

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

JULIA CRISTINA FERNANDES

**Desenvolvimento e caracterização de uma formulação probiótica contendo
*Veillonella atypica***

Lorena

2023

JULIA CRISTINA FERNANDES

**Desenvolvimento e caracterização de uma formulação probiótica contendo
*Veillonella atypica***

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

Orientador: Prof. Dr. Anuj Kumar

Co-orientador: Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha

Versão Corrigida

Lorena

2023

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

Fernandes, Julia Cristina

Desenvolvimento e caracterização de uma formulação probiótica contendo *Veillonella atypica* / Julia Cristina Fernandes; orientador Anuj Kumar - Versão Corrigida. - Lorena, 2023.

97 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2023

1. *Veillonella atypica* atcc 17744. 2. Probióticos. 3. Caracterização in vitro. 4. Alimentos funcionais. I. Título. II. Kumar, Anuj, orient.

BIOGRAFIA

Julia Cristina Fernandes nasceu no dia 23 de novembro de 1990, na cidade de Campinas-SP. Em 2010 ingressou no curso de Engenharia Bioquímica na Escola de Engenharia de Lorena- EEL da Universidade de São Paulo, onde desenvolveu projeto em nível de iniciação científica no Departamento de Biotecnologia, tendo como objetivo avaliar condições de cultivo de *Bacillus thuringiensis* para produção de bioinseticida contra a larva do mosquito *Aedes aegypti*. Após a conclusão dos créditos acadêmicos, estagiou em uma empresa do setor sucroalcooleiro, onde avaliou a aplicação de ferramentas de controle de qualidade Análise Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), o que sustentou o seu Trabalho de Conclusão de Curso – TCC.

Em 2016 ingressou no mercado de trabalho como analista do controle de qualidade em uma empresa de produção de aditivos para ração animal, desenvolvendo atividades relacionadas ao controle de *Salmonella* em rações de aves e suínos, bem como proferindo palestras abordando as Boas Práticas de Fabricação em instalações de clientes, além de participar de auditorias internas e externas para melhoria dos processos.

Em 2018, iniciou seus estudos em nível de pós-graduação *latu sensu* em Gestão da Segurança de Alimentos no Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial SENAC - Campinas SP. Neste curso teve a oportunidade de aprimorar seus conhecimentos nas áreas de microbiologia e ferramentas da qualidade que foram utilizadas nos treinamentos corporativos nos quais participou como analista de pós vendas na empresa produtora de aditivos para ração animal.

Em 2020, deu continuidade aos 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. Assim, deu continuidade à sua vida acadêmica e sua dissertação foi sustentada no desenvolvimento e caracterização de uma preparação probiótica, contendo *Veillonella atypica* ATCC 17744, no tocante as suas propriedades probióticas.

“A mais bela experiência que alguém pode viver é o mistério. É ele a verdadeira fonte da arte e da ciência. Quem não se emociona, quem já não possui o dom de maravilhar-se, mais valia que estivesse morto, porque os seus olhos estão fechados.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por todo amparo e resiliência que me deu para chegar aqui, me dando coragem para enfrentar meus medos e incertezas, me sustentando em todas as horas.

À minha amada família, em especial minha mãe Cristina que é minha conselheira, amiga e psicóloga de todas as horas e que me apoiou para que eu mudasse o rumo da minha carreira. Ao meu padrasto Marcos que sempre esteve do lado apoiando e incentivando. Meu irmão Leandro e minha cunhada Andréia, que sempre me aconselham e querem meu melhor. À minha tia Rosana, que foi e é minha inspiração na carreira acadêmica e que está sempre disposta a me ajudar sempre que necessário. Aos meus avós Ilda e Teodoro que foram meus alicerces na infância e que levo comigo em meus pensamentos todos os dias. Ao meu sobrinho e afilhado Eduardo que trouxe alegria às nossas vidas.

Ao meu orientador, prof. Anuj Kumar, pelo apoio durante esse período e ao meu coorientador, prof. Ismael Maciel de Mancilha, pela amizade, paciência, ensinamentos e confiança em mim depositada. À prof(a) Maria das Graças, que sempre esteve disposta a me ajudar com ideias e planejamentos dos experimentos.

Às minhas amigas de uma vida, Veridiana, Tatiana, Marta, Raisia, Lainy e Ana por todo apoio, longas horas de conversas nos momentos difíceis e por nunca me deixarem desistir. À Viviane por toda ajuda no início conturbado do mestrado, me auxiliando a retomar a vida de laboratório com seus conhecimentos e amizade. À Fernanda, meu maior presente no mestrado, me ajudando, aconselhando e que tivemos muitos momentos de descontração que fizeram essa jornada ser muito mais leve, se tornando uma grande amiga que vou levar para toda a vida.

À minha família de Lorena, Marcos, Meire e Antônio que me ajudaram nessa jornada até aqui.

Ao pessoal do Laboratório Analytical Science, em especial à Ivone que me auxiliou em diversos momentos de dificuldade do experimento. Ao laboratório de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, na realização de parte dos experimentos e que me permitiram acompanhar tais análises.

À Universidade de São Paulo (USP), à Escola de Engenharia de Lorena (EEL) e em especial ao Departamento de Biotecnologia (DEBIQ), pela disponibilização da área de laboratórios.

Por fim, a todas as pessoas que indiretamente ou diretamente contribuíram seja de forma profissional ou pessoal para que este trabalho fosse realizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

FERNANDES, J. C. **Desenvolvimento e caracterização de uma formulação probiótica contendo *Veillonella atypica***, 2023. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

A procura por alimentos funcionais tem sustentado a descoberta de novas cepas microbianas que apresentem propriedades probióticas, destacando-se *Veillonella atypica* ATCC 17744 como cepa promissora. Desta forma, este trabalho, a princípio, teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de uma formulação probiótica contendo a referida cepa, direcionada para atletas. Porém a avaliação sensorial da formulação objeto deste estudo não foi aprovada pelo Comitê de Ética, devido à escassez de comprovações científicas que garantissem o seu consumo seguro, o que resultou na reprogramação das atividades. Desta forma, procedeu-se a caracterização *in vitro* da referida cepa com vistas a estudar características relativas à segurança, bem como propriedades funcionais, como tolerância ao estresse (pH, sais biliares e simulação do trato gastrointestinal), capacidade de adesão (hidrofobicidade, auto-agregação e formação de biofilme), atividade antipatogênica, atividade antioxidante, resistência à antibióticos, síntese de gelatinase, lipase, catalase, e atividade hemolítica. Os resultados de tolerância ao estresse evidenciaram que a cepa em estudo é sensível ao pH em valores inferiores a 4,00, porém não se observou redução da viabilidade celular em pH 3,00 na presença de pepsina bem como na presença de 0,3 e 0,6% de sais biliares. Quanto ao teste de hidrofobicidade, esta cepa apresentou média tolerância ao tolueno e baixa ao xileno. No tocante à síntese de biofilme observou-se a formação de um biofilme fraco após 48 horas de incubação. Verificou-se também que esta cepa não apresentou propriedade antipatogênica contra *Streptococcus aureus* e *Escherichia coli*, assim como apresentou baixa atividade antioxidante pelo método DPPH. Em relação aos testes de segurança, a referida cepa apresentou sensibilidade aos antibióticos testados e em relação a síntese de enzimas, demonstrou ser incapaz de sintetizar gelatinase, lipase, beta-hemólise e catalase. Conclui-se que os resultados do presente trabalho são satisfatórios e que novos estudos são necessários para garantir a utilização segura desta formulação.

Palavras-chave: *Veillonella atypica* ATCC 17744. Probióticos. Caracterização *in vitro*. Alimentos funcionais

ABSTRACT

FERNANDES, J. C. **Development and characterization of a probiotic formulation containing *Veillonella atypica***, 2023. 97p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

The search for functional foods has supported the discovery of new microbial strains that have probiotic properties, highlighting *Veillonella atypica* ATCC 17744 as a promising strain. Therefore, this work, at first, had as objective the development and characterization of a probiotic formulation containing the mentioned strain, directed to athletes. However, the sensory evaluation of the formulation object of this study was not approved by the Ethics Committee, due to the lack of scientific evidence that would guarantee its safe consumption, which resulted in the reprogramming of activities. Thus, the *in vitro* characterization of said strain should be carried out with a view to studying safety characteristics, as well as functional properties, such as stress tolerance (pH, bile salts and simulation of the gastrointestinal tract), adhesion capacity (hydrophobicity, auto - aggregation and biofilm formation), antipathogenic activity, antioxidant activity, antibiotic resistance, synthesis of gelatinase, lipase, catalase, and hemolytic activity. The stress tolerance results showed that the strain under study is sensitive to pH at values lower than 4.00, but no reduction in cell viability was observed at pH 3.00 in the presence of pepsin as well as in the presence of 0.3 and 0.6% bile salts. As for the hydrophobicity test, this strain showed medium tolerance to toluene and low tolerance to xylene. With regard to biofilm synthesis, the formation of a weak biofilm was observed after 48 hours of incubation. It was also verified that this strain did not show antipathogenic properties against *Streptococcus aureus* and *Escherichia coli*, as well as showing low antioxidant activity by the DPPH method. Regarding the safety tests, the referred strain showed sensitivity to the antibiotics tested and regarding the synthesis of enzymes, it proved to be incapable of synthesizing gelatinase, lipase, beta-hemolysis and catalase. It is concluded that the results of this work are satisfactory and that new studies are needed to guarantee the safe use of this formulation.

Keywords: *Veillonella atypica* ATCC 17744. Probiotics. *In vitro* characterization. Functional foods.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de regulação da barreira funcional intestinal (Rodrigues et al. 2016).....	25
Figura 2. Via Metilmalonil-CoA, adaptado de Scheiman et al (2019).....	28
Figura 3. Metabolismo de lactato conforme modelo proposto da interação microbioma-exercício físico (Scheiman et al 2019)	32
Figura 4. Estrutura química de inulina (Silva, 2010).....	46
Figura 5. Curva de calibração em relação a atividade antioxidante do radical DPPH ao Trolox (μM).....	55
Figura 6. Desempenho de <i>Veillonella atypica</i> ATCC 17744 em meio BHIL (UFC/ml).....	60
Figura 7. Avaliação do pH durante o crescimento de <i>Veillonella atypica</i> ATCC 17744 em meio BHIL	60
Figura 8. Viabilidade celular de <i>Veillonella atypica</i> ATCC 17744 em meio BHIL em diferentes valores de pH.....	61
Figura 9. Viabilidade celular de <i>Veillonella atypica</i> ATCC 17744 em meio BHIL contendo diferentes concentrações de sais biliares	62
Figura 10. Viabilidade celular de <i>Veillonella atypica</i> ATCC 17744 em meio BHIL contendo pepsina e pancreatina	63
Figura 11. Caracterização da hidrofobicidade de <i>Veillonella atypica</i> ATCC 17744 após diferentes tempos de contato com xileno e tolueno.....	66
Figura 12. Caracterização da Auto-Agregação de <i>Veillonella atypica</i> ATCC 17744 após 24 horas em PBS.....	67
Figura 13. Microplaca relativa ao Teste da formação de biofilme por <i>Veillonella atypica</i> ATCC 17744 conforme descrito em M&M - item 3.4.2.3	92

Figura 14. Teste gelatinase: tubos contendo meio BHIL com gelatina **A)** em estado líquido após 24 e 48 de incubação ; **B)** em banho de gelo; **C)** em estado sólido após banho de gelo, conforme descrito em M&M – item 3.4.5.2 93

Figura 15. Teste Lipase – Placa de petri evidenciando a ausência de halos – conforme descrito em M&M - item 3.4.5.3..... 93

Figura 16. Teste atividade hemolítica – placas de petri evidenciando ausência de formação de halos, conforme descrito em M&M – item 3.4.5.5 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição e função das células que compõem a barreira intestinal (Oliveira e Hammes, 2016).....	24
Tabela 2. Comportamento de <i>Veillonella atypica</i> ATCC 17744 na presença de diferentes antibióticos.....	73
Tabela 3. Valores de Absorbância referentes aos testes de formação de biofilme A) ensaio 1 e B) ensaio 2, conforme descrito em M&M – 3.4.2.3	92
Tabela 4. Valores médios de Absorbância referentes aos testes de formação de biofilme obtidos nos ensaios 1 e 2, conforme descrito em M&M – 3.4.2.3.....	92

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
	MICROBIOTA HUMANA.....	19
2.1	FATORES QUE INFLUENCIAM A FORMAÇÃO E EQUILÍBRIO DA MICROBIOTA DO TGI .	21
	2.2.1 Barreira intestinal.....	23
2.2	PROBIÓTICOS	26
	2.3.1 <i>Veillonella atypica</i>	28
2.3	PROBIÓTICOS E O DESEMPENHO DE ATLETAS	29
2.4	PROPRIEDADES PROBIÓTICAS <i>in vitro</i>	32
	2.5.1 Tolerância ao Estresse.....	33
	2.5.2 Capacidade de Adesão	34
	2.5.3 Atividade Antipatogênica	37
	2.5.4 Características funcionais.....	39
	2.5.5 Avaliação de Segurança.....	41
2.6	PREBIÓTICOS	45
	2.6.1 Inulina.....	46
3	MATERIAL E MÉTODOS	48
3.1	MICROORGANISMO	48
3.2	MEIO E CONDIÇÕES DE CULTIVO	48
3.3	DESEMPENHO DE <i>Veillonella atypica</i> ATCC 17744 EM MEIO BHIL	49
3.4	AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE <i>Veillonella atypica</i> ATCC 17744 <i>in vitro</i>	49
	3.4.1 Tolerância ao estresse.....	50
	3.4.2 Capacidade de Adesão	51
	3.4.3 Atividade Antipatogênica	53
	3.4.4 Características funcionais – Atividade Antioxidante	54
	3.4.5 Avaliação de Segurança.....	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE <i>Veillonella atypica</i> ATCC 17744 EM MEIO BHIL	58
4.2	AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE <i>Veillonella atypica</i> ATCC 17744 <i>in vitro</i>	60
	4.2.1 Tolerância ao estresse:.....	60
	4.2.2 Capacidade de Adesão	64
	4.2.3 Atividade Antipatogênica	68

4.2.4 Características funcionais – Atividade Antioxidante	70
4.2.5 Avaliação de Segurança.....	71
5 CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS.....	76
APÊNDICE A.....	86
1. ENSAIO 1: Desempenho de <i>Veillonella atypica</i> ATCC17744 em meio formulado com leite reconstituído (10% v/v).....	86
2. ENSAIO 2: Variação do pH de <i>Lactobacillus helveticus</i> em meio formulado com leite reconstituído (10% v/v).....	87
3. ENSAIO 3: Desempenho de <i>Veillonella atypica</i> ATCC17744 em co-cultura com <i>Lactobacillus helveticus</i> em meio formulado com leite reconstituído (10%v/v)	87
.....	87
4. ENSAIO 4: Desempenho de <i>Veillonella atypica</i> ATCC 17744 em meio formulado com leite reconstituído (10% v/v) enriquecido com inulina (1% v/v).....	88
.....	88
5. ENSAIO 5: Desempenho de <i>Veillonella atypica</i> ATCC 17744 em co-cultura com <i>Lactobacillus helvético</i> em meio formulado com leite reconstituído (10% v/v) e enriquecido com inulina (1% v/v).....	89
6. Compilação dos resultados que demonstram a variação do pH nos ensaios 1,2 e 3	90
7. . Compilação dos resultados que demonstram a variação do pH nos ensaios 4 e 5	90
APÊNDICE B.....	91
ANEXO A : Certificado de Análise - Antibiograma e Antimicrobiana.....	93
ANEXO B: Certificado de Análise - Atividade Antioxidante	96
ANEXO C: Certificado de Análise - Atividade Hemolítica.....	97

1 INTRODUÇÃO

Na atualidade tem se observado que as pessoas se preocupam com a qualidade de vida e bem-estar, adotando um estilo de vida que consiste da prática de exercícios físicos e de cuidados com a alimentação. Desta forma, a procura por alimentos que conferem benefícios a saúde tem aumentado e com isso o interesse por alimentos funcionais contendo microrganismos probióticos e compostos prebióticos vem se destacando.

Neste contexto, é relevante destacar que estudos têm revelado que após a prática de exercícios físicos, a microbiota do trato gastrointestinal (TGI) dos atletas é alterada. Assim, em estudos realizados com atletas de alto desempenho, pré e pós maratona, foi demonstrado o predomínio de espécies de bactérias como *Veillonella atypica* na microbiota do TGI de atletas voluntários, com destaque para aqueles que apresentaram melhor performance. Em experimentos, onde avaliou-se a inclusão de *Veillonella atypica* na dieta de ratos, observou-se que estes animais apresentaram desempenho superior, equivalente a 13% na execução de exercícios, em relação ao grupo controle. Considerando a escassez de estudos no tocante ao desenvolvimento e avaliação de preparações probióticas contendo a referida espécie, o presente trabalho considera como hipótese que **“*Veillonella atypica* ATCC 17744 apresenta propriedades probióticas relevantes que justificam sua incorporação em formulações de alimentos funcionais”**. Desta forma, a princípio, esta pesquisa teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização, de um alimento probiótico contendo *Veillonella atypica* ATCC 17744 associada a outras espécies de microrganismos probióticos, bem como com compostos prebióticos. Como parte deste desenvolvimento destaca-se a avaliação sensorial do alimento proposto, cujo procedimento foi submetido à apreciação de um Comitê de Ética devidamente constituído. Assim, tendo em vista a escassez de estudos relativos ao desenvolvimento de formulações de alimentos funcionais contendo *Veillonella atypica* ATCC 17744, o referido Comitê de Ética não encontrou argumentos que pudessem sustentar a aprovação do procedimento submetido, devido a escassez de comprovações científicas que garantam o consumo seguro de preparações probióticas contendo a referida espécie. Neste contexto, vale destacar que, até o momento da submissão do projeto para apreciação do comitê de ética, uma série de experimentos foi desenvolvida, cujos resultados encontram-se apresentados no Apêndice A. Assim,

tornou-se necessário reprogramar as atividades com vistas a contribuir para viabilizar a utilização de *Veillonella atypica* ATCC 17744 em formulações de alimentos funcionais. Desta forma, optou-se pela realização de uma série de testes *in vitro* visando comprovar as propriedades probióticas desta espécie. Assim, o presente trabalho teve como objetivo geral contribuir para o desenvolvimento de alimentos funcionais direcionados para atletas, principalmente aqueles de alto desempenho. Especificamente, uma série de testes *in vitro* foi realizada visando demonstrar as propriedades probióticas de *Veillonella atypica* ATCC 17744 para que esta possa ser devidamente veiculada em formulações de alimentos funcionais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

MICROBIOTA HUMANA

O sistema gastrointestinal é o segundo maior sistema do corpo humano depois do aparelho respiratório e constitui indispensável proteção ao organismo contra o meio externo (Bengmark, 1998), com ênfase para o reconhecimento, seleção, regulação e absorção dos nutrientes. Além destas funções essenciais, glândulas tubulares, presentes ao longo do trato gastrointestinal (TGI), são responsáveis pela secreção de alguns compostos, que associados aos linfócitos intraepiteliais, participam do sistema imune do organismo humano. Estas secreções do TGI, que incluem saliva, muco, suco gástrico e enzimas digestivas, não só promovem a digestão, mas também defendem o organismo contra espécies de microrganismos indesejáveis presentes nos alimentos (Denipote *et al.*, 2010)

De acordo com Damião *et al.* (2009) ao conjunto de bactérias que habitam o sistema gastrointestinal atribui-se a denominação de microbiota intestinal. Do estômago ao cólon, a concentração de microrganismos aumenta, formando uma microbiota complexa de aproximadamente 100 trilhões de bactérias, das quais cerca de 500 espécies diferentes colonizam o intestino grosso.

Bedani e Rossi (2009) relatam que as colônias que habitam este sistema são compostas por espécies autóctones, as quais são membros permanentes, e alóctones, que por sua vez são membros transitórios adquiridos do meio externo .

Segundo Bourlioux (2003), o intestino pode ser considerado um ecossistema complexo composto de 3 componentes principais, os quais estão permanentemente em contato e se interagem uns com os outros: sendo células hospedeiras, nutrientes e microbiota. O termo microbiota intestinal refere-se à população de microrganismos, como bactérias, vírus e fungos, que habita todo o trato gastrointestinal, e que tem como funções manter a integridade da mucosa e controlar a proliferação de bactérias patogênicas no TGI (Toimil, 2019).

De acordo com Machado (2008) as diferentes espécies microbianas presentes na microbiota do TGI humano estão intimamente relacionadas entre si, com destaque para o mutualismo, comensalismo e oportunismo. O mutualismo acontece quando o hospedeiro

é protegido contra invasores e este produz nutrientes essenciais no desenvolvimento do sistema imunológico; o comensalismo se dá quando não há benefício ou malefício ao hospedeiro; e o oportunismo acontece quando doenças são causadas gerando prejuízos ao ser humano. Segundo este autor, embora a maioria dos componentes da microbiota normal ser inofensiva a indivíduos saudáveis e constituir um dos mecanismos de defesa do sistema imunológico, esta consiste ainda de um reservatório de bactérias potencialmente patogênicas ao hospedeiro.

A título de exemplo o autor ressalta que em condições normais, estas populações encontram-se em equilíbrio, porém, em condições adversas, como indivíduos imunocomprometidos, terapias com antibióticos e imunossupressora de transplantados, como radioterapia, quimioterapia ou perfurações das mucosas, pode se observar um desequilíbrio da microbiota resultando no desenvolvimento de espécies oportunistas tendo como consequência a ocorrência de anormalidades na saúde do hospedeiro.

Stürmer *et al.* (2012) reportam que mais de 500 espécies de bactérias estão abrigadas no sistema digestório com distribuição heterogênea ao longo de sua extensão. Logo após o nascimento de um indivíduo, tem início a colonização do trato gastrointestinal do lactente, sendo diversos os fatores que interferem nesse processo, tais como tipo de parto (normal ou cesariana), microbiota intestinal materna, condições de higiene e o tipo de nutrição oferecida ao lactente. O autor ressalta ainda que a microbiota do ser humano torna-se devidamente instalada dos 18 aos 24 meses de idade e tende a ser estável durante toda a vida, contendo de 400 a 1.000 espécies de bactérias, das quais 30 a 40 são as predominantes. Duarte (2007) salienta também que cerca de 3% das espécies são anaeróbias facultativas e 97% são anaeróbias, e numa microbiota saudável predomina em espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

De acordo com Mascarenhas *et al.* (2021) , além dos fatores mencionados, a exposição a antibióticos e fatores relacionados ao estilo de vida, com ênfase para a dieta alimentar, são fatores que interferem na modulação da microbiota intestinal do indivíduo.

Stürmer *et al.* (2012) destacam que espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* são consideradas benéficas, pois realizam atividades biológicas importantes para a manutenção da saúde humana. Alterações podem ser observadas no equilíbrio da microbiota gastrointestinal em condições patológicas, como pelo uso de antimicrobianos e tratamento com imunossupressor ou por ocasião de infecções intestinais. Estudos têm

demonstrado que a seleção bacteriana inicial dentro do trato gastrointestinal seja em parte determinada geneticamente. Os autores exemplificam tal afirmação apresentando uma pesquisa realizada com gêmeos adultos monozigóticos, que moravam em lugares diferentes, mas que, no entanto, encontrou-se semelhança maior na composição da microbiota destes do que entre indivíduos que não eram irmãos gêmeos. Segundo uma hipótese apresentada pelos autores, o genótipo determina o padrão de colonização, através dos sítios de adesão na mucosa intestinal. O padrão desses locais de adesão é geneticamente determinado, o que explicaria a semelhança da microbiota observada entre irmãos monozigóticos.

Mascarenhas *et al.* (2021) relatam ainda que o microbioma intestinal está intimamente relacionado à saúde e às doenças. Outro fator relevante consiste no eixo microbiota-intestino-cérebro que é destacado por Grosicki *et al.* (2020), cujos estudos têm demonstrado uma correlação entre o microbioma intestinal e padrões de comportamento alterados, autismo, e outras doenças de ordem psíquica. Estas descobertas vêm ao longo dos anos mostrando a importância de estudos relacionados à microbiota intestinal.

2.1 FATORES QUE INFLUENCIAM A FORMAÇÃO E EQUILÍBRIO DA MICROBIOTA DO TGI

Lima Maia (2018) relata que a microbiota intestinal pode ter sua composição alterada por diversos fatores. Neste contexto, o autor destaca mudanças na temperatura corporal do hospedeiro, no pH do TGI, tempo de retenção do conteúdo intestinal em determinado segmento do sistema digestivo, além do sistema imunológico do indivíduo. O autor enfatiza que diversas condições influenciam na microbiota do TGI, com destaque para fluxo alimentar que, se for rápido, observa-se no intestino delgado proximal, uma redução no número de bactérias, tendo em vista que algumas espécies são eliminadas junto com o bolo fecal. No tocante ao pH, o autor reporta que se este estiver próximo de 7,00 e a retenção de conteúdo se prolongar, como por exemplo, no intestino grosso, observa-se o favorecimento do desenvolvimento de comunidades microbianas complexas e distintas.

Machado (2008) cita que outros fatores, como espaço (área de contato do órgão do TGI) e nutrientes, também podem interferir na composição da microbiota intestinal. Quando estes fatores não estão limitados, as espécies que apresentam maiores taxas de crescimento predominam, porém, em condições de aumento da população associado a redução da oferta de nutrientes, observa-se que o trato gastrointestinal torna-se ocupado por espécies mais especializadas, resultando em uma microbiota mais complexa

De acordo com Damião *et al.* (2009), o desequilíbrio da microbiota do TGI pode resultar a predominância de espécies patogênicas e oportunistas, sendo portanto, importante a manutenção do equilíbrio desta microbiota para evitar as consequências da disbiose.

Segundo os autores Bedani e Rossi (2009), para manter o equilíbrio da microbiota do TGI alguns fatores são importantes, como a exclusão competitiva dos microrganismos ali presentes em constante competição por nutrientes e sítios de adesão, bem como a inibição de um grupo de microrganismos por metabólitos produzidos por outras espécies, além de predação e parasitismo bacteriano.

