

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

Nadia Cristina Redondo

**Avaliação *in vitro* de características
probióticas do *Enterococcus faecium* CRL183
e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416**

ARARAQUARA

2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

Nadia Cristina Redondo

**Avaliação *in vitro* de características probióticas do
Enterococcus faecium CRL183 e do *Lactobacillus*
helveticus ssp jugurti 416**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Área de Ciência de Alimentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição, área de Ciência dos Alimentos.

ORIENTADOR:

Prof. Dr. ELIZEU ANTONIO ROSSI

ARARAQUARA

2008

COMISSÃO EXAMINADORA

**Prof. Dr. Elizeu Antonio Rossi
(Orientador)**

Profª Drª. Alice Yoshiko Tanaka

Profª Drª. Iracilda Zeppone Carlos

Profª Drª Kátia Sivieri

Prof. Dr. Rubens Monti

Araraquara

2008

Dedico este trabalho aos meus eternos amores, meus pais, Osmar e Sueli que sempre me apoiaram e acreditaram em mim e ao Renato que sempre me ajudou e esteve presente em todos os momentos da minha vida.

O SONHO

Sonhe com aquilo que você quiser.

*Seja o que você quer ser,
porque você possui apenas uma vida e nela só se tem uma chance
de fazer aquilo que quer.*

*Tenha felicidade bastante para fazê-la doce.
Dificuldades para fazê-la forte.
Tristeza para fazê-la humana.
E esperança suficiente para fazê-la feliz.*

*As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus
caminhos.*

*A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por
suas vidas.*

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela luz e por ter direcionado o meu caminho ao propósito da realização deste trabalho.

Aos meus pais, Osmar e Sueli, pelo amor e pela dedicação durante todas as etapas da minha vida.

Ao prof. Dr. Elizeu A. Rossi, por toda sua dedicação, amizade, disposição e principalmente confiança.

Ao Maicon Petronio, pelos ensinamentos no cultivo celular.

A Roseli Aparecida Pinto, pela ajuda, apoio e amizade em todos os momentos.

A todas as meninas do laboratório de Tecnologia de Alimentos, pela companhia, amizade e apoio.

Ao prof. Dr. Sandro Roberto Valentini e a Prof^a. Dr^a Eliana Varanda por disponibilizarem o uso da sala de cultura celular e seus equipamentos do Laboratório de Biologia Molecular e Celular de Microrganismos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da UNESP de Araraquara, pela possibilidade.

À Seção de Pós-Graduação da FCFAr: Cláudia, Sônia e Laura, pela atenção dispensada durante minha estada no programa.

Aos professores, alunos e funcionários do Departamento de Alimentos e Nutrição, pela valiosa contribuição.

À bibliotecária Maria Irani Coito e todos os funcionários da biblioteca, pela atenção e ajuda.

Ao Banco de células do Rio de Janeiro pela doação do cultivo celular Caco-2.

À Fapesp pelo apoio financeiro concedido.

SUMÁRIO

<i>Lista de Tabelas</i>	<i>xi</i>
<i>Lista de Figuras</i>	<i>x</i>
Resumo.....	<i>xi</i>
<i>Abstract</i>	<i>xii</i>
1. <i>Introdução</i>	1
2. <i>Revisão Bibliográfica</i>	2
2.1. <i>Microrganismos probióticos</i>	2
2.2. <i>As bactérias ácido láticas</i>	6
2.3. <i>O Enterococcus faecium</i>	7
2.4. <i>Lactobacillus helveticus</i>	10
2.5 <i>Probióticos e micorbiota intestinal</i>	12
2.6 <i>Adesão e competição entre os microrganismos probióticos e patogênicos</i>	16
2.7 <i>Produção de substâncias antagônicas</i>	20
2.8 <i>Probióticos e o colesterol</i>	24
3. <i>Objetivos</i>	28
3.1 <i>Objetivo geral</i>	28
3.2 <i>Objetivos específicos</i>	28

4. Materiais e métodos.....	30
4.1 Microrganismo e condições de cultivo.....	30
4.1.1 Preparo da suspensão celular.....	30
4.1.2 Contagem de células viáveis	30
4.2. Teste de tolerância ao stress gastrointestinal.....	31
4.2.1 Resistência às condições ácidas.....	31
4.2.2 Determinação da tolerância ao trânsito gastrointestinal	32
4.2.3 Determinação da resistência à presença de sais biliares.....	33
4.3 Hidrolase de sais biliares (HSB).....	34
4.4 Teste de auto-agregação e coagregação bacteriana	34
4.5 Capacidade de competição e adesão ao epitélio intestinal.....	36
4.6 Produção de substância antagônicas.....	39
4.7 Análise estatística dos resultados.....	40
5. Resultados e discussão.....	41
5.1 Determinação da concentração dos microrganismos	41
5.2 Resistência às condições ácidas.....	41
5.3 Determinação da tolerância ao trânsito gastrointestinal.....	46
5.4 Resistência a sais biliares.....	50

5.5 Hidrolase de sais biliares (HSB).....	53
5.6 Auto-agregação e coagregação.....	58
5.7 Capacidade de Adesão ao epitélio intestinal.....	65
5.8 Produção de substâncias antagônicas.....	71
4.1 Microrganismo e condições de cultivo.....	30
4.1.1 Preparo da suspensão celular.....	30
4.1.2 Contagem de células viáveis	30
4.2. Teste de tolerância ao stress gastrointestinal.....	31
4.2.1 Resistência às condições ácidas.....	31
4.2.2 Determinação da tolerância ao trânsito gastrointestinal	32
4.2.3 Determinação da resistência à presença de sais biliares.....	33
4.3 Hidrolase de sais biliares (HSB).....	34
4.4 Teste de auto-agregação e coagregação bacteriana	34
4.5 Capacidade de competição e adesão ao epitélio intestinal.....	36
4.6 Produção de substância antagônicas.....	39
4.7 Análise estatística dos resultados.....	40
5. Resultados e discussão.....	41
5.1 Determinação da concentração dos microrganismos	41

5.2 Resistência às condições ácidas.....	41
5.3 Determinação da tolerância ao trânsito gastrointestinal.....	46
5.4 Resistência a sais biliares.....	50
5.5 Hidrolase de sais biliares (HSB).....	53
5.6 Autoagregação e coagregação.....	58
5.7 Capacidade de Adesão ao epitélio intestinal.....	65
5.8 Produção de substâncias antagônicas.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Determinação da concentração dos microrganismos <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 e <i>Lactobacillus helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416.....	41
Tabela 2.	Tempo (minutos) de retardo no crescimento do <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 e do <i>Lactobacillus helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416, frente a diferentes pH.....	44
Tabela 3.	Efeito da simulação do trânsito gastrointestinal na viabilidade do <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 e <i>Lactobacillus helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416...	48
Tabela 4.	Tempo (minutos) de retardo no crescimento do <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 e do <i>Lactobacillus helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416, frente a diferentes concentrações de Ovgall.....	51
Tabela 5 .	Auto-agregação (%) do <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 e do <i>Lactobacillus helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416.....	59
Tabela 6	Competição e adesão à célula Caco-2 do <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 e do <i>Lactobacillus helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416.....	66
Tabela 7.	Porcentagem de de redução da adesão da <i>E. coli</i> 0157:H7 pelo <i>Enterococcus faecium</i> CRL183 e <i>Lactobacillus helveticus</i> ssp 146 à célula Caco-2.....	
Tabela 8.	Influencia do pH na adesão dos microrganismos	70
Tabela 9	Produção de substâncias antagônicas pelos cultivos de <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 e <i>Lactobacillus helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Etapas para avaliar um microrganismo probiótico para uso em alimentos.....	20
Figura 2.	Perfil de crescimento do <i>Lactobacillus helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416 frente a diferentes pH.....	54
Figura 3.	Perfil de crescimento do <i>Enterococcus faecium</i> CRL183 frente a diferentes pH.....	55
Figura 4.	Crescimento do <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 e do <i>Lactobacillus helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416 frente a diferentes concentrações de Oxgall.”.....	62
Figura 5.	Atividade de HSB produzida pelo <i>Lactobacillus helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416 frente ao TDCA, onde A indica a placa controle e B a placa suplementada com TDCA.....	64
Figura 6.	Atividade de HSB produzida pelo <i>Lactobacillus helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416 frente ao GDCA, onde A indica a placa controle e B a placa suplementada com GDCA.....	65
Figura 7.	Atividade de HSB produzida pelo <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 frente ao TDCA, onde A indica a placa controle e B a placa suplementada com TDCA.....	57
Figura 8.	Atividade de HSB produzida pelo <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 frente ao GDCA, onde A indica a placa controle e B a placa suplementada com GDCA.....	58
Figura 9.	Porcentagem de auto-agregação do <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 e do <i>Lactobacillus helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416.....	60
Figura10.	Micrografia (1000X) da auto-agregação do <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 incubado em tampão PBS (pH 7.2) durante cinco horas.....	61
Figura11.	Micrografia (1000X) da auto-agregação do <i>Lactobacillus helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416 incubado em tampão PBS (pH 7.2) durante cinco horas.....	62
Figura12.	Porcentagem de coagregação do <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 e do <i>Lactobacillus helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416”.....	63
Figura13.	Micrografia (1000X) da coagregação do <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 e <i>Lactobacillus helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416 incubados em PBS (pH 7.2) durante cinco horas.....	64

Figura15. Teste de produção de substâncias antagônicas	72
Figura14. Imagens da competição e da adesão ao epitélio intestinal.....	69

Resumo

Tendo em vista verificar algumas características essenciais aos microrganismos para serem considerados como probióticos, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416. Primeiramente foi testada a capacidade destes microrganismos em resistir aos pH 1.5, 2.0, 3,0 e 4,0 em meio de cultivo específico para cada espécie. Em seguida foi realizado o teste de sobrevivência ao trânsito gastrointestinal, onde, foram simuladas as condições do estômago e do intestino delgado, determinando-se a viabilidade dessas bactérias frente à pepsina em pH 2.0 e a pancreatina em pH 8.0. A resistência aos sais biliares foi avaliada inoculando o *Enterococcus faecium* CRL183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 em meio de cultivo suplementado com 0,1; 0,2; 0,3 e 0,5% de Oxgall. Já para teste de produção da hidrolase de sais biliares, foi verificada a ocorrência da mudança de cor das colônias ou precipitação dos sais biliares taurodeoxicólico e glicodeoxicólico (TDCA e GDCA). No estudo de auto-agregação e coagregação essas cepas foram colocadas separadamente (auto-agregação) e associados (coagregação) e verificada a densidade óptica (DO_{560}). Foi testada a produção de substâncias antagônicas pelos dois microrganismos estudado frente a *Escherichia coli* 0157: H7, *Listeria monocytogenes* V2 e *Salmonella Enteritidis* por meio do teste *spot-on-the lawn*. Os resultados demonstraram que os microrganismos resistiram a todos os pH. Essas bactérias mostraram também ser tolerantes ao teste de sobrevivência ao trânsito gastrointestinal e também no teste de sobrevivência a sais biliares, porém neste teste, o *Enterococcus faecium* CRL 183 obteve um tempo de retardo menor em relação ao *Lactobacillus helveticus* ssp. *jugurti* 416. Já os resultados obtidos para o teste de hidrolase de sais biliares, demonstraram que o *Enterococcus faecium* CRL 183 foi capaz de reduzir os dois sais biliares estudados, enquanto que o *Lactobacillus helveticus* ssp. *jugurti* 416 hidrolisou TDCA, mostrando-se sensível ao GDCA. A porcentagem de auto-agregação foi de aproximadamente 80% para cada microrganismo e a de coagregação entre eles, foi de 25,4%. Nem o *E. faecium* CRL 183, nem o *L. heveticus* ssp *juguri* 416 apresentaram produção de substâncias bactericidas, incluindo bacteriocinas, na presença da *E. coli* 0157: H7, *L. monocytogenes* V2 e *S. enteritidis*

Palavras-chave: microrganismos probióticos, o *Enterococcus faecium* CRL 183, *Lactobacillus helveticus* ssp. *jugurti* 416.

Abstract

The purpose of this work was to assess *in vitro* the probiotic characteristics of *Enterococcus faecium* CRL183 and *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416, having as an aim to verify some characteristics which are essential to the microorganisms, in order to be considered as probiotic. Firstly, the capacity of these microorganisms to resist to pH 1.5, 2.0, 3.0 and 4.0 was tested in a specific culture medium for each species. Then the survival test to the gastrointestinal passage was done, and the conditions of the stomach and small intestine were simulated, so determining the viability of these bacteria comparing with pepsin at pH 2.0 and pancreatin at pH 8.0. The resistance to bile salts was assessed by inoculating *Enterococcus faecium* CRL183 and *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416 in a culture medium supplemented with 0,1; 0,2; 0,3 and 0,5 % of Oxgall. However, for the production test of the hydrolase of bile salts, it was verified the occurrence of change in color of the colonies, or the precipitation of the bile salts taurodeoxycholic and glycodeoxycholic (TDCA and GDCA). In the auto-aggregation and co-aggregation studies, these strains were placed separately (auto-aggregation) and associated (co-aggregation), and then the optical density was verified (DO560), for completion and adhesion intestinal epithelium was tested *Enterococcus faecium* CRL183 and *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416 with the *Escherishia coli* 0157: H7. The production of antagonist substances by both studied microorganisms was tested in comparison with *Escherishia coli* 0157: H7, *Listeria monocytogenes* V2 and *Salmonella enteritidis*, by using the spot-on-the-lawn test. The results demonstrated that the microorganisms resisted to all pH. These bacteria also showed to be tolerant to the survival test to the gastrointestinal passage and also to the survival test to bile salts, though in this test, *Enterococcus faecium* CRL183 obtained a shorter delay time in relation to *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416. Nevertheless, the results obtained for the test of hydrolase of bile salts demonstrated that *Enterococcus faecium* CRL183 was able to reduce both studied bile salts, while *Lactobacillus helveticus ssp. jugurti* 416 hydrolyzed TDCA, showing to be sensitive to GDCA. The percentage of auto-aggregation was approximately 80% for each microorganism and the co-aggregation between them was 25,4%. The *E.faecium* CRL183 and *L. helveticus ssp jugurti* 416 was adherent cells and reduce 60% adherence the *E. coli* 0157: H7. Neither *E.faecium* CRL183, nor *L. helveticus ssp jugurti* 416 showed production of bactericidal substances, including bacteriocins, in the presence of *E. coli* 0157: H7, *L. monocytogenes* V2 and *S. Enteritidis*. The according with this results the *Enterococcus faecium* CRL 183 and the *Lactobacillus helveticus ssp. jugurti* 416 present characteristics for considerate probiotics.

keywords: microorganisms probiótics, *Enterococcus faecium* CRL 183, *Lactobacillus helveticus ssp. jugurti* 416

1. Introdução

Microrganismos probióticos são aqueles capazes de exercer algum tipo de ação benéfica para o organismo, diminuindo o número de doenças como o câncer, infecções gastrintestinais, hipercolesterolemia, entre outras. Na literatura há diversos estudos que relatam a capacidade desses microrganismos na ativação do sistema imune tanto, nos mecanismos de resposta adaptativa e de resposta inata.

Nesse contexto, a ação mais provável dos probióticos nas doenças intestinais é a de inibir a ação das bactérias patogênicas, por meio da competição pelos nutrientes, liberação de ácidos orgânicos, competição pela aderência ao epitélio intestinal ou ainda pela produção de bacteriocinas capazes de impedir o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, porém, esses mecanismos ainda são pouco conhecidos.

Muitas bactérias ácido lácticas (BAL) têm sido caracterizadas como probióticas, sendo os *Lactobacillus* e os *Bifidobacterium* as mais relatadas. Entretanto, verificam-se na literatura estudos envolvendo outras classes de microrganismos menos explorados cientificamente, mas que também apresentam propriedades profiláticas e terapêuticas, como é o caso do *Enterococcus faecium* CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 utilizados na produção do “iogurte” de soja. A esse produto já se atribuiu a capacidade de redução do colesterol sérico, tanto em animais quanto em humanos, além da capacidade de

reduzir o desenvolvimento do câncer de mama e de cólon, e ainda a capacidade de estimular vários parâmetros imunológicos. Porém, tais microrganismos ainda não foram totalmente avaliados quanto a determinadas características probióticas, de modo que possam ser atribuídos a eles todos os efeitos já observados do consumo do “iogurte” de soja.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Microrganismos probióticos

O conceito de probiótico foi sugerido, pela primeira vez, a partir das observações de Metchnikoff, em 1907, correlacionando a utilização de leites fermentados à saúde. Esse autor se baseou na longevidade dos camponeses da Bulgária à baixíssima incidência de câncer de cólon e de uma proteção contra infecções gastrintestinais. Segundo o autor, esses benefícios eram decorrentes do grande consumo de leite fermentado por bactérias produtoras de ácido láctico.

Posteriormente, os estudos de Nurmi e Rantala (1973) verificaram a ocorrência da variação da flora intestinal, quando indivíduos passavam por situações de estresse, mudança de temperatura e de alimentos. Esses autores concluíram que as modificações da microflora eram decorrentes de um desequilíbrio gerado por esses fatores, provocando uma exclusão competitiva entre os microrganismos lá instalados. Mas foram Lilly & Stillwel (1965) os

primeiros cientistas a utilizarem o termo probiótico para denominar substâncias que, secretadas por um protozoário, estimularam o crescimento de outros.

Para Parker (1974), a definição de probióticos foi utilizada para denominar suplementos alimentares, incluindo microrganismos e substâncias que afetam o equilíbrio da microbiota intestinal.

Fuller (1989) considerou os probióticos como suplementos alimentares que contêm bactérias vivas e que produzem efeitos benéficos ao hospedeiro, favorecendo o equilíbrio de sua microbiota intestinal.

Outra definição de probióticos foi dada por Vanbelle et al., (1990) que os descrevem como sendo microrganismos benéficos que exercem a função de melhorar o equilíbrio da microflora intestinal, reduzindo possíveis infecções. Esses microrganismos são bactérias naturais do intestino, as quais, após uma ingestão em doses efetivas, são capazes de se estabelecerem ou mesmo de colonizarem o trato digestivo, mantendo ou aumentando a flora natural, prevenindo a colonização por organismos patogênicos e assegurando uma melhor utilização dos nutrientes.

Porém, Havenaar et al, (1992) restringiram o uso desse termo a produtos que contenham microrganismos vivos e que exerçam efeitos benéficos no aparelho digestivo, no trato respiratório superior ou no trato urogenital em humanos ou em animais.

