

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

PRISCILA FILGUEIRAS DUARTE

**Efeito de inibição de cepas de *Lactobacillus*, isolados de fezes humanas,
frente a diferentes patógenos**

Lorena – SP
2007

PRISCILA FILGUEIRAS DUARTE

**Efeito de inibição de cepas de *Lactobacillus*, isolados de fezes humanas,
frente a diferentes patógenos**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia
Industrial

Área de Concentração: Microbiologia Aplicada
Orientação: Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha

Lorena – SP
2007

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

Catálogo na Publicação
Biblioteca Universitária
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Duarte, Priscila Filgueiras

Efeito de inibição de cepas de *Lactobacillus*, isolados de fezes humanas, frente a diferentes patógenos / Priscila Filgueiras Duarte ; orientador Ismael Maciel de Mancilha. -- 2007

65 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2007

1. Microbiologia Aplicada 2. Lactobacillus 3. Probióticos 4. Inibição. I. Título.

579.6 - CDU

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Paulo Cesar e Rosa Maria, meus eternos heróis e que sempre estiveram presentes em todos os momentos, inclusive nas viagens à Lorena. Amo muito vocês!!!!

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre esteve comigo, e foi graças a Ele que tive força para alcançar esta conquista.

Ao professor Ismael Maciel de Mancilha, que sempre se mostrou disponível a me ajudar, pelos ensinamentos transmitidos e pela compreensão.

Ao Centro Universitário Geraldo Di Biase, por ter cedido o laboratório de Microbiologia para que esta pesquisa fosse desenvolvida.

À minha família, pai, mãe e Marcel, que sempre me deram muito amor, carinho e colo, além do grande apoio em todas as horas.

Serei eternamente grata, ao Adriano, meu namorado, que sempre me compreendeu e me auxiliou da melhor forma possível.

Ao grande amigo e eterno mestre, Carlos Alberto Sanches, pela confiança e ajuda que sempre me deu.

Aos amigos Ronie Cabral, Renato Teixeira, Mônica Côrrea, Cíntia Maciel e Renata, pelas horas divididas no laboratório.

À Taís Cúgola, que sempre esteve comigo durante o período do Mestrado e é uma ótima amiga.

À Capes pelo auxílio financeiro.

À todos os membros da banca que se dispuseram a participar e enobrecer o meu trabalho.

“A maravilhosa disposição e harmonia do universo só pode ter tido origem segundo o plano de um Ser que tudo sabe e tudo pode. Isto fica sendo a minha última e mais elevada descoberta.”

Isaac Newton

RESUMO

DUARTE, P. F. Efeito de inibição de cepas de *Lactobacillus*, isolados de fezes humanas, frente a diferentes patógenos. 2007. 65 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia Química de Lorena, Universidade de São Paulo, 2007.

A procura por suplementos alimentares cresce a cada ano, pois o seu uso contínuo promove a melhora e manutenção da qualidade de vida do hospedeiro. Sustentado neste princípio, a ingestão de produtos probióticos, principalmente leites fermentados, passa a ser uma alternativa neste segmento do mercado. Os probióticos são suplementos alimentares que contêm microrganismos vivos que trazem benefícios à saúde do consumidor pela manutenção e melhora do balanço microbiano do trato gastrointestinal. Existem vários gêneros de microrganismos que apresentam propriedades probióticas, destacando-se o gênero *Lactobacillus*; que exercem várias funções benéficas ao hospedeiro como a diminuição dos níveis de colesterol sanguíneo, efeito anticarcinogênico, adesão ao epitélio intestinal, melhora do sistema imune e a exclusão competitiva, conhecida também como efeito barreira. Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de inibição exercido por cinco cepas de *Lactobacillus* isoladas de fezes humanas: denominadas *L. plantrum* (Lac-01), *L. plantarum* (Lac-02), *L. fermentum* (Lac-03), *L. fermentum* (Lac-04) e *L. fermentum* (Lac-05) sobre o crescimento de *E. coli* O157:H7, *Listeria* spp., *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi* e *Shigella* spp, por meio da técnica de co-cultura. Os resultados revelaram que as cepas Lac-01, Lac-02 e Lac-03 foram capazes de inibir, em diferentes níveis, o crescimento das cepas patogênicas avaliadas, sendo este efeito mais acentuado para *S. typhi* e *Shigella* spp. Observou-se ainda que a cepa Lac-04 não apresentou efeito de inibição sobre *E. coli* O157:H7 e *P. aeruginosa*, ao passo que a cepa Lac-05 inibiu o crescimento de *P. aeruginosa*, *S. typhi* e *Shigella* spp., sendo incapaz de inibir *E. coli* O157:H7 e *Listeria* spp, nas condições estudadas. Posteriormente ao se verificar a produção de substâncias antimicrobianas por meio do método “spot-test”, observou-se o efeito positivo de inibição exercida pelas cepas de *Lactobacillus* sobre o crescimento dos respectivos patógenos. Verificou-se também, por meio de testes enzimáticos específicos, que as substâncias antimicrobianas produzidas pelas cepas de *Lactobacillus* não foram sensíveis às enzimas utilizadas, não podendo afirmar, desta forma, que estas substâncias são bacteriocinas. Os testes de co-agregação demonstraram que as cepas Lac-04 e Lac-05 exerceram melhor efeito sobre os patógenos, quando comparadas com as cepas Lac-01 e Lac-02. A cepa Lac-03 não exerceu efeito de coagregação com nenhum dos patógenos avaliados. Os testes de autoagregação revelaram que as cepas Lac-01, Lac-02, Lac-04 e Lac-05 exerceram efeito de autoagregação acentuado. Observou-se ainda que nenhum dos patógenos estudados foi capaz de autoagregar.