Estes autores relatam ainda que este equilíbrio é mantido devido à convivência dinâmica dos seres humanos com os microrganismos. Esta relação é reforçada constantemente através de mecanismos como a exclusão imunológica, a eliminação de caráter imune e a regulação imune. A exclusão imunológica seria a supressão do número de células viáveis por meio da produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão. A eliminação de caráter imune seria a alteração do metabolismo microbiano, por meio do aumento ou da diminuição da atividade enzimática. A regulação imune seria o estímulo da imunidade do hospedeiro pelo aumento dos níveis de anticorpos e aumento da atividade dos macrófagos.

De acordo com Maia *et al.*, (2018), a interação entre as espécies de microrganismos e o hospedeiro é capaz de influenciar de forma benéfica a saúde humana, uma vez que as bactérias componentes da microbiota intestinal exercem funções antibacterianas, imunomoduladoras e metabólicas.

Ramos (2006) reporta que a principal função da microbiota consiste na resistência à colonização ou efeito de barreira imunológica, a qual pode ser entendida como a capacidade de impedir ou reduzir a colonização e multiplicação de microrganismos

exógenos patogênicos que adentrem o ecossistema digestivo. Lima Maia *et al.* (2018) ressaltam que entre outros fatores, este impedimento ocorre porque as espécies denominadas autóctones (bactérias permanentes) são capazes de desenvolver essa proteção ocupando os sítios de adesão na mucosa do intestino, impedindo assim que as bactérias alóctones (bactérias transitórias adquiridas do meio externo) tenham onde se aderir.

De acordo com Lima Maia *et al.* (2018), o desequilíbrio da microbiota pode trazer sérios prejuízos, como a multiplicação de microrganismos patogênicos. Estas perturbações podem ser prevenidas com a ingestão de probióticos, que são capazes de interferir das espécies indesejáveis ao hospedeiro. Desta forma, as espécies de bactérias residentes no intestino necessitam se manter em equilíbrio para funcionarem como barreira efetiva contra organismos patogênicos e oportunistas.

2.2.1 Barreira intestinal

Um dos mecanismos de defesa do corpo humano é conhecido como barreira intestinal. Oliveira e Hammes (2016) consideram que o intestino está em constante exposição a microrganismos potencialmente patogênicos. Porém, de acordo com Abbas *et al.* (2011) e com Yu (2012) da mesma forma que o sistema imune do intestino é eficaz em sua função de proteção, combatendo os invasores, também é tolerante aos microrganismos autóctones.

Segundo Ramiro-Puig *et al.* (2008) o epitélio intestinal funciona como uma barreira física que restringe a entrada de moléculas antigênicas, ao mesmo tempo em que se encontra em equilíbrio com uma quantidade enorme de macronutrientes e microrganismos. Segundo Cresci e Bawden (2015) e Natividad e Verdu (2013), a barreira intestinal pode ser alterada por diversos fatores como doenças, medicamentos, hormônios, citocinas e toxinas exógenas.

Oliveira e Hammes (2016) reportam que o grau de perturbação causado na barreira intestinal é variável e sua duração depende do tipo e da presença do estímulo agressor. Relatam também que o sistema de defesa intestinal é composto por células que apresentam como característica uma alta taxa de renovação epitelial, conforme caracterizado na Tabela 1.

Tabela 1. Composição e função das células que compõem a barreira intestinal (Oliveira e Hammes, 2016)

Células	Função
Enterócitos	Representam 80% de todas as células epiteliais no intestino. Possuem junções apertadas bastantes eficientes, o que auxilia a separação entre conteúdo lumenais e o interior do epitélio. Podem atuar como células apresentadoras de antígenos, expressando moléculas MHC (<i>major histocompatibility complex</i>) classe II e receptores do tipo <i>Toll</i>
Células calciformes	Responsáveis pela produção de mucina intraluminal. Mucinas, eletrólitos e proteoglicanos formam o muco que reveste a superfície das vilosidades intestinais e mantém os vários componentes patogênicos separados do epitélio. O muco também é capaz de aprisionar antígenos e bactérias, os quais podem ser hidrolisados - tornando-se menos alergênicos - ou ser excretados com auxílio dos movimentos peristálticos intestinais.
Células Enteroendócrinas	Responsáveis pela secreção de hormônios intestinais.
Células de Paneth	Responsáveis pela produção de proteínas antimicrobianas que auxiliam na defesa do hospedeiro contra a entrada de microrganismos invasores. A atuação dessas células estabelece uma barreira física contra o contato com a superfície das células epiteliais subjacentes, criando assim a primeira linha de defesa contra a invasão microbiana.

Oliveira e Hammes (2016) descrevem a barreira imunológica intestinal como sendo composta pelo tecido linfóide associado ao intestino e por imunoglobulinas. O tecido linfóide abriga cerca de 30% dos linfócitos do corpo, onde são encontradas as placas de Peyer, que de acordo com Abbas *et al.*(2011) e Acheson e Luccioli (2004), são recobertas pelas chamadas células M, que capturam antígenos no lúmen para que as células dendríticas apresentem o antígeno.

De acordo com Oliveira e Hammes (2016) os lipopolissacarídeos (LPS) são componentes da parede celular de bactérias gram-negativas que tem a capacidade de induzir a resposta inflamatória e danificar a barreira intestinal do hospedeiro. Desta forma, os LPS são reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro e são capazes de induzir resposta inflamatória de ataque assim que são identificados. Os LPS são considerados endotoxinas, uma vez que podem induzir inflamação crônica mesmo que em baixas concentrações. Assim, as etapas que integram o mecanismo de regulação da barreira funcional intestinal encontram-se ilustradas na Figura 1.

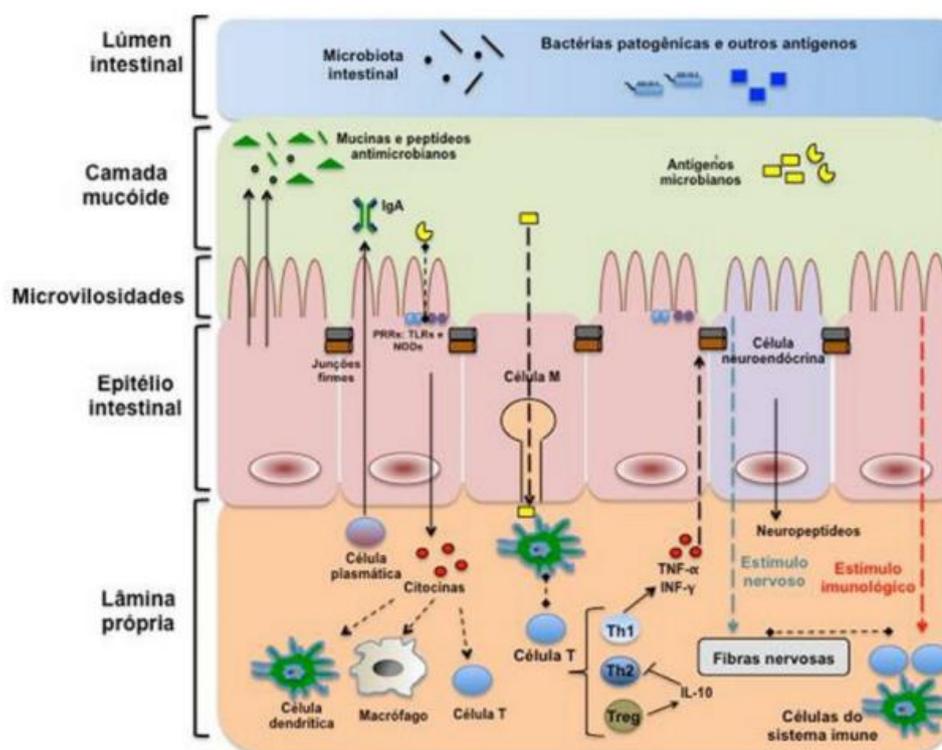


Figura 1. Mecanismo de regulação da barreira funcional intestinal (Rodrigues et al. 2016)

De acordo com Abbas *et al.* (2011) e Ramiro-Puig *et al.* (2008), as imunoglobulinas luminiais também são responsáveis por captar antígenos ou microrganismos e podem impedir que esses se liguem com os receptores das células do hospedeiro, reduzindo assim a resposta inflamatória. Oliveira e Hammes (2016) citam que a imunoglobulina A (IgA) secretória é a principal representante da imunidade humoral, na qual atuam os anticorpos encontrados no plasma sanguíneo do intestino, sendo que sua produção pode ser influenciada pela microbiota comensal, que é constituída pelas espécies de bactérias permanentes do hospedeiro.

De acordo com Oliveira e Hammes (2016), os componentes microbianos presentes no intestino podem induzir uma resposta inflamatória no hospedeiro, reconhecendo padrões moleculares associados aos patógenos como sendo agentes invasores. Esse reconhecimento promove uma sinalização de alerta ao organismo e desta forma, os TLR (toll-like receptor) como são chamados esses receptores, têm como função essencial sinalizar a presença de patógenos ao organismo.

2.2 PROBIÓTICOS

De acordo com Fuller (1989) probióticos são definidos como suplementos alimentares à base de microrganismos vivos, que beneficiam o hospedeiro, promovendo o balanço de sua microbiota intestinal.

Diversas outras definições de probióticos tem sido publicadas ao longo dos anos (Saad, 2006), entretanto, atualmente a definição internacional preconizada pela FAO e WHO (2001) é a mais aceita e reporta que probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Neste contexto, França *et al.* (2021), descrevem que os probióticos têm como funções manter a integridade e o equilíbrio do trato gastrointestinal assim como apresentar ação antibiótica, impedindo a propagação e invasão de bactérias patogênicas ao hospedeiro.

Segundo Fernandez (2015), o interesse por alimentos probióticos tem sido observado pela comunidade científica, bem como por indivíduos que primam pela qualidade de vida, tendo em vista os inúmeros benefícios conferidos por esses microrganismos para a saúde do hospedeiro. O autor ressalta ainda que para se verificar esses benefícios há a necessidade do consumo de uma quantidade mínima diária de células de microrganismos probióticos, sendo a dose mínima recomendada entre 10^8 - 10^9 UFC, correspondente a 100g de produto que contenha de 10^6 - 10^7 UFC/g. Desta forma, esses microrganismos devem ser mantidos viáveis durante a vida de prateleira do produto, conforme afirma Moroti *et al.* (2009).

Pauli (2020) reporta que os efeitos benéficos dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos e efeitos imunológicos, resultando um aumento da resistência imunológica do hospedeiro contra patógenos. De acordo com Saad (2006), a suplementação da dieta com espécies probióticas estimula o desenvolvimento das espécies benéficas, em detrimento à proliferação de espécies potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro

Segundo Gibson *et al.* (2004), as características desejáveis de espécies probióticas consistem na sua sobrevivência às condições adversas do trato gastrointestinal; não apresentar propriedades tóxicas ou patogênicas ao hospedeiro; ser estável e permanecer viável durante sua estocagem; apresentar capacidade antagônica às espécies indesejáveis

do trato gastrointestinal; e apresentar propriedades comprovadas de benefícios ao hospedeiro. Freitas (2011) relata que a eficácia de um produto probiótico é estritamente dependente da quantidade e características das cepas de microrganismos utilizadas na sua elaboração.

Duarte (2007) descreve que as espécies de bactérias consideradas probióticas são gram positivas, se apresentam na forma de cocos ou bacilo, não esporogênicas e fermentadoras de açúcares produzindo principalmente ácido láctico, além de outros compostos, como por exemplo, ácido acético, etanol e CO₂. Brito *et al.* (2013) salientam ainda que estas espécies são anaeróbias, anaeróbias facultativas ou microaerófilas e que pertencem às espécies dos gêneros: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus faecium* e *Bacillus*.

Como mecanismos de ação, Coppola e Turnes (2004) destacam a exclusão competitiva, em que as espécies probióticas competiriam com os patógenos/opportunistas por sítios de fixação e por nutrientes, impedindo sua ação transitoriamente. Assim, a exclusão competitiva explicaria a necessidade da administração continuada em elevadas doses dos microrganismos probióticos, para observar seus efeitos. Os autores relatam ainda que os microrganismos probióticos podem também interferir no desenvolvimento de espécies patogênicas por meio da ação de bacteriocinas, além de ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio. Rosa e Teodoro (2022) citam vários mecanismos para elucidar os efeitos anticarcinogênicos provocados por espécies probióticas, destacando o estímulo da resposta imune do hospedeiro, como por exemplo aumentando a atividade fagocitária, alterações na atividade metabólica da microbiota intestinal, diminuição do pH, entre outros.

Coppola e Turnes (2004) reportam ainda que estes efeitos anticarcinogênicos dos microrganismos probióticos podem ser atribuídos à inibição da atividade de enzimas pro-carcinogênicas ou pela estimulação do sistema imune do hospedeiro. Relatam que, a administração de *Lactobacillus casei* foi relacionada com a indução de uma resposta antitumoral mediada por células T e a ativação de macrófagos assim como a supressão da formação de tumores de cólon em camundongos e a inibição de metástases pulmonares.

Duarte (2007) reporta que os principais mecanismos de ação estudados demonstram a capacidade das células probióticas em aderir ao epitélio intestinal, sua agregação aos microrganismos patogênicos, o efeito hipocolesterolêmico, a

imunomodulação, o efeito anti-carcinogênico e a exclusão competitiva. A maioria dos probióticos pode interagir com a membrana intestinal, formando uma barreira que evita a aderência dos microrganismos indesejáveis.

2.3.1 *Veillonella atypica*

De acordo com Han *et al.* (2020), *Veillonella atypica* pertence à família Veillonellaceae e ao gênero *Veillonella*, é uma bactéria Gram-negativa e cocos anaeróbio. As espécies deste gênero, incluindo a *V. atypica*, são bem conhecidas por sua habilidade de fermentar o lactato, produzindo propionato e acetato, por meio da via metilmalonil-CoA, conforme mostrado na Figura 2. A *V. atypica* pode ser encontrada no intestino e na mucosa oral de mamíferos e desempenha diversas funções em diferentes nichos.

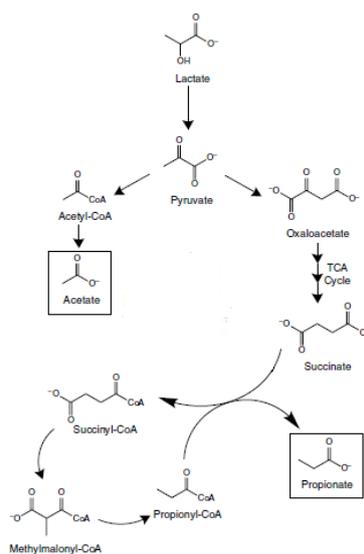


Figura 2. Via Metilmalonil-CoA, adaptado de Scheiman et al (2019)

De acordo com Mashima e Nakazawa (2015) na área de odontologia, sabe-se que a *Veillonella spp.* oral, incluindo *V. atypica*, juntamente com *Streptococcus spp.*, são conhecidos como colonizadores precoces e responsáveis pela formação de biofilme e auxiliam o desenvolvimento de placas dentárias.

De acordo com Nancharaiah e Lensa (2015) o ciclo bioquímico do selênio está recebendo maior atenção por parte da comunidade científica, uma vez que este é um elemento essencial tanto na natureza quanto para o corpo humano. No corpo humano, este elemento tem função antioxidante, prevenindo o envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer. Na natureza esse ciclo desempenha um papel

importante na mineralização de carbono e nitrogênio por meio da respiração anaeróbica bacteriana e a poluição por ele, pode causar danos ecológicos significativos. Assim, os autores comprovaram que *V. atypica*, é capaz de reduzir metais, com transformar selenito biogênico em selênio, desempenhando assim um papel importante no ciclo do selênio.

Recentemente, Scheiman *et al.* (2019) reportaram que a abundância relativa de *Veillonella* intestinal em atletas está significativamente associada ao desempenho destes em corrida de maratona e realizaram um estudo com camundongos alimentados por gavagem com *Veillonella atypica*, sendo constatado que os ratos do grupo experimental apresentaram melhora do tempo de corrida em esteira.

2.3 PROBIÓTICOS E O DESEMPENHO DE ATLETAS

De acordo com Souza e Bueno (2013), as práticas alimentares que promovam a boa saúde e o desempenho ideal são de interesse dos atletas, técnicos, médicos e nutricionistas, tendo em vista que atletas de alto nível, principalmente aqueles não profissionais, podem apresentar a microbiota do TGI alterada. Estes autores relatam ainda que a prática de exercícios físicos exige bastante do organismo em termos de nutrientes, sendo que, se o atleta tiver uma alteração da microbiota do TGI, pode resultar o aumento das espécies patogênicas/opportunistas e conseqüentemente pode ser observada uma redução na concentração de vitaminas, inativação de enzimas, produção de toxinas cancerígenas e destruição da mucosa intestinal, levando a uma menor síntese e absorção de nutrientes. Esta situação pode ser regularizada com o uso de alimentos probióticos que promovem um equilíbrio da microbiota intestinal, garantindo assim uma melhor absorção dos nutrientes e conseqüentemente, melhoria da performance física do atleta.

Exercícios extenuantes podem inclusive inibir a imunidade inata pela redução da proteção da mucosa do trato gastrointestinal, mas estudos têm demonstrado que a administração de probióticos incrementa o sistema imune da mucosa em atletas de elite submetidos a treino exaustivos (Souza e Bueno, 2013).

Pumpa *et al.* (2019) estudaram a eficácia de probióticos sobre a incidência e gravidade de infecções respiratórias e gastrointestinais em atletas de elite jogadores de rugby da Austrália em uma temporada de competições internacionais. Este estudo foi

sustentado em uma pesquisa, desenvolvida por médicos especializados em medicina esportiva, que revelou que doenças gastrointestinais são comuns em atletas de elite após recuperação de uma lesão. Neste contexto, os autores reportaram que nos Jogos Olímpicos de Inverno em 2018 na Coreia do Sul, foi relatada a incidência de 5,4% manifestações de doenças em atletas, sendo 47% relacionadas ao sistema respiratório e 21% ao sistema gastrointestinal. Assim, uma das abordagens consideradas na medicina do esporte é o potencial de bactérias e leveduras probióticas na redução da incidência de doenças do trato respiratório superior e do trato gastrointestinal.

Neste trabalho os autores avaliaram os efeitos dos probióticos na incidência e gravidade de infecções gastrointestinais em jogadores de rugby durante uma temporada de competição internacional, considerando como parâmetros de avaliação associações entre biomarcadores salivares de estresse (cortisol, alfa-amilase) e imunidade da mucosa (s-IgA). Dos 19 atletas avaliados, 9 receberam um suplemento probiótico (Ultrabiótico® 60 - uma mistura encapsulada de bactérias probióticas contendo 60 bilhões de bactérias viáveis de *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum* e *Streptococcus thermophilus*) e SB Floractiv® 250 mg composto de *Saccharomyces boulardi*. Outros 10 atletas receberam um placebo (controle), consumidos juntamente com alimentos duas vezes ao dia. Os resultados revelaram que 5 infecções foram observadas nos atletas, das quais 3 deles do grupo controle.

Os resultados revelaram que os probióticos podem minimizar a incidência de infecções relacionadas ao sistema respiratório e gastrointestinal de atletas, por meio do aumento da imunidade da mucosa. Assim, verificaram que o probiótico avaliado promoveu aumento do nível de alfa-amilase salivar, a qual desempenha papel relevante no sistema de defesa do hospedeiro.

A literatura é escassa no tocante aos estudos relativos ao papel da microbiota do TGI em atletas de alto desempenho. Desta forma, Petersen *et al.* (2017) realizaram sequenciamento metagenômico completo do genoma e metatranscriptômico para estudar a composição da microbiota do TGI de ciclistas que competem em níveis profissional e amador. Os resultados revelaram a existência de uma microbiota intestinal comum em indivíduos que têm uma rotina rica em exercícios físicos. Assim, concluíram que a

atividade física interfere positivamente na composição da microbiota do TGI embora os respectivos efeitos dessa microbiota nestes atletas permaneçam ainda desconhecidos.

De acordo com Scheiman *et al.* (2019) na microbiota do TGI de atletas são encontradas espécies do gênero *Veillonellaceae*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Methanobrevibacter* e *Akkermansia*. A fim de estudar o efeito destas espécies no desempenho atlético e no estado de recuperação muscular dos atletas, os autores recrutaram 15 atletas corredores de maratona e 10 indivíduos sedentários, como controle. Assim, procedeu-se ao sequenciamento de DNA ribossômico 16S (rDNA) desses atletas em amostras de fezes coletadas diariamente no período de uma semana antes e uma semana após o dia da maratona.

Os resultados deste trabalho revelaram que a predominância de espécies do gênero *Veillonella* é uma característica da microbiota destes atletas em relação ao grupo controle. Observaram também que o domínio desta espécie é influenciado pelas atividades pré e pós-exercício, o que levantou a necessidade de se avaliar a influência desta espécie no desempenho dos atletas.

Neste contexto, Scheiman *et al.* (2019) avaliaram a influência de *Veillonella atypica*, isolada do TGI de maratonistas, no desempenho físico de 32 camundongos. Os animais foram então submetidos a exercício físico em esteiras até a exaustão, 5 horas após o recebimento das suspensões de células. Aos animais do grupo controle, por 2 semanas, foram administrados por gavagem uma suspensão de *Lactobacillus bulgaricus*; e, do grupo tratamento, uma suspensão de *Veillonella atypica*. *Lactobacillus bulgaricus* foi escolhido como controle devido à sua incapacidade de catabolizar o lactato, mimetizando assim a carga bacteriana, sem afetar o metabolismo do lactato. A cepa *Veillonella atypica*, foi isolada diretamente de amostras fecais de corredores de maratona. Os resultados mostraram que os camundongos que receberam *V. atypica* permaneceram na esteira em tempos de execução máximos significativamente maiores que os camundongos tratados com *L. bulgaricus*. Scheiman *et al.* (2019) demonstraram ainda que os ratos tratados com *V. atypica* apresentaram desempenho, em média, 13% superiores em relação ao grupo controle.

Os resultados obtidos por Scheiman *et al.* (2019) revelaram que não só o gênero *Veillonella* predomina na microbiota de atletas após o exercício, mas as vias que essas espécies utilizam para metaboliza

o lactato é também importante, tendo em vista que o lactato sistêmico resultante da atividade muscular durante o exercício físico entra no lúmen do trato gastrointestinal e é metabolizado pela *Veillonella*, conforme ilustrado na Figura 3.

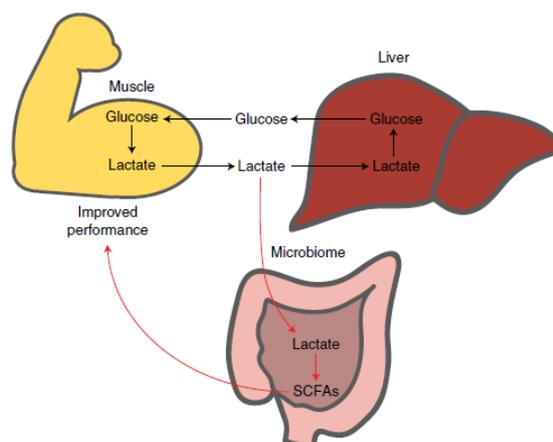


Figura 3. Metabolismo de lactato conforme modelo proposto da interação microbioma-exercício físico (Scheiman *et al.* 2019)

As setas vermelhas representam as etapas propostas pelos autores, onde primeiramente, o lactato produzido no músculo entra no lúmen intestinal através da circulação sanguínea e no intestino será metabolizado como fonte de carbono por microrganismos específicos, como espécies de *Veillonella*.

Scheiman *et al.* (2019) concluíram que a microbiota pode ser um importante componente do desempenho físico de atletas. Os resultados obtidos mostraram que no sistema gastro intestinal de atletas corredores de maratona ocorre predominância de espécies do gênero *Veillonella* após o término das provas.

Estes resultados revelam a necessidade de pesquisas visando o desenvolvimento de preparações probióticas contendo *Veillonella atypica*, as quais teriam os seus efeitos avaliados no desempenho de atletas amadores.

2.4 PROPRIEDADES PROBIÓTICAS *in vitro*

De acordo com De Oliveira Coelho *et al.* (2019) a seleção de microrganismos que apresentam propriedades probióticas requer uma abordagem sistemática usando estratégias com vistas a selecionar cepas seguras e que apresentem propriedades

probióticas devidamente avaliadas e comprovadas. Estes autores reportam ainda que, as referidas estratégias consistem de uma sequência de procedimentos com vistas a selecionar cepas que apresentam propriedades funcionais desejáveis, bem como ausência de características indesejáveis. Neste contexto, no presente trabalho o procedimento adotado consistiu na avaliação de *V. atypica* ATCC 17744 no tocante às características, descritas abaixo, as quais são consideradas relevantes para que esta cepa possa ser utilizada na formulação de alimentos funcionais.

2.5.1 Tolerância ao Estresse

Segundo De Oliveira Coelho *et al.* (2019), após a ingestão, as células probióticas são submetidas a situações adversas no trato gastrointestinal (TGI), tais como pH baixo, presença de suco gástrico e pepsina no estômago, creatina e sais biliares no intestino, além de choque térmico leve causado pela temperatura interna do corpo em comparação com temperatura do alimento probiótico se encontrava anteriormente à sua ingestão. Desta forma, uma cepa probiótica deve apresentar mecanismos de tolerância para sobrepor estas situações desfavoráveis as quais são submetidas.

Omura (2014) reporta que o estômago apresenta baixo pH, em torno de 2,50 a 3,50 e a pepsina ali presente apresenta ação antimicrobiana, sendo que a combinação destes fatores permite a formação de uma barreira eficaz frente à entrada de bactérias potencialmente patogênicas no trato intestinal. Neste contexto, o autor relata que, no tocante à resistência ao suco gástrico, a seleção de cepas probióticas, *in vitro*, é realizada considerando uma faixa de valores de pH entre 1,00 e 5,00. Além disso, o tempo de trânsito do alimento pelo estômago dura em média 90 minutos, mas pode atingir até 4 h, dependendo da sua natureza.