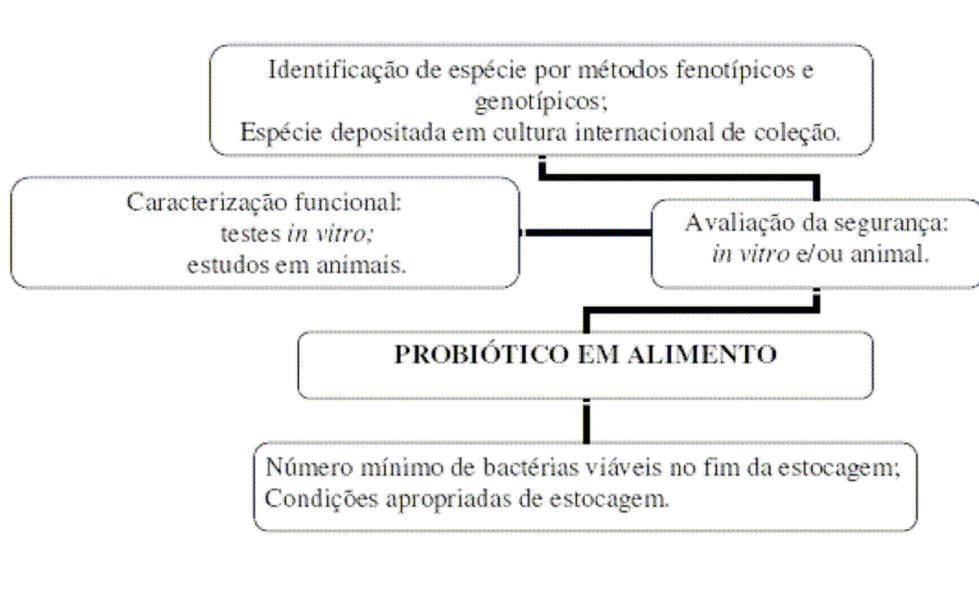
Finalmente, Schrezenmeir & De Vrese (2001) propuseram que o termo probiótico deveria ser usado para designar preparações ou produtos que contêm microrganismos viáveis definidos e em quantidade adequada, capazes de alterar a microbiota intestinal por meio de implantação ou de colonização, produzindo benefícios à saúde.

Para que um microrganismo seja considerado um probiótico, deve ser capaz de atravessar a barreira gástrica para poder multiplicar-se e colonizar o intestino por um tempo curto e produzir compostos antimicrobianos (Pardio et al, 1994).

O efeito positivo dos probióticos tem sido demonstrado tanto *in vitro* quanto *in vivo*, em diversas patologias, como: diarréias, infecções do sistema urinário, distúrbios imunológicos, intolerância a lactose, hipercolesterolemia, alergias alimentares e alguns tipos de câncer (Mc Farland, 2000).

O uso de culturas probióticas pode ser feito em alimentos, porém para que sejam considerados probióticos é necessário serem fermentados por determinados microrganismos que permaneçam vivos no intestino após sua ingestão, interagindo com a flora bacteriana (Mc Farland, 2000). A ingestão regular desses produtos probióticos pode resultar na redução de doenças infecciosas causadas por diversos microrganismos patogênicos (Condon et al, 1998).

A Figura 1 mostra as várias etapas de avaliação para que um microrganismo seja considerado um probiótico seguro para sua utilização em



Fonte: FAO/WHO (2002)

FIGURA 1 – Etapas para avaliar um microrganismo probiótico para uso em alimentos.

Na literatura científica verificam-se muitos estudos envolvendo principalmente bactérias ácido lácticas como probióticas, principalmente em alimentos fermentados, e esses microrganismos demonstraram que são capazes de sobreviver durante o trânsito intestinal e colonizar, transitoriamente, o intestino (Mombelli & Gismondo, 2000).

Nesse sentido, alguns estudos já demonstraram o efeito benéfico do uso de leite fermentado com cultura probiótica, como o de Ferreira et al (1998). No qual foram relatados os seguintes benefícios: favorecimento do crescimento de bactérias benéficas da microbiota intestinal, manutenção do equilíbrio do meio

prevenindo adesão e colonização por microrganismos indesejáveis, estímulo da imunidade local com a produção de IgA secretora e IgG, diminuição das reações inflamatórias e, por fim, regulação da motilidade intestinal por meio do balanço entre solutos e líquidos favorecendo a absorção de nutrientes.

2.2 As bactérias ácido lácticas (BAL)

As bactérias ácido lácticas (BAL) compreendem a classe mais representativa dos microrganismos probióticos. Tradicionalmente, essas bactérias têm sido classificadas conforme suas características fisiológicas, morfológicas e bioquímicas, além das propriedades funcionais. Para isso são considerados os seguintes parâmetros: quantidade de ácido láctico produzido, temperaturas ótimas de crescimento, tolerância ao oxigênio e a diferentes concentrações de cloreto de sódio, capacidade de produzir gás, compostos aromáticos e voláteis, sensibilidade aos antibióticos e produção de bacteriocinas ou capacidade inibitória de patógenos (Simpson e Taguchi, 1995), sendo de fundamental importância que esses parâmetros possam ser determinados *in vitro* (Holzapfel *et al.*, 2001).

Além das propriedades já mencionadas, as BALs apresentam várias peculiaridades comuns, tais como: são Gram positivas, imóveis, não esporuladas, catalase negativa, ausência de citocromos (o que reflete na falta de metabolismo respiratório gerador de energia) e incapacidade de hidrolisar a gelatina e de produzir sulfeto de hidrogênio (Toro, 2005).

Do ponto de vista morfológico, as BALs, podem apresentar-se na forma de cocos, bacilos ou bastões regulares e bacilos ou bastões irregulares. Os cocos são de forma esférica mais ou menos alargada, entre 0,5 e 2 μm , apresentam-se em pares, tétrades ou cadeias de número variado. Os gêneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* e *Enterococcus* estão dispostos em pares ou cadeias, enquanto que o gênero *Leuconostoc* forma células lenticulares dispostas em pares ou cadeias. Os gêneros *Pediococcus* e *Tetragenococcus* formam células dispostas em tétrades (De Roissart e Luquet, 1994; Wood, 1995; Alexon, 1998).

É importante ressaltar que as bactérias lácticas podem sobreviver em um pH relativamente baixo (3,5), diferentemente de outros grupos microbianos com metabolismo respiratório (Smulders *et al.*, 1986). Elas possuem um sistema de transporte simultâneo de ácido láctico e de prótons para o exterior celular, que além de contribuir para a homeostase do pH interno, fornecem energia (Tseng e Montville, 1993).

2.2.1 O *Enterococcus faecium*

O gênero *Enterococcus* caracteriza-se por ser constituído de microrganismos colonizadores transitórios do trato gastrointestinal, indispensáveis no tratamento das diarreias, principalmente na invasão do rotavírus. É capaz de reduzir o LDL colesterol pela ativação do sistema enzimático hepático. A espécie

faecium destaca-se dentre as demais por exercerem tais funções de maneira mais acentuada (Fisioquantic, 2005).

Entretanto, o *E. faecium* foi, por muito tempo, confundido com o *E. fecalis*, uma espécie patogênica, razão pela qual seus estudos foram prejudicados, tendo seu início tardio em relação as demais bactérias benéficas ao organismo humano (Ecology health center, 2005).

O *E. faecium* é uma bactéria não patogênica, com um tempo de reprodução de 19 minutos, diferente do *Lactobacillus* e o *Bifidobacterium* que é de aproximadamente 60 minutos. Com reprodução três vezes mais rápida, seu efeito na remoção de floras patogênicas nos intestinos, é mais efetivo. É mais resistente ao ácido do estômago, sendo menos inibido quando veiculado por suplemento oral, com conseqüente colonização mais rápida nas paredes intestinais. A atividade benéfica relatada em vários estudos refere-se ao aumento na absorção intestinal de nutrientes em relação aos demais microrganismos, quando comparada com os *lactobacillus*. Segundo o Ecology Health Center (2005), os efeitos do *E. faecium* na flora intestinal são freqüentemente visíveis nos primeiros dias após sua ingestão, o que não é observado com outros produtos contendo *Lactobaccilus sp.*

As pesquisas sobre a utilização na dieta e o potencial probiótico do *E. faecium* encontram-se crescentes em vários países, como na Alemanha e na Eslováquia. Estudos de Marciňáková e Lauková (2004), Vahjen e Manner (2005) e

Pollman e col (2005) avaliaram o potencial probiótico de diferentes cepas de *E. faecium* (Ecology health center, 2005).

Kinouchi et al (2006) demonstraram recentemente uma atividade anticarcinogênica em fêmeas de camundongos Balb/c com câncer de mama biologicamente induzido ao receber uma dieta contendo um produto a base de soja fermentado com *E. faecium* CRL 183 e *L. helveticus* ssp *jugurti* 416. Os animais que consumiram este produto apresentaram um volume menor do tumor comparado aos demais grupos. Ainda com relação à atividade anticarcinogênica do *E. faecium*, Sivieri et al (2007) observaram uma redução de 40% na incidência de tumores de cólon em ratos quimicamente induzidos e que ingeriram uma suspensão oral desse microrganismo em uma concentração diária de 10^8 UFC/mL.

Estudo realizado *in vitro* por Rossi et al (1994) com um “iogurte” de soja fermentado por *Enterococcus faecium* CLR 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416, demonstrou a capacidade de redução do colesterol total e de aumento no HDL-colesterol em coelhos hipercolesterolêmicos. Rossi et al (2000) também observaram efeitos semelhantes em ratos hipercolesterolêmicos e em humanos normocolesterolêmicos e concluíram que os efeitos observados são, em grande parte, decorrentes da presença dos microrganismos viáveis no produto.

Com os estudos de Bedani et al (2006) e de Shiguemoto et al (2007), foram comprovados outros benefícios do mesmo produto em ratas ovariectomizadas. No

primeiro estudo, verificou-se o efeito do “iogurte” de soja enriquecido com isoflavonas e cálcio sobre o peso corpóreo e o tecido ósseo. Segundo os autores, esse produto impediu o aumento do peso corpóreo, um dos principais sintomas apresentados na menopausa, além de mostrar efeito protetor das trabéculas, prevenindo, assim, a perda óssea ocasionada pela castração. Já, no segundo estudo, foi comprovado que o mesmo produto suplementado apenas com isoflavonas e aliado a um programa de atividade física, reduziu a perda de massa óssea e aumentou a capacidade de resistência destes animais ao exercício físico.

Já, Rossi et al (2000) observaram um menor percentual de liberação de histamina e degranulação de mastócitos em ratos que consumiram um produto a base de soja fermentado com *E. faecium* CRL 183 e *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 em relação ao grupo placebo, demonstrando os benefícios desses microrganismos na redução do potencial alergênico da proteína da soja.

2.2.2 *Lactobacillus helveticus*

O gênero *Lactobacillus* compreende, atualmente, 56 espécies oficialmente reconhecidas, sendo *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. casei* as mais utilizadas para fins alimentares. Está diretamente relacionado com o estímulo do sistema imune e inibição de patógenos como o *Clostridium perfringens*, o *Bacillus subtilis*, a *Candida albicans*, a *Eschechirichia coli*, o *Proteus vulgaris*, o *S. aureus*, a *Salmonella*, entre outros (Fisioquantific, 2005).

Entre as espécies de *Lactobacillus*, encontra-se o *helveticus* sp., pertencente à flora intestinal humana (Tannock, 1999), sendo seu uso na produção de leite fermentado conhecido há mais de 30 anos pela indústria alimentar japonesa, ao qual já foi atribuído o benefício de regularização do trânsito intestinal prevenindo e tratando a constipação intestinal (Saito et al, 2002).

Na literatura há estudos envolvendo os *Lactobacillus helveticus* sp, como o de Matar et al (2003) que atribuiu diferentes funções benéficas ao leite por eles fermentado, sendo a formação de peptídeos e ácidos graxos livres liberados durante o processo os principais atributos do produto. Segundo Leblanc et al (2002), os peptídeos são formados e liberados durante a fermentação do leite pelo *Lactobacillus helveticus* R389 e demonstram ser estimulantes do processo imunológico, inibindo o crescimento imunodependente de fibrosarcoma em ratos. Esses peptídeos são provenientes das proteínas encontradas no leite que são convertidos em moléculas significativamente diferentes chamadas de peptídeos bioativos (Matar et al, 1996).

Ainda em relação aos *Lactobacillus helveticus* sp, o estudo de Matar et al (1997) verificou que o leite fermentado com a cepa R389 formou peptídeo bioativo enquanto que a cepa de L89 não apresentou tal capacidade. Os autores avaliaram o leite fermentado por estes microrganismos e constataram que apenas naquele fermentado pelo R389 havia atividade antimutagênica.

Em outro estudo de Matar et al (2001) foi observado que o leite fermentado contendo cepa proteolítica de *L. helveticus sp.* aumentou o nível das células do sistema imunológico (IgA-positiva) no intestino de ratos.

Rossi et al (2003) demonstraram que animais que receberam um produto fermentado a base de soja com *E. faecium* CRL 183 e *L. helveticus ssp jugurti* 416 foram capazes de aumentar os níveis de IL-1, IL-2, IL-12, TNF- α TNF- γ liberados por macrófagos. Embora os autores tenham atribuído esses efeitos apenas ao *E. faecium* CRL 183, considerando a presença do *L. helveticus ssp jugurti* 416 no produto, poderia se supor que este último pudesse, também, estar participando da modulação do sistema imune.

2.3 Probióticos e microbiota intestinal

O intestino humano é um sistema complexo responsável por parte da digestão, absorção e transporte de nutrientes e seus metabólitos. É dividido em intestino delgado (subdividido em duodeno, jejuno e íleo) e grosso. O intestino delgado é responsável pela maior parte da digestão enzimática e quase toda a absorção dos nutrientes, já no intestino grosso ocorre absorção de água e a excreção das substâncias indesejáveis ao organismo, sendo esses dois compartimentos interligados por meio da válvula íleo cecal (Corpo humano, 2006).

O trato gastrintestinal (TGI) abriga o maior número e diversidade de espécies de bactérias das que colonizam o corpo humano. Embora esses

microrganismos sejam encontrados em todo TGI, não se observa uma distribuição homogênea dos mesmos. No estômago e no intestino delgado, por exemplo, o ambiente é desfavorável para a colonização e proliferação bacteriana, uma vez que é reduzido pela ação bactericida do suco gástrico, da bile e da secreção pancreática e, também, pelo intenso peristaltismo que esses compartimentos possuem. O íleo é um sítio de transição bacteriológica, entre a escassa população bacteriana do jejuno e a densa flora do cólon. No cólon, os microrganismos encontram condições favoráveis para sua proliferação devido à ausência de secreções intestinais ao peristaltismo lento e ao abundante suprimento nutricional. A população microbiana do cólon é conhecida como microflora ou microbiota intestinal e alcança uma concentração aproximada de 10^{10} a 10^{12} microrganismos por grama de conteúdo luminal, e supera em número o total das células presentes no corpo humano (Tannock, 1999; Guarner & Malagelada, 2003).

Devido aos fatores mencionados, esta microbiota situada no cólon proximal prolifera-se rapidamente em relação aos demais órgãos devido à abundância de nutrientes ali existentes. Porém, existem bactérias que não aderem ao epitélio intestinal, preferindo seus microhabitats (Venema, 1993).

A microbiota intestinal possui mais de 500 espécies de bactérias que atuam como um mecanismo de defesa frente à entrada de microrganismos patogênicos (Isoulari et al, 2004). Essa enorme população é composta, predominantemente, por poucos gêneros bacterianos, mas com alta diversidade quanto às espécies (Bäckhed et al, 2005), sendo os *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*,

Peptococcus, *Peptostreptococcus* e *Ruminococcus* os gêneros mais conhecidos. É possível que a existência dessa composição varia de indivíduo para indivíduo (Guarner & Malagelada, 2003).

Os microrganismos que compõem a flora intestinal podem ser divididos em dois grupos: os da microbiota resistente e os da microbiota transitória. O primeiro grupo é constituído por microrganismos que são considerados fixos, pois são encontrados com regularidade em determinada área e idade do indivíduo, mesmo que perturbado por fatores externos ou internos, e recompõe-se rapidamente; o segundo consiste em uma classe de microrganismos não patogênicos que permanece no intestino por horas, dias ou semanas. Estes provêm do meio ambiente e são considerados de pouca importância (Tannock, 1995).

Porém, no intestino são encontradas também classes de bactérias patogênicas como *Escherichia*, *Bacteroidaceae* e *Enterococcus faecalis*, além de outras, que podem produzir inúmeros metabólitos com efeitos deletérios ao organismo vivo, tais como aminas, nitrosaminas, fenóis e cresóis, indol e escatol, além de enzimas como β -glucuronidase, β -glucosidase, nitroreductase e urease, capazes de converter compostos pró-carcinogênicos em carcinogênicos (Parente et al, 1994).

Assim pode se afirmar que a ação dos probióticos no intestino é principalmente de proteção contra infecções entéricas, sendo o seu efeito protetor

realizado mediante mecanismos antagônicos que impedem a multiplicação dos patógenos e a produção de toxinas. Este antagonismo ocorre pela competição por nutrientes nos sítios de adesão, ao gerar uma maior produção de imunoglobulinas e aumentar a ativação das células mononucleares e dos linfócitos mediante a imuno-modulação. Ocorre também o metabolismo dos carboidratos, que diminui o pH intestinal, reduzindo a proliferação de bactérias patogênicas (Penna, 1998).

De acordo com estas evidências, alguns estudos têm focalizado os possíveis benefícios de fornecer microrganismos probióticos como suplemento alimentar para melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, como, por exemplo, o experimento conduzido por pesquisadores chineses que verificou uma redução na incidência e gravidade da enterocolite necrosante em recém-nascidos prematuros que receberam a suplementação de uma mistura de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium infantis*. A incidência de enterocolite necrosante no grupo suplementado foi significativamente menor do que no grupo controle (9 em 180 versus 24 em 187). Também, não ocorreu quadro grave de enterocolite no grupo que fez uso de probiótico, enquanto seis casos foram observados no grupo controle (Lin et al, 2005).

A melhora da microflora intestinal por meio do uso de culturas probióticas, durante o período de colonização intestinal, tem sido sugerida também por Edwards & Parret (2002), que relataram um possível efeito imunomodulador positivo da instalação de uma flora benéfica no período neonatal. Foi ministrado em 159 recém nascidos um produto a base de leite fermentado com a bactéria

probiótica *Lactobacillus* GG para verificar os riscos destas crianças desenvolverem eczema atópico. O grupo que recebeu o produto fermentado reduziu a incidência desta doença à metade, durante os dois primeiros anos de vida, entretanto, a importância destes benefícios não foi estabelecida a longo prazo.

O fornecimento de bactérias probióticas para a alteração da flora intestinal estabelecida em crianças e indivíduos adultos é um processo mais complexo do que se supunha, pois, estes microrganismos têm se deparado com a estabilidade do ecossistema intestinal. Uma vez que os nichos ecológicos do trato gastrointestinal estejam ocupados por comunidades bacterianas que se auto-regulam, se torna extremamente difícil uma nova bactéria se aderir e estabelecer neste sistema. Estudos com probióticos têm mostrado que apesar de sua aderência ao trato gastrointestinal, sua permanência ocorre apenas enquanto a suplementação é mantida (Tannock, 2000).

2.4 Adesão e competição entre os microrganismos probióticos e patogênicos

A microbiota intestinal contribui na proteção do hospedeiro contra patógenos, prevenindo o estabelecimento desses microrganismos no trato gastrointestinal.

A adesão dos microrganismos patogênicos ocorre na superfície das células epiteliais do intestino, ou seja, na superfície destinada à absorção de nutrientes.

