Y. K. Probiotics: How should they be defined? **Trends in Food Science**, v.10, n.3, p.107-110, 1999.

SANDERS, M.; HUIS IN'T VELD, E. M. J. Bringing a probiotic-containing food product to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. **Antoine Van Leeuwenhoek**, v.76, n.1-4, p.293-315, 1999.

SANTACRUZ, A.; MARCOS, A.; WÄRNBERG, J.; MARTÍ, A.; MARTIN-MATILLAS, M.; CAMPOY, C.; MORENO, L. A.; VEIGA, O.; REDONDO-FIGUERO, C.; GARAGORRI, J. M.; AZCONA, C.; DELGADO, M.; GARCÍA-FUENTES, M.; COLLADO, M. C.; SANZ, Y. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. **Obesity**, v.17, n.10, p.1906-1915, 2009.

SANTACRUZ, A.; COLLADO, M. C.; GARCÍA-VALDEZ, L.; SEGURA, M. T.; MARTÍN-LAGOS, J. A.; ANJOS, T.; MARTÍ-ROMERO, M.; LOPEZ, R. M.; FLORIDO, J.; CAMPOY, C.; SANZ, Y. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. **British Journal of Nutrition**, v.104, n.1, p.83-92, 2010.

SCHAEFER, L.; AUCTION, T. A.; HERMANS, K. E.; WHITEHEAD, D.; BORHAN, B.; BRITTON, R. A. The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. **Microbiology**, v.156, n.6, p.1589-1599, 2010.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics - approaching a definition¹⁻³. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p.361-364, 2001. Suplemento 2.

SCHWARZ, S. KEHRENBURG, C.; WALSH, T. R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.17, n.6, p.431-437, 2001.

SETTANI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, n.2, p.123-138, 2008.

SEIFFERT, S. N.; HILTY, M.; PERRETEN, V.; ENDIMIANI, A. Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: An emerging problem for human health? **Drug Resistance Updates**, v.16, n.1-2, 2013. doi:0.1016/j.drug.2012.12.001.

SCHAAFSMA, G. State-of-the-art concerning probiotic strains in milk. **IDF Nutrition Newsletter**, v5, p.23-24, 1996.

SHAH, N. S. Probiotics and prebiotics. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v.15, n.1, p.1-15, 2004.

SHEN, X. J.; RAWLS, J. F.; RANDALL, T.; BURCAL, L.; MPANDE, C. N.; JENKINS, N.; JOVOV, B.; ABDO, Z.; SANDLER, R. S.; KEKU, T. O. Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas. **Gut Microbes**, v.1, n.3, p.138-147, 2010.

SHERMAN, P.M.; OSSA, J. C.; JOHNSON-HENRY, K. Unraveling the mechanisms of probiotics. **Nutrition in Clinical Practice**, v.24, n.1, p.10-14, 2012.

SJÖGREN, Y. M.; TOMICIC, S.; LUNDBERG, A.; BÖTTCHER, M. F.; BJÖRKSTÉN, B.; SVERREMARK-EKSTRÖM, E.; JENMALM, M. C. **Clinical Mechanisms in Allergic Disease**, v.39, n.12, p.1842-1851, 2009.

SOBHANI, I.; TAP, J.; ROUDOT-THORAVALL, F.; ROPERCH, J. P.; LETULLE, S.; LANGELLA, P.; CORTHIER, G.; NHIEU J. T. V.; FURET, J. P. Microbial dysbiosis in colorectal cancer (CRC) patients. **Public Library of Science One**, v.6, n.1, 2011. doi:10.1371/journal.pone.0016393.

SOMMER, B.; FRIEHS, K.; FLASCHEL, E. Efficient production of extracellular proteins with *Escherichia coli* by means of optimized coexpression of bacteriocin release proteins. **Journal of Biotechnology**, v.145, n.4, p.350-358, 2010.

SPERTI, G. S. **Probiotics**. West Point, Connecticut: Avi Publishing Co. Inc., 1971. 120 p.

STURDEE, S.; BAINTON, R.; BARNHAM, M. Intravascular infection with *Lactobacillus paracasei*. **Journal of Infection**, v.37, n.2, p.184-186, 1998.

SUN, Z.; ZHONG, J.; LIANG, X.; LIU, J.; CHEN, X.; HUAN, L. Novel mechanism for nisin resistance via proteolytic degradation of nisin by the nisin resistance protein NSR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.5, p.1964-1973, 2009.