Após passarem pelo estresse do pH ácido do estômago, as bactérias se deparam com os sais biliares presentes no intestino (mais especificamente no duodeno). Estes sais constituem a maior parte dos componentes da bile e tratam-se de uma estrutura anelar de colesterol ligada à aminoácidos (glicina ou taurina) por ligações amida. A natureza anfifílica destes sais faz deles emulsificantes, solubilizando a gordura ingerida, bem como vitaminas lipossolúveis, facilitando sua digestão e absorção, além de agir nos lipídeos da membrana celular das bactérias, destruindo-a (Begley *et al.*, 2005). Alguns

microrganismos no TGI, tais como enterococos, bacteroides, bifidobactérias e outros, são capazes de hidrolisar as ligações amida destes sais pela atividade enzimática da hidrolase de sais biliares, criando sais biliares desconjugados pela separação da glicina e taurina, reduzindo os efeitos tóxicos dos sais biliares conjugados (Aries *et al.*, 1969 e Du Toit *et al.*, 1998). No entanto, Kurdi *et al.* (2006) relata que sais biliares desconjugados ainda podem ser capazes de danificar a membrana celular da bactéria, causando sua morte.

Sousa (2013) avaliando cepas de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis* quanto à resistência às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, observou uma taxa de sobrevivência acima de 90%, concluindo-se que o sorvete desenvolvido pode chegar em número de células viáveis suficientes ao sistema gastrointestinal do hospedeiro para ser considerado probiótico. Com o mesmo propósito Oliveira (2013) estudou a sobrevivência de cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium lactis*, incorporadas em queijo de cabra, e observou por testes trato intestinais *in vitro*, que todas as cepas sobreviveram em contagens superiores a 5,5 log UFC/g, caracterizando o produto como probiótico.

Campos *et al.* (2021) realizaram quatro testes *in vitro* com amostras de lactobacilos de seis leites fermentados comerciais comumente encontrados em mercados. As amostras testadas apresentaram boa resistência ao meio gástrico *in vitro* assim como resistência ao desafio *in vitro* com sais biliares, apresentando média de 40% de inibição. O teste gastrointestinal simulado não reduziu mais de um Log10 da população microbiana, o que é esperado para cepas apresentarem efeitos probióticos ao hospedeiro.

2.5.2 Capacidade de Adesão

Algumas características precisam ser consideradas para a classificação de um microrganismo como probiótico, entre elas pode-se destacar a adesão a mucosa intestinal, que pode ser considerada uma colonização transitória (Wang *et al.*, 2015) e a formação de agregados com outros microrganismos. Adesão é um processo complexo que envolve mecanismos não específicos (hidrofobicidade) e específicos de receptores e ligantes. Aderência de células é usualmente relatada com característica de superfície celular (Collado *et al.*, 2008). Assim, a habilidade “preditiva” de adesão das células é mais

facilmente detectada quando se reconhece as propriedades como hidrofobicidade e de auto-agregação das cepas (Lima *et al.*, 2016).

A habilidade de formar agregados celulares, desde que esses agregados possam aumentar a aderência microbiana no intestino, promovem vantagens na colonização do trato gastrointestinal (García-Cayuela *et al.*, 2014). Células de leveduras por serem maiores e mais pesadas que as bactérias, podem ser capazes de formar mais rapidamente precipitados em alta proporção (Gil-Rodríguez *et al.*, 2015).

De Oliveira Coelho *et al.* (2019) afirmam que a adesão de células microbianas às células epiteliais do TGI é um processo complexo envolvendo as membranas das respectivas células (microbianas e humanas) que depende da estrutura química e físico-química da superfície celular da cepa probiótica. Esse processo depende do equilíbrio das interações eletrostáticas e de Van der Waals na superfície alvo, que, segundo Boonaert e Rouxhet (2000) e Duary *et al.* (2011), envolve constituintes extracelulares bacterianos.

De acordo com De Oliveira Coelho *et al.* (2019), a adesão de células microbianas às células epiteliais do TGI depende da capacidade de autoagregação das mesmas, bem como das propriedades hidrofóbicas da superfície celular. Estes autores relatam ainda que a capacidade de autoagregação das células microbianas permite que as células probióticas atinjam uma elevada densidade celular no intestino, contribuindo assim com o mecanismo de adesão, enquanto a hidrofobicidade da superfície celular permite uma melhor interação entre a célula microbiana as células epiteliais humanas.

Segundo Salas-Jara *et al.* (2016) as bactérias podem ser encontradas na natureza sob as formas de bactérias planctônicas flutuantes livremente, bem como na forma de colônias imóveis de células formando biofilmes. Biofilme é definido por Donlan e Costerton (2002) como “uma comunidade imóvel microbiana caracterizada por células que estão irreversivelmente ligadas a um substrato, superfície ou entre si, sendo incorporados em uma matriz constituída de substâncias poliméricas extracelulares que estas produzem e exibem um fenótipo alterado em relação à taxa de crescimento e transcrição gênica”.

A formação e desenvolvimento de biofilmes são afetados por múltiplos fatores, incluindo a cepa, as propriedades da superfície celular e parâmetros ambientais, como pH, concentração de nutrientes e temperatura (Donlan e Costerton, 2002). Segundo Terraf *et al.* (2012) a formação de biofilme por bactérias probióticas, pode ser considerada uma

característica desejável, pois podem favorecer a colonização, bem como a permanência das células aderidas na mucosa do hospedeiro, evitando assim a colonização por espécies patogênicas.

Segundo De Oliveira Coelho *et al.* (2019), a característica de hidrofobicidade contribui para uma maior interação entre a célula microbiana e as células epiteliais do hospedeiro e a capacidade de auto-agregação celular permite que a cepa probiótica atinja uma alta densidade celular no intestino.

De Oliveira Coelho *et al.* (2019), avaliaram as características probióticas de *Lactobacillus satsumensis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas de kefir enriquecido com mel, cujos resultados revelaram que as características de auto-agregação e hidrofobicidade mantiveram-se estáveis atingindo níveis de agregação superiores a 80% após 24 h. De acordo com Saulnier *et al.*, (2009) esses valores de autoagregação indicam que as referidas cepas probióticas podem atingir uma alta densidade celular no intestino e afirmam também que cepas que apresentam afinidade com o tolueno (nos testes de hidrofobicidade) são fortes doadoras de elétrons, o que revela que estas apresentam boa capacidade de colonização do intestino. Assim, De Oliveira Coelho *et al.* (2019) demonstraram que a cepa *Leuconostoc mesenteroides* não apresentou característica de hidrofobicidade (0%), ao passo que *S. cerevisiae* aumentou sua hidrofobicidade com o tempo de exposição, atingindo 70% após 90 min de experimento em ambos os solventes, ao passo que *L. satsumensis* após neste período atingiu 44% em xileno e 81% em tolueno.

Propriedades probióticas apresentadas por cepas de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus fermentum* foram estudadas por Souza (2018) para sustentar o desenvolvimento de formulações de alimentos funcionais. Os resultados revelaram que a maioria das cepas avaliadas apresentou elevada capacidade de autoagregação, variando de 60,97 a 96,18%, tendo como consequência uma significativa capacidade de aderir à superfície da mucosa intestinal. Esta característica contribui para colonização adequada do TGI e portanto para os efeitos benéficos resultantes da ação destas cepas, tais como, estímulo do sistema imunológico, bem como a competição com cepas patogênicas no TGI. No tocante a característica de hidrofobicidade, Souza (2018), reportou valores médios de hidrofobicidade em torno de 60%, sendo que para as cepas de *Lactobacillus casei* estes valores variaram entre 9,66 a 69,36 %, e para *Lactobacillus fermentum* valores entre 0,30 a 68,81%. Segundo Ubbink e Schär-Zammaretti (2003) a característica de

hidrofobicidade está relacionada ao acesso das bactérias probióticas à mucosa, no entanto, este não é um pré-requisito forte para caracterizar a força de adesão às células epiteliais do hospedeiro.

Terraf *et al.* (2012) avaliaram a capacidade de formação de biofilmes em diferentes condições de cultivo por espécies de *Lactobacillus* vaginais e demonstraram que esta propriedade foi significativamente influenciada pela cepa, pelo meio de cultura, concentração do inóculo e natureza química do suporte utilizado (lamínulas de vidro e microplacas de poliestireno). Assim, demonstraram que a formação de biofilme é uma propriedade benéfica apresentada por algumas cepas, tendo em vista que esta propriedade era atribuída às espécies patogênicas, bem como a dificuldade de eliminação frente à resistência dos biofilmes.

2.5.3 Atividade Antipatogênica

Em relação a atividade antimicrobiana, apresentada por cepas probióticas, De Oliveira Coelho *et al.* (2019), relataram que quando estas estão aderidas ao TGI sintetizam compostos extracelulares que apresentam atividades antimicrobianas, os quais são resultantes do metabolismo de carboidratos, proteínas e outros compostos menores, tais como ácidos orgânicos, enzimas, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e peptídeos. Outros mecanismos de antagonismo microbiano incluem a exclusão competitiva que consiste na competição por nutrientes e sítios de adesão, bem como, coagregação com células patogênicas e estimulação do sistema imunológico (Lebeer *et al.*, 2008). Essas atividades variam de acordo com a cepa microbiana (Vera-Pingitore *et al.*, 2016; Verón *et al.*, 2017).

Neste contexto, Costa *et al.* (2012) avaliaram duas cepas de *Lactobacillus* e uma de *Bifidobacterium*, isoladas do intestino humano, no tocante a capacidade de exercer ação antimicrobiana sobre *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* e *S. Enteritidis* e metabólitos produzidos em caldo de cultivo estático e em agitação para simular condições de anaerobiose a aerobiose. Os resultados demonstraram que as cepas avaliadas apresentaram efeito de inibição sobre o crescimento das cepas patogênicas estudadas. Além disso, foi possível observar o efeito do oxigênio sobre a produção de substâncias tóxicas aos microrganismos indicadores, evidenciando que *Lactobacillus* cultivados em

aerobiose, parece produzir metabólitos com maior efeito inibitório, enquanto que, para a linhagem de *Bifidobacterium*, o efeito foi oposto.

Pehrson (2013) avaliou cepas de *Lactobacillus*, incluindo *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum* e *L. plantarum* com relação a capacidade de sintetizar substâncias que apresentam efeito antimicrobiano sobre espécies patogênicas, intestinais gram-negativas, como *Escherichia coli* (3 cepas distintas), *Shigella sonnei*, *Shigella dysenteriae* e *Salmonella Enteritidis*, avaliando a atividade inibitória de substâncias presentes no sobrenadante livre de células de cada cepa. A caracterização presuntiva das substâncias responsáveis pela inibição do crescimento microbiano foi realizada submetendo os respectivos sobrenadantes a diferentes tratamentos (catalase, enzimas proteolíticas, tratamento térmico e neutralização do pH). A estratégia pelo autor consistiu na avaliação do crescimento, determinado por turbidimetria, das cepas patogênicas na presença do sobrenadante in natura e tratado. Os resultados mostraram que *L. acidophilus*, *L. casei* e *L. plantarum* foram capazes de inibir 5 das 6 cepas patogênicas avaliadas, em níveis de inibição variando de 23% a 53%, sendo que a cepa *S. dysenteriae* não teve seu crescimento inibido pelas cepas de *Lactobacillus* avaliadas. O autor demonstrou também que apenas de *L. fermentum* 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.

Andrade *et al.* (2014) avaliaram, *in vitro*, o potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra e constataram que as cepas avaliadas apresentaram atividade antagonista sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* var. *Typhimurium* e *Enterococcus faecalis*. Recentemente, Silva *et al.* (2021) estudaram o potencial probiótico de três cepas bacterianas empregadas na formulação de alimentos funcionais, sendo estas *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactococcus lactis*. Os autores observaram que nenhuma das cepas estudadas foi capaz de inibir o crescimento de espécies patogênicas como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Os autores ressaltaram ainda sobre a importância de se levar em consideração que testes *in vitro* nem sempre expressam as condições *in vivo*, uma vez que diversos fatores relacionados ao hospedeiro, bem como ao alimento funcional, interferem no mecanismo de resposta e atuação das espécies probióticas.

2.5.4 Características funcionais

Segundo De Oliveira Coelho *et al.*, (2019) os microrganismos que apresentam propriedades probióticas contém em sua constituição componentes celulares, bem como sintetizam moléculas que contribuem para sua ação funcional, incluindo antioxidantes, enzimas, ácidos orgânicos de cadeia curta, peptídeos, vitaminas essenciais e minerais, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Os compostos com ação antioxidante produzidos pelas espécies probióticas incluem superóxido dismutase, glutathione dismutase, ácido ascórbico, melatonina e glutathione, que protegem o corpo humano contra altos níveis de radicais de oxigênio que causam danos aos lipídios, proteínas e DNA (Schieber e Chandel, 2014). De acordo com Ferreira (2021) os antioxidantes podem atuar nos organismos na proteção de células contra radicais livres, impedindo que os mesmos sejam formados e reparando os danos já causados. O autor classifica estes compostos como antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, sendo que os enzimáticos bloqueiam a iniciação de reações de oxidação onde as enzimas são responsáveis pela remoção das espécies reativas ao oxigênio e os não enzimáticos interagem com os radicais consumindo-os durante a reação.

Durante o processo de fermentação as bactérias sintetizam, além de ácidos orgânicos, diversos compostos bioativos com atividade antioxidante (Almeida *et al.*, 2011).). As propriedades antioxidantes demonstradas em leites fermentados de bovinos e de camelo sugerem que, além do seu valor nutricional, estes também são considerados alimentos funcionais que podem ser empregados na formulação de novos alimentos que contribuem para a saúde do consumidor (Ferreira, 2021).

Para a determinação do potencial antioxidante dos alimentos funcionais utiliza-se do método de radicais livres que consiste em medir a perda de cor de uma solução composta por radicais estáveis DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) que apresenta cor violeta quando na presença de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio, baseando-se portanto na transferência de elétrons de um composto antioxidante para uma molécula (Brand-Williams *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 2005). Duarte-Almeida *et al.* (2006) complementam mencionando que os resultados da atividade antioxidante são obtidos pelo decaimento da

absorbância da amostra em estudo em relação ao controle, sendo o resultado expresso em porcentagem de sequestro de radicais livres (%) que pode ser expressa através da equação: $\text{Atividade \%} = (\text{Acontrole} - \text{Aamostra}) / \text{Acontrole}$

Neste contexto De Oliveira Coelho *et al.* (2019), avaliaram, utilizando o método DPPH, a capacidade antioxidante de três cepas probióticas: *Lactobacillus satsumensis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Saccharomyces cerevisiae*, as quais foram isoladas de kefir enriquecido com mel. Desta maneira, as cepas analisadas foram tratadas de duas formas distintas, onde para avaliar a atividade antioxidante intracelular, foi necessário obter-se o conteúdo intracelular por homogeneizador ultrassônico. Os resultados revelaram que as cepas avaliadas apresentaram a capacidade de produzir compostos antioxidantes intra e extracelulares, em valores variando entre 22 e 27%, sendo que o *L. satsumensis* e *S. cerevisiae* apresentaram a maior atividade intracelular e extracelular, respectivamente. Assim, os autores concluíram que a ingestão desse alimento funcional poderia aumentar a quantidade de antioxidantes no organismo por secreção extracelular ou por lise de células microbianas (componentes intracelulares) no TGI, uma vez que apresentaram atividade antioxidante em ambos os componentes (intra e extracelulares).

Com o objetivo formular uma bebida fermentada probiótica à base de extrato hidrossolúvel de amêndoas enriquecido com óleos de açaí e pequi, com adição de farinha de linhaça, Guimarães *et al.* (2020) avaliaram a atividade antioxidante das formulações desenvolvidas, pelo método DPPH. Neste trabalho os autores formularam o que foi denominado de bebida base, consistida em fermento láctico probiótico contendo culturas superconcentradas de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidocacterium* e *Streptococcus thermophilus*, com calda de morango, sucralose e farinha de linhaça. Esta bebida base foi então enriquecida com óleo de açaí e com óleo de pequi. Os valores de DPPH reportados pelos autores foi 42,4% para a bebida de base, com o óleo de açaí de 43,6% e com o óleo de pequi 50,9%. Os resultados demonstram a qualidade nutricional expressas na riqueza do potencial antioxidante dessas formulações com alta funcionalidade a prevenção de agravos patológicos, caracterizando o produto desenvolvido como alimento de base funcional.

2.5.5 Avaliação de Segurança

De acordo com Culligan *et al.* (2009) o risco de provocar infecção por meio do consumo de alimentos que contenham microrganismos vivos deve ser avaliado. Desta forma, as cepas probióticas devem ser seguras para o consumo e, portanto consideradas GRAS (Generally Recognized As Safe) (Culligan *et al.*, 2009). Neste sentido, algumas iniciativas adotadas pela comunidade europeia (The European Union Novel Food Regulation, QPS e PROSAFE), Estados Unidos (FDA e OMS) e Canadá (Health Canada: NHPR) têm sido direcionado para o estabelecimento de critérios para a avaliação de segurança de microrganismos probióticos para uso humano e animais domésticos. Assim, segundo De Oliveira Coelho *et al.* (2019), as recomendações comuns incluem registros de histórico de isolamento, identificação taxonômica e ausência de genes de virulência, infectividade, toxicidade e resistência a antibióticos transferíveis.

2.5.5.1 Resistência a antibióticos

Segundo Omura (2014) antibióticos são substâncias químicas que possuem atividade bactericida ou bacteriostática sobre microrganismos, podendo ser sintetizados por bactéria e, fungos e apresentam diferentes mecanismos de ação. Neste contexto Grillo *et al.* (2013) alertam para o risco da utilização de antibióticos, uma vez que estes foram desenvolvidos para o tratamento de doenças microbianas. Assim, seu uso tem se tornando cada vez mais desafiador, pois além de perturbar a eubiose intestinal, o emprego empírico e indiscriminado destas drogas pode levar ao desenvolvimento de resistência bacteriana e, conseqüentemente, desencadear o surgimento de infecções causadas por microrganismos multirresistentes. Desta forma, é imprescindível o conhecimento do perfil de sensibilidade aos antibióticos das bactérias que estão diretamente associadas a infecções, bem como o mecanismo de disseminação desta resistência.

De acordo com Omura (2014), e os mecanismos de resistência a antibióticos estão sustentadas em quatro estratégias: i) inativação da droga; ii) prevenção da chegada da droga ao seu alvo; iii) redução da suscetibilidade ao alvo; ou iv) aquisição de genes de resistência que conferem diferentes mecanismos de resistência. Klein (2011) relata que

as cepas probióticas apresentam variada resistência aos antimicrobianos, devido às suas características intrínsecas ou por aquisição de genes que conferem mecanismos de resistência. Este autor explica que a resistência intrínseca está baseada nas características naturais do microrganismo, como fisiologia e peculiaridades estruturais da cepa (características da parede celular ou perda da função ativa do antibiótico). Já a resistência adquirida pode ser transferida horizontalmente entre bactérias e resulta da mutação no genoma bacteriano ou aquisição de genes de resistência por meio de processos de conjugação (requer transferência pelo contato célula-célula), transdução (transferência genética por intermédio de bacteriófagos) e transformação (absorção de DNA solúvel a partir do meio por células doadoras) (Mathur e Singh, 2005).

De acordo com Omura (2014) transposons - que são elementos de DNA que codificam uma enzima chamada transposase, responsável pela mobilização desse elemento no genoma, através de um mecanismo de "corte e cola" - podem também contribuir para transferência de genes, onde segmentos podem saltar ou transferirem entre eles a partir de uma molécula de DNA (plasmídeo, cromossomo) para outra (plasmídeo, cromossomo, fago) dentro de uma única célula. Klare *et al.*, (2007) relata que cepas bacterianas que carregam genes de resistência adquirida a antibióticos, não devem ser utilizadas em alimentos, a menos que haja comprovação de que tal fenótipo seja resultante de mutação cromossômica.

Luciano (2016) avaliou o potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus* spp. isoladas de subprodutos do processamento de frutas e sua sensibilidade a antimicrobianos. Os resultados revelaram que a maioria das cepas testadas exibiram resistência aos antimicrobianos, em especial à kanamicina, eritromicina e tetraciclina e o autor salientou a necessidade de novos estudos para garantir a sua segurança para que estas cepas possam ser veiculadas em alimentos funcionais. Neste contexto, Silva (2018) avaliou o potencial probiótico de bactérias lácticas isoladas de leite de cabra, sendo estas *Weissella cibaria* (LS1), *Lactococcus lactis subsp. lactis* (LS2, LS3 e DF04Mi) e *Lactobacillus plantarum*. Os resultados mostraram que os isolados avaliados foram sensíveis aos antibióticos ampicilina, gentamicina, cloranfenicol, tetraciclina e clindamicina, permitindo considerar os isolados como possíveis candidatos a cepas probióticas.

Barbosa *et al.*, (2021) isolaram do Kombucha uma espécie de bactéria do ácido láctico e identificada como *Pediococcus acidilactici*, que foi submetida aos testes de segurança com ênfase para os testes de resistência a antibióticos. Os resultados revelaram

que a referida cepa apresentou sensibilidade à ampicilina, cefalotina, gentamicina, eritromicina e tetraciclina, sendo resistente apenas à ciprofloxacino. Assim, os autores concluíram que este alimento funcional é seguro para o consumo.

2.5.5.2 Enzimas relacionadas à patogenicidade: Gelatinase, Lipase, Beta-hemólise e Catalase

De acordo com Omura, (2014), os fatores de patogenicidade, também conhecidos como fatores de virulência, referem-se a mecanismos comuns observados entre várias espécies patogênicas e estão relacionados a atividades de enzimas específicas, tais como gelatinase, lipase, catalase e atividade hemolítica não são desejadas nas bactérias que serão utilizadas como probióticas.

No tocante a síntese de hemolisina, Husain (2008) reporta que esta ocorre devido ao requerimento de íons de ferro, micronutriente fundamental, que é utilizado como cofator enzimático no desenvolvimento de microrganismos patogênicos. Vesterlund et al. (2007) relatam que este teste tem por objetivo investigar a capacidade das cepas em ocasionar anemia e edema no indivíduo hospedeiro, visto que a produção de hemolisina é um fator de virulência por conta do consumo do ferro pelas bactérias patogênicas que a possuem. Omura (2014) classifica os resultados desta análise como alfa-hemolítica (grande capacidade de consumir ferro), beta-hemolítica (baixa capacidade de consumir ferro) e gama hemolítica (incapacidade de consumir ferro).

Em relação a atividade da enzima gelatinase, Omura (2014) reporta que se trata de uma enzima proteolítica capaz de hidrolisar gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros peptídeos bioativos e que está associada à inflamação e virulências em humanos e animais. Desta forma, torna-se relevante caracterizar cepas probióticas no tocante a capacidade de sintetização de tal enzima. De acordo com Fisher e Phillips (2009) a principal função da gelatinase na patogenicidade das cepas que a possuem é a obtenção de nutrientes a partir da degradação do tecido hospedeiro.

No tocante a caracterização relativa à atividade lipolítica, Brito (2021) reporta que esta tem como objetivo investigar a capacidade das cepas em degradar lipídios de cadeia longa. Segundo Xie *et al.* (2012) essa característica é considerada como fator de

virulência presente em cepas patogênicas, uma vez que provoca acúmulo dessa enzima no sangue do hospedeiro.

Em relação a catalase, concentrações Martín e Suárez (2010) reportaram que esta é uma enzima intracelular sintetizada por algumas espécies de microrganismos que tem a função de decompor o peróxido de hidrogênio, que apresenta ação antagonista a bactérias patogênicas. Os autores enfatizam ainda que este constitui um mecanismo de defesa microbiano não-específico eficaz mesmo em baixas concentrações de peróxido de hidrogênio presente. Neste contexto, Alvim (2015) relata que peróxido de hidrogênio é oxidado pelas enzimas peroxidases gerando halogênios e isocianetos, que atuam como agentes antibacterianos sobre espécies patogênicas, por meio da ruptura da membrana celular e interrupção da síntese proteica.

Paula *et al.* (2011) relatam que as bactérias do ácido lático são boas produtoras de peróxido de hidrogênio. Como estas espécies não sintetizam a catalase, o peróxido de hidrogênio é acumulado, contribuindo para o efeito inibitório sobre os patógenos que não sintetizam catalase. De acordo com Alvim (2015), a maioria das cepas probióticas é representada por bactérias do ácido lático que são catalase-negativo.

Barbosa *et al.*, (2021) como visto anteriormente, estudaram os aspectos de segurança e funcionalidade do *Pediococcus acidilactici* que foi isolado de Kombucha. Além dos testes com antibióticos já comentados, os autores também testaram a cepa com relação à atividade hemolítica e gelatinase, sendo estes negativos, o que possibilitou concluir que o isolado de Kombucha é candidato à segurança para consumo humano.

Brito (2021) avaliou 97 cepas de bactérias ácido-láticas isoladas da fermentação espontânea do fruto amazônico bacupari (*Rheedia gardneriana*), considerando as características de virulência como atividade de gelatinase, síntese de lipase e atividade hemolítica. Como resultado, duas cepas isoladas, apresentaram resultados negativos quanto a atividade de gelatinase e lipolítica, e apenas uma delas apresentou resultado gama-hemolítica (incapacidade de consumir ferro). Uma vez que de todas as cepas isoladas, apenas esta apresentou potencial probiótico baseado nas análises de segurança realizadas, o autor então a identificou como sendo *Weissella jogaejeotgali*.

Machado (2021) avaliou, *in vitro*, cepas de bactérias do ácido lático, isoladas de kefir e kombucha, considerando aspectos de segurança em relação às atividades de gelatinase e hemolisina, reportando resultados negativos para ambos os testes.

2.6 PREBIÓTICOS

Prebióticos são definidos por Raizel *et al.* (2011) como sendo ingredientes alimentares utilizados como substratos para crescimento dos microrganismos dos intestinos, não digeridos no intestino delgado ao atingirem o intestino grosso, são metabolizados seletivamente por um número limitado de bactérias benéficas. Sendo assim, estes compostos interferem na composição da microbiota do cólon auxiliando o crescimento e a proliferação das bactérias benéficas, principalmente espécies de lactobacilos e bifidobactérias, induzindo assim efeitos fisiológicos importantes para a saúde do hospedeiro.

Os compostos prebióticos são constituídos essencialmente por carboidratos de tamanhos diferentes, tais como mono, dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos, os quais são encontrados na cebola, chicória, alho, alcachofra, cereais, aspargos, raízes de almeirão, beterraba, banana, trigo e tomate, sendo também encontrado no mel, açúcar mascavo e em tubérculos (Raizel *et al.*, 2011).

De acordo com Ghosh *et al.* (2021), para que os oligossacarídeos possam ser considerados prebióticos estes devem ser resistentes ao pH do trato gastro intestinal e às enzimas digestivas, para que consigam atingir o cólon e ser metabolizado pelas bactérias benéficas do TGI.