Após a colonização, estas se utilizam de um sistema especializado de injeção a fim de enviar algumas de suas próprias proteínas ao interior da célula hospedeira, com a finalidade de se reproduzirem, porém quando isto ocorre estes microrganismos liberam substâncias tóxicas danosas à saúde do organismo hospedeiro (Nutrição em pauta, 2005).

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

Dentre os microrganismos patogênicos de importância, no tocante à segurança alimentar, *Escherichia coli* desempenha papel importante na veiculação de doenças. Vários surtos de toxinfecção alimentar envolvendo principalmente o consumo de carne mal cozida têm sido registrados, apontando *E. coli* como principal agente etiológico.

A *Escherichia coli* O157:H7 pertence ao grupo EHEC (enterohemorrágicas), apresenta característica peculiar quanto ao tipo de sintomas desencadeados por sua ação, manifestando-se sob a forma de diarreia sanguinolenta nos indivíduos acometidos e progredindo para quadros mais graves, como, colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica. Esta cepa possui três diferentes fatores virulentos,

que parecem desempenhar papel crucial na patogênese. O primeiro é a produção da toxina citotóxica “Shiga-like” (SLT I e II), o segundo é a produção de hemolisina que está relacionada com a alfa hemolisina de outras espécies de *Escherichia* e o último é a capacidade que esta bactéria tem de aderir-se e colonizar a superfície intestinal. A fixação na superfície da mucosa previne a perda da bactéria por peristaltismo e promove um aumento na concentração de toxinas liberadas pela célula (Kuntz, 1999).

O estudo do efeito causado por probióticos sobre a inibição de patógenos é de grande interesse, uma vez que, tais bactérias são importantes agentes causadores de doenças do trato gastrintestinal. Segundo Servin et al., (2003), Kalantzoulou,(1997) e Jin et al., (1996) as bactérias lácticas apresentam grande efeito inibitório sobre o crescimento e a produção de toxinas de muitas outras espécies de bactérias. Esta atividade antagônica pode ser resultado de competição por nutrientes; diminuição do potencial redutor; produção de ácido láctico e ácido acético, resultando num decréscimo de pH, ou ainda a adesão às células da mucosa e epitélio do intestino.

A principal dificuldade encontrada nos estudos envolvendo a adesão *in vivo* dos probióticos é conhecer o mecanismo desse processo (Mayara-Makinen et al, 1983). Inicialmente a adesão foi considerada uma técnica que envolve interações físicas não específicas entre a célula do microrganismo e epitélio intestinal, mas com os estudos de Conway e Kjellberg (1989) e Kimoto et al (1999) foram

descobertas inúmeras interações envolvendo relações específicas entre os receptores celulares.

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

A autoagregação e a coagregação dos probióticos são mecanismos que envolvem um ou mais microrganismos, representando um processo necessário para ocorrer a adesão ao epitélio intestinal. Trata-se de um mecanismo importante, uma vez que pode formar barreiras que previnem a colonização por microrganismos patogênicos (Reid et al, 1988; Boris et al, 1997; Del Re et al, 2000). Porém, vale ressaltar que algumas características físico-químicas celulares podem impedir a adesão, como a hidrofobicidade (Wadstrom et al, 1987; Péres et al, 1998; Del Re et al 2000) e a presença de determinadas proteínas de menor

peso molecular em alguns *Lactobacillus* (Schneitz et al, 1993; Mukai & Arihara, 1994).

2.5 Produção de substâncias antagônicas

Substâncias antagônicas são metabólitos liberados por bactérias lácticas, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, radicais livres, diacetileno, acetaldeído, isômeros D de aminoácidos e bacteriocinas, todos capazes de inibir a proliferação de outras bactérias (Piard & Desmazeud, 1992). Entre tais substâncias, as bacteriocinas são as mais estudadas devido ao seu efeito protetor no organismo. São peptídeos ou proteínas com atividade antibacteriana, sintetizados no ribossomo bacteriano (Montville et al, 1995).

Na natureza existe uma enorme diversidade desse tipo de bacteriocinas, encontradas em quase todas das espécies bacterianas estudadas e sabe-se, ainda, que dentro de uma mesma espécie bacteriana pode haver a produção de diferentes tipos de substâncias antagônicas (Riley & Wertz, 2002), ou seja, acredita-se que 99% das bactérias possam produzir ao menos um tipo de bacteriocina, razão pela qual muitos estudos relatam que essa é uma área ainda pouco estudada (Klaenhammer, 1988).

As bacteriocinas são substâncias produzidas por vários microrganismos, principalmente bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, patogênicas e não patogênicas (Todorov et al., 2005). São de origem protéica

(sintetizadas no ribossomo celular) e, portanto, as bacteriocinas podem ser inativadas por algumas enzimas proteolíticas. Fato esse comprovado no estudo de Lash et al (2005) que, utilizando o sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, verificou que as enzimas proteolíticas (pepsina, tripsina ou α -quimotripsina) eliminaram totalmente a ação e atividade das bacteriocinas.

É importante ressaltar que as bacteriocinas não são letais para as células que as produzem e exercem um efeito protetor para ela. Isso foi demonstrado no estudo de Kalantzopoulos (1997), o qual verificou que *Lactobacillus acidophilus* e *Streptococcus thermophilus* neutralizaram a ação de enterotoxinas produzidas por cepas patogênicas de *Escherichia coli* no intestino, por meio da produção de bacteriocinas específicas.

Porém, a produção deste composto antimicrobiano é fortemente dependente de pH, fonte de nutrientes e temperatura de incubação do microrganismo (Todorov et al., 2005).

Segundo Klaenhammer (1993), as bacteriocinas podem ser divididas em quatro classes. A classe I dos pequenos peptídeos (<5kDa), conhecida como lantibióticos, a esse grupo pertencem os aminoácidos como lantionina, B-metillantionina, dehidroalanina e dehidrobutirina (Sahl & Bierbaum, 1998; Guder et al, 2000). Com base nas características estruturais e modo de ação, os lantibióticos são subdivididos em dois subgrupos: A e B. Os lantibióticos tipo A

inibem as células sensíveis por despolarização da membrana plasmática (Belkum et al, 1989; Schuller et al, 1989), são maiores que os lantibióticos tipo B, com tamanho variado entre 21 e 38 aminoácidos, sendo, a nisina a bacteriocina mais representativa e melhor estudada desse grupo (Gross & Morell, 1971). Os lantibióticos do tipo B têm uma estrutura secundária globular e sua composição não excede a 19 aminoácidos, têm seu modo de ação através da inibição enzimática da célula alvo, um exemplo dessa subclasse é a mersacidina, que interfere na biossíntese da parede celular (Brotz et al, 1995).

As bacteriocinas da classe II são representadas por peptídeos hidrofóbicos (<10kDa) e, apesar de serem pequenos como os da classe I, possuem uma variação em seu tamanho de 30 a 60 aminoácidos, são estáveis ao calor e não contêm a lantionina em seus peptídeos (Klaenhammer, 1988). As bacteriocinas desse grupo formam hélices anfifílicas com hidrofobicidade variável, estrutura de β -folha e estabilidade térmica de moderada (100°C) a alta (121°C). Essa classe se subdivide em 3 grupos: a classe II a é o grupo mais representativo e se caracteriza por conter uma seqüência amino-terminal conservada (-Tir-Gli-Asn-Gli-Val-Xaa-Cis) e uma atividade contra *Listeria*. Alguns exemplos incluem a pediocina AcH a sakacina A (Schillinger & Lucke, 1989) e a leucocina A. As bacteriocinas da classe II b são representadas pela lactacina F (Muriana & Klaenhammer 1991), lactococcina G, e lactococcina M, que formam poros nas membranas plasmáticas. Um terceiro subgrupo (II c) tem sido proposto, o qual consiste de bacteriocinas que possuem peptídeos ativados por tiol, que requerem resíduos de cisteína reduzida para tornarem-se ativos (como a acidocina B). A classe III é constituída

por grandes proteínas termolábeis (>30kDa), ou seja, sensíveis ao calor, como as helveticinas J e V acidofilina e lactacinas A e B. E por fim, a classe IV, conhecida também como bacteriocinas complexas, caracteriza-se por incorporar carboidratos e lipídeos na sua molécula protéica para ter atividade, porém, essa classe é pouco conhecida em relação à estrutura e à função, sendo a leuconocina S e a lactocina 27 as mais representativas dessa classe.

De acordo com o estudo de Garcerá et al (1993), que trata do mecanismo de alguns lantibióticos e pequenos peptídeos, a ação das bacteriocinas ocorre na membrana plasmática, sendo essa idéia, bem aceita, mas o exato mecanismo não está bem claro. Sua ação frente à célula alvo pode ocorrer de diferentes formas, como promover um efeito bactericida, sem lise celular (Carminati et al, 1989) ou com lise celular (bacteriolítico) ou, ainda, inibir a multiplicação microbiana, efeito bacteriostático (Cilano et al, 1991). Esses mecanismos de ação são muito mais dependentes de fatores relacionados à espécie bacteriana, como sua fase de crescimento celular, ou suas condições de crescimento, do que de uma característica relacionada à sua própria molécula (Hurst, 1983).

A atividade inibitória das bacteriocinas pode ter um diferente espectro de ação, podendo ser restrita como as lactococcinas A, B, e M, que inibem somente a *Lactococcus sp* (Roos et al, 1993), ou ser extraordinariamente ampla, como alguns lantibióticos do tipo A, por exemplo a nisina A e a mutacina B-Ny266 que são capazes de aniquilar várias espécies de microrganismos, incluindo os *Actinomyces*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*,

Enterococcus, Gardnerella, Haemophilus, Helicobacter, Lactococcus, Listeria, Micrococcus, Mycobacterium, Neisseria, Propionibacterium, Streptococcus, e Staphylococcus (Mota-Meira et al, 2000).

No estudo de Gao et al (1991) foi demonstrado que a ação das bacteriocinas é totalmente dependente do pH intestinal, sendo o valor mínimo para a produção dessa substância 3,0 e o máximo de 6,5, e da composição fosfolipídica da membrana citoplasmática do microrganismo.

2.6 Probióticos e colesterol

O colesterol é sólido, cristalino, branco, insípido e inodoro. É um dos esteróis que fazem parte da estrutura das membranas celulares, sendo, também, um reagente de partida para a biossíntese de vários hormônios, do ácido biliar (ácidos colanóicos) e da vitamina D. Sua síntese ocorre pelo fígado, em um processo regulado por um sistema compensatório, ou seja, quanto maior for a ingestão de colesterol menor é a quantidade sintetizada pelo fígado (Tahri, Crociani, Ballongue, & Schneider, 1995).

No organismo o excesso de colesterol (hipercolesterolemia) pode causar diversos problemas, pois é um importante fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, podendo levar a formação de depósitos de placas nos vasos sanguíneos (aterosclerose), acidentes cardiovasculares (AVC) e infartos (Havernaar et al, 1992). Portanto a redução dos níveis de colesterol sérico é de

extrema importância para a manutenção do estado de saúde, podendo até diminuir a incidência de mortes por razões coronarianas.

Essa redução pode ser feita principalmente com uma dieta equilibrada contendo alimentos que auxiliam este processo, entre eles, os que apresentem em sua formulação microrganismos probióticos, como as bactérias ácido lácticas (Havernaar et al, 1992).

Sabe-se que determinadas bactérias lácticas podem atuar de forma benéfica na redução do colesterol por produzirem e liberarem no organismo uma enzima conhecida como hidrolase de sais biliares (HSB) capaz de desconjugar sais biliares, levando a necessidade da produção de bile a partir do colesterol, diminuindo, dessa forma, a sua concentração circulante (Tahri, Crociani, Ballongue, & Schneider, 1995).

Os principais ácidos biliares primários (cólico e quenodesoxicólico) são esteróis sintetizados a partir do colesterol. A síntese desses sais é catalisada pela 7- α -hidroxilase no retículo endoplasmático ($\text{colesterol} + \text{NADPH} + \text{O}_2 \rightarrow 7\text{-}\alpha\text{-hidroxicolesterol} + \text{NADP}^+$). O ácido biliar sintetizado em maior quantidade é o ácido cólico, que contém 24 carbonos. Este ácido é tioesterificado com a coenzima A ($\text{colato} + \text{CoA} + \text{ATP} \rightarrow \text{colil-CoA} + \text{AMP} + \text{PPi}$); seguidamente ocorre a transferência do resíduo colil da colil-CoA formada para a glicina ou para a taurina, gerando respectivamente, os ácidos glicocólico ou taurocólico. No caso do ácido quenodesoxicólico não ocorre a hidroxilação em C12, mas sim, a

conjugação com a glicina e a taurina. É importante ressaltar que a solubilidade e a hidrofobicidade desses esteróides são determinantes para que ocorra a conjugação (Porta, 2006).

Já os ácidos biliares secundários são resultantes da ação das bactérias intestinais que promovem a desconjugação das ligações com a taurina e a glicina com a redução da hidroxila em C7, gerando os ácidos desoxicólico (derivado do cólico) e o litocólico, resultante do quenodesoxicólico (Porta, 2006).

Essa desconjugação é uma reação de catálise provocada pela enzima hidrolase de sais biliares (HSB), permitindo a liberação de glicina ou taurina (Batta et al, 1990).

A HSB, produzida por diversos microrganismos, já foi purificada e bem caracterizada (Kim et al, 2005). Esta enzima, pertence à família da cloroglicina e contém em sua molécula penicilina amidase (EC 3.5.1.11), capaz de hidrolisar a penicilina liberando o ácido 6-aminopenicillínico (6-APA), o qual é utilizado para a produção de penicilina sintética. Essa enzima tem seu pH ótimo entre 5,0 e 6,0 (Corzo & Gilliland, 1999. Tanaka et al, 1999).

Como qualquer enzima, a HSB tem seu substrato específico, neste caso, esta enzima reconhece os ácidos biliares com os núcleos de esteróis clorato e os grupos aminoácidos glicina/taurina (Begley et al, 2006).

Estudos com *Lactobacillus acidophilus* em produtos fermentados, têm demonstrado resultados positivos na redução dos níveis de colesterol (Gilliland 1985). Nesse sentido, muitos estudos têm sido conduzidos visando uma ação hipocolestorolemiante, tanto na área de medicamentos quanto na área de alimentos.

3. Objetivos

3.1 Geral

Avaliar, *in vitro*, as características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416 quanto à atividade hidrolase de sais biliares (HSB), à produção de substâncias antagônicas, à resistência às condições do sistema digestório e à capacidade de adesão.

3.2 Específicos

Os microrganismos anteriormente referidos foram submetidos aos seguintes testes:

- Resistência às condições ácidas, enzimáticas e frente a sais biliares;
- Atividade hidrolase de sais biliares (HSB);
- Capacidade de autoagregação e coagregação
- Capacidade de competição e adesão ao epitélio intestinal, nas seguintes condições:
 - *E. faecium* CRL183 (isoladamente)
 - *L. helveticus ssp jugurti* 416 (isoladamente)
 - *E. coli*.0157:H7 (isoladamente)
 - *E. faecium* CRL183+ *L. jugurti* (associados)
 - *E. faecium* CRL183 na presença de *E. coli* 0157H7

- L. helveticus* ssp *jugurti* 416 na presença de *E. coli* 0157H7
- E. faecium* CRL183 e *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 já colonizados na célula Caco-2 e posteriormente acrescentado o cultivo de *E. coli*.0157:H7
- E. coli*.0157:H7 primeiramente colonizada na célula Caco-2 e posteriormente, acrescentado os cultivos de *E. faecium* CRL183 e de *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 .
- Capacidade de adesão das cepas anteriormente mencionadas em pH 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5 e 9,0.
- Produção de substâncias antagônicas.

4. Materiais e métodos

4.1 Microrganismos e condições de cultivo

Foram utilizadas cepas de *Enterococcus faecium* CRL183 procedente da coleção e cultivo do Centro de Referência para *Lactobacillus*-CERELA da Argentina e de *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 da coleção de cultivo do Departamento Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP) de Araraquara.

Os microrganismos foram cultivados em meio TSB (Tryptic Soy Broth – Acumídia-Maryland) na concentração 10% (v/v) à 37°C/16horas.

4.1.1 Preparo da suspensão celular

As células, após 24 horas de incubação a 37°C, foram centrifugadas durante 5 minutos e lavadas por três vezes em solução salina tamponada de fosfato pH 7,0.

4.1.2 Contagem de células viáveis

Após os procedimentos descritos no item 4.1.1, as células foram diluídas oito vezes em água tamponada fosfatada e plaqueadas em triplicata com meios de cultivo M17 (DIFCO-Becton Dickintson) específico para o *Enterococcus* e MRS

(Acumídia-Maryland) para *Lactobacillus*, por um período de 24 a 48 horas a 37°C. Em seguida, foi realizada a contagem das colônias, representando a viabilidade celular das suspensões de *E. faecium* CRL 183 e *L. helveticus* ssp *jugurti* 416.

4.2 Teste de tolerância ao *stress* gastrintestinal

4.2.1 Resistência às condições ácidas

Neste ensaio foi utilizada a metodologia de Gilliland et al(1984), baseada no tempo necessário para que o crescimento dos microrganismos em análise fosse suficiente para provocar um aumento de 0,3 unidades de densidade óptica (DO_{560}), em diferentes pH.

As células lavadas de *E. faecium* CRL 183 e de *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 foram incubadas em tubos que continham os meios M17 e MRS, respectivamente, com pH ajustado para 1,5; 2,0; 3,0 e 4,0 com ácido clorídrico a 1N, e incubadas a 37°C. Foram utilizados tubos controle com pH 6,5 e pH 6,9 para os meios de cultivo MRS e M17, respectivamente. Leituras espectrofotométricas foram realizadas em triplicata, a cada 30 minutos por um período de 2 horas.

O tempo de retardo de crescimento de cada microrganismo frente aos diferentes pH foi calculado pela diferença entre DO_{560} do grupo controle e dos demais tubos, até que fosse alcançado um aumento de 0,3 unidades e DO_{560} .

4.2.2 Determinação da tolerância ao trânsito gastrointestinal.

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

Foram utilizadas soluções salinas a 0,5% contendo 0,3g/ml de pepsina (Pepsin Cristalin-SIGMA) e 0,1g/ml de pancreatina (Pancreatin Porcine Pâncreas-SIGMA). Os pH foram ajustados para 2,0 e 8,0 com HCl 0,1 N e NaOH 0,1N, respectivamente. Em seguida as soluções foram esterilizadas por meio de filtração em membrana de 0,2 μ m (CORNING[®]).

Foram transferidos 10 ml de cada solução para tubos estéreis contendo 3ml de solução salina estéril adicionados de 2 ml de suspensão celular de *E. faecium* CRL 183 e *L. helveticus* ssp *jugurti* 416, separadamente. Após a homogeneização, os tubos foram incubados a 37°C. Alíquotas de 1ml foram retiradas em duplicata para cada ensaio, para o teste de tolerância gástrica nos tempos 0, 1, 90 e 180 minutos e nos tempos 0; 1 e 240 minutos para o ensaio de tolerância ao trânsito intestinal. Essas alíquotas foram diluídas em água tamponada fosfatada e, posteriormente, plaqueadas em profundidade, em duplicata e incubadas a 37°C.