TAKEMURA, N.; OKUBO, T.; SONOYAMA, K. *Lactobacillus plantarum* strain No. 14 reduces adipocyte size in mice fed high-fat diet. **Experimental Biology and Medicine**, v.235, n.7, p.849-856, 2010.

TANAKA, K.; KOMIYAMA, A.; SUNOMOTO, K.; ISHISAKI, A.; HALL, S.; STANBURY, P. Two different pathways for D-xylose metabolism and the effect of xylose concentration on the yield coefficient of L-lactate in mixed-acid fermentation by the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* IO-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.60, n.1-2, p.160-167, 2002.

TANNOCK, G. W. Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria. **Current Issues in Molecular Biology**, v.1, n.1, p.53-64, 1999.

TARAS, D.; VAHJEN, W.; SIMON, O. Probiotics in pigs — modulation of their intestinal distribution and of their impact on health and performance. **Livestock Science**, v.108, n.1, p.229-231, 2007.

TEJERO-SARIÑENA, S.; BARLOW, J.; COSTABILE, A.; GIBSON, G. R.; ROWLAND, I. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. **Anaerobe**, v.18, n.5, p.530-538, 2012.

TETTHE, G. L.; BEUCHAT, L. R. Sensitivity of acid-adapted and acid-shocked *Shigella flexneri* to reduced pH achieved with acetic, lactic, and propionic acids. **Journal of Food Protection**, v.64, n.7, p.975-981, 2001.

TIMMERMAN, H. M.; KONING, C. J. M.; MULDER, L.; ROMBOUTS, F. M.; BEYNEN A. C. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics - A comparison of functionality and efficacy. **International Journal of Food Microbiology**, v.96, n.3, p.219-233, 2004.

TODOROV, S. D.; PRÉVOST, H.; LEBOIS, M.; DOUSSET, X.; LEBLANC, J. G.; FRANCO, B. D. G. M. Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*) — From isolation to application: Characterization of a bacteriocin. **Food Research International**, v.44, n.5, p.1351-1363, 2011.

TROMM, A.; NIEWERTH, U.; KHOURY, M.; BAESTLEIN, E.; WILLHELMS, G.; SCHULZE, J.; STOLTE, M. The probiotic *E. coli* strain Nissle 1917 for the treatment of collagenous colitis: First results of an open label trial. **Zeitschrift für Gastroenterologie**, v.42, n.5, p.365-369, 2004.

TSAI, C.; HSIH, H.; CHIU, H.; LAI, Y.; LIU, J.; YU, B.; TSEN, H. Antagonistic activity against Salmonella infection in vitro and in vivo for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. **International Journal of Food Microbiology**, v.102, n.2, p.185-194, 2005.

TSAI, C.; LIN, P.; HSIEH, Y. Three *Lactobacillus* strains from healthy infant stool inhibit enterotoxigenic *Escherichia coli* grown in vitro. **Anaerobe**, v.14, n.2, p.61-67, 2008a.

TSAI, Y. T.; CHENG, P. C.; FAN, C. K.; PAN, T. M. Time-dependent persistence of enhanced immune response by a potential probiotic strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, n.12, p.219-225, 2008b.

TSAI, Y. T.; CHENG, P. C.; LIAO, J. W.; PAN, T. M. Effect of the administration of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 on Peyer's patch-mediated mucosal immunity. **International Immunopharmacology**, v.10, n.7, p.791-798, 2010a.

TSAI, Y. T.; CHENG, P. C.; PAN, T. M. Immunomodulating activity of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-infected mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.21, p.11265–11272, 2010b.

TURNBAUGH, P. J.; LEY, R. E.; MAHOWALD, M. A.; MAGRINI, V.; MARDIS, E. R.; GORDON, J. I. An obesity associated microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v.444, n.1, p.1027-1031, 2006.

TURNBAUGH, P. J.; BÄCKHED, F.; FULTON, L.; GORDON, J. I. Diet-Induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. **Cell Host and Microbe**, v.3, n.4, p.213-223, 2008.