Gupta *et al.* (2022), reportam que a microbiota intestinal benéfica, presente no cólon do hospedeiro seletivamente metaboliza os prebióticos como substrato gerando ácidos orgânicos de cadeia curta, os quais, de acordo com Oniszcuk *et al.* (2021), apresentam propriedades imunomoduladoras e interferem positivamente na integridade da barreira imunológica intestinal

De acordo com Pier *et al.* (2020) dentre os prebióticos comumente utilizados destacam-se a inulina, frutooligossacarídeos (FOS), galactooligossacarídeos (GOS), lactulose, polidextrose, isomaltooligossacarídeos, xilooligossacarídeos (XOS) e lactitol, dentre outros.

2.6.1 Inulina

A inulina é um polissacarídeo composto por unidades de β -D-frutofuranosil, com grau de polimerização entre 2 a 60 unidades e apresenta uma unidade de sacarose na sua extremidade (Figura 3). Por não ser hidrolisada por enzimas digestivas, a inulina é fermentada no cólon, o que lhe confere características prebióticas (Zamarchi *et al.*, 2020).

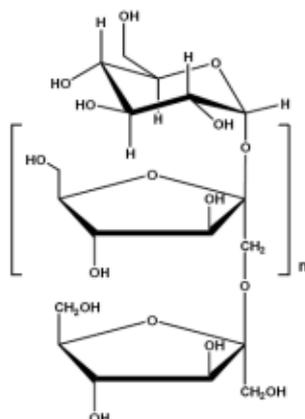


Figura 4. Estrutura química de inulina (Silva, 2010)

Pesquisas sobre os efeitos positivos do consumo de inulina como um agente prebiótico não são recentes. Neste contexto, Salminen *et al.* (1998) destacaram o papel da inulina na manutenção da saúde do colón intestinal, melhorando as funções fisiológicas e imunológicas do organismo contribuindo assim para menor incidência de infecções agudas, diarreia, constipação intestinal e doenças inflamatórias intestinais.

De acordo com Rebequi *et al.* (2016) a inulina é considerada como carboidrato de reserva, sendo geralmente extraída das raízes de plantas como chicória, alho, cebola e banana. A inulina apresenta relevantes propriedades nutricionais, como por exemplo baixo teor de açúcar, baixo valor calórico e baixo índice glicêmico, podendo contribuir para a redução do risco de doenças crônicas não transmissíveis. Os autores ressaltam que o seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis.

De acordo com Rebequi *et al.* (2016) e Zamarchi *et al.* (2020), no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão que regulamenta o uso de inulina em alimentos como massa de pizza, cereais matinais extrusados, bolos

industrializados (muffins), produtos lácteos, de panificação, cárneos e doces em geral, dentre outros.

De acordo com Lemos *et al.* (2019) a inulina apresenta diversas características funcionais, nutricionais e tecnológicas relevantes, permitindo assim combinações adequadas para a melhoria de atributos como sabor e textura de alimentos funcionais. Segundo Macedo *et al.* (2020), a boa solubilidade da inulina permite que esta seja utilizada em produtos lácteos, contribuindo para melhoria da ação das culturas probióticas nos alimentos simbióticos.

Feitosa (2020) avaliaram iogurtes adicionados de diferentes concentrações de mel e de inulina. A inulina foi adicionada a fim de se obter uma formulação funcional ao iogurte, devido suas características prebióticas. Os autores concluíram que a inulina melhorou a estabilidade do iogurte ao longo do tempo de armazenamento devido às suas propriedades como umectante e higroscópico, além de uma melhora na textura do produto.

Peres *et al.* (2020) relatam que a utilização da inulina, como agente funcional, faz com que a resistência de sorvetes a altas temperaturas aumente significativamente. Zamarchi *et al.* (2020) reportam que a inulina confere aumento na viscosidade dos produtos, formando uma espécie de gel, e que, em temperaturas mais baixas, como no caso de sorvetes, este gel é formado mais rapidamente, resultando em um derretimento mais lento.

Silva *et al.* (2019) estudaram a influência de frutooligossacarídeo e inulina sobre o perfil cardiometabólico de ratos Wistar. Para tanto, avaliaram os parâmetros de peso do ceco, ganho de peso, glicemia, triglicerídeos, tecidos adiposo subcutâneo e epididimal, observando efeitos sistêmicos benéficos desses compostos.

Lima Maia *et al.* (2018) reportaram efeito benéfico relativo ao consumo diário de prebióticos como a inulina. A fermentação que ocorre no cólon do hospedeiro é capaz de produzir ácidos orgânicos de cadeia curta (propionato, butirato, acetato), que são importantes para o intestino, pois atuam diminuindo o pH do cólon, além de estimular o crescimento de bactérias benéficas no trato intestinal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMO

Veillonella atypica ATCC 17744, caracterizada no presente trabalho, foi adquirida da American Type Culture Collection, a qual foi devidamente ativada em tubo falcon de 15 ml contendo meio BHI (Brain Heart Infusion), constituído de infuso cérebro-coração (17 g/L), peptona (10 g/L), dextrose (2 g/L), cloreto de sódio (5 g/L), fosfato dissódico (2,5 g/L) e água destilada (1L), adicionado de 10% de lactato (Pantec®, 60% de pureza) (BHIL), conforme proposto por Scheiman et al. (2019). Uma vez preparado, este meio foi esterilizado (121°C/15 min) em autoclave, após a inoculação (5% v/v) da referida cepa e incubado em estufa bacteriológica à 37°C por 48 horas. Em seguida, preparou-se tubos de culturas estoque, as quais foram mantidas sob congelamento (- 6°) em meio BHI (70%) suplementado com glicerol (30%).

3.2 MEIO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Veillonella atypica ATCC 17744, obtida da cultura estoque, foi devidamente ativada em tubos tipo Falcon 15 ml contendo meio BHI, os quais foram inoculados (5% v/v) e incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas em condições de anaerobiose. Para garantir esta condição os referidos tubos foram mergulhados em banho de gelo imediatamente após a etapa de esterilização para induzir a formação de vácuo, conforme preconizado por Silva et al. (2013). Para se certificar da condição de anaerobiose, o mesmo procedimento foi utilizado em um tubo tipo Falcon de 15 ml contendo meio tioglicolato, constituído de (g/L) triptona 15,0; extrato de levedura = 5,0; dextrose = 5,5; cloreto de sódio = 2,5; L-cistina = 0,5; tioglicolato de sódio = 0,5 e resazurina sódica = 0,001 pH 7,10± 0,2 a 25°C. Este meio apresenta coloração amarela em anaerobiose e vermelha em contato com oxigênio.

3.3 DESEMPENHO DE *Veillonella atypica* ATCC 17744 EM MEIO BHIL

Para traçar a curva de crescimento, *Veillonella atypica* ATCC 17744 foi ativada em tubo tipo Falcon de 15 mL contendo 9,5 ml de meio BHIL devidamente inoculado com 0,5 ml do inóculo, obtido da cultura estoque, seguido de incubação em estufa bacteriológica à 37°C por 24 horas. Em seguida, 15 tubos tipo Falcon de 15 ml contendo 9,5 mL de meio BHIL, devidamente esterilizados, foram inoculados com 0,5 ml da cultura previamente ativada seguido de incubação em estufa bacteriológica a 37°C. Amostras, correspondendo a 2 tubos, foram coletadas a cada 12 horas por um período de 48 h, e a partir de então a cada 24 h até a estabilização do pH. Então, cada amostra foi homogeneizada em vórtex por 20 segundos e 1 ml da mesma foi adicionada em 9 ml de solução salina (NaCl 9g/L) e realizada a diluição seriada até a 10⁹ UFC/ml. Feito isso, foi realizado a técnica de pour-plate com meio BHIL suplementado com 15 g/L ágar e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 48 horas para então realizar a contagem das colônias. Após a retirada da alíquota de 1 ml para contagem de viabilidade celular, foi realizada a medição de pH (PG1800 GEHAKA®) no tubo de ensaio contendo o restante do meio fermentado. Este ensaio foi realizado em 2 repetições.

3.4 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE *Veillonella atypica* ATCC 17744 *in vitro*

Tendo em vista a necessidade de se conhecer as propriedades probióticas de *Veillonella atypica* ATCC 17744, visando o desenvolvimento de formulações de alimentos funcionais, uma série de testes, *in vitro*, foi conduzida com o objetivo de caracterizar esta cepa no tocante as seguintes propriedades: tolerância ao estresse (pH, tolerância aos sais biliares, sobrevivência ao trato gastrointestinal), capacidade de adesão (hidrofobicidade, auto-agregação e formação de biofilme), atividade antipatogênica, atividade antioxidante e avaliação de segurança (atividade hemolítica, gelatinase, lipase, resistência a antibióticos, catalase), conforme detalhado a seguir.

3.4.1 Tolerância ao estresse

3.4.1.1 pH

A avaliação de tolerância a estresse por parte de *Veillonella atypica* ATCC 17744, no tocante a resistência ao pH, foi realizada de acordo com metodologia descrita por De Oliveira Coelho *et al.*, (2019) adaptada. Para tanto, cultivou-se *Veillonella atypica* ATCC 17744 em meio BHIL, cujo pH foi ajustado para 2,00; 3,00; 4,00 e 7,00, com soluções de HCl 0,1M e NaOH 0,1M. Os ensaios foram realizados, em duplicata e com repetição, em tubos tipo Falcon de 15 mL contendo 9,5 mL dos respectivos meios, os quais foram inoculados com 0,5 mL de inóculo devidamente ativado, seguido de incubação em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h. Amostras foram coletadas no tempo inicial e após 1, 2, 3 e 4 horas de incubação, sendo então submetidas a diluições em série e cultivadas por pour-plate em Agar BHIL à 37°C por 48 horas para contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) que foram utilizadas para traçar uma curva de crescimento.

3.4.1.2 Sais biliares

A tolerância aos sais biliares, por *Veillonella atypica* ATCC 17744, foi avaliada de acordo como metodologia descrita por De Oliveira Coelho *et al.*, (2019) com modificações. Para tanto, em duplicata e com repetição, 2 tubos tipo Falcon de 15 ml contendo 9,0 ml de meio BHIL contendo 0,3 e 0,6 % (m/v) de bile bovina (Sigma Aldrich®) devidamente esterilizados, foram inoculados com 1,8 ml de inóculo previamente ativado, seguido de incubação em estufa bacteriológica a 37°C. Amostras foram coletadas no tempo inicial e após 1, 2, 3 e 4 horas, as quais foram submetidas a diluições seriadas e cultivadas por pour-plate em Agar BHI a 37°C por 48 horas para contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

3.4.1.3 Tolerância às condições do Trato Gastrointestinal

A sobrevivência de *Veillonella atypica* ATCC 17744 às condições do trato gastrointestinal foi determinada de acordo com metodologia descrita por De Oliveira

Coelho *et al.*, (2019) com modificações. Assim, em duplicata e com repetição, utilizou-se tubos tipo Falcon de 15 ml contendo 10 ml de suco gástrico (0,03g de pepsina, 10 ml de NaCl 0,5% com pH ajustado para 3,00 com HCl 0,1M) e tubos contendo 10 ml de suco pancreático gástrico (0,01g de pancreatina, 10 ml de NaCl 0,5%, cujo pH foi ajustado para 8,00 com NaOH 0,1M). Estas soluções foram devidamente filtradas através de membranas 0,22 mm (Merk®), em capela de fluxo laminar, após o que 0,8 mL de cada solução foram transferidas para cinco tubos Eppendorf cada, os quais foram inoculados com 0,2 mL de inóculo de *Veillonella atypica* ATCC 17744 devidamente ativado, seguido de incubação em estufa bacteriológica a 37°C. Amostras foram coletadas no tempo inicial e após 1, 2, 3 e 4 horas, as quais foram submetidas a diluições seriadas e cultivadas por puor-plate em Agar BHI a 37°C por 48 horas para contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC). A tolerância foi verificada comparando a viabilidade celular inicial do inóculo utilizado e final após a exposição às enzimas e pH de cada meio testado.

3.4.2 Capacidade de Adesão

3.4.2.1 Hidrofobicidade

No tocante a avaliação da capacidade de adesão apresentada por *Veillonella atypica* ATCC 17744, com ênfase para hidrofobicidade, testes foram realizados em conformidade com as metodologias descritas por De Oliveira Coelho *et al.*, (2019) e Vitola (2017) com modificações. Para tanto, em duplicata e com repetição, tubos tipo Falcon de 50 ml contendo 40 ml de meio BHIL foram devidamente inoculados com 2 mL de uma suspensão de células de *Veillonella atypica* ATCC 17744 devidamente ativada, seguido de incubação em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Em seguida a suspensão de células obtida foi centrifugada a 1500 x g por 5 min (NT820 NOVA TECNICA®), lavada três vezes com Solução tampão PBS (0,234 g/L de NaH₂PO₄ e 0,4330 g/L de Na₂HPO₄ em pH 7,2) e suspensa na mesma solução para leitura da densidade ótica a 600 nm, sendo a densidade ótica ajustada, com a suspensão diluída, em PBS, para a obtenção absorvância entre 0,6 e 0,8 (600 nm), sendo esta considerada a absorvância inicial (A0). Em paralelo, 3 tubos de ensaio contendo 1 ml de xileno PA (Synth) e outros 3 tubos de ensaio com 1 mL de tolueno PA (Synth) foram inoculados

com 5 mL de uma suspensão de células de *Veillonella atypica* ATCC 17744 devidamente ativadas e submetidos a agitação em vortex por 1 min., seguido de incubação em estufa bacteriológica a 37°C. Amostras foram coletadas após 30, 60 e 90 min. de incubação e submetidas a leitura da densidade ótica para obtenção dos valores de At para cada solvente. A hidrofobicidade, expressa em %, foi determinada de acordo com a relação proposta por Vitola (2017):

$$\% \text{ Hidrofobicidade} = [(A0 - At) / At] \times 100$$

3.4.2.2 Auto-agregação

Para se avaliar a propriedade de auto-agregação apresentada por *Veillonella atypica* ATCC 17744 utilizou-se da metodologia proposta por Redondo (2008), com modificações. Os experimentos foram conduzidos em duplicata e com repetição, que consistiu na centrifugação, a 1500 x g por 5 minutos (NT820 NOVA TECNICA®), de uma suspensão de células da referida espécie devidamente ativada em meio BHIL a 37°C por 24 h. Em seguida, o pellet obtido foi lavado por 4 vezes com solução tampão PBS (pH 7,20), após o que o mesmo foi suspenso em 4,0 mL da mesma solução e submetido a agitação em vórtex por 10 segundos para posterior leitura da absorbância (A0) a 600 nm. Na sequência, esta suspensão foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C e amostras de 0,1 mL foram coletadas no tempo inicial e após 2, 5 e 24 horas e transferidas para tubos de ensaio contendo 3,9 mL de solução PBS para a devida leitura da absorbância a 600 nm (At). A % de auto-agregação foi obtida por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Auto-agregação} = 1 - (A0 / At) \times 100$$

3.4.2.3 Formação de Biofilme

A propriedade de formar biofilmes por *Veillonella atypica* ATCC 17744 foi avaliada em conformidade com a metodologia descrita por Hooshdar *et al.*, (2020) com adaptações. Para tanto, em cada repetição, utilizou-se de 2 microplacas de poliestireno contendo 96 poços, sendo que nas microplacas adicionou-se 200 µL do inóculo previamente ativado em 15 poços e 200µL de meio BHIL esterilizado em outros 3 poços (branco), após o que as mesmas foram incubadas sob condições de anaerobiose (jarra +

kit de anaerobiose Probac do Brasil ®) a 37°C por 24 e 48 h. Em seguida, os respectivos poços foram esvaziados e lavados 3 vezes com solução tampão PBS e colocadas para secar em capela de fluxo laminar. Na sequência, adicionou-se em cada um dos poços utilizados com 200 µL de uma solução de cristal violeta 1% por um tempo de 10 min., após o que foram lavados 3 vezes com água esterilizada. Em seguida, foram adicionados em cada poço 200µL de uma solução de ácido acético glacial 33% e submetidos a leitura da absorbância a 492 nm. Assim, os valores de densidade ótica correspondentes aos poços contendo o inóculo de *Veillonella atypica* ATCC17744 (DO) foram comparados aos valores obtidos com o branco (DO_b), sendo a capacidade de formar biofilme obtida de acordo com a seguinte relação:

$DO \leq DO_b$ = Sem capacidade de formar biofilme

$DO \leq 2 \text{ vezes } DO_b$ = Capacidade fraca de formar biofilme

$2 \text{ vezes } DO_b \leq DO \leq 4 \text{ vezes } DO_b$ = Capacidade média de formar biofilme

$DO \geq 4 \text{ vezes o valor de } DO_b$ = Capacidade forte de formar biofilme

3.4.3 Atividade Antipatogênica

Tendo em vista a ausência de infraestrutura adequada para se trabalhar com microrganismos patogênicos no DEBIQ, optou-se por avaliar a atividade antipatogênica apresentada por *Veillonella atypica* ATCC 17744 nos Laboratórios de Microbiologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP de acordo com a metodologia descrita por Tagg e McGiven, (1971). Para tanto, enviou-se em caixa de isopor devidamente refrigerada para o referido laboratório um tubo tipo Falcon de 15 mL contendo uma suspensão de células de *Veillonella atypica* ATCC 17744 devidamente ativada em meio BHIL em estufa bacteriológica a 37°C por 24h. Esta suspensão foi centrifugada 3500 x g por 5 min à 4°C. Os ensaios foram realizados em triplicata sendo os inóculos de *Streptococcus aureus* e *Escherichia coli* padronizados para 10⁶ UFC/g na escala de Mcfarland. A atividade antipatogênica foi avaliada por meio da inoculação, em profundidade, de 1 mL dos respectivos inóculo dos patogênicos e 3 gotas do sobrenadante e do pellet de *Veillonella atypica* ATCC 17744, em meio TSA (15 g/L de digestão

pancreática de caseína, 5g/L de enzima digestiva de soja, 5 g/L de cloreto de sódio, ágar 15 g/L), seguido de incubação em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. O efeito da inibição foi avaliado por meio da medição do halo formado em torno das colônias.

3.4.4 Características funcionais – Atividade Antioxidante

Dentre as características funcionais apresentadas por cepas probióticas destaca-se a atividade antioxidante, a qual foi avaliada nos laboratórios da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP em conformidade com a metodologia descrita por Costa *et al.* (2020) e Bian *et al.*, (2013). Para tanto enviou-se em caixa de isopor devidamente refrigerada, para o referido laboratório, um tubo tipo Falcon de 15 ml contendo 10 ml de uma suspensão da referida cepa previamente ativada em meio BHIL a 37°C por 24 horas. De acordo com a metodologia utilizada, adicionou-se a uma alíquota de 1 ml da referida suspensão de células 10 µl de uma solução de 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH 0,1 mM) em etanol absoluto, seguido de incubação a temperatura ambiente e no escuro por 30 min. O ensaio controle foi realizado com água em substituição a amostra. Na sequência procedeu-se a leitura da Absorbância a 517 nm tendo etanol como branco. Os resultados foram expressos como Atividade Equivalente ao Trolox (Equivalente Trolox µM) de acordo com a curva padrão mostrada na Figura 5 e equação abaixo:

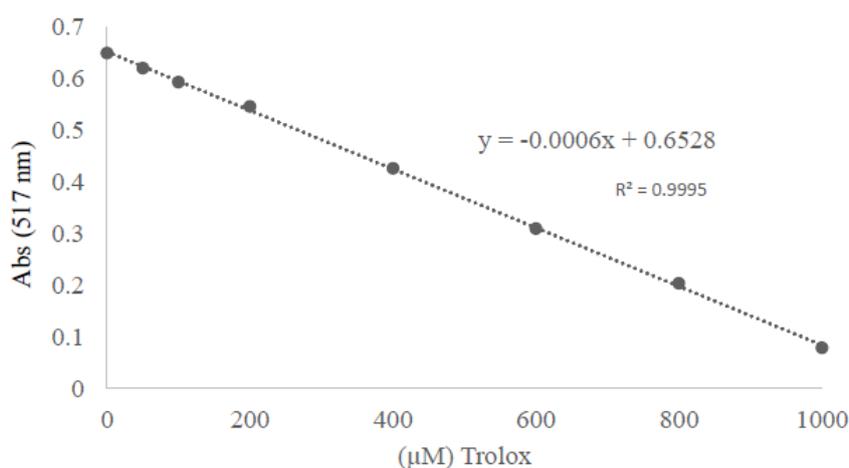


Figura 5. Curva de calibração em relação a atividade antioxidante do radical DPPH ao Trolox (µM).

A Atividade Antioxidante foi calculada conforme descrito abaixo:

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = (\text{Abs controle}^* - \text{Abs amostra}) / \text{Abs controle}^*$$

Onde Abs controle* é equivalente a absorbância da solução 0.1 mM de DPPH em água

3.4.5 Avaliação de Segurança

3.4.5.1 Resistência à Antibióticos

Para avaliação da resistência à antibióticos por *Veillonella atypica* ATCC17744, foi enviado em mãos, em caixa de isopor com gelo, para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, um tubo tipo Falcon de 15 ml contendo 10 ml da referida cepa ativada em meio BHIL por 24 horas. A metodologia empregada foi baseada no antibiograma sobre interpretação das zonas de inibição e concentração inibitória mínima (CLSI, 2021), realizada em triplicada. O método consistiu em ressuspender a referida cepa em 5ml de solução salina 0,85%, a fim de se obter uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland.

Após a homogeneização do inóculo, foi introduzido um swab estéril dentro do tubo, e em seguida este foi comprimido contra a parede do tubo para a remoção do excesso de líquido. A inoculação foi feita em forma de estrias na superfície do ágar Milluer Hinton em três direções, girando a placa em ângulo de 60° após cada estria. Antes da aplicação dos discos, as placas semeadas foram deixadas em fluxo laminar por aproximadamente cinco minutos, para permitir que o excesso de umidade da superfície do ágar fosse absorvido. Os discos foram então retirados da geladeira antes de sua aplicação e deixados em temperatura ambiente. A aplicação destes foi feita com auxílio de uma pinça estéril para evitar contaminação. Todos os discos foram pressionados suavemente para o contato total com a superfície do ágar.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica à 35°C por 18 a 24 horas, após o que verificou-se a existência de crescimento uniforme, bem como a presença de contaminantes e o respectivo diâmetro do halo de inibição. Os halos foram medidos com auxílio de um paquímetro utilizando uma fonte de luz refletida para iluminar a placa invertida sobre um fundo preto e opaco.

3.4.5.2 *Síntese de Gelatinase*

A capacidade de síntese da enzima gelatinase por *V. atypica* ATCC 17744 foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Brito (2021) com adaptações. Os experimentos foram conduzidos em duplicada e com repetição, nos quais preparou-se um meio de cultura contendo 3,7 g de BHI, 12 g de gelatina em pó (sem sabor e incolor, Dr Oetker), 1 ml de lactato de sódio 60% e 100 ml de água. Uma vez autoclavado, 4 ml deste meio foram distribuídos em tubos de ensaio de 20 ml com tampa, após o que foram inoculados com 200 µL do inóculo previamente ativado em meio BHIL a 37°C por 24 h, sendo que o tubo controle não foi inoculado. Na sequência estes tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas em condições de anaerobiose (jarra) e aerobiose, após o que os mesmos foram mergulhados em banho de gelo por 30 min. para observação do endurecimento do meio contendo gelatina, caracterizando assim a incapacidade da cepa de sintetizar gelatinase.

3.4.5.3 *Síntese de Lipase*

A capacidade de sintetizar lipase por *Veillonella atypica* ATCC 17744 foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Brito (2021) com adaptações. Os experimentos foram conduzidos em duplicada e com repetição, nos quais preparou-se um meio de cultura constituído de 3,7 g de BHI, 0,2 g de CaCl₂, 1 ml de lactato de sódio 60%, 1 ml de tween 80, 1,5 g de ágar e 100 ml de água, devidamente autoclavado e distribuído em placas de Petri. Após solidificação as placas foram inoculadas com 10 µL de uma suspensão da referida cepa, devidamente ativada, em 4 pontos distintos da superfície do meio, sendo que uma das placas não foi inoculada (controle), seguido de incubação em estufa bacteriológica a 37°C por 24 e 48 horas. Os resultados foram observados por meio da formação ou não de halos ao redor do inóculo.

3.4.5.4 Síntese de Catalase

A síntese de catalase por *Veillonella atypica* ATCC 17744 foi verificada por meio da metodologia descrita por Machado Castro, *et al.* (2020) com adaptações. Assim, realizou-se os ensaios em duplicata e com repetição, onde em uma lâmina de vidro, esterilizada com álcool 70% e seca sob luz UV por 20 min, com o auxílio de uma alça de platina espalhou-se uma alíquota de uma suspensão da referida cepa devidamente ativada. Em seguida, sobre o esfregaço da suspensão de células adicionou-se 2 gotas de peróxido de hidrogênio 3% sendo então observada a formação ou não de bolhas de ar resultante da ação da catalase sobre o peróxido de hidrogênio.

3.4.5.5 Atividade hemolítica

Para avaliação da atividade hemolítica apresentada por *Veillonella atypica* ATCC 17744 encaminhou-se sob refrigeração em caixa de isopor para o Laboratório Analytical Science em Campinas SP, um tudo tipo Falcon de 15 ml contendo 10 ml de uma suspensão de células da referida cepa devidamente ativada em meio BHIL a 37°C por 24 h. A metodologia empregada foi descrita por De Oliveira Coelho *et al.*, (2019) com adaptações, que consistiu da inoculação de uma alçada de 10 µl da referida suspensão em placas de Petri contendo meio Agar Sangue (Biocen) seguido de incubação em jarra de anaerobiose à 37°C por 48 horas. Os resultados foram obtidos por meio da avaliação da coloração das colônias formadas, bem como pela medição do halo formado ao redor das mesmas. Quando há formação de halo com coloração verde a cepa é classificada como alfa-hemolítica, ao passo que a formação de halo com zona de lise é considerada como beta-hemolítica e quando não há formação de halo de inibição a cepa é caracterizada como gama-hemolítica. Desta forma, as cepas alfa-hemolítica são classificadas como parcialmente hemolíticas, ou seja, hemolisam parte das hemácias do hospedeiro. As cepas caracterizadas como beta-hemolíticas são consideradas hemolíticas, o que significa que tem alta capacidade de lisar as hemácias do hospedeiro. Enquanto que as cepas caracterizadas como gama-hemolíticas não são consideradas hemolíticas, ou seja, são seguras para consumo tendo em vista a sua incapacidade de lisar as hemácias do hospedeiro.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, encontram-se apresentados os resultados relativos aos testes, *in vitro*, de caracterização de *Veillonella atypica* ATCC 17744 tendo como objetivo demonstrar as suas propriedades probióticas para sustentar o desenvolvimento de formulações de alimentos funcionais. Para tanto, a referida cepa foi devidamente ativada em meio BHIL e as células submetidas a diferentes testes, e os resultados aqui demonstrados, são as médias das duplicatas realizadas em cada um dos experimentos.