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

Neste estudo, para determinar a sobrevivência ao trânsito estomacal e intestinal, foi utilizada a metodologia de Charteris, Kelly, Morelli e Collins (1998). Foram considerados microrganismos tolerantes para o teste de sobrevivência à simulação gástrica, aqueles que diminuíram, no máximo, em 30% a sua concentração celular e, para o ensaio de sobrevivência ao trânsito intestinal, aqueles que apresentaram uma redução de 1,5 log da sua contagem inicial.

4.2.3 Determinação da resistência à presença de sais biliares

Neste ensaio foi utilizada a metodologia de Gilliland (1984), baseada no tempo necessário para que o crescimento dos microrganismos em análise fosse suficiente para provocar um aumento de 0,3 unidades de densidade óptica (DO_{560}) frente a diferentes concentrações de sais biliares.

As células lavadas de *E. faecium* CRL 183 e de *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 foram incubadas em tubos contendo os meios M17 e MRS, respectivamente, suplementados com Oxgall (SIGMA-Aldrich) nas concentrações 0,1; 0,2; 0,3 e 0,5%, e incubadas a 37°C. Um tubo sem Oxgall foi utilizado como controle. Foram realizadas leituras espectrofotométricas em triplicata, a cada 20 minutos, por um período de 3 horas.

O tempo de retardo de crescimento de cada microrganismo frente a diferentes concentrações de Oxgall foi calculado pela diferença entre DO_{560} , do grupo controle e dos demais tubos, até que fosse alcançado um aumento de 0,3 unidades de DO_{560} .

4.3 Hidrolase de sais biliares (HSB)

Neste ensaio foi utilizada a metodologia de Tanaka, Hashiba, Kok e Mierau (2000), baseada na desconjugação dos sais biliares TDCA (Sodium taurodeoxycholate hydrate-SIGMA ALDRICH) e GDCA (Glycodeoxycholic acid monohydrate- SIGMA ALDRICH) pelos microrganismos.

As células de *E. faecium* CRL 183 e de *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 foram incubadas em placas com meio de cultura sólido específico para cada espécie (M17 e MRS) e suplementado com 5% TDCA ou GDCA. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, sendo verificada a ocorrência de halos de precipitações de sais biliares ou mudanças de cor das colônias (branco opaco) e do meio de cultivo, indicando a presença, ou não, dessa enzima.

4.4 Teste de auto-agregação e coagregação bacteriana

O teste de auto-agregação seguiu a metodologia de Kós et al (2003), baseada nas diferentes absorvâncias dos microrganismos em tampão fosfato salino PBS pH 7,2, obtidas durante 5 horas.

Para a obtenção das células lavadas dos microrganismos, o procedimento inicial foi o mesmo descrito no item 4.1.1, porém, na última centrifugação, as células foram ressuspendidas com 4ml de tampão fosfato salino (PBS-GIBCO-Invitrogen) pH 7,2. Após esse procedimento, as células foram homogeneizadas em vortex por 10 segundos e incubados a 37°C. Foram retiradas alíquotas de 0,1ml nos tempos 0; 1; 2; 3, 4 e 5 horas e transferidas para tubos contendo 3,9ml de tampão PBS pH 7,2 (GIBCO-Invitrogen) e lidas as absorvâncias a 600nm.

Para calcular a porcentagem de autoagregação, foi utilizada a seguinte equação: $1 - (A_0/A_t) \times 100$, onde A_t representa a absorvância nos tempos 1; 2; 3; 4 e 5 horas e A_0 no tempo inicial.

No teste de coagregação, a metodologia empregada foi a mesma do teste de autoagregação, porém, os microrganismos foram utilizados em conjunto (2 ml de suspensão celular de cada um). Foi realizado um grupo controle contendo os microrganismos separados.

Para calcular a porcentagem de coagregação, foi utilizada a equação de Handley et al (1987).

$$\text{Coagregação (\%)} = \frac{((Ax + Ay) / 2) - A(x + y)}{Ax + Ay/2} \times 100$$

Onde Ax e Ay representam as absorvâncias do *E. faecium* CRL 183 e do *L. helveticus ssp jugurti* 416, respectivamente, e A(x + y) representa a absorvância da mistura destes microrganismos.

Para realizar a micrografia dos testes de auto-agregação e coagregação, foram retiradas alíquotas de 0,5 ml em intervalos de 1 hora do ensaio e transferidos para a superfície de uma lâmina submetida a coloração de Gram. Após a secagem, as lâminas foram examinadas em microscópio binocular NIKON® (modelo ECLIPSE-E 2000) com sistema de captura de imagens, em aumento de 1000 X.

4.5 Capacidade de competição e adesão ao epitélio intestinal

Para verificar a adesão do *E. faecium* CRL 183 e do *L. helveticus ssp jugurti* 416 ao epitélio intestinal foi utilizada a metodologia segundo Dupre et al, (2003). Para tanto, foi utilizado um cultivo de células epiteliais originárias do colón (Caco-2), na concentração de $3,6 \log_{10} \text{UFC ml}^{-1}$ e incubado juntamente com a suspensão celular dos microrganismos em questão na concentração de $9 \log_{10} \text{UFC ml}^{-1}$.

A célula Caco-2 foi cultivada em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Médium-Invitrogen) suplementado com 1% de uma solução contendo aminoácidos

não essenciais (SIGMA-7145), 5 µl/ml de gentamicina (SIGMA), 8,401g/ml de bicarbonato de sódio, 59,8 g/ml de HEPES-Invitrogen (ácido sulfônico 1-Piperazinetano e sal monossódico 4-(2-hidroxietil)) e 20% de soro bovino fetal (FCS-Ameresco) e incubada a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% v/v de CO₂. As células foram semeadas até a fase de maturação, em torno de 20 dias, sendo, o meio de cultura trocado 3 vezes por semana. Cerca de 200 µl de células foram colocadas em placa de 48 orifícios, contendo ao fundo, uma lamínula de vidro de 10 mm de espessura. O volume final foi completado com aproximadamente 800 µl de meio de cultura. Após uma nova fase de maturação, os testes foram iniciados.

Os microrganismos foram incubados como descrito no item 4.1, e em seguida centrifugados e ressuspensos com DMEM isento de gentamicina. Às células Caco-2 foram adicionados 200 µl de cada suspensão bacteriana (isoladas para o teste de adesão ou em conjunto para o teste de competição). As placas foram centrifugadas na rotação 1500 rpm/10 minutos e incubadas por 3 horas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% v/v de CO₂. Após este período as células foram fixadas com 1 ml de etanol por 30 minutos e coradas com 1 ml de May-Grunwald-Giemsa por mais 20 minutos. As placas foram lavadas duas vezes com tampão PBS 7.2 (GIBCO-Invitrogen).

Em seguida as lamínulas de vidro foram fixadas em lâminas retangulares de vidro e foram visualizadas em microscópio com aumento de 1000X.

Para o teste de competição a adesão ao epitélio intestinal, foram simuladas as seguintes associações de microrganismos, sempre na presença da célula Caco-2:

- O *E.faecium* CRL183 e o *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 adicionados simultaneamente;
- o *E.faecium* CRL183 e a *E.coli*.0157:H7 adicionados simultaneamente;
- o *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 e a *E.coli*.0157:H7 adicionados simultaneamente;
- o *E.faecium* CRL183 e o *L. helveticus* ssp *jugurti* 416, adicionados após a colonização da *E. coli*.0157:H7;
- a *E. coli*.0157:H7 adicionada após a colonização pelo *E.faecium* CRL183 e *L. helveticus* ssp *jugurti* 416.

4.6 Capacidade de adesão das cepas em diferentes pH

Foi verificado também a influência do pH na adesão dos microrganismos, tendo sido, o pH do meio de cultura DMEM ajustado para 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0, 8,5 e 9,0 com NaOH a 1N. Em seguida foi realizado o teste descrito acima.

De acordo com Dupre et al, (2003), foram consideradas não aderentes quando menos de 10 bactérias se mostraram aderidas à uma célula Caco-2. Aderentes quando observadas entre 10 e 16 bactérias por célula, muito aderentes entre 16 a 60 bactérias por célula e altamente aderentes, com mais que 60 bactérias por célula.

4.7 Produção de substâncias antagônicas

Para verificar a produção de substâncias antibacterianas foi utilizada a técnica *spot-on-the-lawn* descrita por Lewus et al (1991), que consiste na inibição do crescimento de uma cepa sensível por uma bactéria produtora (teste). Nesse estudo foi verificada a produção de substâncias antagônicas pelo *Enterococcus faecium* CRL183 e *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 frente aos microrganismos patogênicos *Escherichia coli* 0157: H7 proveniente da fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), *Listeria monocytogenes* V2 pertencente à coleção de cultivo do Departamento de Farmácia Bioquímica (USP) de Ribeirão Preto e *Salmonella Enteritidis* da coleção de cultivo do Departamento Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (UNESP) de Araraquara.

Inicialmente os microrganismos *E. faecium* CRL183 e *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 foram inoculados em meio de cultura TSB (Tryptic Soy Broth –Acumídia-Maryland) e incubados por 24 horas a 37°C. Em seguida foram retiradas alíquotas de cada inóculo e adicionadas na forma de pontos (cerca de 2 µl por ponto) na superfície de placas contendo meio de cultivo TSAYE (Tryptic Soy Agar Yeast Extract- Acumídia-Maryland), os quais foram incubados por 24 horas a 37°C em anaerobiose, a fim de evitar a formação de peróxido de hidrogênio. Após esse período foi acrescentada em cada placa uma sobrecamada de aproximadamente 8 ml de meio BHI semi sólido (Brain-Heart Infusion Broth 0,8% Agar -Acumídia-Maryland), contendo uma cepa patogênica na concentração de 10⁶ UFC/ml. Para

cada microrganismo teste foi utilizada uma única cepa patogênica de cada vez. As placas foram incubadas por 24h a 37°C. A presença de halo de inibição, ao redor de cada colônia, indica a produção de substâncias antibacterianas, incluindo bacteriocinas.

4.8 Análise estatística dos resultados

Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa SIGMASTAT, ao teste de médias de Tukey e ao teste T de Student. As diferenças foram consideradas significativas para $p \leq 0,05$.

5. Resultados e discussão

5.1 Determinação da concentração dos microrganismos.

Para que os microrganismos pudessem ser utilizados nas diversas etapas propostas para esse estudo foi necessário, primeiramente, determinar a concentração de cada um nas suspensões recém-preparadas.

Na tabela 1 são apresentadas as concentrações dos microrganismos em estudo.

Tabela 1. Determinação da concentração dos microrganismos *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416.

Microrganismos	Concentração (log ₁₀ UFC ml ⁻¹)
<i>E. faecium</i> CRL 183	7,95
<i>L. helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416	7,91

5.2 Resistência às condições ácidas

As secreções ácidas do estômago e as enzimáticas do trato gastrintestinal, além de serem indispensáveis para o processo digestório, constituem-se nos primeiros mecanismos de defesa do organismo frente aos microrganismos invasores, pois, estas secreções atuam como um bloqueio microbiano à colonização do estômago e conseqüentemente do intestino. Entretanto, para que um microrganismo possa aderir ao epitélio intestinal e se desenvolver, para então ser considerado um probiótico, ele precisa sobreviver a todas estas barreiras do trato gastrintestinal (Marteau et al, 1993).

Neste sentido, para verificar as propriedades probióticas de um microrganismo, a primeira característica a ser analisada é sua tolerância ao ácido gástrico. Mas, é importante ressaltar que após a ingestão do alimento, o pH estomacal que inicialmente variava de 1,2 a 2,0, passa para 3,0 ou até 4,0 dependendo do alimento ingerido. No caso de iogurtes, o pH do estômago pode chegar a 5,0 (Takiguchi and Suzuki, 2000; Cheng et al, 2004).

Alguns testes *in vitro* podem ser usados para determinar a tolerância ao ácido estomacal, porém, é importante ressaltar que os níveis de tolerância a diversos pH variam consideravelmente entre as bactérias probióticas (Klaenhammer e Kullen 1999).

Segundo Gupta et al (1996), Gomez-Gil et al (1998) e Park et al, (2006), para que uma bactéria possa ser considerada probiótica, ela deve sobreviver entre os pH 2,0 e 3,0, durante 3 horas.

Já na avaliação de Bernardeau *et al.* (2001), para resistir à passagem pelo estômago, o tempo de permanência para que as culturas possam ser consideradas potencialmente probióticas é de 90 minutos em pH 3,0.

No presente estudo foi verificada a resistência dos microrganismos *Enterococcus faecium* CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 frente aos pH 1,0 ;2,0; 3,0 e 4,0, nos tempos 30; 60; 90 e 120 minutos.

Os resultados expressos na tabela 2 demonstram que ambos os microrganismos estudados resistiram aos diferentes pH, ou seja, mudaram suas DO_{560} em 0,3 unidades até o final do experimento (120 minutos) indicando a capacidade de crescimento. Porém, verifica-se uma superioridade na resistência apresentada pelo microrganismo *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416, demonstrando que esse microrganismo cresceu melhor em condições ácidas do que em pH neutro (controle), justificando então, os valores negativos apresentados nessa tabela. Quando comparado aos resultados encontrados para o *Enterococcus faecium* CRL 183, o *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 demonstrou que além de ter uma maior resistência as condições ácidas, essa condição se faz necessária para seu melhor crescimento.

Essa superioridade de resistência a baixos pH demonstrada pelo *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416, pode ser justificada por uma característica específica em sua estrutura molecular. Segundo Rius et al, (1994), alguns microrganismos podem apresentar um citoplasma com alta capacidade

tamponante (pH 3,72 a 7,74), favorecendo sua resistência a mudanças do pH e ganho de estabilidade em condições ácidas.

Além disso, quando um microrganismo é exposto às condições ácidas, o pH de homeostase é mantido por uma descarga de H⁺ da célula (Booth 1985). Esse processo é dependente da atividade de H⁺-ATPase, sendo essa a enzima responsável por manter a concentração de H⁺ entre a célula e o meio. A atividade elevada da H⁺-ATPase nas BALs, quando são expostas a baixos pH, foi verificada em algumas espécies por Matsumoto et al (2004).

Tabela 2. Tempo (minutos) de retardo no crescimento do *Enterococcus faecium* CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416, frente a diferentes pH

Microrganismos	pH			
	1,5	2,0	3,0	4,0
<i>E. faecium</i> CRL 183	13	1	29	54
<i>L. helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416	(-)*26	(-)*29	(-)*24	(-)*24

* valores negativos indicam que os tempos de crescimento foram inferiores ao controle.

Em concordância com os nossos resultados, Shinoda et al (2001) demonstraram também que o *Lactobacillus helveticus* CP53 desenvolve-se bem em pH 3,0; 4,0; 5,0 e 6,5.

A figura 2 mostra o crescimento do *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416, porém, neste caso, verifica-se que todos os valores de pH foram favoráveis ao seu crescimento.

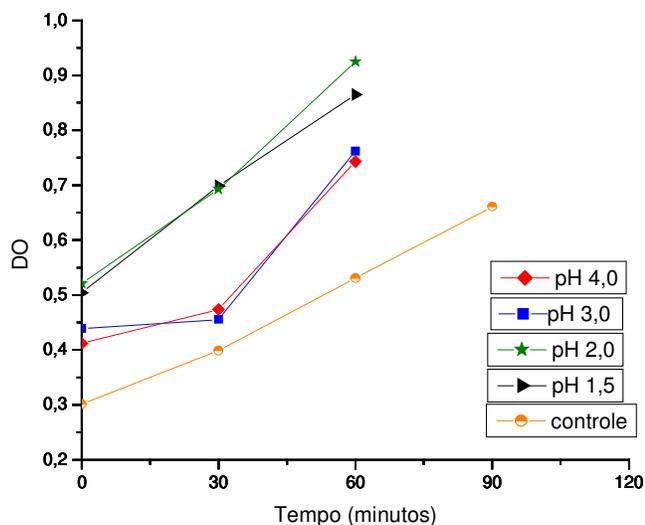


Figura 2. Perfil de crescimento do *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 416 frente a diferentes pH.

Em relação ao microrganismo *E. faecium*, encontram-se na literatura científica alguns estudos que buscam demonstrar a tolerância desta bactéria frente a diversos valores de pH. Morandi et al (2005) testaram a resistência de 70 cepas do gênero *Enterococcus* sp. isoladas de queijo frente a diversas temperaturas e pH. Foi verificado entre elas, que a espécie *E. faecium* sobreviveu a todas as variações de temperaturas e pH, não reduzindo seu ciclo logarítmico.

Na figura 3, observa-se o perfil de crescimento do *Enterococcus faecium* CRL 183. Verifica-se que em pH 2,0 o microrganismo apresentou a melhor curva de crescimento.

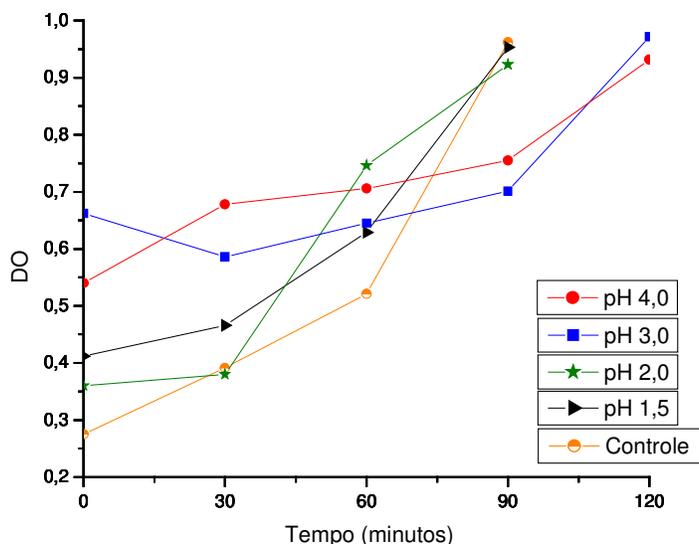


Figura 3. Perfil de crescimento do *Enterococcus faecium* CRL183 frente a diferentes pH.

5.3 Determinação da tolerância ao trânsito gastrintestinal

Para verificar a sobrevivência dos microrganismos frente às barreiras do trato gastrintestinal, são necessários alguns testes, para os quais se pode empregar metodologias *in vivo* e *in vitro*. Segundo Charteris et al (1998) as metodologias *in vitro* representam uma importante forma de caracterização dessa capacidade, pois, além de garantir resultados confiáveis, são executadas com maior facilidade que os estudos *in vivo*.

Em nosso estudo verificou-se o potencial probiótico do *E. faecium* CRL 183 e do *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 diante da simulação das condições gástricas e intestinais, utilizando solução de pepsina da mucosa do estômago suíno (SIGMA) com pH ajustado para 2,0 e solução de pancreatina suína (SIGMA) com pH ajustado para 8,0.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 3, os dois microrganismos estudados demonstraram pouca sensibilidade à simulação das condições gástricas, mantendo-se viáveis até o final do ensaio aos 180 minutos.

Para o microrganismo *E. faecium* CRL 183 houve uma perda de viabilidade de aproximadamente 20% ao final das 3 horas, enquanto que para o *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 a redução foi maior, ou seja, aproximadamente 27,5% da sua contagem inicial, entretanto, ambas reduziram menos que 30%, condição essencial para que possam ser considerados resistentes ao *stress* estomacal segundo, Charteris et al (1997).