TURNBAUGH, P. J.; HAMADY, M.; YATSUNENKO, T.; CANTAREL, B. L.; DUNCAN, A.; LEY, R. E.; SOGIN, M. L.; JONES, W. J.; ROE, B. A.; AFFOURTIT, J. P.; EGHOLM, M.; HENRISSAT, B.; HEATH, A. C.; KNIGHT, R.; GORDON, J. I. A core microbiome in obese and lean twins. **Nature**, v.457, p.480-485, 2009.

UCHIDA, M.; KURAKAZU, K. Yogurt containing *Lactobacillus gasseri* OLL2716 exerts gastroprotective action against acute gastric lesion and antral ulcer in rats. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.96, n.1, p.84-90, 2004.

VALDEZ, G. F. Maintenance of Lactic Acid Bacteria. In: SPENCER, J. F. T.; SPENCER, A. L. R. **Food microbiology protocols**. New Jersey: Humana Press. 2001. 495p.

VAN DER WAL, F. J.; LUIRINK, J.; OUDEGA, B. Bacteriocin release proteins: mode of action, structure, and biotechnological application. **FEMS Microbiology Reviews**, v.17, n.4, p.381-399, 1995.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18, n.7, p.714-728, 2008.

VÁSQUEZ, A.; JAKOBSSON, T.; AHRNÉ, S.; FORSUM, U.; MOLIN, G. Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy swedish women. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.8, p.2746-2749, 2002.

VERGIN, F. Anti- und Probiotika. **Hippokrates**, v.25, n.4, p.116-119, 1954.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Lactic acid bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, v.36, n.9-10, p.895-904, 2003.

VON WRIGHT, A.; AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: An introduction. In: SALMINEN, S.; LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A. C.; VON WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects**. 4th. ed. Boca Raton: CRC Press. 2011. 779 p.

VOLOKHOV, D. V.; AMSELLE, M.; BECK, B. J.; POPHAM, D. L.; WHITTAKER, P.; WANG, H.; KERRIGAN, E.; CHIZHIKIV, V. E. *Lactobacillus brantae* sp. nov., isolated from feces of Canada geese (*Branta canadensis*). **International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology**, v.62, n.9, p.2068-2071, 2011.

WALSH, M. C.; GARDINER, G. E.; HART, O. M.; LAWLOR, P. G.; DALY, M.; LYNCH, B.; RICHERT, B. T.; RADCLIFFE, S.; GIBLIN, L.; HILL, C.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C.; ROSS, P. Predominance of a bacteriocin-producing *Lactobacillus salivarius* component of a five-strain probiotic in the porcine ileum and effects on host immune phenotype. **FEMS Microbiology Ecology**, v.64, n.2, p.317-327, 2008.

WANG, Q.; YAMABE, K.; NARITA, J.; MORISHITA, M.; OSHUMI, Y.; KUSANO, K.; SHIRAI, Y.; OGAWA, H. I. Suppression of growth of putrefactive and food poisoning bacteria by lactic acid fermentation of kitchen waste. **Process Biochemistry**, v.37, n.4, p.351-357, 2001.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: The majority unseen. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, n.12, p.6578-6583, 1998.

WOOD, B. J. B. HOLZAPFEL, W. H.; **The lactic acid bacteria: The genera of the lactic acid bacteria**. Londres: Chapman & Hall. 1995. v.2. 283 p.

WOOD, B. J. B. **Microbiology of fermented foods**. 2nd.ed. London: Thomson Science. 1998. 383 p.

WU, G. D.; CHEN, J.; HOFFMAN, C.; BITTINGER, K.; CHEN, Y.; KEILBAUGH, S. A.; BEWTRA, M.; KNIGHTS, D.; WALTERS, W. A.; KNIGHT, R.; SINHA, R.; GILROY, E.; GUPTA, K.; BALDASSANO, R.; NESSEL, L.; LI, H.; BUSHMAN, F. D.; LEWIS, J. D. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. **Science**, v.332, n.6052, p.105-108, 2011.

XIE, Y.; AN, H.; HAO, Y.; QIN, Q.; HUANG, Y.; LUO, Y.; ZHANG, L. Characterization of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LB-B1 isolated from koumiss, a traditionally fermented dairy product from China. **Food Control**, v.22, n.7, p.1027-1031, 2011.

YOSHIDA, A.; AOKI, R.; KIMOTO-NIRA, H.; KOBAYASHI, M.; KAWASUMI, T.; MIZUMACHI, K.; SUZUKI, C. Oral administration of live *Lactococcus lactis* C59 suppresses IgE antibody production in ovalbumin-sensitised mice via the regulation of interleukin-4 production. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.61, n.3, p.315-322, 2011.