4.1 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE *Veillonella atypica* ATCC 17744 EM MEIO BHIL

O desempenho de *Veillonella atypica* ATCC 17744 em meio BHIL a 37°C encontra-se demonstrado na Figura 6. Observa-se uma fase de adaptação nas primeiras 12 horas de crescimento, seguida de uma fase exponencial até o tempo de 24 horas atingindo uma população de 6×10^8 UFC/mL após o que se verifica fases estacionária e de morte bem definidas. Tendo em vista que, de acordo com a Food and Agriculture Organization, (2002), uma preparação probiótica deve conter $>10^6$ UFC/ml para atingir os efeitos funcionais desejados considera-se que *V. atypica* ATCC 17744, nas condições estudadas, apresentou desempenho satisfatório o que sustenta a sua incorporação em formulações de alimentos funcionais.

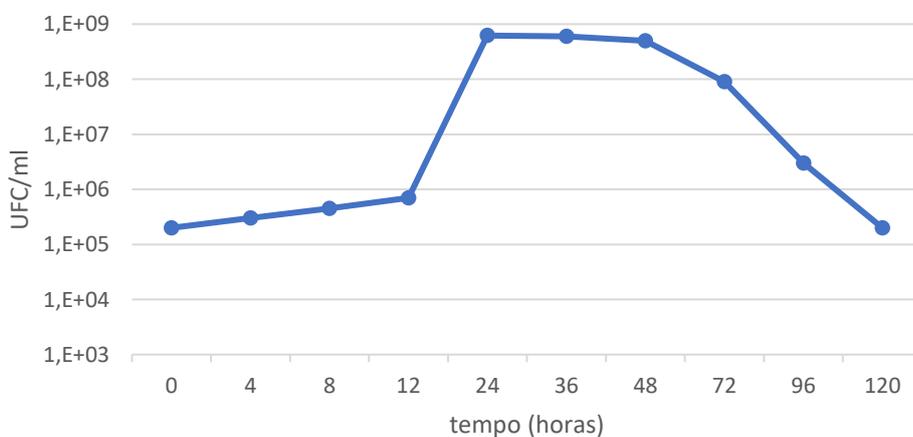


Figura 6. Desempenho de *Veillonella atypica* ATCC 17744 em meio BHIL (UFC/ml).

Em relação a variação do pH durante o crescimento, observa-se na Figura 7 uma ligeira queda de 7,40 no tempo inicial para 6,32 após 120 horas de cultivo. Este comportamento revela que a referida cepa é sensível ao pH do meio, quando comparado com outras espécies de bactérias do ácido láctico, como *Lactobacillus plantarum*, que em meio MRS atinge valores de pH em torno de 3,72 após 24 horas de cultivo, conforme reportado por Feltrin *et al.*, (2000). Neste contexto, destaca-se ainda que Souza *et al.*, (2022) avaliaram as características físico química de iogurte (*Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricuse* e *Streptococcus salivarius* subs. *thermophilus*), cujas células se encontravam imobilizadas em suporte de alginato. Os autores, mostraram que o pH do meio decresceu de 6,81 para 4,69 após 5 horas de fermentação, sendo este pH correspondente ao ponto isoelétrico da caseína cuja coagulação interfere nas características físico químicas do iogurte.

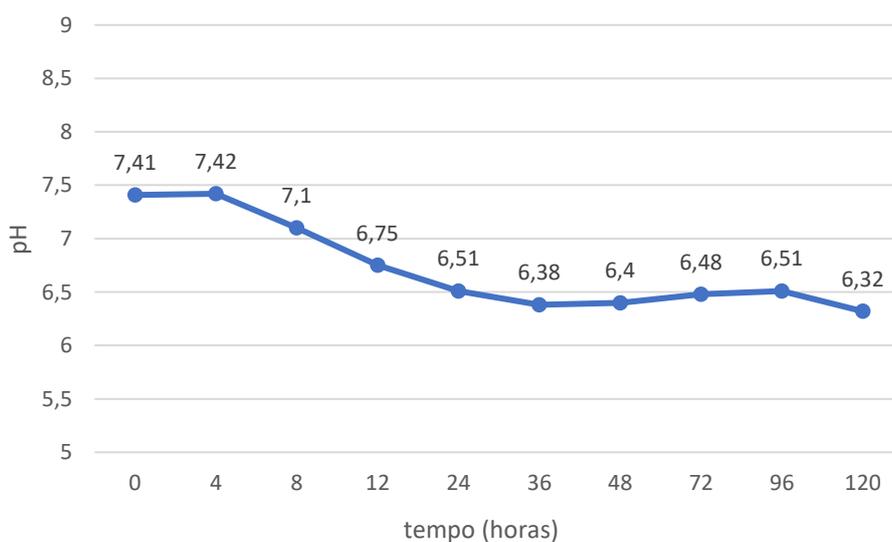


Figura 7. Avaliação do pH durante o crescimento de *Veillonella atypica* ATCC 17744 em meio BHIL

4.2 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE *Veillonella atypica* ATCC 17744 *in vitro*

4.2.1 Tolerância ao estresse:

Após a ingestão pelo hospedeiro, as células probióticas devem resistir a condições adversas que compreendem uma série de fatores incluindo baixo pH, suco gástrico e pepsina no estômago, bem como a presença de pancreatina e sais biliares no intestino. Neste contexto, a cepa de *V. atypica* ATCC 17744 foi devidamente caracterizada quanto a sua resistência aos referidos fatores, cujos resultados encontram-se representados nas Figuras 8, 9 e 10

Em relação ao desempenho da referida cepa em meio BHIL em diferentes valores de pH verifica-se que não houve crescimento celular nos meios a pH 2,00 e em 3,00 observou-se um decréscimo acentuado na viabilidade celular nas primeiras 3 horas de cultivo. Por outro lado, em meio BHIL a pH 4,00 e 7,00 a população celular se manteve constante ao longo do experimento, sendo que em meio a pH 4,00 observou-se uma queda equivalente a 1 log após 3 horas de cultivo.

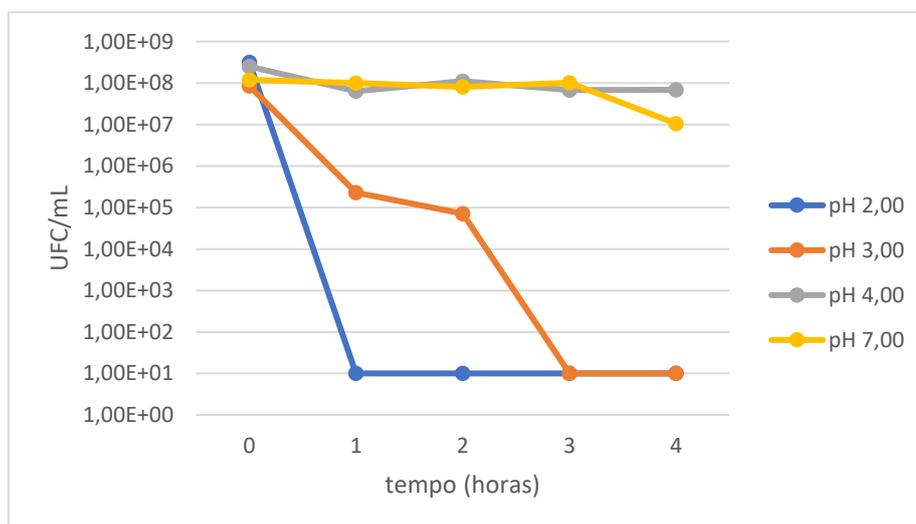


Figura 8. Viabilidade celular de *Veillonella atypica* ATCC 17744 em meio BHIL em diferentes valores de pH.

No que se refere a tolerância de *V. atypica* ATCC 17744 aos sais biliares avaliou-se o desempenho desta cepa em meio BHIL na presença de sais biliares nas concentrações de 0,3 e 0,6 %, cujos resultados encontram-se representados na Figura 9.

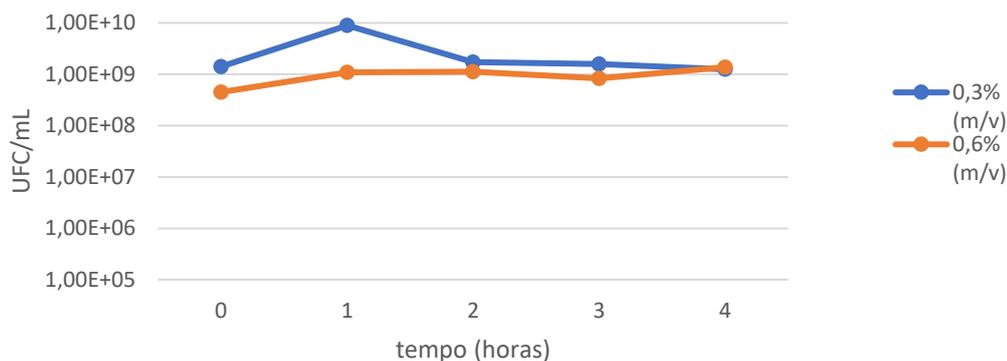


Figura 9. Viabilidade celular de *Veillonella atypica* ATCC 17744 em meio BHIL contendo diferentes concentrações de sais biliares

Os sais biliares são ácidos orgânicos sintetizados no fígado a partir do colesterol e excretados pelos hepatócitos para ser armazenado na vesícula biliar, sendo uma parte destes expelido nas fezes enquanto outra é reabsorvida no íleo, sendo portanto, novamente excretado no fígado, em processo entero-hepático (Abreu, 2015). Sua função no organismo é solubilizar a gordura ingerida, bem como vitaminas lipossolúveis, facilitando a digestão e absorção, além de degradar os lipídeos da membrana celular das bactérias (Begley *et al.*, 2005). Portanto uma das características das cepas probióticas consiste na sua capacidade de sobreviver na presença destes sais com vistas a atingir o intestino do hospedeiro. Desta forma, observa-se que a cepa avaliada no presente trabalho apresentou desempenho satisfatório em ambas as condições avaliadas, mantendo uma população de células viáveis superior a 10^8 UFC/ml.

No tocante a capacidade de transitar pelo TGI, avaliou-se o desempenho de *V. atypica* ATCC 17744 cultivada em meio BHIL contendo pepsina a pH 3,00 para simular as condições do estômago e na presença de pancreatina para simular as condições do intestino. Os resultados, reportados na Figura 10, demonstram que não houve interferência destas substâncias na viabilidade da referida cepa, nas condições estudadas.

Observa-se que a população de células se manteve em níveis de 10^8 UFC/mL e 10^7 UFC/mL na presença de pepsina e pancreatina, respectivamente, o que demonstra sua tolerância as condições do TGI do hospedeiro.

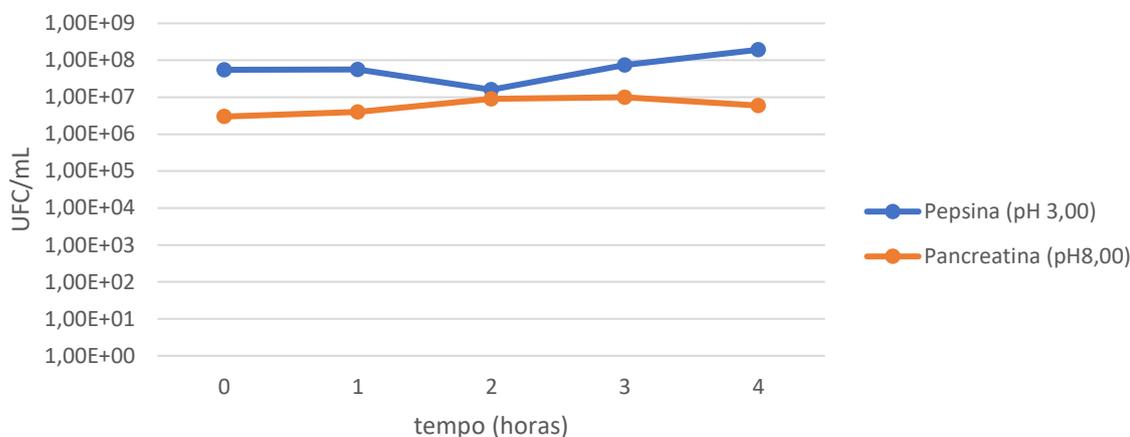


Figura 10. Viabilidade celular de *Veillonella atypica* ATCC 17744 em meio BHIL contendo pepsina e pancreatina

No tocante às simulações das condições do trato gastrointestinal, observa-se que em condições de pH 3,00 com a presença de pepsina, a cepa avaliada apresentou viabilidade celular superior a 10^6 UFC/ml. Segundo Meira (2011) a pepsina confere proteção às células em condições de pH baixo, uma vez que esta diminui a hiperpolarização da membrana celular, ou seja, impede que íons H^+ sejam secretados para o meio, acarretando na diminuição do pH interno das células. Este mecanismo é conhecido como atividade H^+ -ATPase (Miwa *et al.*, 1997).

Redondo (2008), demonstrou a tolerância ao caracterizar uma cepa de *Lactobacillus helveticus*, que se desenvolveu satisfatoriamente nos meios a diferentes valores de pH (1,50, 2,00, 3,00, 4,00), bem como na presença de sais biliares (0,1, 0,2, 0,3, 0,5%), demonstrando assim tolerância as condições do TGI do hospedeiro.

Sousa (2013), avaliou a resistência às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, por uma cepa de *Lactobacillus acidophilus* em um sorvete de graviola com concentrado de proteína de soro de leite (WPC), como substituto parcial da gordura do leite. Os resultados demonstraram que esta cepa apresentou uma redução na viabilidade celular equivalente a 5,05 log UFC/ml em sorvete a pH 2,50 e aumento correspondente a 7,2 UFC/ml, nas mesmas condições, na presença de sais biliares. O autor conclui que

a utilização de WPC pode ser vantajosa, uma vez que a presença deste ingrediente desempenhou um papel importante na proteção da cepa probiótica contra os efeitos dos fluidos gastrointestinais. Resultados semelhantes foram reportados por Ding e Shah (2010) que avaliaram a sobrevivência de diferentes cepas probióticas na forma livre e encapsuladas, com destaque para uma cepa de *Lactobacillus acidophilus*. Os autores relataram que, na forma livre, a referida cepa apresentou, no que se refere a viabilidade celular, uma redução de até 6,01 log, em MRS a pH 2,00 por 2 horas de cultivo. Reportaram ainda uma redução no crescimento celular de até 4 log, após 4 horas de cultivo, nas mesmas condições, na presença de 3% de bile com a cepa encapsulada. Estas observações permitiram ao autor afirmar que os alimentos probióticos devem ser feitos juntamente com um alimento ou leite, para que favoreça uma maior sobrevivência destes ao TGI *in vivo*.

Em atenção as características de tolerância as condições do TGI Campos *et al.* (2021), relataram que dentre as várias espécies de *Lactobacillus* estudadas todas foram capazes de sobreviver em meio MRS contendo suco gástrico artificial (pH 2.00). Resultados semelhantes foram encontrados por Hoque et al., (2010) onde todas as cepas de *Lactobacillus* spp isoladas de dois iogurtes de Bangladesh, foram avaliadas e sobreviveram em leite desnatado esterilizado em pH 2,20. Costa *et al.* (2013) também avaliaram o potencial probiótico *in vitro* de 12 amostras de bactérias ácido-láticas (11 *Lactobacillus* spp. e uma *Weissella paramesenteroides*, isoladas de queijo-de-minas artesanal da Serra da Canastra. Os testes de sensibilidade ao pH gástrico e sais biliares, demonstraram que todas as cepas avaliadas foram resistentes ao pH gástrico (2.0). No tocante aos testes de sais biliares, as cepas tiveram resultados distintos, onde alguns microrganismos mostraram pouca inibição do crescimento enquanto outros foram moderadamente ou altamente inibidos. Os autores concluíram que as cepas *L. rhamnosus* B4, *W. paramesenteroides* C10 e *L.rhamnosus* D1 apresentaram o melhor potencial probiótico de acordo com os testes *in vitro* realizados.

Desta maneira, a cepa em estudo apresentou resultados satisfatórios no que se refere à tolerância ao estresse, uma vez que após exposição aos sais biliares e à simulação do sistema gastro intestinal, não houve redução da viabilidade celular abaixo de 10^6 UFC/ml.

4.2.2 Capacidade de Adesão

De acordo com De Oliveira Coelho *et al.* (2019), a característica de hidrofobicidade contribui para uma maior interação entre a célula microbiana e as células epiteliais do hospedeiro e a capacidade de auto-agregação celular permite que a cepa probiótica atinja uma alta densidade celular no intestino.

Abreu (2015) afirma que a hidrofobicidade da superfície da célula microbiana é uma característica que indica seu potencial de adesão às mucosas intestinais do hospedeiro. A hidrofobicidade é medida através da habilidade de aderir a hidrocarbonetos, sendo que elevados valores indicam maior habilidade de adesão. No entanto, o autor ressalta que outros estudos (Mathara *et al.*, 2008; Vinderola and Reinheimer, 2003) defendem que os valores de hidrofobicidade não estão correlacionados diretamente às propriedades de adesão.

A hidrofobicidade da superfície celular bacteriana foi avaliada por Pelletier *et al.*, (1997) através da medida do MATS (microbial adhesion to solvents). Este teste consiste em avaliar a capacidade de uma cepa microbiana em aderir a solventes, como por exemplo tolueno e xileno, uma vez que estes apresentam a característica de doar elétrons, assim como ocorre no intestino, simulando desta forma a capacidade de colonizar TGI do hospedeiro por parte de uma cepa microbiana (Todorov *et al.*, 2010). Nader-Macias *et al.* (2008) classificam as espécies microbianas, em relação a capacidade de colonizar o TGI como alta (66,67 a 100%), média (33,37 a 66,66%) e baixa hidrofobicidade (0 a 33,33%). Desta forma, a cepa de *Veillonella atypica* ATCC 17744, avaliada no presente trabalho, apresenta média hidrofobicidade.

Neste contexto, a propriedade de hidrofobicidade apresentada por *Veillonella atypica* ATCC 17744 foi devidamente avaliada, cujos resultados encontram-se apresentados na Figura 11. Observa-se que a referida cepa apresenta uma afinidade crescente pelos solventes utilizados, correspondendo a valores de hidrofobicidade crescentes variando de 37,2 a 55,6 % e de 22,7 a 36,7% para tolueno e xileno, respectivamente, após 90 minutos de contato. Os resultados mostram que a cepa de *Veillonella atypica* ATCC 17744 apresentou hidrofobicidade crescente na presença de ambos solventes, sendo que em contato com tolueno o valor máximo observado foi

equivalente a 55,6% ao passo que na presença de xileno o valor máximo correspondeu a 36,7%.

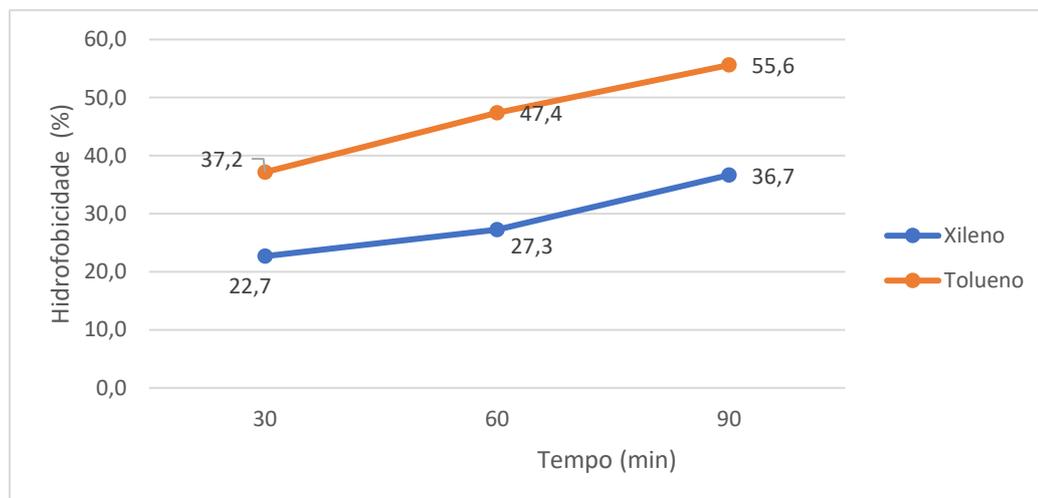


Figura 11. Caracterização da hidrofobicidade de *Veillonella atypica* ATCC 17744 após diferentes tempos de contato com xileno e tolueno.

De Oliveira Coelho *et al.* (2019) relataram resultados semelhantes quando uma cepa de *Lactobacillus satsumensis* foi caracterizada quanto a hidrofobicidade, reportando valores correspondentes a 77% à 73% em tolueno e 42% a 58% em xileno, os quais foram considerados como alta e média hidrofobicidade, respectivamente. Vitola (2017), caracterizou 3 cepas aleatórias isoladas de silagem de colostro bovino quanto à sua propriedade de hidrofobicidade, cujos resultados mostraram que nenhuma das cepas avaliadas apresentaram uma alta capacidade de adesão ao hidrocarboneto, com resultados entre 12 e 14%, apenas. Abushelaibi *et al.*, (2017) também avaliaram a característica de hidrofobicidade de espécies de bactérias do ácido láctico isoladas de leite de camela, reportando valores de hidrofobicidade entre 2,2% e 57,8%, dentre os 9 isolados caracterizados.

Porém o estudo de Todorov *et al.*, (2010) que teve por objetivo avaliar as propriedades probióticas de cepas isoladas de salmão, demonstraram que os isolados que haviam apresentado alta capacidade de hidrofobicidade nos testes *in vitro*, não aderiram em altas concentrações às células epiteliais quando foram submetidos aos testes *in vivo*, concluindo a partir destes dados que a capacidade de adesão ao hidrocarboneto pode auxiliar na adesão, porém não é uma garantia para que esta realmente ocorra nas células epiteliais.

A característica de auto-agregação apresentada por *Veillonella atypica* ATCC 17744 foi avaliada em conformidade com a metodologia proposta por Redondo, (2008) e os resultados, expressos em %, encontram-se apresentados na Figura 12. Observa-se um efeito crescente de auto-agregação variando de 14,3% para 68,7% nos tempos de 2 e 24 horas, respectivamente.

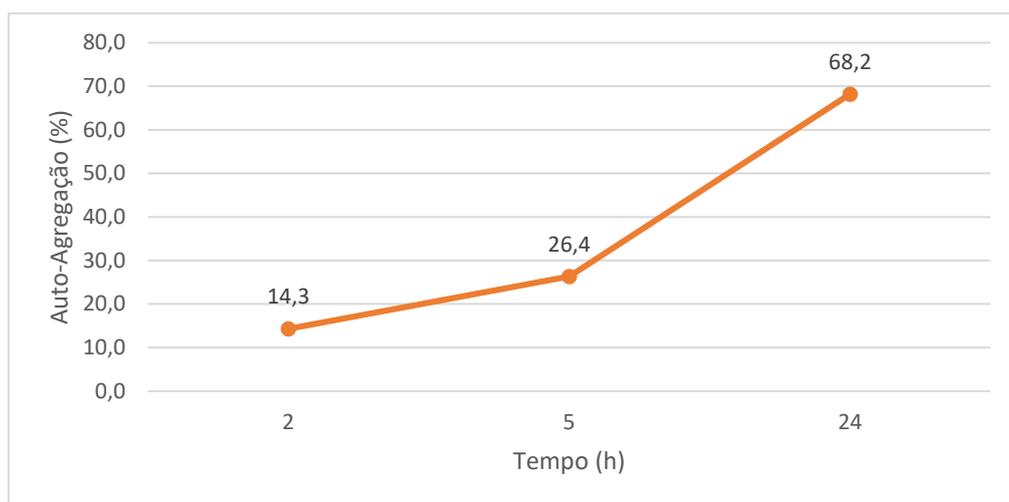


Figura 12. Caracterização da Auto-Agregação de *Veillonella atypica* ATCC 17744 após 24 horas em PBS.

De acordo com Newaj-Fyzul *et al.* (2014), a auto-agregação representa a capacidade que a cepa tem para aderir às células epiteliais da mucosa gastrointestinal, sendo considerado por Santos (2020) como uma característica desejável para espécies probióticas. Desta forma, a capacidade de auto agregar às células epiteliais contribuem para o efeito de exclusão competitiva que consiste na competição por sítios de adesão, bem como por nutrientes, com as espécies oportunistas (Rodrigues, 2022).

Costa *et al.* (2015), reportam que o sucesso no processo de adesão de cepas probióticas no trato gastrointestinal depende de diversos fatores. Assim, destacam a capacidade de se manter vivas no trânsito intestinal resistindo à ação enzimática, habilidade de colonizar o TGI por meio da adesão às células epiteliais do intestino; apresentar taxa de crescimento superior a sua eliminação pelo peristaltismo intestinal e produzir fatores antimicrobianos que resultam na inibição de espécies oportunistas.

Cypriano (2013) avaliando mecanismos pelos quais *Lactobacillus* spp. se estabelecem no intestino e interagem com linhagens de *Candida albicans*, potencialmente patogênicas, reportou que a capacidade de auto-agregação das cepas avaliadas está relacionada a existência de componentes na superfície celular das bactérias.

De acordo com Santos (2020) a capacidade de autoagregação pode ser classificada como (-) < 60%; (+) 60% a 80% e (++) > 80%. Desta forma é possível verificar que a cepa em estudo apresenta, *in vitro*, uma boa propriedade de auto agregação após 24 horas.