Ainda na tabela 3, podem ser observados os resultados obtidos para o teste de tolerância às condições intestinais, onde, ambos os microrganismos demonstraram-se também resistentes a pancreatina. O número de células do *E. faecium* CRL 183, durante todo o tempo de estudo, não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), ao passo que *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 apresentou uma perda de viabilidade aos 240 minutos em relação ao tempo inicial. Cabe ressaltar

que a redução verificada não foi superior a 1,5 log, condição necessária para que este microrganismo possa ser considerado resistente às condições do meio.

Tabela 3. Efeito da simulação do trânsito gastrointestinal na viabilidade do *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416.

Microrganismos	Total de células viáveis ao teste TSTE* (\log_{10} UFC mL ⁻¹) em diferentes tempos de exposição				Total de células viáveis ao teste TSTI** (\log_{10} UFC mL ⁻¹) em diferentes tempos de exposição		
	Início	1min	90min	180min	Início	1min	240min
	<i>E. faecium</i> CRL 183	7,95 ^a	7,89 ^a	6,87 ^b	6,40 ^c	7,95 ^a	7,95 ^a
<i>L. helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416	7,91 ^a	7,89 ^a	6,84 ^b	5,78 ^c	7,94 ^a	7,85 ^a	6,83 ^b

* TSTE = tolerância à simulação do trânsito estomacal.

** TSTI = tolerância à simulação do trânsito intestinal.

Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si para $p < 0,05$.

Sivieri et al (2007) determinaram a sobrevivência gastrointestinal do *Enterococcus faecium* CRL 183 em ratos com câncer de cólon quimicamente induzido e que receberam o “iogurte” de soja fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp *Jugurti* 416. Os resultados demonstraram que o *Enterococcus faecium* CRL 183 se mostrou viável nas fezes dos animais, mas, contudo, a viabilidade do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 não foi determinada nesse estudo.

Ainda em relação à sobrevivência frente às barreiras gastrintestinais, Lund et al (2002) verificaram a viabilidade de uma cepa de *Enterococcus faecium* em humanos, frente a doses de vancomicina (dose de 150ml durante dez dias). Ao final deste estudo, constataram que essa cepa permaneceu viável, mesmo após esse tratamento com o antibiótico, em concentração de 4×10^6 UFC/g de fezes de voluntários entre 20 e 30 anos.

Saito et al (2004) encontraram resultados satisfatórios em relação à atividade probiótica da cepa de *Lactobacillus helveticus* GCL1001. Neste trabalho foi verificada a concentração deste microrganismo nas fezes de indivíduos adultos que ingeriram, durante cinco dias, cerca de 84 ml de leite fermentado contendo 10^{10} UFC ml⁻¹ desta bactéria. Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que, apesar da redução 5 ciclos logarítmicos, esse microrganismo foi qualificado como probiótico.

Charteris et al (1997) denominaram de microrganismos potencialmente probióticos, as cepas de *Lactobacillus casei* 212.3, *Lactobacillus fermentum* KLD, *Bifidobacterium bifidum* 2715 e *Bifidobacterium bifidum* 1453, as quais apresentaram viabilidade superior a 70% no teste de sobrevivência gástrica e uma queda de viabilidade inferior a 1,5 log para teste de sobrevivência ao trânsito intestinal.

Outro importante estudo foi o realizado por Minelli et al (2004) os quais verificaram que a cepa de *Lactobacillus casei* imunitass® foi tolerante após ser

submetida à simulação do trânsito gastrointestinal. Em nosso estudo, os resultados encontrados, embora para espécies diferentes, estão de certa forma, condizentes com os encontrados na literatura, permitindo-nos afirmar que o *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 sobrevivem ao trânsito gastrointestinal e apresentam, portanto, características importantes para que possam ser considerados probióticos.

5.4 Resistência a sais biliares

A resistência aos sais biliares é outro importante mecanismo para que um microrganismo seja potencialmente probiótico. Os ácidos biliares são sintetizados a partir do colesterol no fígado e armazenados na vesícula biliar, onde após a ingestão de gorduras, são secretados no duodeno na concentração aproximada de 500–700 ml/dl (Hill & Draser, 1968; Hylemon & Glass, 1983).

A ação dos sais biliares pode ser prejudicial aos microrganismos, pois a exposição de bactérias à bile pode resultar em uma desorganização celular, devido à composição da sua membrana. Essa modificação afeta não somente sua viabilidade, mas também suas interações celulares (Valdez et al, 1996).

No presente estudo verificou-se a sensibilidade dos microrganismos *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 em diferentes concentrações de Oxgall (OXGALL-SIGMA Aldrich). Foi levado em

consideração o tempo gasto para que os microrganismos apresentassem um aumento de suas DO_{560} em 0,3 unidades.

Segundo Dunne et al (2001), para uma bactéria apresentar características potencialmente probióticas deve ser capaz de sobreviver à concentração de 0,5% de Ovgall.

De acordo com este presente estudo, o *Enterococcus faecium* CRL 183 e o *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 conseguiram aumentar sua DO_{560} durante o período previsto para o ensaio, apesar de apresentarem uma redução da velocidade de crescimento maior na concentração de Ovgall a 0,5%, conforme mostra a Tabela 4. Essa concentração retardou o crescimento da cepa de *E. faecium* em 41 minutos e em 175 minutos da cepa de *L. helveticus* ssp *jugurti*.

Tabela 4. Tempo (minutos) de retardo no crescimento do *Enterococcus faecium* CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416, frente a diferentes concentrações de Ovgall.

Microrganismos	Concentrações de Ovgall (%)			
	0,1	0,2	0,3	0,5
<i>E. faecium</i> CRL 183	8	22	23	41
<i>L. helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416	42	106	123	175

Em um similar estudo realizado por Rossi et al (1999) foi determinada a resistência frente aos sais biliares de vários microrganismos: *Enterococcus faecium* CRL 183, *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 73 e *Streptococcus thermophilus* 85. Os resultados mostraram que tanto o *Enterococcus faecium* quanto o *Lactobacillus helveticus* ssp. *jugurti* tiveram um tempo de retardo no crescimento menor que os verificados em nosso estudo para as concentrações 0,1 0,2 e 0,3 de Oxgall. Entretanto, o *L. helveticus* ssp *jugurti* não apresentou crescimento (variação de DO_{560}) na concentração máxima de Oxgall utilizada no estudo dos referidos autores (0,5%) durante o período do ensaio que foi de 160 minutos, tempo menor que o empregado por nós.

No estudo de De Man et al (1960), foi demonstrado que algumas cepas de *Lactobacillus* sp e *Bifidobacterium* sp. foram capazes de sobreviver a bile proveniente de diferentes espécies animais. Foram utilizadas as biles bovina (Sigma Chemical Co Ltd, Poole, United Kingdom), suína (Sigma) e a humana em concentrações que variaram de 0,3 a 7,5%. O ensaio foi conduzido a 37°C e o crescimento foi verificado após 24-48h. Os resultados demonstraram que algumas cepas testadas exibiram uma boa resistência à bile bovina e suína e tiveram uma pequena redução de viabilidade para a bile humana, demonstrando a existência de pequenas alterações na resistência dos microrganismos frente a biles de diferentes procedências.

A figura 4 mostra o comportamento do *Enterococcus faecium* CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 frente às concentrações 0,1, 0,3 e 0,5% de Ovgall. Verifica-se que a velocidade de crescimento do *Enterococcus faecium* CRL 183 foi superior, em todas as concentrações, durante todo o tempo de estudo.

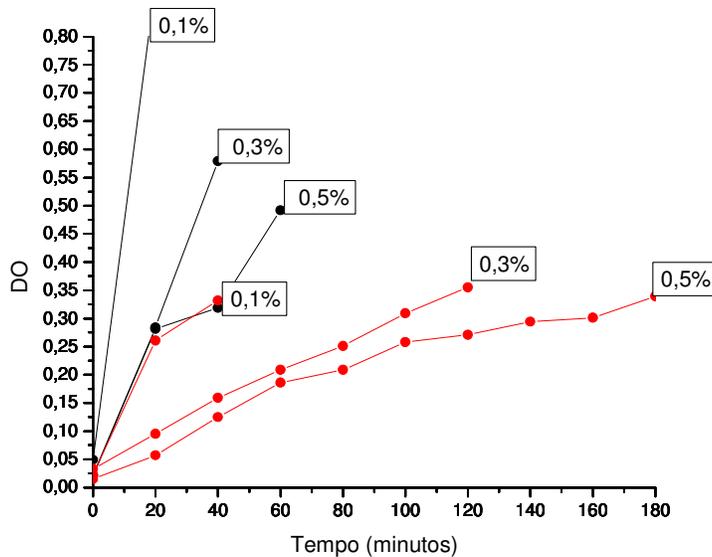


Figura 4. Crescimento do (■) *Enterococcus faecium* CRL 183 e do (●) *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 frente a diferentes concentrações de Ovgall.

5.5 Hidrolase de sais biliares (HSB)

A HSB é uma enzima produzida por diversos microrganismos, entre eles os probióticos. Muitos estudos envolvendo a cinética dessa enzima relataram a sua eficiência em hidrolisar os sais biliares glicoconjugados e tauroconjugados e, como consequência dessa ação, tem sido demonstrado que este mecanismo auxilia na

redução das concentrações de colesterol total sanguíneo (Taranto et al, 1999; Tanaka et al, 2000; Kim et al, 2005), razão pela qual a produção dessa enzima por bactérias probióticas tem sido amplamente estudada.

Por isso, procuramos demonstrar a produção de HSB pelos microrganismos *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 frente a hidrólise dos ácidos taurodeoxicólico (TDCA) e do glicodeoxicólico (GDCA).

Para verificar a atividade da hidrolase de sais biliares, o estudo de Dashkevics & Feighner (1989) demonstrou que a desconjugação dos sais biliares pelas BALs pode ocorrer de duas formas: 1) formação de um precipitado (resultante da hidrólise destes sais) ao redor das colônias, o qual difunde-se para todo ágar, levando a mudança de cor do meio; 2) colônias de coloração branca e opacas.

Em nosso estudo, pode ser observada pela figura 5, que a hidrólise do TDCA pelo *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 foi demonstrada pela coloração das colônias que se apresentaram brancas e opacas



Figura 5. Atividade de HSB produzida pelo *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 frente ao TDCA, onde A indica a placa controle e B a placa suplementada com TDCA

Entretanto, frente ao GDCA, o *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 mostrou-se não apenas incapaz de hidrolisar este sal biliar (figura 6), mas também, com uma alta sensibilidade, confirmando os resultados encontrados neste mesmo estudo no teste de sobrevivência aos sais biliares, onde, esta bactéria apresentou um retardo no crescimento bastante significativo.

Os estudos de Moser & Savage (2001) revelaram que a HSB produzida por *L. buchneri* JCM1069 expressou somente a capacidade de hidrolisar o taurodeoxicólico (TDCA). Segundo os autores, isso ocorreu, porque o TDCA e o taurocólico possuem diferentes posições de taurina nas suas estruturas. Já, o estudo de Mc Auliffe et al (2005), mostrou uma alta atividade de HSB produzida por *L. acidophilus* NCFM frente ao TDCA e GDCA, porém, após o gene *bshA* ser

inativado, esta enzima deixou de ter atividade em sais contendo quenodeoxicólico. Esses trabalhos sugerem que o tipo de HSB pode variar de acordo com o microrganismo que a produz e com o sal biliar que esta enzima irá atuar, explicando, assim, os resultados encontrados em nosso estudo.



Figura 6. Atividade de HSB produzida pelo *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 frente ao GDCA, onde A indica a placa controle e B a placa suplementada com GDCA

Na figura 7 e 8 são evidenciadas as atividades de HSB do microrganismo *Enterococcus faecium* CRL 183. Pode-se observar que esta cepa foi capaz de hidrolisar os dois sais biliares, por meio da formação de precipitados ao redor das colônias, além de ter provocado mudança de cor dos meios de cultura após a desconjugação dos sais.

Rossi et al (1994) já haviam comprovado em testes *in vitro*, que o *E. faecium* CRL 183 era capaz de diminuir cerca de 54% do colesterol. Essa

capacidade também foi observada em testes *in vivo*, utilizando coelhos hipercolesterolêmicos. Esses animais tiveram uma redução de 18% do colesterol sanguíneo após consumirem um produto fermentado com *Enterococcus faecium* por 30 dias (Rossi et al, 1999). Segundo os autores, um dos mecanismos prováveis dessa ação seria justamente a capacidade desse microrganismo em produzir HSB.



Figura 7. Atividade de HSB produzida pelo *Enterococcus faecium* CRL 183 frente ao TDCA, onde A indica a placa controle e B a placa suplementada com TDCA .

Esses resultados ajudam a explicar outros encontrados na literatura científica, como os de Taranto et al (1996) que também demonstraram o efeito de um produto fermentado com uma cepa de *E. faecium* sobre a redução das concentrações séricas de colesterol total em camundongos.

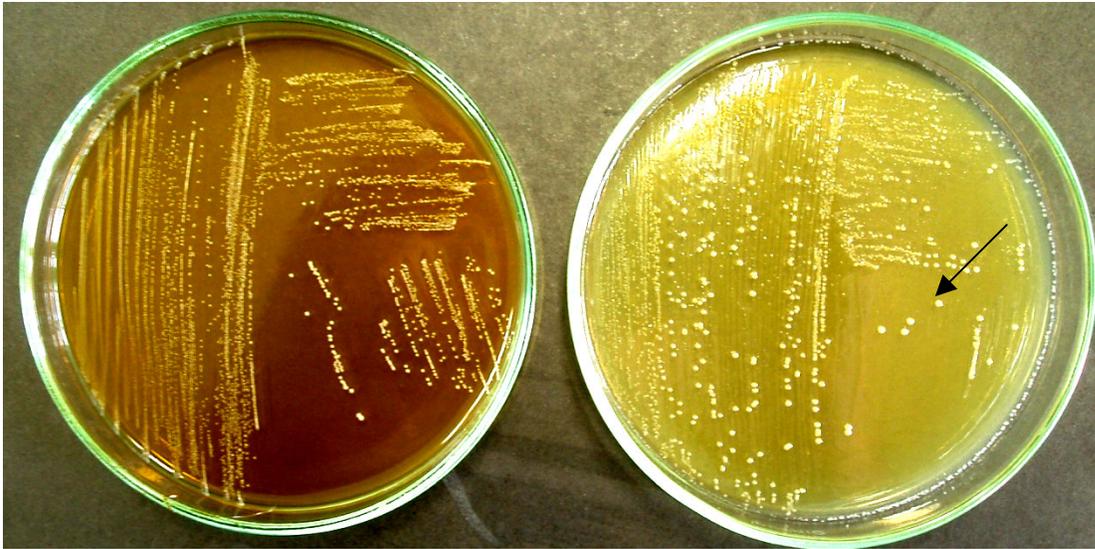


Figura 8. Atividade de HSB produzida pelo *Enterococcus faecium* CRL 183 frente ao GDCA, onde A indica a placa controle e B a placa suplementada com GDCA

5.6 Auto-agregação e coagregação

Wadstrom et al (1987) relacionaram a autoagregação dos microrganismos com a capacidade de adesão ao epitélio intestinal, sendo, então uma importante condição para que os mesmos possam fazer parte da microbiota intestinal.

A auto-agregação do *E. faecium* CRL 183 e do *L.helveticus* ssp *jugurti* 416 foi determinada durante 5 horas de experimentação e seus resultados, expressos em porcentagem, são apresentados na tabela 5. Pode-se verificar, que o *Enterococcus faecium* CRL 183 apresentou inicialmente (tempo 1 e 2 horas) uma capacidade maior de auto-agregação que a do *L.helveticus* ssp *jugurti* 416

(diferença significativa $p < 0,05$). No entanto, após três horas de experimento houve um aumento considerável do percentual de auto-agregação do *Lactobacillus*, alcançando valores estatisticamente iguais ao do *E. faecium* CRL 183, valores esses, que permaneceram iguais até o final do ensaio, chegando aos 350 minutos com aproximadamente 80% autoagregação.

Tabela 5. Auto-agregação (%) do *Enterococcus faecium* CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416.

Microrganismos	Tempo (horas)				
	1	2	3	4	5
<i>E. faecium</i> CRL 183	21 ^a	32 ^b	48 ^c	69 ^d	79 ^e
<i>L. helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416	7 ^a	18 ^b	49 ^c	67 ^d	80 ^e

Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si para $p < 0,05$.

Vários estudos envolvendo as BALs neste tipo de avaliação apresentaram valores condizentes aos encontrados em nosso estudo. Neste sentido, podem ser citados os trabalhos de Del Re et al (1998) e (2000) com *Bifidobacterium longum* e com *Bifidobacterium suis* e de Kós et al (2003) com o *Lactobacillus acidophilus* M92. Todos obtiveram ao final de seus experimentos, um percentual de auto-agregação de 95%, 80% e 70% respectivamente.

A figura 9, apresentada a seguir, ilustra melhor o comportamento da capacidade de auto-agregação de cada microrganismo em estudo.

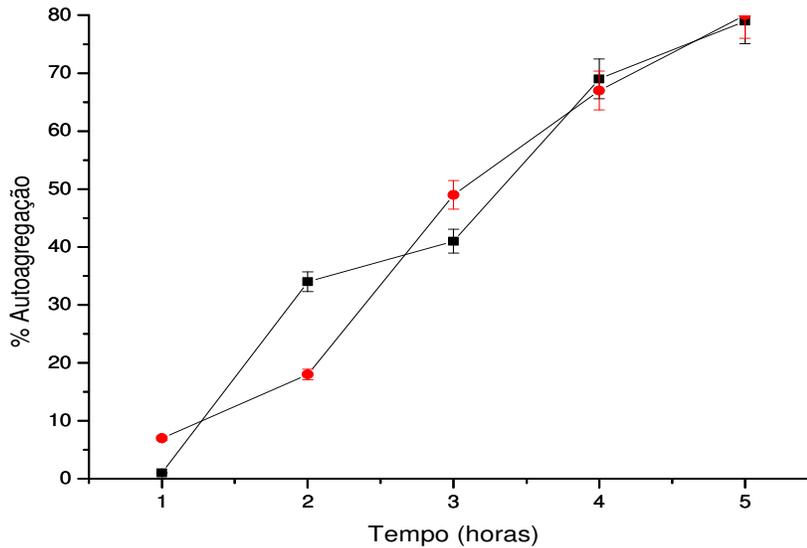


Figura 9. Porcentagem de auto-agregação do (■) *Enterococcus faecium* CRL 183 e do (●) *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416.

Del Re et al (1998) demonstraram que o fenômeno da auto-agregação está associado a vários mecanismos moleculares como os receptores da membrana. Nesse estudo, os autores verificaram que para o *Bifidobacterium longum* as capacidades de auto-agregação e adesão estão associadas a um fenótipo na membrana celular, o Agg+ (quando este fenótipo está presente) e o Agg- (ausente). Seus resultados demonstraram que a presença do Agg+ determina um percentual de auto-agregação e adesão superior.