YOUNG, K. M.; FOEGEDING, P. M. Acetic, lactic and citric acids and pH inhibition of *Listeria monocytogenes* Scott A and the effect on intracellular pH. **The Journal of Applied Bacteriology**, v.74, n.5, p.515-520, 1993.

YOUSEFI, M.; KARKOODI, .K Effect of probiotic Thepax® and *Saccharomyces cerevisiae* supplementation of performance and egg quality of laying hens. **International Journal of Poultry Science**, v.6, n.1, p.52-54, 2007.

YOUSIF, N. M. K.; HUCH, M.; SCHUSTER, T.; CHO, G.; DIRAR, H. A.; HOLZAPFEL, W. H.; FRANZ, C. M. A. P. Diversity of lactic acidbacteria from Hussuwa, a traditional African fermented sorghum food. **Food Microbiology**, v.27, n.6, p.757-768, 2010.

YU, J.; WANG, W. H.; MENGHE, B. L.; JIRI, M. T.; WANG, H. M.; LIU, W. J.; BAO, Q. H.; LU, Q.; ZHANG, J. C.; WANG, F.; XU, H. Y.; SUN T. S.; ZHANG, H. P. Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.7, p.3229-3241, 2011.

ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article. **APCBEE Procedia**, v.2, n.1, p.50-56, 2012.

ZAKARIA, I. I.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. Bacteriocin release protein-mediated secretory expression of recombinant chalcone synthase in *Escherichia coli*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.165, n.2, p.737-747, 2011.

ZHANG, Y.; ZHANG, L.; DU, M.; YI, H.; GUO, C.; TUO, Y.; HAN, X.; LI, J.; ZHANG, L.; YANG, L. Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. **Microbiological Research**, v.167, n.1, p.27-31, 2011.

ZHANG, B.; SHANGGUAN, T.; MA, H.; HUANG, X.; ZHANG, Y. Lysis of mastitis pathogens isolated from dairy cow milk samples by purified recombinant lysostaphin. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.20, p.4649-4659, 2012a.

ZHANG, Y.; ZHANG, L.; MA, W.; YI, H.; YANG, X.; DU, M.; SHAN, Y.; HAN, X.; ZHANG, L. Screening of probiotic lactobacilli for inhibition of *Shigella sonnei* and the macromolecules involved in inhibition. **Anaerobe**, v.18, n.5, p.498-503, 2012b.

ZHOU, X.; BENT, S. J.; SCHNEIDER, M. G.; DAVIS, C. C.; ISLAM, M. R.; FORNEY L J. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. **Microbiology**, v.150, n.8, p.2565-2573, 2004

ZOTTA, T.; RICCIARDI, A.; GUIDONE, A.; SACCO, M.; MUSCARIELLO, L.; MAZZEO, M. F.; CACACE, G.; PARENTE, E. Inactivation of ccpA and aeration affect growth, metabolite production and stress tolerance in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **International Journal of Food Microbiology**. v.155, n.1-2, p.51-59, 2012.

APÊNDICES

APENDICE A. Resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos sobrenadantes *in natura*.

<i>Lactobacillus acidophilus</i>				
Cepa patogênica indicadora	Repetição*	Absorbância a 630 nm		
		Controle negativo	Sobrenadante	MRS pH 7.0
<i>Escherichia coli</i> 0112	1 ^a	0.715	0.416	0.650
	2 ^a	0.731	0.541	0.754
	3 ^a	0.630	0.457	0.684
<i>Escherichia coli</i> 0124	1 ^a	0.683	0.359	0.566
	2 ^a	0.793	0.440	0.653
	3 ^a	0.666	0.352	0.610
<i>Escherichia coli</i> 0127	1 ^a	0.843	0.678	0.849
	2 ^a	0.824	0.658	0.841
	3 ^a	0.853	0.580	0.780
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	1 ^a	0.864	0.388	0.603
	2 ^a	0.874	0.488	0.750
	3 ^a	0.770	0.356	0.633
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 13313	1 ^a	0.834	0.814	1.138
	2 ^a	0.870	0.824	1.036
	3 ^a	0.783	0.780	1.056
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	1 ^a	0.602	0.300	0.496
	2 ^a	0.589	0.355	0.564
	3 ^a	0.489	0.264	0.483

*Valores médios de três leituras.