Resultados semelhantes foram reportados por De Oliveira Coelho *et al.*, (2019) que observaram que uma cepa de *Lactobacillus satsumensis* apresentou um percentual de agregação menor que 60% em tempo inferior a 24 horas. Por outro lado, uma cepa de *Lactobacillus helveticus* apresentou elevada capacidade de autoagregação após 5 horas, conforme relatado por Redondo (2008), o que demonstra que esta característica é espécie dependente.

Tendo como objetivo desenvolver uma formulação de bebida funcional contendo uma cepa *Lactobacillus* sp. H7, isolada de kefir, e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e amora-preta, Rodrigues (2022) avaliou a capacidade de auto agregação da referida cepa de lactobacilos e reportou que, após 24 horas, esta cepa apresentou capacidade de agregação correspondente a 68%, sendo considerado pelo autor como uma boa capacidade de autoagregação.

A propriedade de adesão de uma cepa probiótica pode também ser avaliada por meio da determinação da sua capacidade de formar biofilmes, tendo em vista que, de acordo com Terraf *et al.* (2012), esta é uma propriedade que permite avaliar a capacidade de colonização da mucosa do intestino, o que contribui para a ocorrência do efeito de exclusão competitiva promovida pela da espécie em estudo. Neste contexto, Hooshdar *et al.* (2020) classificam a capacidade de formação de biofilmes, bem como sua força, por espécies microbianas como forte, média ou fraca. Desta forma, os autores definem a formação de um biofilme fraco como aquele que apresenta uma densidade ótica menor que 2 vezes em relação ao controle, como médio quando esta relação está entre 2 e 4 vezes, e como biofilme forte quando esta relação é maior que 4.

Referente a caracterização de *Veillonella atypica* ATCC 17744, em relação a formação de biofilmes, observou-se que as médias das leituras de absorvância dos poços controle (branco) em 24 horas foi de 0,0793 enquanto que estas leituras referentes as amostras correspondeu a 0,0791, resultando em um coeficiente de aproximadamente 1, caracterizando como incapacidade de formar biofilme. Após 48 horas de incubação verificou-se que a média da absorvância referente aos poços das amostras 0,1117, cujo coeficiente corresponde a 1,41, caracterizando como formação de biofilme fraco (Apendice B).

Neste contexto, Terraf *et al.* (2012) avaliaram quinze cepas de *Lactobacillus*, das quais *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus delbrueckii* demonstraram a média e alta capacidade de formar biofilmes e afirmaram que esta característica é significativamente dependente da cepa microbiana, meio de cultura, nível de inóculo, crescimento microbiano e natureza do suporte utilizado para o ensaio (lamínulas de vidro e microplacas de poliestireno).

4.2.3 Atividade Antipatogênica

De acordo com Costa *et al.* (2012) a maioria das espécies de bactérias do ácido láctico apresenta capacidade de interferir no desenvolvimento de espécies patogênicas. A capacidade de exclusão ou redução de patógenos demonstrada por muitas linhagens de bactérias ácido lácticas e bifidobactérias é uma das características mais importantes atribuídas a estes microrganismos, uma vez que está diretamente relacionada à capacidade de produzir e tolerar elevadas concentrações de metabólitos, favorecendo a competição com outros microrganismos num dado ecossistema.

Desta forma, no presente trabalho caracterizou-se a atividade antipatogênica de *Veillonella atypica* ATCC 17744 sobre *Streptococcus aureus* ATCC 6538 e *Escherichia coli* ATCC 11229, em meio TSA em conformidade com a metodologia descrita por Tagg e McGiven, (1971). Os resultados obtidos demonstraram a ausência de halos de inibição tanto na presença das células (pellet) quanto na presença do sobrenadante da suspensão de células da cepa em análise (Anexo A). Estes resultados demonstram a ausência do efeito de inibição da cepa de *Veillonella atypica* ATCC 17744 sobre as referidas espécies patogênicas, nas condições estudadas.

Resultados semelhantes foram obtidos por Silva *et al.* (2021) ao avaliar o efeito inibitório de cepas de *Lactobacillus spp.* sobre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. Em sua conclusão, os autores ressaltam um fator importante: os testes *in vitro*, apesar de serem ferramentas importantes no entendimento dos mecanismos e características intrínsecas das cepas probióticas, nem sempre expressam as condições reais *in vivo*, uma vez que diversos fatores relacionados ao hospedeiro e ao alimento utilizado como veículo irão interferir no mecanismo de resposta e atuação das bactérias.

Diversos estudos têm sido realizados demonstrando o efeito de inibição de cepas potencialmente probióticas sobre espécies patogênicas. Costa *et al.* (2012), avaliaram o efeito de inibição de duas espécies de *Lactobacillus* (*L. acidophilus* e *L. plantarum*) e uma *Bifidobacterium lactis*, sobre *B. cereus*, *E. coli* e *S. Enteritidis* reportando que as cepas avaliadas demonstraram efeito de inibição (média de 24 mm) sobre as referidas espécies patogênicas. Pehrson (2013) avaliou o efeito de inibição de cepas de *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum* e *L. plantarum*) sobre *Escherichia coli*, *Shiguella sonnei*, *Shiguella dysenteriae* e *Salmonella enteritidis*. Os resultados mostraram que *L. acidophilus*, *L. casei* e *L. plantarum* foram capazes de inibir 5 das 6 cepas patogênicas avaliadas, em níveis de inibição variando de 23% a 53%, sendo que a cepa *S. dysenteriae* não teve seu crescimento inibido pelas cepas de *Lactobacillus* avaliadas. O autor demonstrou também que apenas de *L. fermentum* 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. O autor conclui que o efeito de inibição observado foi devido à presença de ácidos orgânicos, uma vez que estes provocaram o abaixamento do pH, que foi prejudicial às cepas patogênicas estudadas.

Andrade *et al.* (2014) avaliaram o potencial probiótico quanto à atividade antimicrobiana de *Lactobacillus spp.* isolados de queijos minas artesanal da Serra da Canastra, demonstrando que as cepas avaliadas apresentaram atividade antagonista sobre as espécies *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica var. Typhimurium*, *Enterococcus faecalis* e bactérias ácido-lácticas isoladas dos próprios queijos. De forma semelhante, as cepas de *Lactobacillus satsumensis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Saccharomyces cerevisiae* isoladas da bebida de kefir à base de mel estudadas por De Oliveira Coelho *et al.* (2019) também apresentaram resultados

positivos contra *Streptococcus aureus* e *Escherichia coli*, apresentando zonas de inibição de 8 à 12,5 mm.

4.2.4 Características funcionais – Atividade Antioxidante

De acordo com Ferreira (2021), durante o processo metabólico diversas reações ocorrem utilizando espécies de oxigênio reativas como peróxido de hidrogênio, radical superóxido aniônico e outros. Os sistemas biológicos possuem mecanismos antioxidantes de origem enzimática e não enzimática para controlar os danos causados pelo excesso dos radicais livres, que podem desencadear diferentes patologias, desde doenças cardiovasculares a promoção de câncer. Os antioxidantes endógenos são enzimas, como a catalase e superoxi desmutase, e outros compostos de outra natureza, como a bilirrubina e a albumina que agem na presença desses radicais. Entretanto, quando o organismo é exposto ao excesso dessas espécies reativas o sistema de compostos endógenos pode falhar em garantir essa proteção. Para compensar o déficit, o corpo pode usar antioxidantes exógenos consumidos dos alimentos, suplementos e fármacos.

Um dos métodos para se avaliar a atividade antioxidante de uma determinada espécie microbiana consiste em dosar a perda de cor de uma solução composta por radicais estáveis DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) que apresenta cor violeta na presença de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio baseando-se, portanto, na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (Brand-Williams et al., 1995; Huang et al., 2005). Desta forma, a atividade antioxidante apresentada pela cepa de *Veillonella atypica* ATCC 17744 foi determinada no presente trabalho em conformidade com a metodologia descrita por Costa et al. (2020) e Bian et al. (2013), resultando em um valor equivalente $4,30\% \pm 0,15$ (Anexo B), o que demonstra que esta cepa apresenta baixa atividade antioxidante, tendo em vista que a maioria das espécies probióticas apresenta atividade antioxidante superior a 20%.

De Oliveira Coelho et al. (2019) reportaram que as três cepas microbianas por eles selecionadas e avaliadas (*Lactobacillus satsumensis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Saccharomyces cerevisiae*), isoladas de kefir à base de mel apresentaram a capacidade de sintetizar compostos antioxidantes na faixa de 22 à 27%. De forma semelhante, Guimarães et al., (2020), dosaram a atividade antioxidante de bebidas fermentadas probiótica que chamou de bebida base (fermento láctico probiótico contendo culturas

superconcentradas de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidocacterium* e *Streptococcus thermophilus*, com calda de morango, sucralose e farinha de linhaça mista com extrato hidrossolúvel de amêndoas) enriquecidos com óleos vegetais de frutos amazônicos como o açaí e pequi, reportando valores de atividade antioxidante de 42,4% para a bebida de base (com o óleo de açaí de 43,6% e com o óleo de pequi 50,9%. Os autores concluem que os resultados mostram a qualidade nutricional expressas nos principais teores de macronutrientes e na riqueza do potencial antioxidante dessas formulações com alta funcionalidade a prevenção de agravos patológico. Ferreira (2021) avaliou a atividade antioxidante de um leite fermentado por *Lactobacillus helveticus* e *Enterococcus faecium* obtendo atividade antioxidante de 12%. Por outro lado, Cheuczuk e Rocha (2014) ao avaliarem a atividade antioxidante de uma bebida láctea fermentada prebiótica de leite pasteurizado e soro de leite, não constataram nenhuma atividade antioxidante, a semelhança dos resultados obtidos no presente trabalho.

4.2.5 Avaliação de Segurança

Um dos fatores mais importantes envolvidos na caracterização de cepas com potencial probiótico consiste na sua avaliação no tocante ao consumo com segurança por parte do hospedeiro. Neste contexto, a Comunidade Europeia, Estados Unidos e Canadá estabeleceram critérios para assegurar o consumo de preparações probióticas por humanos e animais. Assim, integram esses critérios os registros relativos ao histórico de isolamento, identificação taxonômica e ausência de genes de virulência, bem como características de infectividade, toxicidade e resistência a antibióticos transferíveis, conforme relatado por De Oliveira Coelho *et al.* (2019).

Desta forma, a cepa de *Veillonella atypica* ATCC 17744 foi avaliada no que se refere aos testes de resistência à antibióticos e presença de enzimas relacionadas à patogenicidade, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 4, referentes ao laudo do Anexo A. Observa-se que a cepa avaliada apresentou sensibilidade à todos os antibióticos testados, ou seja, a cepa não oferece resistência aos medicamentos já existentes no mercado. De acordo com Luciano (2016), a resistência bacteriana a antibióticos põe em risco a saúde pública, sendo um problema de amplitude mundial. Diante disso, microrganismos que venham a ser utilizados como aditivo alimentar não devem possuir genes de resistência a antibióticos.

Tabela 2. Comportamento de *Veillonella atypica* ATCC 17744 na presença de diferentes antibióticos.

Antibiótico	Halo de inibição(mm)- Média de duas repetições	Interpretação
Ceftiofur	39,5	Sensível
Ciprofloxacina	25,5	Sensível
Ceftriaxona	37	Sensível
Enroflaxacina	27	Sensível
Amoxicilina	22,5	Sensível
Ampicilina	22,5	Sensível
Gentamicina	21,5	Sensível
Tetraciclina	30	Sensível

Resultados semelhantes foram encontrados por Silva, (2018) que avaliou o potencial probiótico de bactérias lácticas isoladas de leite de cabra, e estas foram sensíveis aos antibióticos ampicilina, gentamicina, cloranfenicol, tetraciclina e clindamicina. O mesmo foi observado por Barbosa *et al.* (2021) que isolaram uma cepa de bactéria ácido láctica de Kombucha e esta se mostrou sensível ampicilina, cefalotina, gentamicina, eritromicina e tetraciclina antibióticos testados, sendo resistente apenas à ciprofloxacino. Neste contexto, Luciano (2016) avaliou o potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus* spp. isoladas de subprodutos do processamento de frutas e observou que todas as cepas avaliadas exibiram resistência aos antimicrobianos kanamicina e eritromicina e ressaltou a necessidade de novos testes para assegurar o consumo de alimentos funcionais contendo as referidas cepas.

É prática comum entre os profissionais da área da saúde prescrever probióticos em paralelo ao tratamento com antibióticos com o objetivo de minimizar os efeitos destes compostos sobre o desequilíbrio causado na microbiota do TGI. Desta forma, os resultados mostrados na Tabela 4 demonstram uma baixa efetividade no uso de preparações probióticas contendo *V. atypica* ATCC 17744 concomitante ao tratamento com antibióticos avaliados.

Em relação a síntese de enzimas que conferem características de patogenicidade para *Veillonella atypica* ATCC 17744, no presente trabalho avaliou-se a sua capacidade

de sintetizar gelatinase, lipase, catalase e beta-hemólise. Os resultados (fotos no APÊNDICE B) revelaram que a cepa em estudo é gelatinase, lipase e catalase negativa e gama hemolítica (Anexo C)

Omura (2014) destaca a importância da análise destas enzimas, uma vez que os fatores de patogenicidade, também conhecidos como fatores de virulência, referem-se a mecanismos comuns observados entre várias espécies patogênicas e não são desejadas nas bactérias que serão utilizadas como probióticas. Em relação a atividade da enzima gelatinase, Fisher e Phillips (2009) afirma que sua principal função na patogenicidade das cepas que a possuem é a obtenção de nutrientes a partir da degradação do tecido hospedeiro.

No tocante a caracterização relativa à atividade lipolítica se faz necessária pois, de acordo com Xie *et al.* (2012), essa característica é considerada como fator de virulência presente em cepas patogênicas, uma vez que provoca acúmulo dessa enzima no sangue do hospedeiro.

Em relação a catalase, Martín e Suárez (2010) reportam que esta é uma enzima intracelular sintetizada por algumas espécies de microrganismos que tem a função de decompor o peróxido de hidrogênio, que apresenta ação antagonista a bactérias patogênicas. Paula *et al.* (2011) relatam que as bactérias do ácido láctico são boas produtoras de peróxido de hidrogênio. Como estas espécies não sintetizam a catalase, o peróxido de hidrogênio é acumulado, contribuindo para o efeito inibitório sobre os patógeno que não sintetizam catalase.

No tocante a síntese de hemolisina, Vesterlund *et al.* (2007) relatam que este teste tem por objetivo investigar a capacidade das cepas em ocasionar anemia e edema no indivíduo hospedeiro, visto que a produção de hemolisina é um fator de virulência por conta do consumo do ferro pelas bactérias patogênicas que a possuem. Omura (2014) classifica os resultados desta análise como alfa-hemolítica (grande capacidade de consumir ferro), beta-hemolítica (baixa capacidade de consumir ferro) e gama hemolítica (incapacidade de consumir ferro).

Estudos realizados por Barbosa *et al.* (2021) demonstram resultados semelhantes quando cepas que apresentam potencial probiótico foram avaliadas e apresentaram atividades hemolítica e gelatinase negativas. Por outro lado, Brito (2021), avaliou 97 cepas de bactérias ácido-láticas isoladas a partir da fermentação espontânea do fruto

amazônico bacupari (*Rhedia gardneriana*) e reportou que duas cepas foram classificadas como gelatinase e lipase negativas e uma delas classificada como gama hemolítica e outra como alfa hemolítica. O autor concluiu pela necessidade de novos estudos para garantir que as referidas cepas são seguras para consumo. Vale destacar ainda que Machado (2021) caracterizou cepas de bactérias ácido-lácticas, de kefir e de kombucha, e reportou resultados negativos para a atividade das enzimas gelatinase e hemolisina.

5 CONCLUSÕES

A caracterização, *in vitro*, de *Veillonella atypica* ATCC 17744 em relação as suas propriedades probióticas demonstrou, que:

- No que se refere a tolerância às condições de estresse observadas no estômago e intestino os resultados revelaram que a referida cepa apresentou sensibilidade a pH inferior a 4,00, porém, na presença de pepsina a pH 3,00 essa tolerância foi positivamente alterada.

- Em relação as propriedades de adesão, os resultados revelaram hidrofobicidade média e baixa na presença de tolueno e xileno, respectivamente. No que se refere a auto agregação observou-se que a referida cepa apresenta média capacidade de auto agregação após 24 horas de incubação e propriedade de formação de biofilme fraco após 48 horas de incubação.

- Os testes de atividades antipatogênica e propriedade antioxidante revelaram que a referida cepa é incapaz de atuar sobre os patógenos avaliados, bem como em evitar a oxidação de DPPH.

- Em relação as características de segurança observou-se que a referida cepa apresenta sensibilidade aos 9 antibióticos avaliados e foi incapaz de sintetizar enzimas que caracterizam a sua patogenicidade.

- Diante do exposto, conclui-se que *Veillonella atypica* ATCC 17744 apresentou resultados satisfatórios e que novos estudos são necessários para garantir a utilização segura desta formulação.

REFERÊNCIAS

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H.H., Pillai, S. Cellular and molecular immunology, 7th ed. Philadelphia. Saunders; 2011.p. 295-307
- Abushelaibi, A., AlMahdin, S., El-Tarabily, K., Shah, N.P., Ayyash, M., 2017. Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. *LWT - Food Sci. Technol.* 79, 316–325. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.041>.
- Acheson, D.W.K., Luccioli, S., 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. Mucosal immune responses. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18, 387–404. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2003.11.002>
- Almeida, M.M.B., de Sousa, P.H.M., Arriaga, Â.M.C., do Prado, G.M., Magalhães, C.E. de C., Maia, G.A., de Lemos, T.L.G., 2011. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Res. Int.* 44, 2155–2159. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.051>
- Alvim, L.B., 2015. Segurança e efeito probiótico de *Weissella paramesenteroides* WpK4 isolada de suíno na infecção experimental com *Salmonella typhimurium* em camundongos. Tese - Universidade Federal de Minas Gerais.
- Andrade, C.R.G., Souza, M.R., Penna, C.F.A.M., Acurcio, L.B., Sant’Anna, F.M., Castro, R.D., Oliveira, D.L.S., 2014. In vitro probiotic properties of *Lactobacillus* spp. Isolated from minas artisanal cheese from serra da Canastra - MG | Propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus* spp. isolados de queijos minas artesanais da Serra da Canastra - MG. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 66, 1592–1600. <https://doi.org/10.1590/1678-6781>
- Aries, V., Crowther, J.S., Drasar, B.S., Hill, M.J., 1969. Degradation of bile salts by human intestinal bacteria. *Gut* 10, 575–576. <https://doi.org/10.1136/gut.10.7.575>
- Barbosa, J.P., Trindade, D.P. de A., De Oliveira, J.G.P., De Souza, J.C., Tette, P.A.S., 2021. Aspectos de segurança e funcionalidade do *Pediococcus acidilactici* isolado de Kombucha brasileira: buscando por atributos de probiótico / Safety and functionality aspects of *Pediococcus acidilactici* isolated from Brazilian Kombucha: screening for probioti. *Brazilian J. Dev.* 7, 121221–121237. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n12-746>
- Bedani, R., Rossi, E.A., 2009. Microbiota intestinal e probióticos: Implicações sobre o câncer de cólon. *J. Port. Gastreterologia* 16, 19–28.
- Begley, M., Gahan, C.G.M., Hill, C., 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 625–651. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.09.003>
- Bengmark, S., 1998. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* 42, 2–7. <https://doi.org/10.1136/gut.42.1.2>
- Bian, J., Peng, F., Peng, X.P., Peng, P., Xu, F., Sun, R.C., 2013. Structural features and antioxidant activity of xylooligosaccharides enzymatically produced from sugarcane bagasse. *Bioresour. Technol.* 127, 236–241. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.112>
- Boonaert, C.J.P., Rouxhet, P.G., 2000. Surface of lactic acid bacteria: Relationships

- between chemical composition and physicochemical properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2548–2554. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2548-2554.2000>
- Bourlioux, P., Koletzko, B., Guarner, F., Braesco, V., 2003. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: Report on the Danone Symposium “The Intelligent Intestine,” held in Paris, June 14, 2002. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 675–683. <https://doi.org/10.1093/ajcn/78.4.675>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci. Technol.* 28, 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Brito, J.M. de, Ferreira, A.H.C., Júnior, H.A. de S., Araripe, M. de N.B. de A., Lopes, J.B., Duarte, A.R., Cardoso, E. de S., Rodrigues, V.L., 2013. Probióticos, prebióticos e simbióticos na alimentação de não-ruminantes -Revisão. *Rev. Eletrônica Nutr.* 10, 2525–2545. Tese - UNESP Botucatu
- Brito, G.F., 2021. Seleção e microencapsulação de bactérias ácido-láticas potencialmente probióticas obtidas de frutos do bacupari (*Rheedia gardneriana*). Dissertação - Universidade Federal do Tocantins.
- Campos, J.V.F., Silva, M.O., Vieira, A.C.A., Faria, L.M. de., Valente, G.L.C., 2021. In vitro evaluation of the probiotic potential of microorganisms isolated from functional commercial fermented milks. *Agrar. Sci. J.* 13, 1–9. <https://doi.org/10.35699/2447-6218.2021.35380>
- Cheuczuk, F., Rocha, L.A., 2014. Propriedades antioxidantes de bebida láctea fermentada prebiótica incorporada de polpa de cajá-manga. Tese - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- CLSI, 2021. Diagnósticos Microbiológicos Especializados [WWW Document]. URL <https://www.dme.ind.br/wp-content/uploads/Bula-de-Bancada-CLSI-Edicao-2021.pdf>
- Collado, M.C., Meriluoto, J., Salminen, S., 2008. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 1065–1073. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0632-x>
- Coppola, M.M., Turnes, C.G., 2004. Probióticos e resposta imune Probiotics and immune response. *Ciência Rural* 34, 1297–1303. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782004000400056>
- Costa, G.N., Suguimoto, H.H., Da Silva Miglioranza, L.H., Gómez, R.J.H.C., 2012. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* frente a microrganismos patogênicos “in vitro.” *Semin. Agrar.* 33, 1839–1846. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n5p1839>
- Costa, H.H.S., Souza, M.R., Acúrcio, L.B., Cunha, A.F., Resende, M.F.S., Nunes, Á.C., 2013. Potencial probiótico in vitro de bactérias ácido-láticas isoladas de queijo-de-minasartesanal da Serra da Canastra, MG. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 65, 1858–1866. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000600038>
- Costa, R. de L., Feltre, K., Pombo, G. do V., Pereira, Y. de S., Costa, M.T., Gobesso, A.A. de O., 2015. Probióticos e exercício físico na saúde digestiva de equinos [WWW Document]. *Novos desafios da Pesqui. em Nutr. e produção Anim.* URL

<https://repositorio.usp.br/item/002732836>

- Cresci, G.A., Bawden, E., 2015. Gut Microbiome: What We Do and Don't Know. *Nutr. Clin. Prat.* 30, 734–746. <https://doi.org/10.1177/0884533615609899>
- Culligan, E.P., Hill, C., Sleator, R.D., 2009. Probiotics and gastrointestinal disease: Successes, problems and future prospects. *Gut Pathog.* 1, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-1-19>
- Cypriano, V.H. do N., 2013. Propriedades Probióticas de *Lactobacillus* spp. de Origem Humana e Interação com Leveduras Potencialmente Patogênicas do Gênero *Candida*. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Damião AOMC, Leite AZA, Lordello MLL, S.A., 2009. Probióticos. *Wait. LD. Nutr. Oral, Enter. e Parenter. na Prática Clínica.* 2115–2138.
- De Oliveira Coelho, B., Fiorda-Mello, F., De Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S.K., De Carvalho, J.C., Soccol, C.R., 2019. In vitro probiotic properties and DNA protection activity of yeast and lactic acid bacteria isolated from a honey-based kefir beverage. *Foods* 8, 1–17. <https://doi.org/10.3390/foods8100485>
- Denipote, F.G., Trindade, E.B.S. de M., Burini, R.C., 2010. [Probiotics and prebiotics in primary care for colon cancer]. *Arq. Gastroenterol.* 47, 93–8.
- Ding, W.K., Shah, N.P., 2010. Enhancing the biotransformation of isoflavones in soymilk supplemented with lactose using probiotic bacteria during extended fermentation. *J. Food Sci.* 75, M140–M149. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01526.x>
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- Du Toit, M., Franz, C.M.A.P., Dicks, L.M.T., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., Ahrens, F., Holzapfel, W.H., 1998. Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. *Int. J. Food Microbiol.* 40, 93–104. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00024-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00024-5)
- Duarte-Almeida, J.M., Santos, R.J. dos, Genovese, M.I., Lajolo, F.M., 2006. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 26, 446–452. <https://doi.org/10.1590/s0101-20612006000200031>
- Duarte, P.F., 2007. Efeito de inibição de cepas de *Lactobacillus*, isolados de fezes humanas, frente a diferentes patógenos. Dissertação - Universidade de São Paulo.
- Duary, R.K., Rajput, Y.S., Batish, V.K., Grover, S., 2011. Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *Indian J. Med. Res.* 134, 664–671. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.90992>
- FAO/WHO, 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria – Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, Córdoba, Argentina.

<http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/probiotics/en/index.html>.