Na figura 10 pode-se observar a auto-agregação do *E. faecium* CRL 183. Inicialmente os microrganismos estão dispersos, porém, a partir da primeira hora de incubação, nota-se o início da formação de pequenas agregações de células que se tornam cada vez maiores e bem definidos.

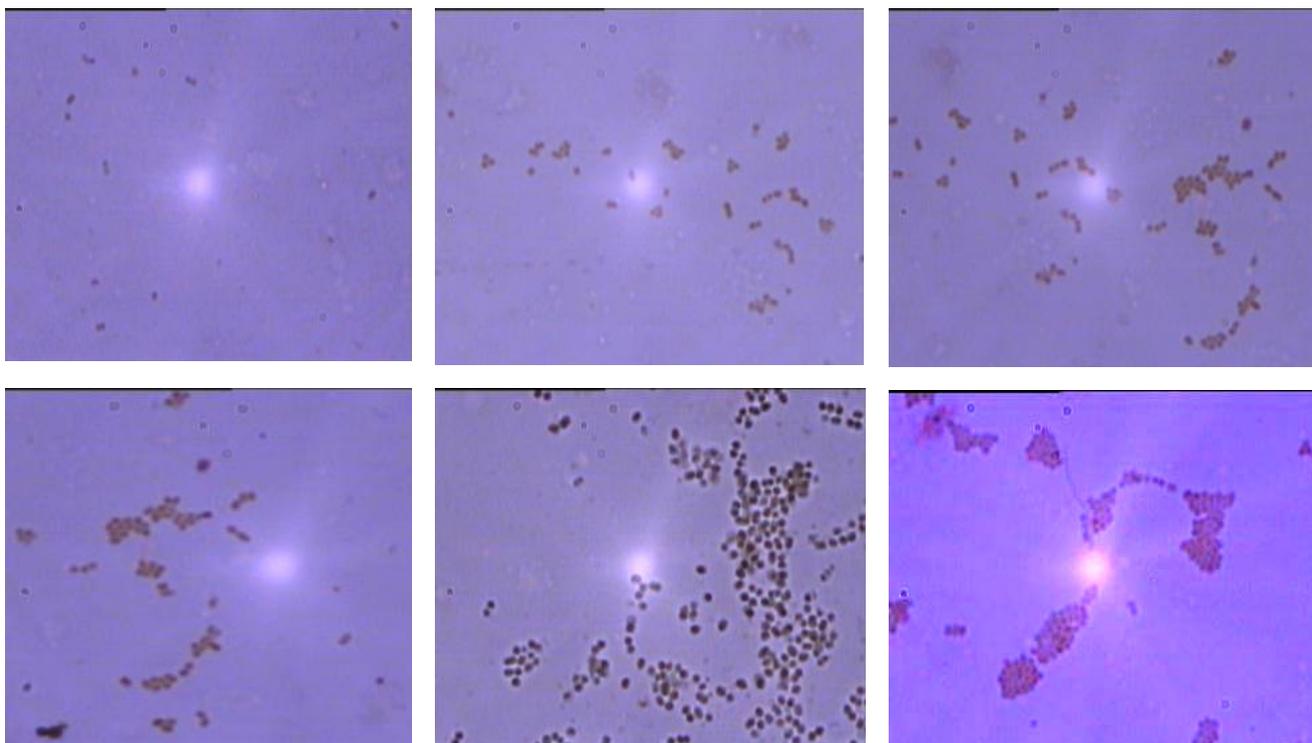


Figura 10. Micrografia (1000X) da auto-agregação do *Enterococcus faecium* CRL 183 incubado em tampão PBS (pH 7.2) durante cinco horas.

Na figura 11 são apresentadas as microfotografias do teste de auto-agregação do *L. helveticus* ssp *jugurti* 416, onde observa-se o comportamento semelhante ao descrito para o *E. faecium* CRL 183.

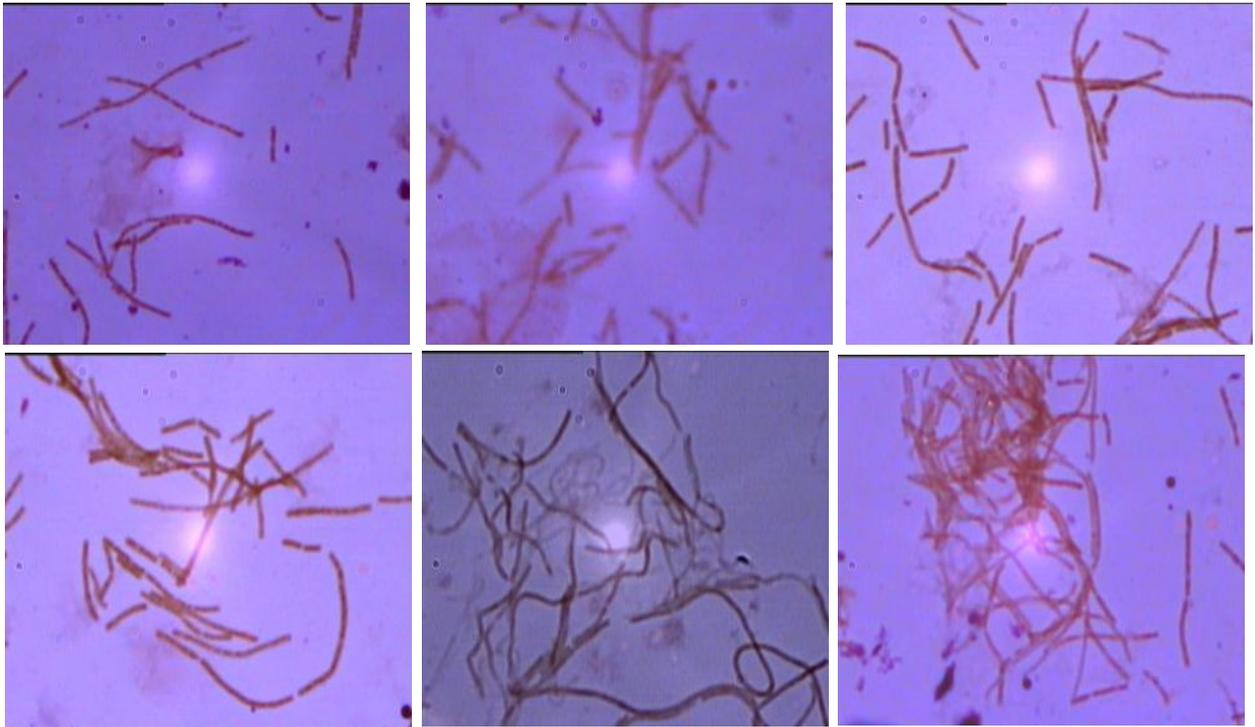


Figura 11. Micrografia (1000X) da auto-agregação do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 incubado em tampão PBS (pH 7.2) durante cinco horas.

A capacidade de um microrganismo em coagregar é de grande importância na caracterização de sua capacidade probiótica, pois leva a formação de uma barreira frente à colonização intestinal por patógenos (Reid et al, 1988).

Nesse estudo foi determinada a coagregação entre *Enterococcus faecium* CRL 183 e o *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416, durante o período de 5 horas de ensaio, uma vez que esses microrganismos têm sido amplamente utilizados pelo nosso grupo de pesquisa na produção do “iogurte” de soja. Na figura 12 pode-se observar que, ao final desse teste, ocorreu um percentual de coagregação de 25,4%, resultado considerado superior aos encontrados em

outros estudos, como o de Kós et al (2003) que obtiveram uma coagregação entre *Lactobacillus acidophilus* M92 e *Enterococcus faecium* L3 de, aproximadamente, 19,46%.

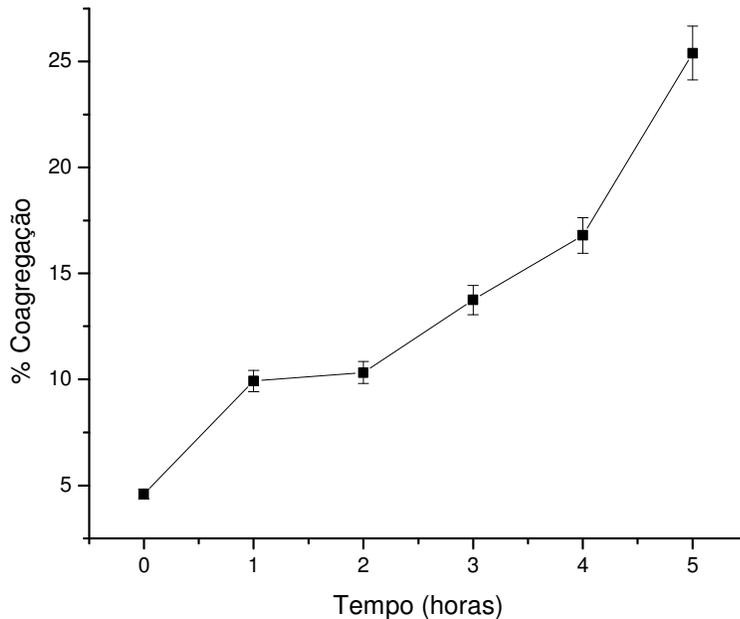


Figura 12. Porcentagem de coagregação do *Enterococcus faecium* CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416

O processo de coagregação entre o *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 pode ser melhor observado nas microfotografias apresentadas na figura 13. Os dois microrganismos estavam nitidamente separados e, com o passar do tempo, observa-se um aumento gradual no processo de coagregação dos mesmos.

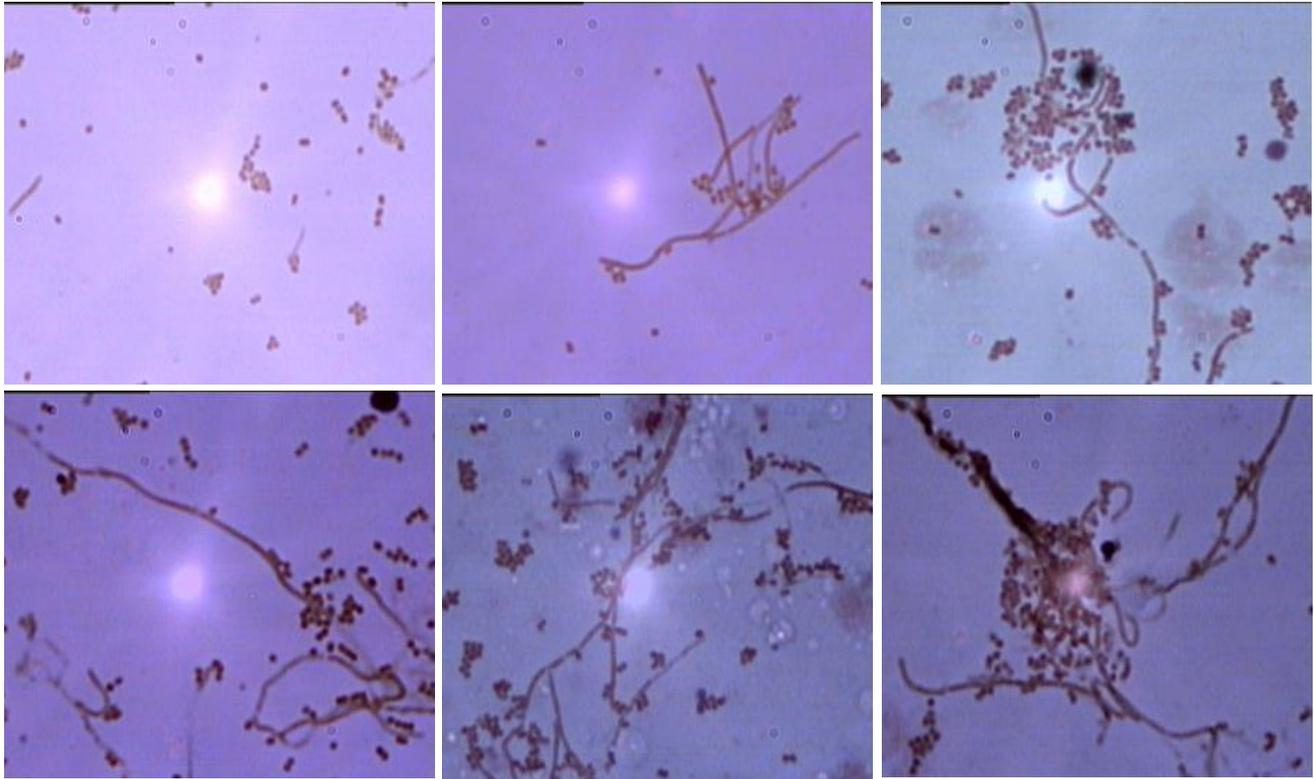


Figura 13. Micrografia (1000X) da coagregação do *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 incubados em PBS (pH 7.2) durante cinco horas.

Reid et al (1988) verificaram que a coagregação de bactérias ácido lácticas constitui-se num importante mecanismo de defesa para o organismo contra infecções do trato urogenital. Estudos de Spencer e Cheasson (1994) destacaram um mecanismo similar de proteção no trato gastrintestinal quando os microrganismos coagregavam-se. Suskovic et al (1997) verificaram que após ocorrer coagregação do *L. acidophilus* M92 com a *E. coli* e a *S. typhinimurium* houve redução significativa na adesão desses patógenos no intestino, devido a uma atividade antagônica produzida por este *Lactobacillus* durante a coagregação.

Saijonmaa-Koulumies e Lloyd (1996) estudaram os efeitos da coagregação do *L. reuteri* UK1A com *S. intermedius*, em fezes de cães. Os resultados comprovaram uma menor possibilidade de infecção na mucosa anal destes animais, demonstrando que esse processo de interação traz benefícios ecológicos importantes contra patógenos.

5.7 Capacidade de Adesão ao epitélio intestinal

A presença de algumas bactérias no trato intestinal é dependente da sua habilidade em aderir às células da mucosa intestinal (Fuller, 1992). De acordo com Servin et al, (2003) o processo de adesão microbiana de bactérias lácticas inclui fatores como interações eletrostáticas, hidrofóbicas e presença de ácidos lipoteicóicos

Neste estudo, foi avaliada a adesão das cepas do *E. faecium* CRL183 e do *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 ao epitélio intestinal. Na tabela 6, observa-se que ambas as cepas foram aderentes à célula Caco-2, embora, o *E. faecium* CRL183 tenha sido mais que o *L. helveticus* ssp *jugurti* 416.

Estes resultados estão condizentes com alguns encontrados na literatura, como os de Gopal et al., (2001), que ao compararem as propriedades de adesão *in vitro* de três cepas probióticas de *Lactobacillus*, entre elas, o *helveticus*, em diferentes células intestinais humanas, incluindo HT-29, Caco-2 e HT29-MTX, encontraram uma forte adesão das três cepas, que permaneceram fixadas as

monocamadas das células epiteliais mesmo depois de serem extensivamente lavadas.

Nallapareddy et al, (2000) e Lund & Edlund (2001), ao trabalharem com cepas de *E. faecium*, também demonstraram que esse microrganismo possui uma alta adesão ao epitélio intestinal.

Tabela 6. Competição e adesão à célula Caco-2 do *Enterococcus faecium* CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416.

Microrganismos	Adesão
<i>E. faecium</i> CRL183	(+++)
<i>L. helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416	(++)
<i>E. coli</i> 0157:H7	(+++)
<i>E. faecium</i> CRL183 +	(++)
<i>L. helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416 associados	(++)
<i>E. faecium</i> CRL183 +	(++)
<i>E. coli</i> 0157:H7 associados	(+)
<i>L. helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416 +	(+)
<i>E. coli</i> 0157:H7 associados	(+)
<i>E. faecium</i> CRL183 +	(++)
<i>L. helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416 aderidos à célula e frente a <i>E. coli</i> 0157:H7	(++)
<i>E. coli</i> 0157:H7 aderida a célula, frente a ação do <i>E. faecium</i> CRL183 e do <i>L. helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416 associados	(+)
<i>E. coli</i> 0157:H7 aderida a célula, frente a ação do <i>E. faecium</i> CRL183 e do <i>L. helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416 associados	(++)
<i>L. helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416 associados	(+)

(+) aderente
 (++) muito aderente
 (+++) altamente aderente

Na tabela 6 é apresentada também a habilidade de adesão da *E. coli*.0157:H7, microrganismo que foi utilizado para ser verificada a capacidade de competição dos cultivos probióticos em estudo.

É importante ressaltar que uma das formas pelas quais os probióticos exercem suas ações é através da competição por sítios de adesão bacteriana na superfície do epitélio intestinal. Segundo Rostagno et al, (2003), os probióticos competem com os patógenos pelos receptores celulares. Dessa forma, a maioria dos probióticos pode interagir com a membrana intestinal, formando uma parede de defesa contra os patógenos invasores, ou seja, formam uma “película biológica” que evita a aderência de microrganismos indesejáveis.

Tabela 7. Porcentagem de redução da adesão da *E. coli* 0157:H7 pelo *Enterococcus faecium* CRL183 e *Lactobacillus helveticus ssp jugurti* 146 à célula Caco-2.

Microrganismos	%
<i>E. faecium</i> CRL183 e <i>L. helveticus ssp jugurti</i> 416 associados e frente <i>E. coli</i> 0157:H7	60
<i>E. coli</i> 0157:H7 frente a adesão ao <i>E. faecium</i> CRL183 e <i>L. helveticus ssp jugurti</i> 416 associados	25

Verifica-se no teste de competição à adesão ao epitélio intestinal (tabela 7) que no momento em que a célula Caco-2 foi primeiramente colonizada pela associação de *E. faecium* CRL183 e *L. helveticus* ssp *jugurti* 416, a adesão da *E. coli*.0157:H7 foi reduzida, mas quando a célula em estudo já está colonizada pela *E. coli*.0157:H7 e são acrescentados cultivos de *E. faecium* CRL183 e *L. helveticus* ssp *jugurti* 416, esse patógeno se torna mais resistente. Tais resultados demonstram claramente a importância em se manter a microbiota colonizada por microrganismos benéficos, pois é muito mais eficaz impedir a adesão de patógenos do que excluí-los depois de aderidos.

A inibição da adesão da *E. coli* O157:H7 ao epitélio intestinal por cepas de *Lactobacillus helveticus* pode ser também verificada em muitos estudos, como o de Sherman et al, (2005) e o de Johnson-Henry et al, (2006). Nesses trabalhos foram demonstrados que a cepa de *Lactobacillus helveticus* R0052 impediu a adesão da *E. coli* O157:H7 no epitélio intestinal. Segundo Servin et al, (2003), os *Lactobacillus* de origem intestinal possuem propriedades adesivas que os permitem inibir e/ou prevenir a colonização por microrganismos patógenos.

A inibição da adesão de cepas *E. coli* por *E. faecium* também é relatada na literatura científica. Jin et al, (2000), verificaram que a cepa de *E. faecium* 18C23 na concentração 10^9 UFC/ml, foi capaz de inibir cerca de 90% da adesão das cepas de *E. coli* K88 e *E. coli* K88MB. Esses autores concluíram que esta cepa, além de inibir a adesão desses patógenos, pode também prevenir e/ou diminuir a intensidade da diarreia provocada pela K88. Através desses resultados e dos

obtidos em nosso estudo, fica evidente que *E. faecium* tem a capacidade de diminuir a adesão da *E. coli*.