Lactobacillus casei

Cepa patogênica indicadora	Repetição*	Absorbância a 630 nm		
		Controle negativo	Sobrenadante	MRS pH 7.0
<i>Escherichia coli</i> 0112	1 ^a	0.713	0.395	0.709
	2 ^a	0.705	0.440	0.667
	3 ^a	0.640	0.450	0.687
<i>Escherichia coli</i> 0124	1 ^a	0.678	0.351	0.557
	2 ^a	0.839	0.391	0.668
	3 ^a	0.633	0.343	0.605
<i>Escherichia coli</i> 0127	1 ^a	0.828	0.631	0.819
	2 ^a	0.815	0.617	0.833
	3 ^a	0.828	0.660	0.767
<i>Salmonella</i> <i>enteritidis</i> ATCC 13076	1 ^a	0.887	0.396	0.617
	2 ^a	0.879	0.433	0.755
	3 ^a	0.777	0.353	0.647
<i>Shigella</i> <i>dysenteriae</i> ATCC 13313	1 ^a	0.738	0.832	1.157
	2 ^a	0.767	0.806	1.113
	3 ^a	0.782	0.775	1.103
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	1 ^a	0.592	0.311	0.532
	2 ^a	0.544	0.348	0.589
	3 ^a	0.500	0.279	0.494

*Valores médios de três leituras.

Lactobacillus fermentum

Cepa patogênica indicadora	Repetição*	Absorbância a 630 nm		
		Controle negativo	Sobrenadante	MRS pH 7.0
<i>Escherichia coli</i> 0112	1 ^a	0.669	0.296	0.631
	2 ^a	0.703	0.443	0.730
	3 ^a	0.641	0.373	0.695
<i>Escherichia coli</i> 0124	1 ^a	0.685	0.284	0.564
	2 ^a	0.848	0.393	0.666
	3 ^a	0.628	0.268	0.584
<i>Escherichia coli</i> 0127	1 ^a	0.863	0.487	0.807
	2 ^a	0.795	0.497	0.852
	3 ^a	0.885	0.458	0.787
<i>Salmonella</i> <i>enteritidis</i> ATCC 13076	1 ^a	0.891	0.432	0.611
	2 ^a	0.914	0.414	0.771
	3 ^a	0.788	0.280	0.631
<i>Shigella</i> <i>dysenteriae</i> ATCC 13313	1 ^a	0.946	0.697	1.007
	2 ^a	0.758	0.616	1.035
	3 ^a	0.772	0.642	1.058
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	1 ^a	0.712	0.303	0.550
	2 ^a	0.643	0.343	0.596
	3 ^a	0.568	0.280	0.492

*Valores médios de três leituras

Lactobacillus plantarum

Cepa patogênica indicadora	Repetição*	Absorbância a 630 nm		
		Controle negativo	Sobrenadante	MRS pH 7.0
<i>Escherichia coli</i> 0112	1 ^a	0.685	0.389	0.696
	2 ^a	0.688	0.557	0.773
	3 ^a	0.646	0.465	0.696
<i>Escherichia coli</i> 0124	1 ^a	0.700	0.402	0.614
	2 ^a	0.814	0.419	0.668
	3 ^a	0.612	0.348	0.612
<i>Escherichia coli</i> 0127	1 ^a	0.846	0.584	0.846
	2 ^a	0.825	0.621	0.835
	3 ^a	0.880	0.549	0.778
<i>Salmonella</i> <i>enteritidis</i> ATCC 13076	1 ^a	0.894	0.418	0.631
	2 ^a	0.931	0.463	0.758
	3 ^a	0.792	0.355	0.649
<i>Shigella</i> <i>dysenteriae</i> ATCC 13313	1 ^a	0.748	1.029	1.297
	2 ^a	0.775	0.853	1.171
	3 ^a	0.782	0.816	1.186
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	1 ^a	0.559	0.334	0.610
	2 ^a	0.604	0.376	0.618
	3 ^a	0.530	0.325	0.527