- Feitosa, R.M., 2020. Estabilidade físico-química de iogurtes adoçados com mel de abelha *Apis mellifera* L. *Cienc. Anim. Bras.* 21. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v21e-50923>
- Feltrin, V.P., Sant'Anna, E.S., Porto, A.C.S., Torres, R.C.O., 2000. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 43, 119–124. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132000000100015>
- Fernandez, L.C., 2015. Desenvolvimento de sorvetes probióticos à base de extrato solúvel de soja. Diss. - Universidade São Paulo.
- Ferreira, D.P., 2021. Viabilidade celular e atividade antioxidante de leite fermentado por *Lactobacillus helveticus* e *Enterococcus faecium*. Tese - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- Fisher, K., Phillips, C., 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155, 1749–1757. <https://doi.org/10.1099/mic.0.026385-0>
- Food and Agriculture Organization, 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. pp. 1–11.
- França, T.B. de, Silva, P.F. de O.A., Santos, N.F. dos, Matos, R.J.B. de, 2021. Efeitos De Probióticos Sobre O Eixo Microbiota-Intestino-Cérebro E O Transtorno De Ansiedade E Depressão / Effects of Probiotics on the Microbiota-Intestine-Brain Axis and the Anxiety and Depression Disorder. *Brazilian J. Dev.* 7, 16212–16225. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n2-307>
- Freitas, W.L. da C., 2011. Estudo do Efeito de Micorganismos Probióticos Sobre *Eimeria acervulna* (Tyzzer, 1929) em Frangos de Corte. Dissertação - Universidade de São Paulo.
- García-Cayueta, T., Korany, A.M., Bustos, I., P. Gómez de Cadiñanos, L., Requena, T., Peláez, C., Martínez-Cuesta, M.C., 2014. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Res. Int.* 57, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.01.010>
- Ghosh, A., Chandra, A., Dhar, A., Shukla, P., Baishya, D., 2021. Multi-efficient thermostable endoxylanase from *Bacillus velezensis* AG20 and its production of xylooligosaccharides as efficient prebiotics with anticancer activity. *Process Biochem.* 109, 59–71. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.06.011>
- Gibson, G.R., Probert, H.M., Loo, J. Van, Rastall, R.A., Roberfroid, M.B., 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 17, 259–275. <https://doi.org/10.1079/nrr200479>
- Gil-Rodríguez, A.M., Carrascosa, A. V., Requena, T., 2015. Yeasts in foods and beverages: In vitro characterisation of probiotic traits. *Lwt* 64, 1156–1162. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.042>
- Grillo, V.T.R., Gonçalves, T.G., De Campos Júnior, J., Paniágua, N.C., Teles, C.B.G., 2013. Bacterial incidence and antimicrobial resistance profile in pediatric patients at a public hospital in Rondônia, Brazil. *Rev Ciênc Farm Básica Apl* 34, 117–123.

- Grosicki, G.J., Riemann, B.L., Andrew, A.F., Taylor Valentino, M.S.L., 2020. Self-Reported Sleep Quality Is Associated With Gut Microbiome Composition in Young, Healthy Individuals: A Pilot Study. *Elsevier* 73, 76–81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sleep.2020.04.013>.
- Guimarães, S.C.N., Alves, D.T.V., Souza, R.B.M., Costa, C.E.F., Melo, K.C., Oliveira, I.S., Soares, S.D., Santos, O.V., 2020. Desenvolvimento de formulações fermentadas probióticas mistas enriquecidas com óleos de frutos amazônicos. *Brazilian J. Dev.* 6, 10882–10901. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n3-093>
- Gupta, M., Bangotra, R., Sharma, S., Vaid, S., Kapoor, N., 2022. Industrial Crops & Products Bioprocess development for production of xylooligosaccharides prebiotics from sugarcane bagasse with high bioactivity potential. *Ind. Crop. Prod.* 178, 114591. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114591>
- Han, M., Liu, G., Chen, Y., Wang, D., Zhang, Y., 2020. Comparative Genomics Uncovers the Genetic Diversity and Characters of *Veillonella atypica* and Provides Insights Into Its Potential Applications. *Front. Microbiol.* 11, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01219>
- Hooshdar, P., Kermanshahi, R.K., Ghadam, P., Khosravi-Darani, K., 2020. A review on production of exopolysaccharide and biofilm in probiotics like lactobacilli and methods of analysis. *Biointerface Res. Appl. Chem.* 10, 6058–6075. <https://doi.org/10.33263/BRIAC105.60586075>
- Hoque, M.Z., Akner, F., Hossain, K.M., Rahman, M.S.M., Billah, M.M., Islam, K.M.D., 2010. Isolation, identification and analysis of probiotic properties of *Lactobacillus* spp from traditional yoghurts. *World J. Dairy & Food Sci.* 5, 39–46.
- Huang, D., Boxin, O.U., Prior, R.L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Husain, S., 2008. Effect of Ferric Iron on Siderophore Production and Pyrene Degradation by *Pseudomonas fluorescens*. *Curr Microbiol* 331–334.
- Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G., Hildebrandt, B., Müller-Bertling, S., Witte, W., Goossens, H., 2007. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 900–912. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm035>
- Klein, G., 2011. Antibiotic Resistance and Molecular Characterization of Probiotic and Clinical *Lactobacillus* Strains in Relation to Safety Aspects of Probiotics. *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 267–81. <https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0672>
- Kurdi, P., Kawanishi, K., Mizutani, K., Yokota, A., 2006. Mechanism of growth inhibition by free bile acids in lactobacilli and bifidobacteria. *J. Bacteriol.* 188, 1979–1986. <https://doi.org/10.1128/JB.188.5.1979-1986.2006>
- Lemos, D.M., Paula, A., Rocha, T., Palmeira, J., Gouveia, G. De, Neto, E., Oliveira, A. De, 2019. Elaboração e caracterização de geleia prebiótica mista de jabuticaba e acerola. *Brazilian J. Food Technol.* 22, 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/1981-6723.09818>
- Lima, M. dos S.F. de, Souza, K.M.S. de, Porto, A.L.F., Cavalcanti, M.T.H., 2016.

- Avaliação da capacidade hidrofóbica e de auto-agregação de leveduras isoladas após digestão in vitro de leite fermentado por grãos de kefir. COBEQ. <https://doi.org/10.36229/978-65-5866-059-0.cap.07>
- Lima Maia, P., de Cerqueira Fiorio, B., Regis da Silva, F., 2018. A Influência Da Microbiota Intestinal Na Prevenção Do Câncer De Cólon. *Arq. Catarinenses Med.* 47, 182–197.
- Luciano, W.A., 2016. Avaliação de propriedades probióticas de cepas de *Lactobacillus* isoladas de subprodutos do processamento de frutas. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal da Paraíba.
- Macedo, L.L., Vimercati, W.C., Araújo, C. da S., 2020. Fruto-oligossacarídeos : aspectos nutricionais , tecnológicos e sensoriais 1–9. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.08019>
- Machado, A. dos S., 2008. Importância da microbiota intestinal para a saúde humana, enfocando nutrição, probióticos e disbiose. Tese- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte.
- Machado, J.C., 2021. Potencial probiótico, tecnológico e aspectos de segurança de bactérias ácido- lácticas isoladas de kefir e de kombucha. Tese - Universidade Federal de Pelotas.
- Machado, R.C., Gonçalves, L.B., Appelt, H.R., Roll, R.J., Czarnobay, M., Nespolo, C.R., 2020. Contagem de Bactérias lácticas e análise físico químicas em leite ovino cru. *An. do Salão Int. Ensino, Pesqui. e Extensão* 11, 4.
- Martín, R., Suárez, J.E., 2010. Biosynthesis and degradation of H₂O₂ by vaginal lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 400–405. <https://doi.org/10.1128/AEM.01631-09>
- Mascarenhas, G.C.M., Salles, P.P., Do Amaral, M.M.L.S., 2021. O impacto da microbiota intestinal na qualidade do sono: uma revisão integrativa / The impact of gut microbiota on sleep quality: An integrative review. *Brazilian J. Dev.* 7, 70985–70998. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n7-327>
- Mashima, I., Nakazawa, F., 2015. The interaction between *Streptococcus* spp. and *Veillonella tobetsuensis* in the early stages of oral biofilm formation. *J. Bacteriol.* 197, 2104–2111.
- Mathara, J.M., Schillinger, U., Kutima, P.M., Mbugua, S.K., Guigas, C., Franz C., Holzappel, W.H., 2008. Functional Properties of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Maasai Traditional Fermented Milk Products in Kenya. *Curr Microbiol* 56, 315–321.
- Mathur, S., Singh, R., 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - A review. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 281–295. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008>
- Moroti, C., Magri, L.F.S., Souza, J.C.B. de, Matos, D.B. de S., Costa, M. de R., Sivieri, K., 2009. Potencial da Utilização de Alimentos Probióticos, Prebióticos e Simbióticos na Redução de Colesterol Sanguíneo e Glicemia. *UNIOPAR Cient Ciênc Biol Saúde* 11, 63–67.
- Nancharaiyah, Y.V., Lensa, P.N.L., 2015. Ecology and Biotechnology of Selenium-

Respiring Bacteria. *MMBR* 79, 61–70.

Natividade, J.M.M., Verdu, E.F., 2013. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications. *Pharmacol. Res.* 69, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.007>

Newaj-Fyzul, A., Al-Harbi, A.H., Austin, B., 2014. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. *Aquaculture* 431, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.026>

Oliveira, A.M., Hammes, T.O., 2016. Microbiota e barreira intestinal: implicações para obesidade. *Clin. Biomed. Res.* 36, 222–229. <https://doi.org/10.4322/2357-9730.67683>

Oliveira, M.E.G. de O., 2013. Queijo de coalho caprino adicionado de bactérias lácticas: Elaboração, caracterização e avaliação in vitro de potencial probiótico. Dissertação - Universidade Federal de Pernambuco.

Omura, M.H., 2014. Características probióticas e de segurança de bactérias do ácido láctico predominantes em leite humano. Tese - Universidade Federal de Viçosa.

Oniszczyk, A., Oniszczyk, T., Gancarz, M., 2021. Role of Gut Microbiota, Probiotics and Prebiotics in the Cardiovascular Diseases 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules26041172>

Paula, L., Lima, J. De, Henrique, L., Bambirra, S., Aburjaile, F., 2011. Produção de substâncias envolvidas no fenômeno de antagonismo bacteriano Involved substance production in the phenomenon of bacterial antagonism. *Rev. Biol. e Ciências da Terra* 11, 1–10.

Pauli, A. de, 2020. Probióticos e prebióticos [WWW Document]. URL <https://www.ojilo.com.br/colunas/artigo/85-probiotico-e-prebioticos> (accessed 8.30.22).

Pehrson, M.E. de S.F., 2013. Avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias sintetizadas por cepas de *Lactobacillus* sp. que apresentam propriedades probióticas. Dissertação - Universidade de São Paulo.

Pelletier, C., et al, 1997. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1725–1731.

Peres, J.F., Maria, H., Bolini, A., 2020. Sorvetes de chocolate simbiótico de baixa caloria : análise tempo-intensidade múltipla e estudo de preferência. *Brazilian J. Food Technol.* 23, 1–18. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/1981-6723.10819>

Petersen, L.M., Bautista, E.J., Nguyen, H., Hanson, B.M., Chen, L., Lek, S.H., Sodergren, E., Weinstock, G.M., 2017. Community characteristics of the gut microbiomes of competitive cyclists. *Microbiome* 5. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0320-4>

Pumpa, K. L.; Mckune, A. J.; Harnett, J., 2019. A new role for probiotics in enhancing rugby elite athlete: a double-blind controlled study randomized. *J. Sci. Med. Sport* 22, 876–881. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2019.03.013>.

Raizel, R., Santini, E., Kopper, A.M., Filho, A.D. dos R., 2011. Efeitos do consumo de

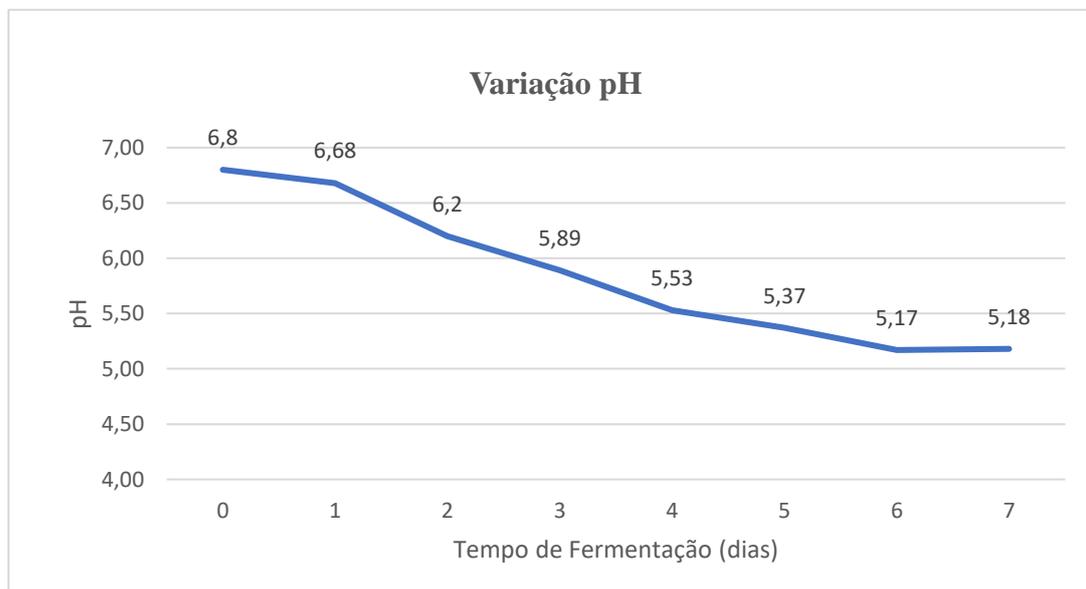
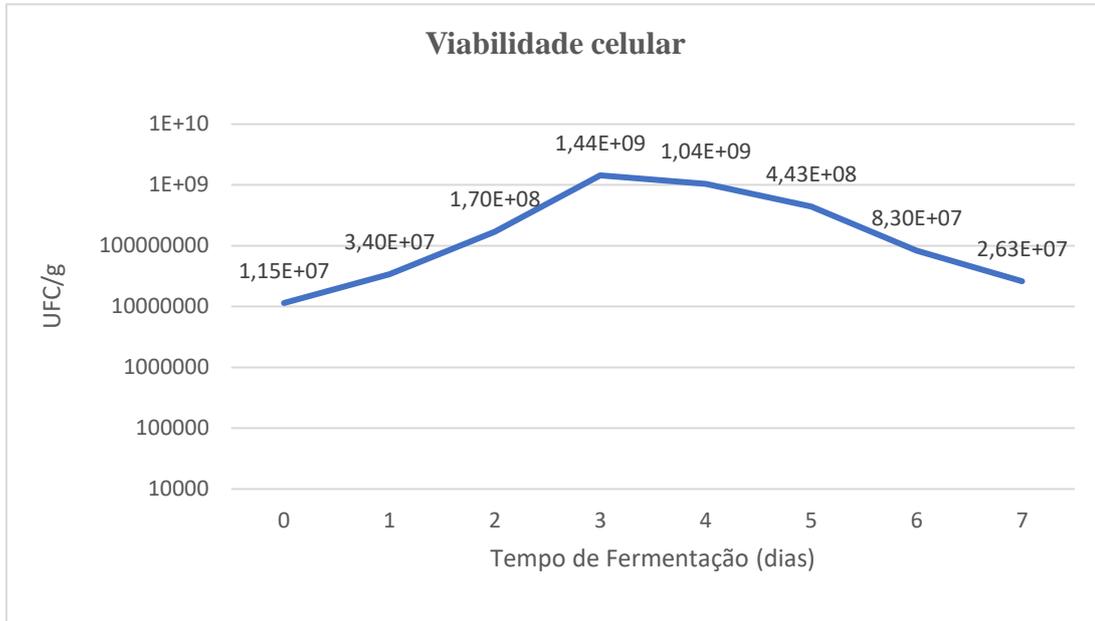
- probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. *Ciência & Saúde* 4, 66–74.
- Ramiro-Puig, E., Pérez-Cano, F.J., Castellote, C., Franch, A., Castell, M., 2008. [The bowel: a key component of the immune system]. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 100, 29–34. <https://doi.org/10.4321/s1130-01082008000100006>
- Ramos, M., 2006. Influência da ingestão de *Bifidobacterium breve* carregado no leite humano na modulação da microbiota intestinal, na histomorfometria do cólon, na produção de citocinas e de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio em modelo murino. Tese - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- Rebequi et al, F., 2016. Utilização de inulina como substituto de açúcar em paçoca de amendoim: avaliação físico-química e sensorial entre escolares. *Salusvita* 35, 305–320.
- Redondo, N.C., 2008. Avaliação in vitro de características probióticas do enterococcus faecium CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416. Tese- Universidade Estadual Paulista (UNESP).
- Rodrigues, F.A. de P., Medeiros, P.H.Q.S. de, Prata, M. de M.G., Lima, A.Â.M., 2016. Fisiologia da Barreira Epitelial Intestinal. *Sist. Dig. Integr. Básico-Clínica* 441–478. <https://doi.org/10.5151/9788580391893-18>
- Rodrigues, P.V., 2022. *Lactobacillus* sp. H7 isolado de kefir na produção e caracterização de leite fermentado com a adição de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 e amora-preta. Dissertação - Universidade Federal de Pelotas.
- Rosa, L.D.S., Teodoro, A.J., 2022. Produtos lácteos probióticos e câncer – uma revisão narrativa Probiotics dairy products and cancer- a narrative review Productos lácteos probióticos y câncer : una revisión narrativa. *Res. Soc. Dev.* 11, 1–17. I: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i5.28221>
- Saad, S.M.I., 2006. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Rev. Bras. Ciências Farm.* 42, 1–16. <https://doi.org/10.1590/s1516-93322006000100002>
- Salas-Jara, M.J., Ilabaca, A., Vega, M., García, A., 2016. Biofilm forming lactobacillus: New challenges for the development of probiotics. *MDPI* 4, 1–14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4030035>
- Salminen, S., Bouley, C., Gibson, G., 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* 80, 147–171. doi:10.1079/BJN19980108
- Santos, J.T. de O., 2020. Avaliação in vitro da capacidade de absorção de aflatoxina B1 e probiótica de leveduras isoladas do camarão branco do pacífico (*Litopenaeus vannamei*). Dissertação - Universidade Federal do Piauí.
- Scheiman, J., Lubber, J.M., Chavkin, T.A., MacDonald, T., Tung, A., Pham, L.D., Wibowo, M.C., Wurth, R.C., Punthambaker, S., Tierney, B.T., Yang, Z., Hattab, M.W., Avila-Pacheco, J., Clish, C.B., Lessard, S., Church, G.M., Kostic, A.D., 2019. Meta-omics analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. *Nat. Med.* 25, 1104–1109. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0485-4>
- Schieber, M., Chandel, N.S., 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr. Biol.* 24, R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>

- Silva, L.A. da, 2018. Potencial probiótico de bactérias lácticas isoladas de leite caprino: Aspectos de segurança e funcionalidade. Tese - Universidade federal da Paraíba.
- Silva, N.F. da, Wanderley, K.A.A., Gomes, A.D.C., Finkler, C.L.L., 2021. Caracterização in vitro de propriedades probióticas de bactérias ácido lácticas. Rev. Bras. Tecnol. Agroindustrial 15, 3556–3572. <https://doi.org/10.3895/rbta.v15n1.12837>
- Silva et al, N. da;, 2013. Manual de métodos de Análise microbiológica de alimentos e água [WWW Document]. URL https://books.google.com.br/books?id=ki9dDwAAQBAJ&pg=PA521&lpg=PA521&dq=desaeração+do+meio+com+banho+de+gelo&source=bl&ots=QTHEGdkEeU&sig=ACfU3U2QOY7_CDpyN6UQX8kd-vNW030W7Q&hl=pt-BR&sa=X&ved=2ahUKEwi389jcx8P1AhXFqpUCHaBMAOQQ6AF6BAg3EAM#v=onepage&q=desaera
- Silva, F.B., 2010. Efeitos da inulina nas propriedades físico-químicas, sensoriais e de textura de embutidos de peito de peru defumado. Dissertação - Universidade Federal de Santa Catarina.
- Silva, F.C., Aparecida, M., Oliveira, D.L., Souza, L.B. De, Goulart, T., Souza, D., Aparecida, H., Paula, D.A., 2019. Frutanos tipo inulina associados à dieta de cafeteria : efeito no perfil cardiometabólico de ratos Wistar Inulin-type fructan associated with cafeteria diet : effect on the. Semin. Ciências Biológicas e da Saúde 40, 25–36. <https://doi.org/10.5433/1679-0367.2019v40n1p25>
- Sousa, G.L., 2013. Desenvolvimento de sorvete simbiótico de graviola (*Annona muricata* L.) com teor reduzido de gordura e avaliação da resistência gastrointestinal dos probióticos in vitro. Tese.
- Souza, B.M.S. de, 2018. Avaliação do potencial probiótico de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus fermentum* autóctones e aplicação em leites fermentados com diferentes matrizes. Tese - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho.
- Souza, P.G. de, Silva, R.M. da, Pontes, G. da C., Marinho, H.A., 2022. Caracterização físico-química do leite fermentado por *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subs. *thermophilus* imobilizados em alginato. Brazilian J. Sci. 1, 30–37. <https://doi.org/10.14295/bjs.v1i3.22>
- Souza, K., Bueno, J., 2013. Utilização dos Probióticos no Esporte [WWW Document]. URL <http://clinicaesportivajaneteneves.blogspot.com/2013/06/utilizacao-dos-probioticos-no-esporte.html>
- Stürmer, E.S., Casasola, S., Gall, Maristella Comoretto, Gall, Magda Comoretto, 2012. A importância dos probióticos na microbiota intestinal humana. Rev Bras Nutr Clin 27, 264–72.
- Tagg, J.R., McGiven, A.R., 1971. Assay system for bacteriocins. Appl. Microbiol. 21, 943. <https://doi.org/10.1128/aem.21.5.943-943.1971>
- Terraf, M.C.L., Juárez Tomás, M.S., Nader-Macías, M.E.F., Silva, C., 2012. Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. J. Appl. Microbiol. 113, 1517–1529. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05429.x>

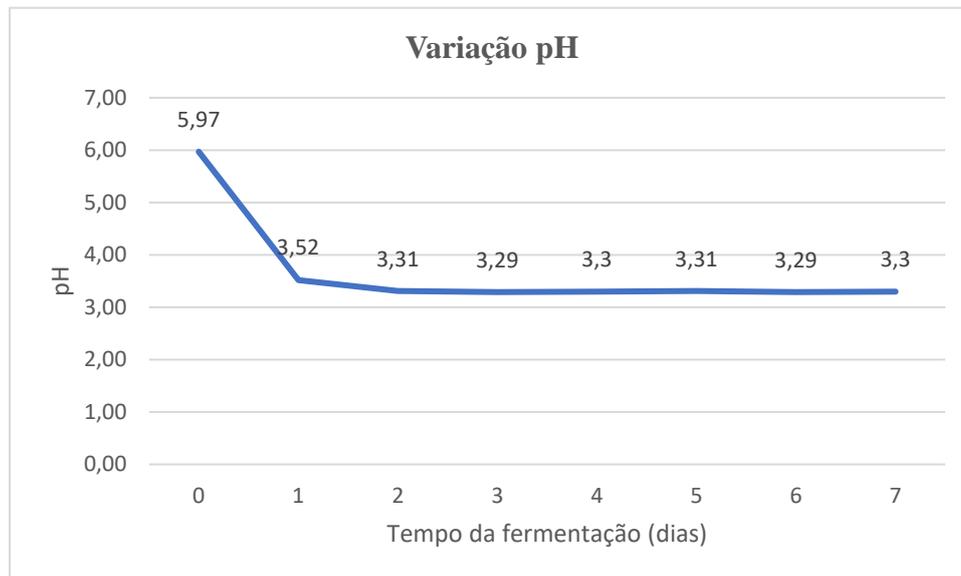
- Todorov, S.D., Furtado, D.N., Saad, S.M.I., Tome, E., Franco, B.D.G.M., 2010. Potential beneficial properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* 110, 971–986. DOI:10.1111/j.1365-2672.2011.04950.x.
- Toimil, R.F., 2019. Microbiota intestinal: cada vez mais importante | Veja Saúde [WWW Document]. URL <https://saude.abril.com.br/blog/alimente-se-com-ciencia/microbiota-intestinal-cada-vez-mais-importante/>
- Ubbink, J., Schär-Zammaretti, P., 2003. The cell wall of lactic acid bacteria: Surface constituents and macromolecular conformations. *Eur. Cells Mater.* 6, 108. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74820-6
- Vesterlund, S., Vankerckhoven, V., Saxelin, M., Goossens, H., Salminen, S., Ouwehand, A.C., 2007. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: Presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. *Int. J. Food Microbiol.* 116, 325–331. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2007.02.002>
- Vinderola, G.C., Reinheimer, J.A., 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristic and biological barrier resistance. *Food Res* 6, 885–904.
- Vitola, H.R.S., 2017. Bactérias ácido lácticas isoladas de silagem de colostro bovino: Potencial probiótico e viabilidade de imobilização celular utilizando como suporte grãos de soja. Dissertação -Universidade Federal de Pelotas.
- Wang, X., Wu, Q., Deng, K., Wei, Q., Hu, P., He, J., Liu, H., Zheng, Y., Wei, H., Shah, N.P., Chen, T., 2015. A novel method for screening of potential probiotics for high adhesion capability. *J. Dairy Sci.* 98, 4310–4317. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9356>
- Xie, W., Khosasih, V., Suwanto, A., Kim, H.K., 2012. Characterization of lipases from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from human facial sebaceous skin. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 84–91. <https://doi.org/10.4014/jmb.1107.07060>
- Yu, L.C.-H., 2012. Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 3, 27. <https://doi.org/10.4291/wjgp.v3.i1.27>
- Zamarchi, C.T., Moleta, M.B., Macagnan, F.T., 2020. Benefícios da aplicação de fibras alimentares à base de polidextrose e inulina em alimentos funcionais: revisão integrativa. Trabalho de Conclusão de curso - Instituto Federal Santa Catarina.