Na figura 14 podem ser verificadas as capacidades de competição e adesão ao epitélio intestinal dos microrganismos em estudo.

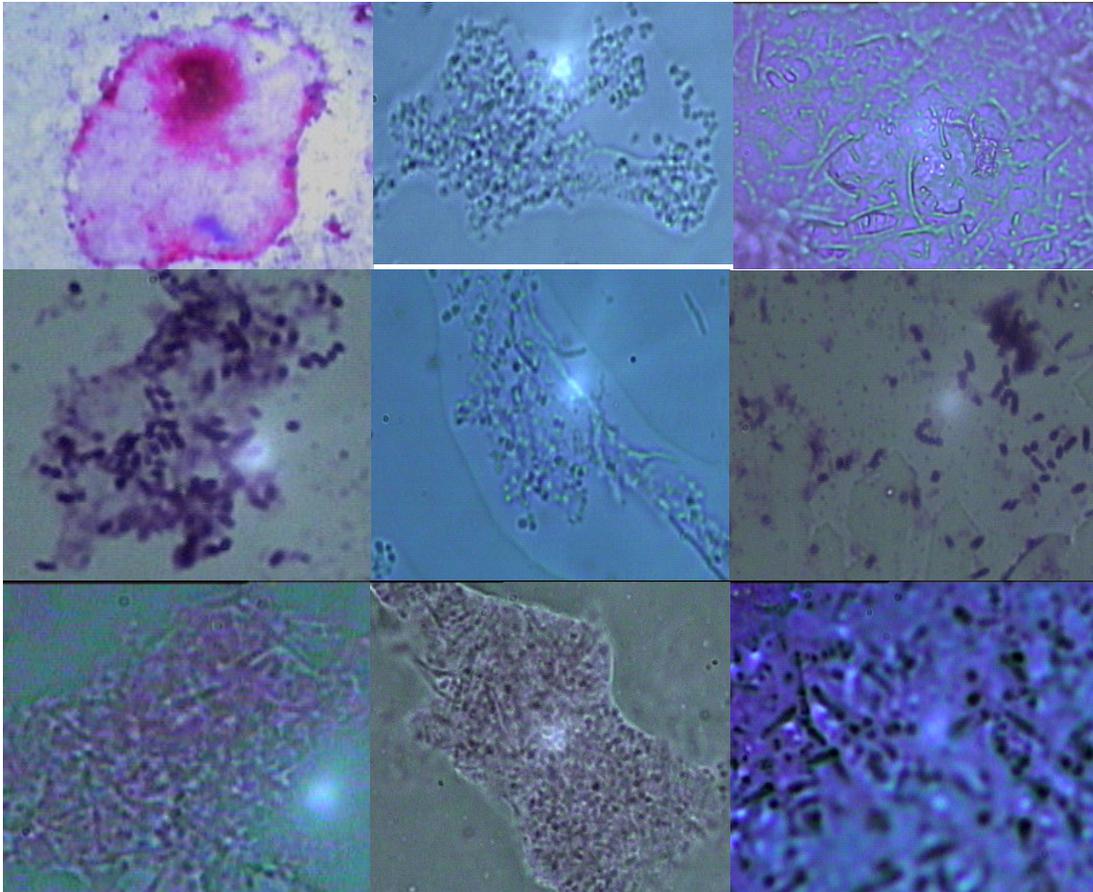


Figura 14. Imagens da competição e da adesão ao epitélio intestinal (aumento de 1000X)

a- Somente a célula Caco-2

b- Célula Caco+ *E. faecium* CRL 183

c- Célula Caco+ *L. helveticus* ssp *jugurti* 416

d- Célula Caco+ *E. coli* 0157:H7

e- Célula Caco+ *E. faecium* CRL 183 e *L. helveticus* ssp *jugurti* 416

f- Célula Caco+ *E. faecium* CRL 183 e *E. coli* 0157:H7

g- Célula Caco+ *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 e *E. coli* 0157:H7

h- Célula Caco primeiramente colonizada pelo *E. faecium* CRL 183 e *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 e posteriormente adicionada pela *E. coli* 0157:H7

i- Célula Caco primeiramente colonizada pela *E. coli* 0157:H7 e posteriormente adicionadas pelas cepas de *E. faecium* CRL 183 e *L. helveticus* ssp *jugurti* 416

Na figura 14 é demonstrada a capacidade de adesão da célula Caco-2 (b,c e d) e a competição pela adesão entre o *E. faecium* CRL183 e o *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 com a *E. coli* 0157:H7 (e, f, g, h e i). Verifica-se que o *E. faecium* CRL183 e o *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 reduziram a adesão da *E. coli* 0157:H7. Esses resultados sugerem que o *E. faecium* CRL183 e o *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 podem exercer um efeito protetor ao epitélio.

Vale ressaltar que os testes de competição a adesão ao epitélio intestinal foram realizados em pH de aproximadamente 6,0. Nesse sentido, se fez necessário estudar a influência do pH sobre a adesão, principalmente naqueles valores próximos do pH intestinal.

De acordo com a tabela 8, a variação do pH não impediu a adesão de nenhuma das cepas estudadas, porém na medida em que se tornava alcalino, provocou uma diminuição da adesão, tanto do *L. helveticus* ssp *jugurti* 416, quanto do *E. faecium* CRL183.

Tabela 8. Influencia do pH na adesão dos microrganismos.

Microrganismos	pH						
	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0
<i>E. faecium</i> CRL183	(+++)	(+++)	(+++)	(++)	(++)	(++)	(++)
<i>L. helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)

Pelos resultados obtidos pode-se afirmar que a capacidade de adesão dos microrganismos em estudo torna-se diminuída no meio intestinal a medida que o pH se alcaliniza, o que confirma de certa maneira que a ingestão de probióticos deve ser preferencialmente de 10⁹ UFC/dia (Charteris et al,1998)

5.8 Produção de substâncias antagônicas

Na tabela 9 são apresentados os resultados observados no teste de produção de substâncias antibacterianas, nas quais estão incluídas as bacteriocinas, pelos cultivos de *E. faecium* CRL 183 e *L. helveticus* ssp *jugurti* 416. Pode-se verificar que nenhum dos microrganismos mostrou-se produtor dessas substâncias, uma vez que não foram capazes de inibir o crescimento dos cultivos utilizados como indicadores.

Tabela 9. Produção de substâncias antagônicas pelos cultivos de *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416.

Cepas produtoras Cepas indicadoras	<i>E. faecium</i> CRL 183	<i>L. helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416
	<i>E. coli</i> 0157: H7	(-)
<i>L. monocytogenes</i> V2	(-)	(-)
<i>S. Enteritidis</i>	(-)	(-)

(-) teste negativo

A figura 15 ilustra os resultados observados no teste em questão

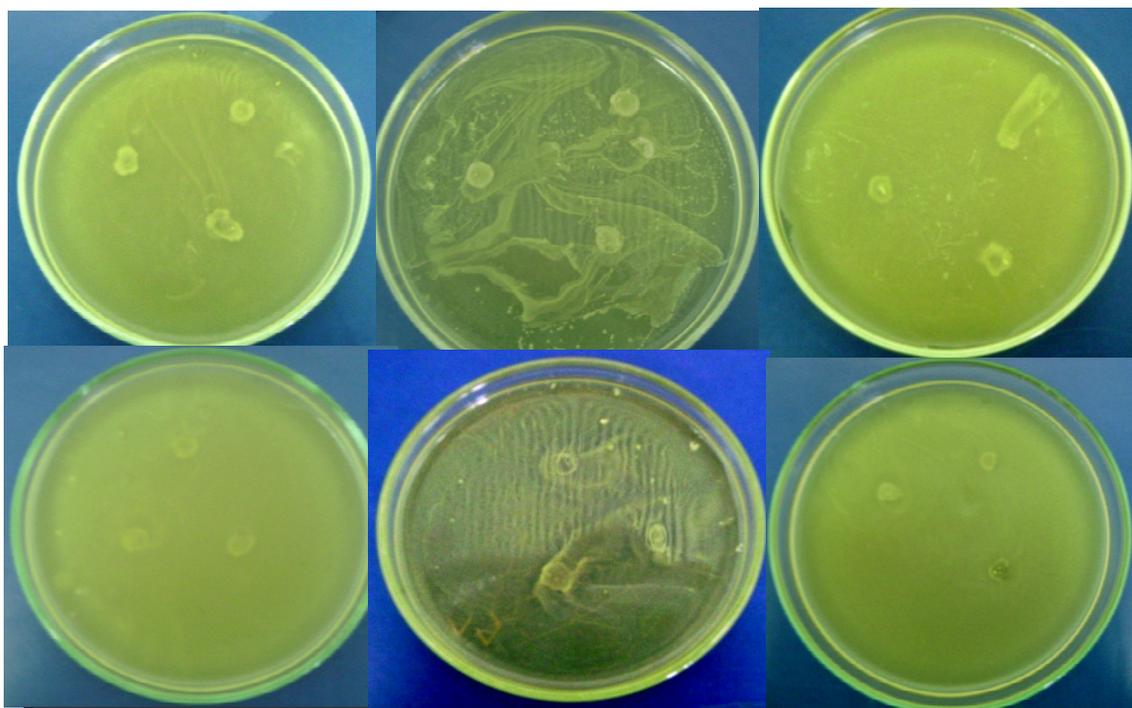


Figura 15. Teste de produção de substâncias antagônicas

- a- placa contendo pontos de *E. faecium* CRL 183 frente a *E. coli* 0157:H7
- b- placa contendo pontos de *E. faecium* CRL 183 frente a *L. monocytogenes* V2
- c- placa contendo pontos de *E. faecium* CRL 183 frente a *Salmonella enteritidis*
- d placa contendo pontos de *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 frente a *E. coli* 0157:H7
- e- placa contendo pontos de *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 183 frente a *L. monocytogenes* V2
- f- placa contendo pontos de *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 frente a *Salmonella Enteritidis*

Considerando que o *E. faecium* CRL 183 e o *L. helveticus* ssp *jugurti* 416 são microrganismos com características probióticas, esperava-se que fossem, também, capazes de produzir substâncias antimicrobianas: condição importante na manutenção de uma microbiota intestinal saudável. Entretanto, cabe ressaltar que os testes foram realizados apenas frente a três bactérias patogênicas, para as quais não se observou nenhuma ação inibitória. Faz-se necessário, portanto, em estudos posteriores, avaliar tal capacidade frente aos principais gêneros de bactérias que normalmente colonizam o intestino humano e que, em concentrações elevadas, podem acarretar sérios prejuízos à saúde do hospedeiro.

6.0 Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- O *Enterococcus faecium* CRL 183 e o *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 são resistentes às condições ácidas do suco gástrico;
- os microrganismos estudados demonstraram ser tolerantes ao meio estomacal e intestinal;
- essas duas bactérias foram capazes de se desenvolver na presença de sais biliares até a concentração máxima de 0,5% de Ovgall;
- o *Enterococcus faecium* CRL 183 foi capaz de hidrolisar os dois sais biliares estudados, enquanto que o *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 hidrolisou apenas o TDCA e se mostrou sensível ao GDCA;
- tanto o *Enterococcus faecium* CRL 183, quanto o *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 apresentaram um percentual de auto-agregação de aproximadamente 80%;
- esses microrganismos atingiram um percentual de coagregação de 25,4% ao final de 5 horas de ensaio;

- as cepas de *Enterococcus faecium* CRL 183 e o *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 não produziram substâncias antagônicas capazes de inibir o crescimento da *E. coli* 0157:H7, da *L. monocytogenes* V2 e da *Salmonella Enteritidis*;
- o *Enterococcus faecium* CRL 183 e o *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 foram capazes de aderir ao epitélio intestinal e de impedir em cerca de 60% a adesão da *E. coli* 0157:H7;
- o pH intestinal diminuiu a adesão do *Enterococcus faecium* CRL 183 e o *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 .

Diante das conclusões apresentadas, pode-se afirmar que os dois microrganismos apesar de não terem produzido substâncias antimicrobianas nas condições de estudo, exibem características de grande importância para que possam ser definitivamente considerados como probióticos, porém, o *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 por não ter sido capaz de hidrolisar o ácido glicodeoxicolico, pode ser considerado como um microrganismo com menor potencial hipocolesterolêmico.

Referências Bibliográficas

ALEXON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology, In : SALMINEN, S. VON WRIGHT, A (Ed.) **Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects**, 2nd ed, New York: Marcel Dekker, 1998, p. 1-72.

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

BATTA, A. K.; G. SALEN, R.; ARORA, S.; SHEFER, M.; BATTA; A. Perseon. Side chain conjugation prevents bacterial 7-dehydroxylation of bile acids. **J. Biol. Chem.** V.265, p.10925–10928, 1990.

BELKUM, M.J.; HAYEMA, B.J., GEIS, A.; KOK, J; VENEMA, G. Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. **Appl Environ Microbiol.** May. v.55,p.1187–11, 1989.

BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C. G. M. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 3, p. 1729–1738, 2006.

BEDANI, R.; ROSSI, E. A.; LEPERA, J. S. ; Wang, C.; VALDEZ, G. F . Effect of a novel soy fermented product enriched with isoflavones and calcium on bone tissue of rats. **Arch. Latinoam. Nutri.**, v. 56, p. 146-152, 2006.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J.P.; GUEGUEN, M. Probiotic properties of two *Lactobacillus* strains in vitro. **Milchwissenschaft**, v. 56, n. 12, p. 663-667, 2001.

BOOTH, I.R. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. **Microbiol. Rev.** v. 49, pp 359–378, 1985.

BORIS, S.; SUA´REZ, J.E; BARBE´S, C. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. **J. Appl. Microbiol.** , v.83,p. 413–420, 1997.

BROTZ, H.; BIERBAUM, G.; MARKUS, A.; MOLITOR, E.; SAHL Y H. G. Mode of action of the lantibiotic mersacidin-inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism. **Antimicrobiol. Agents Chem.** V.39p.714-719, 1995.

CARMINATI, D.; GIRAFFA, G.; BOSSI, M. G. Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, Ames, v. 52, n. 9, p. 614-617, 1989.

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

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, K. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial population. Int. **J. Food Microbiol.**, v.35,p.1-27, 1997.

CHENG, G.; FENG, A.N.; MEI-JUAN, Z.; XIU-HUA HAO, S, J.; YUN-XIA, H.E. Time- and pH-dependent colon-specific drug delivery for orally administered diclofenac sodium and 5-aminosalicylic acid. **World. J Gastroenterol.** v.. 10, n.12, p.1769-1774, 2004.

CILANO, L.; ROSSO, D.; BOSSO, M. G. Azione di sostanze inibitrici prodotte da batteri lattici verso microrganismi patogeni. **L'Ind.Latte**, Lodi, v. 27, n. 3-4, p. 3-20, 1991.

CONDONY, R.; MARINÉ, A.; RAFECAS, M. **Yogurt**: elaboración y valor nutritivo. Madrid: Fundación española de la nutrición, 1998.

CONWAY, P.L.; KJELLBERG, S. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus fermentum* strain 737 to mouse stomach squamous epithelium. **J. Gen. Microbiol.**, v. 135, p.1175–1186, 1989.

CORPO HUMANO. www.corpohumano.hpg.ig.com.br. Acceso 15/01/2006

CORZO, G.; GILLILAND, S. E.. Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*. **J. Dairy Sci.** v.82, p. 472–480, 1999.

DASHKEVICZ, M. P.; FEIGHNER, S. D.. Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active *Lactobacillus* spp. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.55, p.11–16, 1989.

DE MAN ,J.C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M.T. A medium for the cultivation of lactobacilli. **J. Appl. Bacteriol.** v. 23, p.130–5, 1960.

DEL RE, B.; Busetto, A.; VIGNOLA, G.; SGORBATI, B.; PALENZONA, D. Autoaggregation and adhesion ability in a *Bifidobacterium suis* strain. **Lett.. Appl. Microbiol.**, v. 27, p.307-310, 1998.

DEL RE, B.; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M.; PALENZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 31, p.438–442, 2000.

DE ROISSART, H.; LUQUET, F. M. Bacteries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques. France (Lorica): 1994, v. 2.

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

DUNNE , C.; O'MAHONY, L.; MURPHY, L.; THORNTON, G.; MORRISSEY, D.; O'HALLORAN, S.; O'SULLIVAN, G. C.; SHANAHAN, F.; COLLINS, K. *In-vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with in vivo findings. **Am. J.Clin. Nutri.**, v.73, p.386-392, 2001. Suplemento 2.

DUPRE` , S. ZANETTI, A. M.; SCHITO, G.; FADDA ,L. A. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *Journal of Medical Microbiol.* v.52, p.491–498, 2003.

ECOLOGY HEALTH CENTER. Disponível em <http://www.crohns.net/page/c/prod/prod/nhr1500>. Acesso em 19 ago. 2005.

EDWARDS, C.A.; PARRET, A.M. Intestinal flora during the first months of life: new perspectives. **Br. J. Nutr**;v.88, p.S11-S18, 2002. Suplemento 1.

FERREIRA, A.J.P.; FERREIRA, C.A.; PETRELLA NETO, N.; OLIVEIRA, D.R.; NUREMBERGER JÚNIOR, R.; LOPES, V.C.B.A. Probiotics: benefits and efficiency in poultry production. **Arq. Instituto Biológico**, v.65, p.139-149, 1998.

FISIOQUANTIC. Disponível em <http://fisioquantic.com.br/site/>. Acesso em: 19 ago. 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION /WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Ontario,

CANADA, 2002. Disponível em http://www.fao.org/es/esn/food/foodandfood_probio_en.stm . Acesso em: 22 jan. 2005.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.66, n.5, p.365-378, 1989.

FULLER, R. ed. History and development of probiotics. **Probiotics: The scientific basis**. London: Chapman & Hall, p. 1-8, 1992,.

GAO, F. H.; ABEE, T.; RONINGS, W. N. Mechanism of action of the peptide antibiotic nisin in liposomes and cytochrome c-oxidase containing proteoliposomes. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 57, n. 8, p. 2164-2170, 1991

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

GILLILAND, S.E.; NELSEN, C.R.; MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.49 n. 277-81, p.2077-2080, 1984.

GILLILAND, S.E.; NELSON, C.R.; MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 49, p. 377-381, 1985.

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

GOPAL, P.K.; PRASAD, J.; SMART, J.; GILL, H.S. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and

their antagonistic activity against enterotoxigenic *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 67, p. 207-216, 2001.

GROSS, E.; MORELL, J.L. The structure of nisin. **J. Am. Chem. Soc.** v.93, p.4634-4635, 1971.

GUDER, A., WIEDEMANN, I.; SAHL, H.-G. Post-translationally modified bacteriocins the lantibiotics. *Biopolymers*, v. 55, p. 62-73,2000.

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

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v.361, p.512-9, 2003.

HANDLEY, P.S; HARTY, D.W.S.; WYATT, J.E.; BROWN, C.R.; DORAN, J.P.; GIBBS, A.C.C. A comparison of the adhesion, coaggregation and cell-surface hydrophobicity properties of fibrillar and imbricate strains of *Streptococcus salivarius*. **J. Gen. Microbiol.**,v. 133, p. 3207–3217, 1987.

HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, M. J.H. Probiotics: a general view. In: WOOD, B.J.B. **Lactic acid bacteria in health and disease 1**. Amsterdam : Elsevier Applied Science, 1992. p.151- 170.

HILL MJ, DRASER BS. Degradation of bile salts by human intestinal bacteria. **Gut**,v.9, p.22–7, 1968.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJORKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms

in food and nutrition. **Am. J. Clin. Nutri.**, Bethesda, v. 73, n. 2. p. 365S-373S, 2001.

HURST, A. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. In: BRANEN, A.L. DAVIDSON, P.M. (Ed). **Antimicrobial in Foods**. New York :Marcel Deckker, p. 327-351, 1983.

HYLEMON, P. B., AND T. L. GLASS.. Biotransformation of bile acids and cholesterol by the intestinal microflora, In D. J. Hentges (ed.), Human intestinal microflora in health and disease. Academic Press, New York., p. 189-213,1983.

ISOULARI, E.; SALMINEM, S.; OUWEHAND, A.C. Probiotics. **Best Practice & Res.** v.18, p.299-313, 2004.

JIN, L.Z.; HO, Y.W.; ABDULLAH, N.; ALI, M.A.; JALALUDIN, S. Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. **Letters in Applied Microbiology**. v.23, p. 67-71, 1996.

JIN, L. Z., R. R. MARQUARDT, AND X. ZHAO. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. **Appl. Environ. Microbiol.**v. 66, p.4200–4204, 2000.

JOHNSON-HENRY, K. C.; HAGEN, K. E.; , GORDONPOUR, M.; TOMPKINS, T. A.; PHILIP M. ShermanSurface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cell. Microbiol*, v. 22,2006.

KALANTZOPOULOS, G. Fermented products with probiotic qualities. **Anaerobe**. v.3, p.15-190, 1997.

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

KLAENHAMMER, T. R.; Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochemie** v.70, p.337-349, 1988.

KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.12, p.39-86, 1993.

KLAENHAMMER, T.R.; KULLEN, M.J. Selection and design of probiotics. **Int.J.Food Microbiol.**, v.50, p.45-57, 1999.

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

KINOUCI, F.L. “Iogurte” de soja como coadjuvante no tratamento de câncer de mama. 2006. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 85f.

KOS, J.; ŠUŠKOVIC´, S.; VUKOVIC´, M.; ŠIMPRAGA, S.; FRECE, J.; MATOŠIĆ, S.. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **J. Appl. Microbiol.**, v. 94, p.981–987,2003.

KUNTZ, T.B.; KUNTZ, S.T.; Enterohemorrhagic *E. coli* Infection. **Fourth Prize Paper.** v.6, p. 192-196.

LEBLANC, J.G.; MATAR, C.; VALDEZ, J.C.; LEBLANC, J.; PERDIGÓN, G. Immunomodulatory effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. **J Dairy Sci.**, v.85, p.2733-2742, 2002.

LEWUS, C.B.; KAISER, A.; MONTVILLE, T.J. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.** v.57, p.1683– 1688, 1991.

LILLY, D.; STILLWELL, R.H. Probiotics growth - promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.147, p.747-748, 1965.

LIN, H.C.; SU, B.H.; CHEN, A.C.; LIN, T.W.; TSAI, C.H.; YEH, T.F. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth infants. **Pediatrics**, v. 115, p.1-4, 2005.

LUND, B., EDLUND, C. Probiotic *Enterococcus faecium* strain is a possible recipient of the vanA gene cluster. **Clin. Infect. Dis.** v.32, p. 1384– 1385. 2001.

LUND, B.; ADAMSSON, I.; EDLUND, C. Gastrointestinal transit survival of an *Enterococcus faecium* probiotic strain administered with or without vancomycin. **Int. J. Food Microbiol.**, v.77, p.109– 115. 2002.

MARCIŇÁKOVÁ, M.; SIMONOVÁ, M.; LAUKOVÁ, A. Probiotic properties of *Enterococcus faecium* EF9296 strain isolated from silage. **Acta Vet.** v. 73, p. 513-519, 2004.

MARTEAU, P.; POCHART, P.; BOUHNİK, Y.; RAMBAUD, J.C. The fate and effects of transiting, nonpathogenic micro-organisms in the human intestine. In: SIMOPOULOS, A.P.; CORRING, T.; RÉRAT, A, (Ed). Intestinal flora, immunity, nutrition and health. **World Rev. Nutr. Diet**, v.74, p.1–21, 1993.

MATAR, C.; AMIOT, J.; SAVOIE, L.; GOULET, J. The effect of milk fermentation by *Lactobacillus helveticus* on the release of peptides during in vitro digestion. **J Dairy Sci.**, v.79, p.971-979, 1996.

MATAR C, LEBLANC JG, MARTIN L, PERDIGÓN G. Biologically active peptides released from fermented milk: role and functions. In: Farnworth, T. (Ed) *Handbook of fermented functional foods* . Boca Raton: CRC Press: 2003, p.177-200.

MATAR, C.; NADATHUR, S.S.; BAKALINSKY, A.T.; GOULET J. Antimutagenic effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant. **J Dairy Sci.**, v. 80, p.1965-1970, 1997.

MATAR, C.; VALDEZ, J.C.; MEDINA, M.; RACHID, M.; PERDIGÓN,G. Immunomodulating effects of milks fermented by *Lactobacillus helveticus* and its non-proteolytic variant. **J. Dairy Res.**, v.68, p. 601-609, 2001.

MATSUMOTO, M.; OHISHI, H.; BENNO, Y. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. Int. **J. Food Microbiol.** v.93, p.109–113, 2004.

MAYRA-MAKINEN, A.; MANNINEN, M.; GYLLENBERG, H. The adherence of lactic acid bacteria to the columnar epithelial cells of pigs and calves. **J. Appl. Microbiol.**, v. 55, p.241–245, 1983.

MC AULIFFE, O.; CANO; R. J.; KLAENHAMMER, T. R. Genetic analysis of two bile salt hydrolase activities in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Appl. Environ. Microbiol.**,v. 71, p.4925–4929, 2005.

MC FARLAND, L.V. Beneficial microbes. Health or hazard? **Eur Gastroenterol. Hepatol.**, v.12, n.10, p.1069-71, 2000.

METCHNIKOFF, E. The prolongation of life. London: William Heinemann, 1907.

MINELLI, E.B.; BENINI, A.; MARZOTTO, M.; SBARBATI, A.;RUZZENENTE, O.; COLS, E. Assessment of nivel probiótic *lactobacillus casei* strains for the production of functional dairy foods. **Int. Dairy j.**, v.14 p.723-736, 2004.

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

MOMBELLI, B.; GISMONDO, M.R. The use of probiotics in medical practice. **Int. Antimicrobiol. Ag.**, v.16, n.4, p.531-6, 2000.

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

MORANDI, S.; BRASCA, M.; ALFIERI, P.; LODI,R., TAMBURINI. A. Influence of pH and temperature on the growth of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **Lait** © INRA, EDP Sciences, p. 181–192, 2005.

MOSER, S. A.; SAVAGE, D. C. Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in *lactobacilli*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.67, p.3476–3480, 2001.

MOTA-MEIRA, M.; LAPOINTE, G. ; LACROIX, C,; LAVOIE, M. C. MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. **Antimicrob. Agents Chemother.** v,44, p.24-29,2000.

MUKAI, T.; ARIHARA, K. Presence of intestinal lectin-binding glycoproteins on the cell surface of *Lactobacillus acidophilus*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v.58, p.1851–1854, 1994.

MURIANA, P.M. & T.R. KLAENHAMER,. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.57, p. 114-121, 1991.

NALLAPAREDDY, S.R., QIN, X., WEINSTOCK, G.M., HO"O"K, M., MURRAY, B.E. *Enterococcus faecium* adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. **Infect. Immun.**v. 68,p. 5218– 5224, 2000.

NURMI, E. V.; RANTALA, M. New aspects of Salmonella infection in broiler production. **Nature**, p. 210, 1973.

NUTRIÇÃO em pauta. Disponível em [http//nutricao em pautaosited.profissionalde.nutricao.htm](http://nutricao.em.pautaosited.profissionalde.nutricao.htm). Acesso em: 5 jul. 2005.

PARENTE, E.; RICCIARD, A.; ADDARIO, G. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140NWC during batch fermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, Washington, v. 41, n. 4, p. 388-394, 1994.

PARDIO, V.T.; KRZYSATOF, N.; WALISZEWSKI, K.N.; ROBLEDO, G. Los probióticos y su futuro. **Arch. Latinoam. Nutr**, v. 4681, p.6-10, 1994.

PARK, S.C.; HWANG, M.H. ; KIM2, Y.H.; KIM, J.C.; SONG, J.C.; LEE, K.W.; JEONG, K.S.; RHEE, M.H.; KIM, K.S.; KIM, T.W. Comparison of pH and bile resistance of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from rat, pig, chicken, and human sources. **World J.I of Microbiol. Biotechnol.**, v. 22, p. 35–37, 2006

PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story. **Animal Nutri. Health**, n.29, p.4-8, 1974.

PENNA, F.J. Diarrea y probióticos. Simpósio sobre utilidad de los probióticos en el manejo de las diarreas. **Rev Enfer Infect.**, v.6, p.182, 1998.

PÉREZ, P.F.; MINNAARD, Y.; DISALVO, E.A.; DE ANTONI, G.L. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. **Appl. Environ.Microbiol.**, v. 64, p.21–26, 1998.

PIARD, J.C.; DESMAZEUD, M. Inibiting factors producet by lact acid bacteria 2. Bacterioces and other antibacterial substances. **Lait.**, v.72, p.113-142, 1992.

POLLMAN, M.; NORDHOFF, M.; POSPISCHIL, A.; TEDIN, K.; WIELER, V.H. Effects of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on the rate of natural chlamydia infection in swine. **Infec. Immun.**, v.73, n.7, p.4346-4353, 2005.

PORTA,G. Transporte dos Ácidos Biliares. **Gaz. Méd.**,;v.76, p.S13-S15, 2006. Suplemento 1

REID, G.; MCGROARTY, J.A.; ANGOTTI, R.; COOK, R.L. Lactobacillus inhibitor production against Escherichia coli and coaggregation ability with uropathogens. Canadian, **J. Microbiol.**, v.34,p. 344–351, 1988.

RIUS, N.; SOLE, M.; FRANCIS, A.; LOREN, J.G. Buffering capacity and membrane H⁺ conductance of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 120, p. 291-296, 1994

ROOS K, GRAHN E, HOLM S E, JOHANSSON H, LIND L. Interfering alphastreptococci as a protection against recurrent streptococcal tonsillitis in children. **Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.** v.25, p.141-48, 1993.

ROSS, R.P.; GALVIN, M.; MCAULIFFE, O.; MORGAN, S.M.; RYAN, M.P.; TWOMEY, D.P.; MEANEY, W.J. ;HILL C. Developing applications for lactococcal bacteriocins. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.76,p. 337–346, 1999.

ROSSI, E.A.; GIORI, G.S.; HOLGADO, A.P.R.; VALDEZ, G.F. *In vitro* effect of *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus* on cholesterol. **Microbiol. Alim. Nutr.**, v. 12, p. 267-270, 1994.

ROSSI, E. A. ; CARLOS, I.Z. ; VENDRAMINI, A.P. ; VENDRAMINI, R.C. ; DÂMASO, A. R. . Influência de nutrientes no sistema imune: papel das citocinas, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico.. In:Ferreira, C. L.L.F. (Org.). **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. 19 ed. Viçosa-MG: 2003, v. 1, p. 135-154

ROSSI, E. A.; VENDRAMINI, R. C.; CARLOS, I Z.; PEI, Y. C; VALDEZ, G. F. Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 209, p.305–307, 1999.

ROSSI, E. A. ; CARLOS, I. Z. ; VENDRAMINI, R.C. ; MACHADO, C. O. ; CYRILLO, R. N. S. ; PERAZZO, F. F. ; VALDEZ, G. F. . Avaliação do potencial alergênico de um novo produto fermentado de soja. **RBCF. Ver. Brás. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 103-113, 2000.

ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.C.; CARLOS, I.Z.; UEIJI, I.S.; SQUINZARI, M.M.; SILVA JUNIOR S.I.; VALDEZ, G.F. Effects of a novel soy product on the serum lipids of hypercholesterolemic rabbits. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 74, p. 213-216, 2000.

ROSTAGNO, H.S.; ALBINO, L.F.T.; FERES, F.A.; TOLEDO, R.S. Utilização de probióticos e prebióticos em aves. Em FERREIRA, C.L.F, **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**, Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, p. 181-202, 2003.

SAHL, H.G & BIERBAUM, G. Lantibiotics biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. **Annu Rev Microbiol**,v. 52, p.41-79,1998.

SAIJONMAA-KOULUMIES, L., LLOYD, D. Colonization of the canine skin with bacteria. **Vet. Dermatol.**, v. 7, p. 153-162,1996.

SAITO, Y.; SAKAMOTO, M.; TAKIZAWA, S.; BENNO, Y. Monitoring the cell number and viability of *Lactobacillus helveticus* GCL1001 in human feces by PCR methods. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.231, n.126 , p.125-130,2004.

SAITO, Y.; HAMANAKA, Y.; SAITO, K.; TAKIZAWA, S.; BENNO, Y. Stability of species composition of fecal bifidobacteria in human subjects during fermented milk administration. **Curr. Microbiol.**, v. 44, p.368-373, 2002.

SCHILLINGER, U.; LUCKE, Y F-K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.** v.55,p.1901-1906, 1989.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition. **Am. J. Clin. Nutri.**, Bethesda, v.73, n.2, p.361S-364S, 2001.

SCHLEIFER, K. H.; AMANN,L.R.; HARTEL,C.; EHRMANN, M.; KOHLER, W.; KAUSE, A. Phylogenetic relationships of acid lactic bacteria and their identification with nucleic acid probes, In: **Lactic Acid Bacteria**. Research and industrial applications in the agro-food industries,1991. p. 23-32

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

SCHULLER, F.; BENZ, R. ; SAHL, H. G. The peptide antibiotic subtilin acts by formation of voltage-dependent multi-state pores in bacterial and artificial membranes. **Eur. J. Biochem.** v.182,p.181-186, 1989.

SERVIN, A.L.; COCONIER, M. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. **Best Practice & Research.** v.17, p.741-754, 2003.

SHERMAN, P.M., JOHNSON-HENRY, K.C., YEUNG, H.P., NGO, P.S.C., GOULET, J., AND TOMPKINS, T.A. Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157H7: H7-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. **Infect Immun** .v.73, p. 5183–5188, 2005.

SHIGUEMOTO,G.E.; ROSSI,E.A. et al. Isoflavone-supplemented soy yoghurt associated with resistive physical exercise increase bone mineral density of ovariectomized rats. **Maturitas**, 2007 (*in press*).

SHINODA, D.; KUSUDA, Y.; ISHIDA, N.; IKEDA, K.; KANEKO, O.; MASUDA, E.; YAMAMOTO, N. Survival of *Lactobacillus helveticus* strain CP53 in the human gastrointestinal tract **Lett. Appl. Microbiol.**,v.32, p.108-113, 2001.

SIMPSON, W. J.;TAGUCHI, H. The genus *Pediococcus* with notes on the genera *Tetragenococcus* and *Aerococcus*.. In: WOOD, B.J.B.; HOLZAPFEL, W.H. (Ed.) **The genera of Lactic Acid Bacteria**. London :Chapman and Hall, 1995. p. 125-172.

SIVIERI, K.; CANO, V. P.S.; VALENTINI, S. R. ROSSI, E.A.. Demonstration of the cellular viability and safety of *Enterococcus faecium* CRL 183 in long-term experiments. **Lait**, v.87. p.59-69, 2007.

SMULDERS, F. J. M.; BARENDSEN, P.; VAN LOGTESTIJN, J. G.; MOSSEL, D. A. A.; VAN DER MAREL, G. M. Review: Lactic Acid: Considerations in Favour of its Acceptance as a Meat Decontaminant. **Journal of Food Technology**, v. 21, p. 419-436, 1986.

S`US`KOVIC`, J.; BRKIC`, B.; MATOS`IC`, S.; MARIC`, V. Lactobacillus acidophilus M92 as potential probiotic strain. **Milchwissenschaft.**, v. 52,p. 430–435, 1997.

TAKIGUCHI, R.; SUZUKI, Y. Survival of lactic acid bacteria in simulated digestive juice. **J. Intest. Microbiol**, v.14, p. 11–18, 2000.

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

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

TANNOCK, G.W., Normal Microflora. London: Chapman & Hall, 1995.

TANNOCK GW. The normal microflora: an introduction. In: TANNOCK, G.W (Ed.) **Medical importance of normal microflora**. Netherlands: 1999. p.1-23

TANNOCK, G.W. Identification of lactobacilli and bidobacteria. In: TANNOCK, G.W (Ed.) **Probiotics, a Critical Review** . Wymondham : Horizon Scientific, 1999. p. 45-56.

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

TSENG, C.H.; MONTVILLE, T. J. Metabolic regulation and distribution in *Lactobacillus*. Causes and consequences. **Biotechnol.**, v. 9, p.113-121, 1993.

TODOROV, B. ONNO, O. SOROKIN, J.M. CHOBERT, I. Ivanova and X. Dousset, Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST31 isolated from sourdough. **International Journal of Food Microbiology**, v. 48 pp. 167–177, 1999.

Todorov S.D.; Dicks, L.M.T. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. **Enzyme Microb. Technol.**, v.36, p. 318-326.2005.

TORO, C.R. Uso de bactérias lácticas probióticas na alimentação de camarões *litopenaeus vannamei* como inibidoras de microrganismos patogênicos e estimulantes do sistema imune. 2005 Tese (doutorado em processos biotecnológicos)-Universidade do Paraná, Curitiba.

VALDEZ , G.F.; MARTOS, G.; TARANTO, M.P.; LORCA, GL.; OLIVER, G.; RUIZ HOLGADO, A. P. Influence of bile on β -galactosidase activity and viability of *Lactobacillus reuteri* when subjected to freeze-drying. **J.Dairy Sci.**, v. 80, p.1955-1958, 1996.

VAHJEN, W.; MANNER, K.; POLLMAN M.; NORDHOFF, M.; POSPISCHIL, A.; TEDIN, K.; WIELER, V.H. Effects of a probiotic strain of *Enterococcus faecium* on

the rate of natural chlamydia infection in swine. **Infec. Immun.** v.73, n.7, p.4346-4353, 2005.

VANBELLE, M.; TELLER, E.; FOCANT, M. **Probiotcs in animal nutrition: A** review. Arch. Animal Nutri., Louvaini, 1990, v. 46, n. 7, p. 543-567.

VENEMA, K.; ABEE, T.; HAANDRIKMAN, A.J., LEENHOUTS, J.K.; KANINGS, W.N.; VENEMA, G. Mode of action of lactococcin B, a thiol-activated bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, n. 4, p. 1041-1048, 1993.

WADSTRO" M, T.; ANDERSSON, K.; SYDOW, M.; AXELSSON, L.; LINDGREN, S.; GULLMAR, B. Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 62, p. 513–520, 1987.

WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W.H. The genera of lactic acid bacteria. (Ed). Aspen Publishers Gaithersburg MD, vol.2, p.398 ,1995.