*Valores médios de três leituras

Lactobacillus acidophilus

Cepa patogênica indicadora	Repetição*	Absorbância a 630 nm							
		100 °C /15min	121 °C /15min	α -Quimotripsina	Pronase	Tripsina	Catalase	MRS pH 4.2	Sobrenadante pH 7.0
<i>Escherichia coli</i> 0112	1 ^a	0,411	0,422	0,446	0,374	0,431	0,352	0,398	0,739
	2 ^a	0,439	0,380	0,416	0,404	0,442	0,400	0,439	0,637
	3 ^a	0,473	0,391	0,383	0,437	0,517	0,381	0,479	0,637
<i>Escherichia coli</i> 0124	1 ^a	0,368	0,379	0,432	0,377	0,385	0,390	0,310	0,605
	2 ^a	0,400	0,393	0,389	0,387	0,359	0,380	0,360	0,630
	3 ^a	0,437	0,361	0,364	0,438	0,408	0,408	0,381	0,641
<i>Escherichia coli</i> 0127	1 ^a	0,559	0,587	0,598	0,574	0,544	0,607	0,497	0,870
	2 ^a	0,617	0,573	0,577	0,610	0,559	0,595	0,577	0,805
	3 ^a	0,628	0,571	0,547	0,628	0,597	0,593	0,595	0,824
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	1 ^a	0,371	0,424	0,455	0,353	0,329	0,364	0,314	0,649
	2 ^a	0,418	0,401	0,392	0,403	0,389	0,296	0,380	0,664
	3 ^a	0,481	0,446	0,341	0,455	0,458	0,324	0,376	0,677
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 13313	1 ^a	0,788	0,818	0,841	0,907	0,780	0,895	0,803	0,988
	2 ^a	0,785	0,824	0,803	0,881	0,806	0,894	0,915	1,082
	3 ^a	0,825	0,801	0,777	0,846	0,840	0,865	0,928	1,063
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	1 ^a	0,290	0,338	0,349	0,278	0,273	0,354	0,259	0,582
	2 ^a	0,333	0,325	0,336	0,299	0,305	0,320	0,304	0,477
	3 ^a	0,366	0,316	0,318	0,337	0,340	0,339	0,340	0,506

*Valores médios de três leituras

Lactobacillus casei

Cepa patogênica indicadora	Repetição*	Absorbância a 630 nm							
		100 °C /15min	121 °C /15min	α -Quimotripsina	Pronase	Tripsina	Catalase	MRS pH 4.3	Sobrenadante pH 7.0
<i>Escherichia coli</i> 0112	1 ^a	0,442	0,468	0,496	0,456	0,475	0,415	0,403	0,707
	2 ^a	0,463	0,483	0,496	0,454	0,464	0,403	0,454	0,632
	3 ^a	0,513	0,495	0,403	0,444	0,441	0,426	0,487	0,668
<i>Escherichia coli</i> 0124	1 ^a	0,316	0,382	0,455	0,350	0,320	0,334	0,316	0,566
	2 ^a	0,363	0,341	0,360	0,385	0,362	0,289	0,353	0,642
	3 ^a	0,428	0,302	0,303	0,430	0,411	0,255	0,382	0,623
<i>Escherichia coli</i> 0127	1 ^a	0,489	0,547	0,587	0,516	0,467	0,503	0,480	0,842
	2 ^a	0,553	0,533	0,521	0,549	0,516	0,436	0,536	0,815
	3 ^a	0,612	0,522	0,482	0,593	0,563	0,494	0,563	0,841
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	1 ^a	0,355	0,333	0,345	0,387	0,321	0,305	0,320	0,672
	2 ^a	0,373	0,322	0,353	0,357	0,364	0,333	0,379	0,686
	3 ^a	0,422	0,306	0,355	0,420	0,420	0,347	0,419	0,627
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 13313	1 ^a	0,735	0,740	0,812	0,766	0,748	0,795	0,704	1,134
	2 ^a	0,773	0,764	0,722	0,812	0,808	0,783	0,748	1,125
	3 ^a	0,768	0,731	0,697	0,814	0,813	0,784	0,777	1,186
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	1 ^a	0,322	0,334	0,337	0,261	0,253	0,291	0,245	0,561
	2 ^a	0,320	0,315	0,313	0,307	0,284	0,308	0,288	0,491
	3 ^a	0,338	0,298	0,332	0,346	0,332	0,280	0,324	0,494