APÊNDICE A

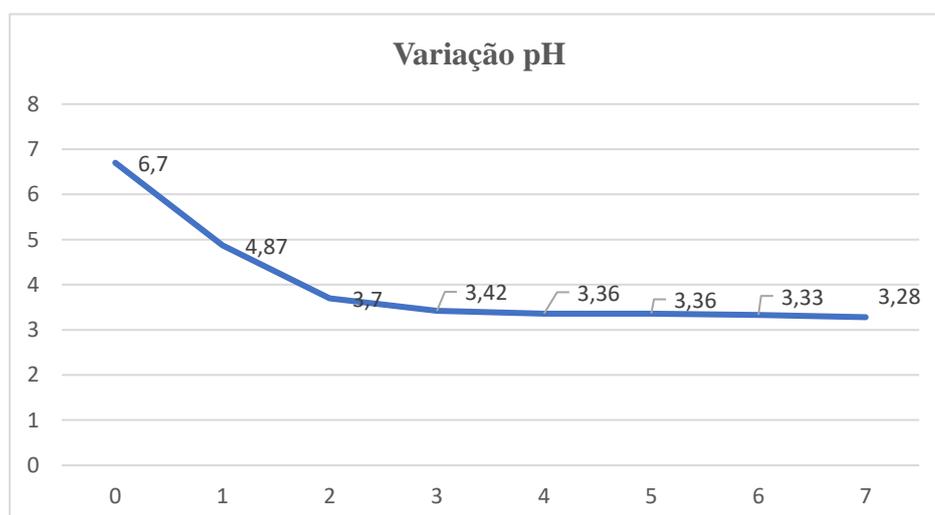
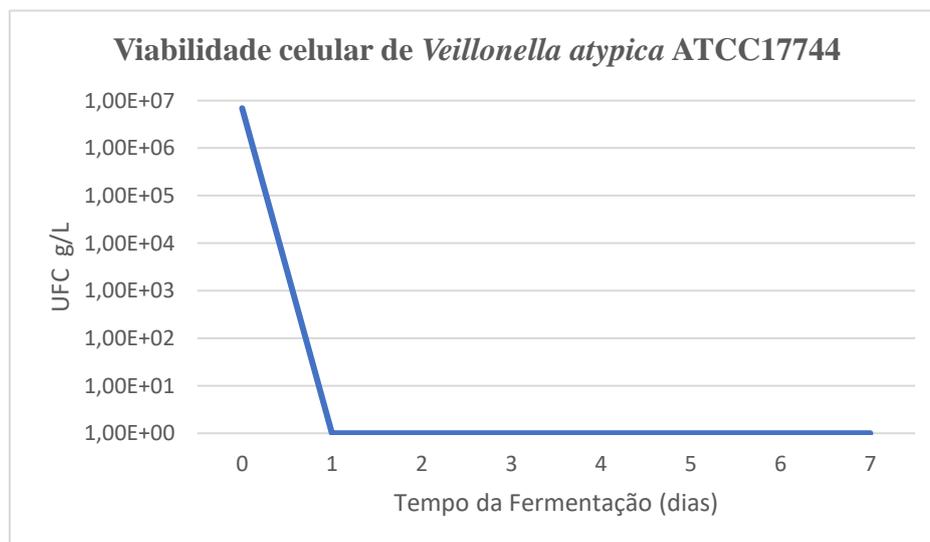
1. ENSAIO 1: Desempenho de *Veillonella atypica* ATCC17744 em meio formulado com leite reconstituído (10% v/v)



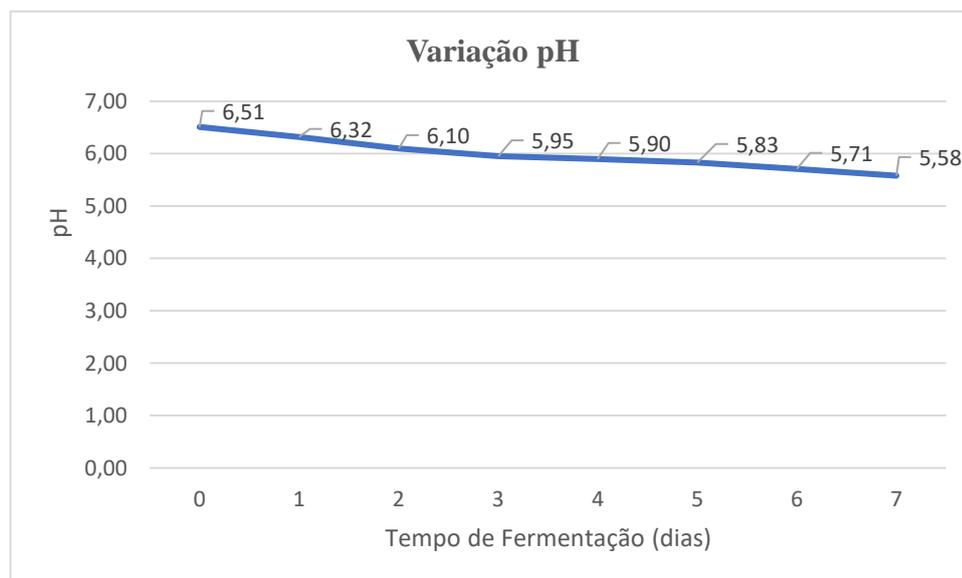
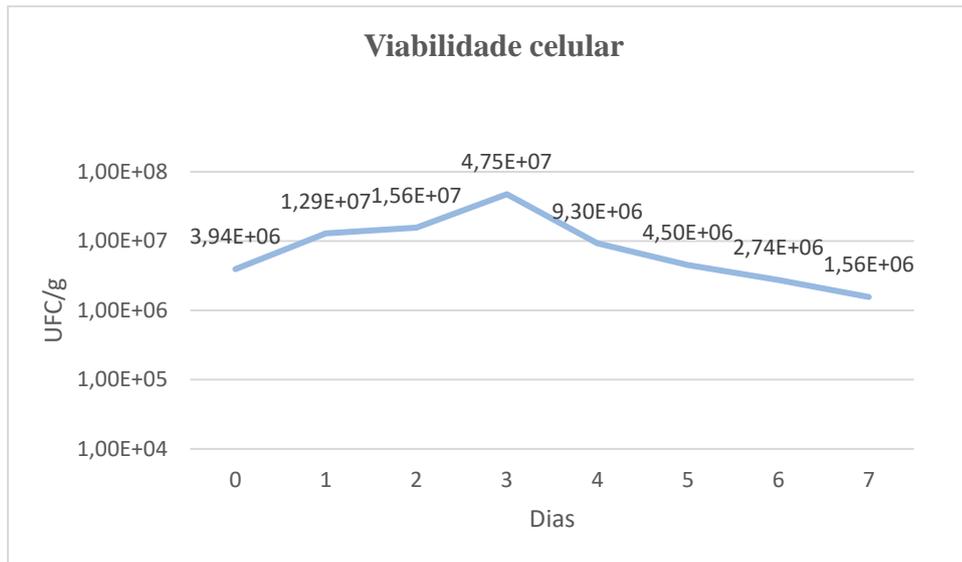
2. ENSAIO 2: Variação do pH de *Lactobacillus helveticus* em meio formulado com leite reconstituído (10% v/v)



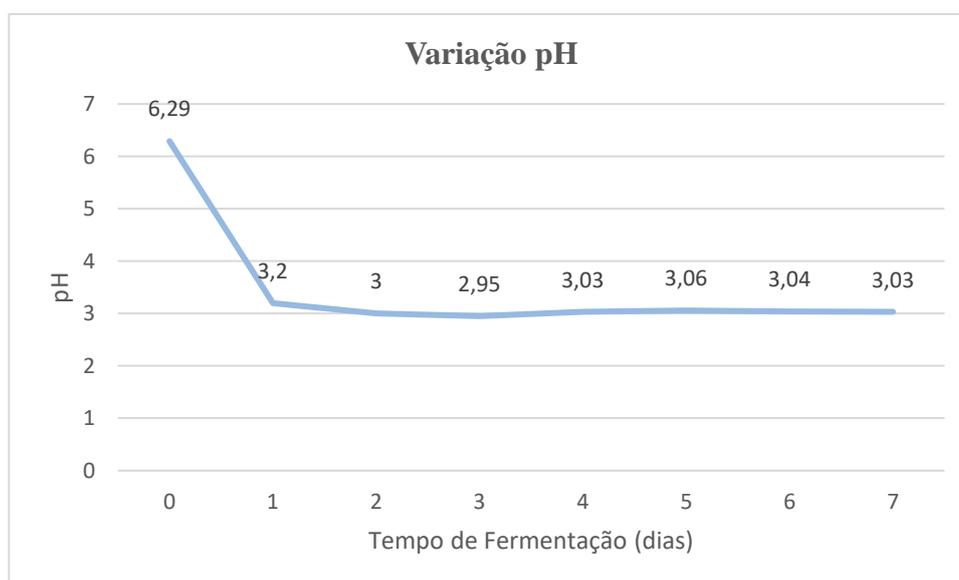
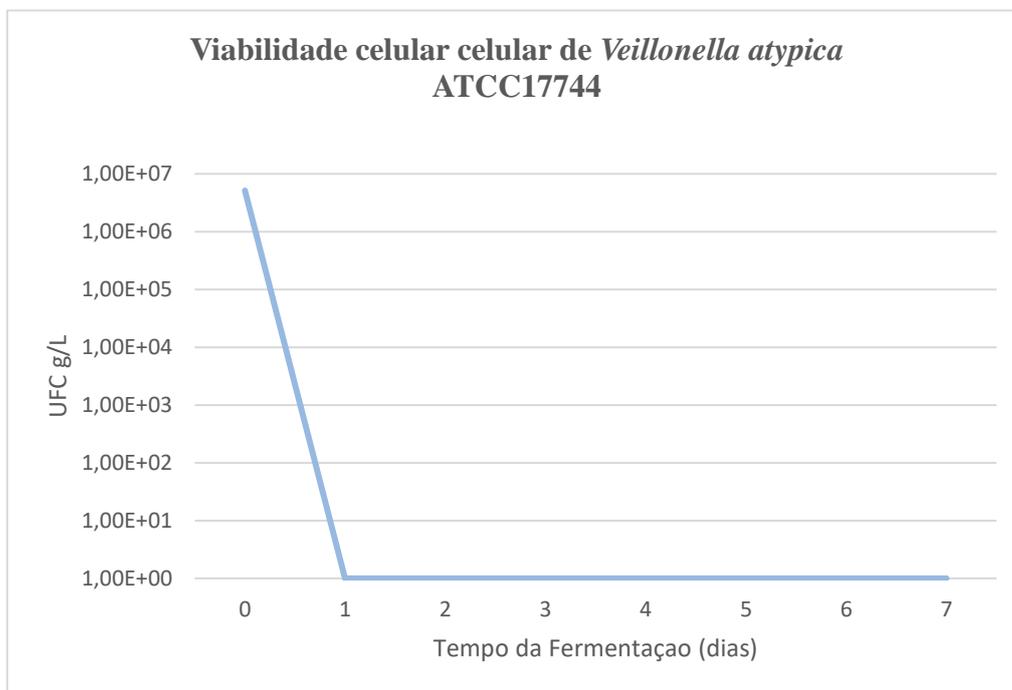
3. ENSAIO 3: Desempenho de *Veillonella atypica* ATCC17744 em co-cultura com *Lactobacillus helveticus* em meio formulado com leite reconstituído (10% v/v)



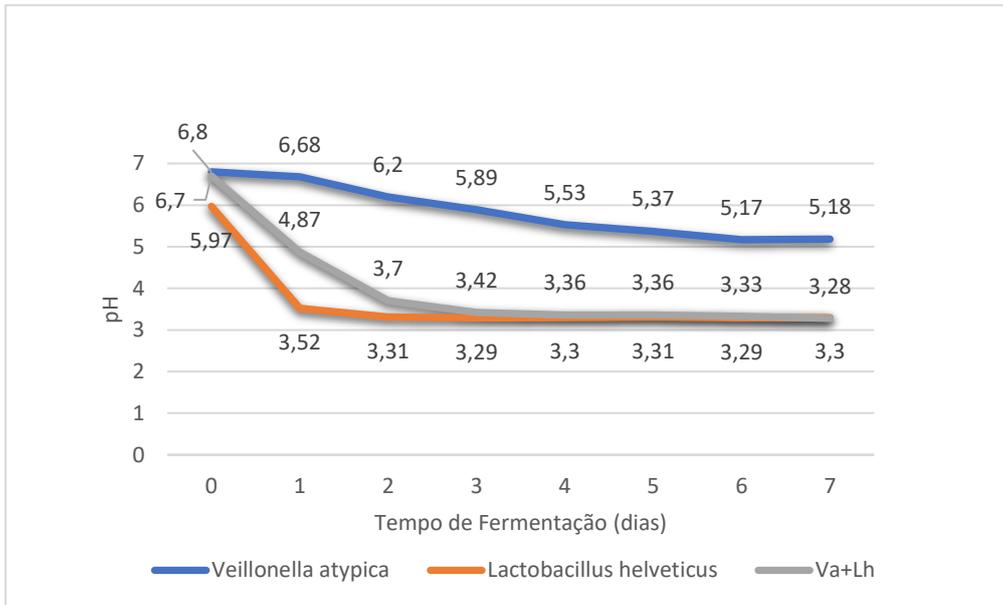
4. ENSAIO 4: Desempenho de *Veillonella atypica* ATCC 17744 em meio formulado com leite reconstituído (10% v/v) enriquecido com inulina (1% v/v)



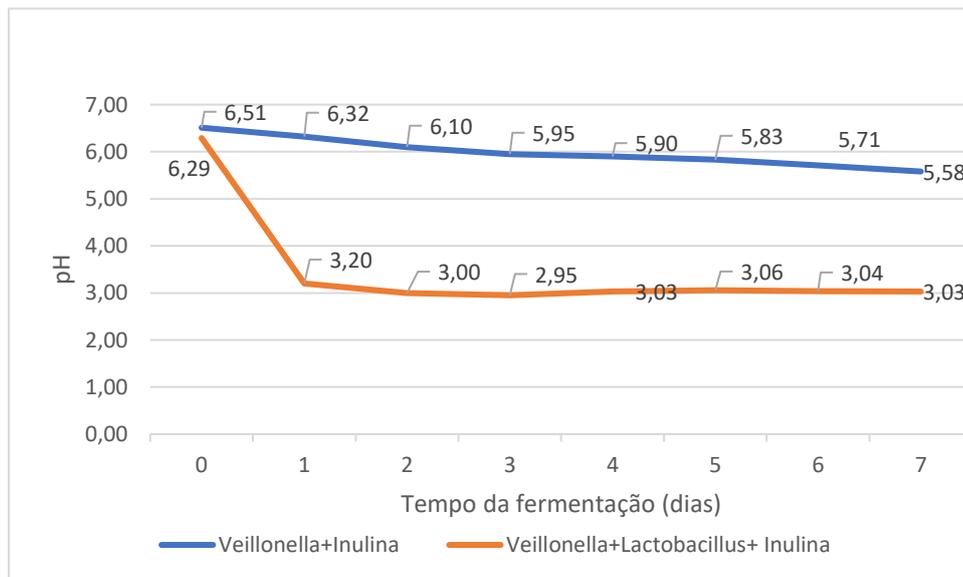
5. ENSAIO 5: Desempenho de *Veillonella atypica* ATCC 17744 em co-cultura com *Lactobacillus helveticus* em meio formulado com leite reconstituído (10% v/v) e enriquecido com inulina (1% v/v)



6. Compilação dos resultados que demonstram a variação do pH nos ensaios 1,2 e 3



7. . Compilação dos resultados que demonstram a variação do pH nos ensaios 4 e 5



APÊNDICE B



Figura 13. Microplaca relativa ao Teste da formação de biofilme por *Veillonella atypica* ATCC 17744 conforme descrito em M&M - item 3.4.2.3

Tabela 3. Valores de Absorbância referentes aos testes de formação de biofilme A) ensaio 1 e B) ensaio 2 conforme descrito em M&M – 3.4.2.3

A)		24 HORAS						3		4		5		6		7		B)		24 HORAS						3		4		5		6		7							
A	0,0725	0,0713	0,0700	0,0719	0,0744	0,0816	A	0,0795	0,0859	0,0871	0,0773	0,0792	0,0873	B	0,0648	0,0654	0,0638	0,0735	0,0711	0,0709	B	0,0848	0,0757	0,0775	0,0852	0,0833	0,0733	C	0,0863	0,0811	0,0597	0,0779	0,0764	0,0795	C	0,0863	0,0933	0,087	0,085	0,0852	0,1222
MEDIAS	BRANCO	Amostras						MEDIAS	BRANCO	Amostras																															
	0,0745	0,072567							0,083533	0,085633																															
A)		48 HORAS						3		4		5		6		7		B)		48 HORAS						3		4		5		6		7							
A	0,0725	0,1249	0,0916	0,0912	0,0806	0,0894	A	0,0795	0,1168	0,1152	0,124	0,1034	0,1158	B	0,0648	0,0894	0,0918	0,0848	0,0871	0,0883	B	0,0848	0,1236	0,1086	0,1121	0,1257	0,1589	C	0,0863	0,1075	0,1787	0,0928	0,0813	0,1111	C	0,0863	0,124	0,1057	0,1181	0,1998	0,1092
MEDIAS	BRANCO	Amostras						MEDIAS	BRANCO	Amostras																															
	0,0745	0,099367							0,0855	0,12406																															

Tabela 4. Valores médios de Absorbância referentes aos testes de formação de biofilme obtidos nos ensaios 1 e 2, conforme descrito em M&M – 3.4.2.3

24 HORAS		BRANCO		3		4		5		6		7			
A	0,076	0,0786	0,07855	0,0746	0,0768	0,08445	B	0,0748	0,07055	0,07065	0,07935	0,0772	0,0721		
B	0,0748	0,07055	0,07065	0,07935	0,0772	0,0721	C	0,0863	0,0872	0,07335	0,08145	0,0808	0,10085		
C	0,0863	0,0872	0,07335	0,08145	0,0808	0,10085	MEDIAS	BRANCO	Amostras						
MEDIAS	0,079033	0,0791							0,079033	0,111713					
48 HORAS		BRANCO		3		4		5		6		7			
A	0,076	0,12085	0,1034	0,1076	0,092	0,1026	B	0,0748	0,1065	0,1002	0,09845	0,1064	0,1236		
B	0,0748	0,1065	0,1002	0,09845	0,1064	0,1236	C	0,0863	0,11575	0,1422	0,10545	0,14055	0,11015		
C	0,0863	0,11575	0,1422	0,10545	0,14055	0,11015	MEDIAS	BRANCO	Amostras						
MEDIAS	0,079033	0,111713							0,079033	0,111713					



Figura 14. Teste gelatinase: tubos contendo meio BHIL com gelatina **A)** em estado líquido após 24 e 48 de incubação ; **B)** em banho de gelo; **C)** em estado sólido após banho de gelo, conforme descrito em M&M – item 3.4.5.2



Figura 15. Teste Lipase – Placa de petri evidenciando a ausência de halos – conforme descrito em M&M - item 3.4.5.3

Análise	Resultado	
Atividade Hemolítica	Gama Hemolítica	

Figura 16. Teste atividade hemolítica – placas de petri evidenciando ausência de formação de halos, conforme descrito em M&M – item 3.4.5.5

ANEXO A : Certificado de Análise - Antibiograma e Antimicrobiana

	<p>Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia de Alimentos Laboratório de Higiene e Legislação</p>	
---	---	---

Relatório de Ensaio Analítico – RE 08.22

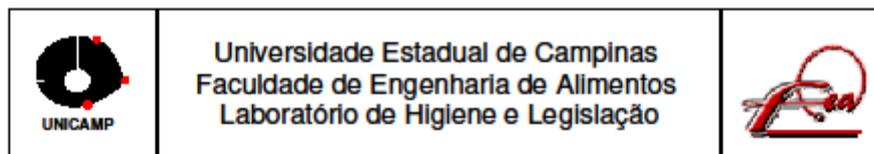
p. 1/3

Interessado: Julia C. Fernandes – EEL/USP**Data de entrada:** 03/11/2022**Material recebido:** 01 Cepa de *Veillonella atypica***Tabela 1. Resultado teste de contaminação.**

Amostra	Crescimento em MRS 37°C/24h
Cepa <i>Veillonella</i>	Colônias uniformes em MRS. Através de microscopia, verificou-se a pureza da cepa, seguindo-se com as análises.

Tabela 2. Antibiograma. Análise em duplicata.

Antibiótico	Halo (mm)	Média	Interpretação
Ceftiofur	38	39,5	Sensível
	41		
Ciprofloxacina	21	25,5	Sensível
	30		
Ceftriaxona	36	37	Sensível
	38		
Enrofloxacina	24	27	Sensível
	30		
Amoxicilina	22	22,5	Sensível
	23		
Ampicilina	22	22,5	Sensível
	23		
Gentamicina	19	21,5	Sensível
	24		
Tetraciclina	28	30	Sensível
	32		



p. 2/3

Tabela 3. Teste de inibição por difusão em ágar por poços (40 µL inóculo/poço). Análises em triplicata.

Amostra	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>E. coli</i> ATCC 11229
Cepa <i>Veillonella</i> (pellet)	Sem formação de halo	Sem formação de halo
	Sem formação de halo	Sem formação de halo
	Sem formação de halo	Sem formação de halo

*Controle TSA: sem crescimento.

Tabela 4. Teste de inibição por difusão em ágar por contato direto (10ul). Análises em triplicata.

Amostra	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>E. coli</i> ATCC 11229
Cepa <i>Veillonella</i> (pellet)	Sem formação de halo	Sem formação de halo
	Sem formação de halo	Sem formação de halo
	Sem formação de halo	Sem formação de halo
Cepa <i>Veillonella</i> (sobrenadante)	Sem formação de halo	Sem formação de halo
	Sem formação de halo	Sem formação de halo
	Sem formação de halo	Sem formação de halo

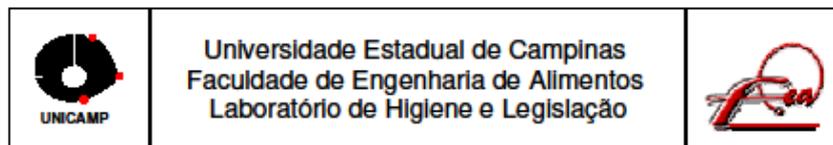
*Controle TSA: sem crescimento.

Métodos utilizados:

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 31st ed. CLSI supplement M100 (ISBN 978-1-68440-104-8 [Print]; ISBN 978-1-68440-105-5 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2021 (Adaptado).

TAGG, J.R., MCGIVEN, A.R. Assay system for bacteriocins. **Applied Microbiology**, Baltimore, v.21, n.5, p.943, 1971.

Mayr-Harting, A., Hedges, A.J., & Berkeley, C.W. (1972). **Methods for studying bacteriocins**. In Norris, J.R. & Ribbons, D.W. *Methods in Microbiology*, vol. 7^A, (P.315-422). New York: Academic Press Inc.



p.3/3

Comentários:

O(s) resultado(s) apresentado(s) refere(m)-se à(s) amostra(s) recebida(s), sendo o interessado responsável pela amostragem e envio ao nosso laboratório.

Os resultados do teste de difusão em ágar não indicam presença de ação antimicrobiana de *Veillonella* sobre os micro-organismos alvos do estudo.

Campinas, 24 de novembro de 2022.



Profª Drª Maristela S. do Nascimento

ANEXO B: Certificado de Análise - Atividade Antioxidante

Análise atividade antioxidante ao radical - 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH)

Método espectrofotométrico mensurado a 517 nm, com resultados expressos como percentual de atividade em relação ao controle (Atividade %) e Atividade equivalente ao Trolox (Equivalente Trolox μM) conforme equação e curva padrão (Figura 1) apresentados abaixo respectivamente:

$$\text{Atividade \%} = (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}$$

* A_{controle} é equivalente a absorbância da solução 0.1 mM de DPPH e água

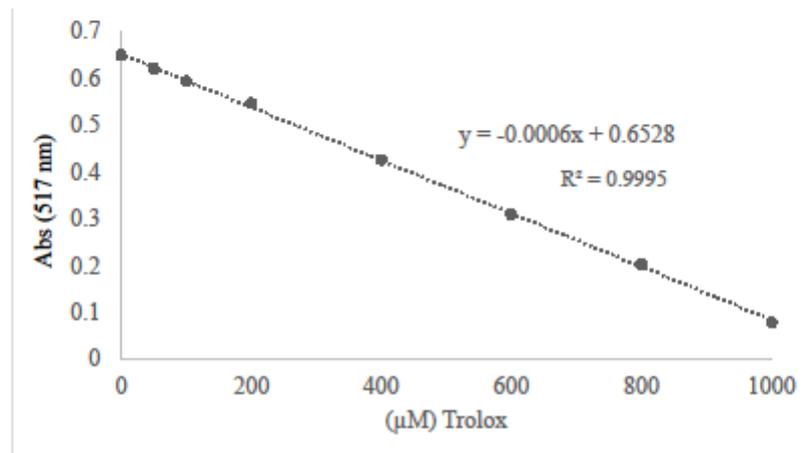


Figura 1. Curva de calibração em relação a atividade antioxidante do radical DPPH ao Trolox (μM).

Resultados

Tabela 1. Atividades antioxidantes em relação ao radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) das amostras de extrato de bactéria (Cultura velha e Cultura fresca).

Amostra	Atividade %	Equivalente Trolox (μM)
Cultura velha	$2,05 \pm 0,23$	$26,88 \pm 2,54$
Cultura fresca	$4,30 \pm 0,15$	$51,33 \pm 1,66$

*Valores médios \pm respectivos desvios mensurados em triplicata.

ANEXO C: Certificado de Análise - Atividade Hemolítica



ANALYTICAL SCIENCE ANÁLISES E CONSULTORIA

CERTIFICADO DE ANÁLISE N° CA 2022/4345

Página 1 de 1

AMOSTRA(S): 2022/4345**MATERIAL:** Isolado de *Veillonella* sp**INTERESADO:** Escola de Engenharia de Lorena EEL/USP**ENDEREÇO:** Estrada Municipal do Campinho, s/n – Pte Nova – Lorena-SP**NATUREZA DA ANÁLISE:** Microbiológica **Data da Análise:** 26/10/2022**1. METODOLOGIA**

Oliveira Coelho B., Fiorda - Mello F., De Melo Pereira G.V., Thomaz - Soccol V., Rakshit S.K., De Carvalho J.C., Soccol C.R.J.F. In Vitro Probiotic Properties And Dna Protection Activity Of Yeast And Lactic Acid Bacteria Isolated From A Honey-Based Kefir Beverage. *Foods*. 2019;8:485. doi: 10.3390/foods8100485. - DOI - PMC - PubMed.

2. RESULTADOS

Análise	Resultado
Atividade Hemolítica	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;">Gama Hemolítica</div>  </div>

3. OBSERVAÇÕES

3.1 O(s) resultado(s) desta(s) análise(s) refere(m)-se tão somente a(s) amostra(s) enviada(s) ao laboratório e acima identificadas, sendo vedada a publicação, sob pena de indenização, na qual o nome da Analytical Science seja utilizado para qualificar produção sobre a qual a mesma não exerceu qualquer meio de controle.

3.2 Este Certificado de Análise somente poderá ser reproduzido na íntegra. A reprodução parcial requer aprovação formal deste laboratório.

3.3 A amostragem e a coleta do material é de responsabilidade do interessado, assim como a identificação é fornecida pelo mesmo.

MSc. Ivone F. S. Alves
Diretora Científica
CRBio 079658/01

Dr. Leonel Yamaguchi Alves
Diretor Executivo – RT
CRF 61446-0