*Valores médios de três leituras

Lactobacillus fermentum

Cepa patogênica indicadora	Repetição*	Absorbância a 630 nm							
		100 °C /15min	121 °C /15min	α -Quimotripsina	Pronase	Tripsina	Catalase	MRS pH 4.1	Sobrenadante pH 7.0
<i>Escherichia coli</i> 0112	1 ^a	0,210	0,266	0,420	0,326	0,211	0,349	0,275	0,711
	2 ^a	0,310	0,312	0,341	0,402	0,318	0,354	0,320	0,629
	3 ^a	0,417	0,308	0,260	0,419	0,407	0,331	0,369	0,658
<i>Escherichia coli</i> 0124	1 ^a	0,195	0,229	0,301	0,275	0,185	0,230	0,302	0,560
	2 ^a	0,258	0,184	0,259	0,292	0,250	0,201	0,257	0,628
	3 ^a	0,312	0,227	0,219	0,307	0,310	0,255	0,284	0,645
<i>Escherichia coli</i> 0127	1 ^a	0,362	0,381	0,406	0,444	0,308	0,399	0,391	0,807
	2 ^a	0,410	0,356	0,371	0,436	0,368	0,362	0,410	0,837
	3 ^a	0,423	0,345	0,333	0,412	0,410	0,389	0,402	0,832
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	1 ^a	0,319	0,285	0,255	0,280	0,293	0,269	0,298	0,678
	2 ^a	0,309	0,265	0,269	0,294	0,283	0,295	0,247	0,710
	3 ^a	0,268	0,295	0,291	0,259	0,306	0,278	0,273	0,741
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 13313	1 ^a	0,637	0,630	0,605	0,637	0,673	0,677	0,609	1,023
	2 ^a	0,583	0,644	0,620	0,616	0,614	0,648	0,649	1,019
	3 ^a	0,580	0,654	0,667	0,620	0,608	0,654	0,607	1,074
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	1 ^a	0,282	0,273	0,273	0,253	0,226	0,223	0,270	0,496
	2 ^a	0,272	0,239	0,248	0,287	0,247	0,246	0,288	0,554
	3 ^a	0,259	0,269	0,246	0,301	0,259	0,236	0,249	0,545

*Valores médios de três leituras

Lactobacillus plantarum

Cepa patogênica indicadora	Repetição*	Absorbância a 630 nm							
		100 °C /15min	121 °C /15min	α -Quimotripsina	Pronase	Tripsina	Catalase	MRS pH 4.4	Sobrenadante pH 7.0
<i>Escherichia coli</i> 0112	1 ^a	0,441	0,473	0,520	0,452	0,514	0,486	0,412	0,779
	2 ^a	0,470	0,459	0,508	0,448	0,491	0,495	0,450	0,663
	3 ^a	0,540	0,484	0,436	0,490	0,567	0,467	0,508	0,671
<i>Escherichia coli</i> 0124	1 ^a	0,309	0,301	0,420	0,364	0,349	0,336	0,323	0,641
	2 ^a	0,361	0,358	0,371	0,383	0,380	0,354	0,349	0,626
	3 ^a	0,406	0,327	0,319	0,429	0,410	0,335	0,378	0,606
<i>Escherichia coli</i> 0127	1 ^a	0,489	0,546	0,584	0,528	0,531	0,523	0,508	0,797
	2 ^a	0,547	0,558	0,522	0,556	0,561	0,567	0,538	0,823
	3 ^a	0,591	0,525	0,453	0,602	0,582	0,547	0,561	0,785
<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13076	1 ^a	0,389	0,437	0,518	0,400	0,337	0,383	0,498	0,665
	2 ^a	0,431	0,467	0,466	0,457	0,384	0,392	0,403	0,734
	3 ^a	0,476	0,443	0,411	0,508	0,434	0,420	0,406	0,759
<i>Shigella dysenteriae</i> ATCC 13313	1 ^a	0,713	0,844	0,829	0,767	0,786	0,823	0,771	1,132
	2 ^a	0,794	0,844	0,777	0,863	0,872	0,815	0,783	1,298
	3 ^a	0,819	0,805	0,760	0,846	0,928	0,809	0,804	1,153
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	1 ^a	0,313	0,317	0,366	0,362	0,339	0,352	0,317	0,621
	2 ^a	0,330	0,323	0,344	0,375	0,370	0,339	0,328	0,516
	3 ^a	0,358	0,355	0,318	0,322	0,361	0,348	0,339	0,523

*Valores médios de três leituras