Palavras-chave: *Lactobacillus*; Probióticos; Inibição.

ABSTRACT

DUARTE, P. F. Inhibition effect of *Lactobacillus* strains, isolated from human faeces, front different pathogens. 2007. 65 f. Dissertation (Master of Science in Industrial Biotechnology) - Escola de Engenharia Química de Lorena, Universidade de São Paulo, 2007.

The probiotics are special food that contain live microorganisms that promote benefits to consumer health through maintenance and improvement of microbial balance of gut tract. There are many microorganisms species used in probiotics products, standing out *Lactobacillus* species that produce many benefits to consumer like decrease of blood cholesterol level, anti-carcinogenic effect, adherence to intestinal epithelium, immune system stimulation and the competitive exclusion, also known as barrier effect. In this regard, the present work aimed to evaluate the inhibition effect exerted by five *Lactobacillus* strains, isolated from human faeces: denominated, *L. plantarum* Lac-01, *L. plantarum* Lac-02, *L. fermentum* Lac-03, *L. fermentum* Lac-04 e *L. fermentum* Lac-05 on the growth of *E. coli* O157:H7, *Listeria* spp., *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi* and *Shigella* spp., by means of coculture technique. The results showed that the strains Lac-01, Lac-02 and Lac-03, were able to inhibit, at different levels, the growth of pathogenic strains, and this effect was more accentuated on *S. typhi* and *Shigella* spp. It was also observed that the strain Lac-04 did not present inhibition effect on *E. coli* O157:H7 and *P. aeruginosa* ATCC 27853, and the Lac-05 inhibited the growth of *P. aeruginosa*, *S. typhi* and *Shigella* spp., and showed no effect on *E. coli* O157:H7 and *Listeria* spp. Afterwards, the production of antimicrobial substance was verified by means of "spot-test" method, showing the positive inhibition effect exerted by all *Lactobacillus* strains on the growth of the respective pathogens. By means of specific enzymatic test, the antimicrobial substances produced by *Lactobacillus* strains were not sensible to the action of enzymes proteinase-K, papain and pepsin, but this is not enough to affirm that these substances are bacteriocins. The coaggregation test demonstrated that the strains Lac-04 and Lac-05 exerted better effect on the pathogens, when compared to strains Lac-01 and Lac-02. The strain Lac-03 did not coaggregate with any pathogenic strains. The autoaggregation test showed that the strain Lac-01, Lac-02, Lac-04 and Lac-05 exerted accentuated auto-aggregation effect. The studied pathogen was not able to autoaggregate.

Key-words: *Lactobacillus*; Probiotics; Inhibition.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Escala de classificação de autoagregação e coagregação.....	33
FIGURA 2 –Crescimento de Lac-01 na presença de patógenos	37
FIGURA 3 –Crescimento de Lac-02 na presença de patógenos	39
FIGURA 4 –Crescimento de Lac-03 na presença de patógenos	41
FIGURA 5 –Crescimento de Lac-04 na presença de patógenos	43
FIGURA 6 –Crescimento de Lac-05 na presença de patógenos	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Atividade antimicrobiana de substâncias produzidas pelas cepas de <i>Lactobacillus</i> contra patógenos (halos de inibição em milímetros)	47
TABELA 2 – Capacidade de coagregação de cepas de <i>Lactobacillus</i> frente as espécies patogênicas	52
TABELA 3 – Autoagregação de cepas de <i>Lactobacillus</i> e espécies patogênicas	53

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 PROBIÓTICO: DEFINIÇÃO, HISTÓRICO E MICROBIOTA INTESTINAL	14
2.2 PRINCIPAIS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS	17
2.3 MECANISMOS DE AÇÃO DOS PROBIÓTICOS	18
2.4 BACTÉRIAS PATOGÊNICAS	24
2.4.1 <i>Escherichia coli</i>	24
2.4.2 <i>Listeria</i> spp.	26
2.4.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
2.4.4 <i>Salmonella typhi</i>	28
2.4.5 <i>Shigella</i> spp.	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 MICRORGANISMOS	30
3.2 CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus</i> E DE PATÓGENOS QUANDO INCUBADOS SIMULTANEAMENTE	30
3.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUZIDAS POR <i>Lactobacillus</i> SOBRE ESPÉCIES PATOGÊNICAS	31
3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUZIDAS PELOS <i>Lactobacillus</i>	32
3.5 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DO MECANISMO DE COAGREGAÇÃO E AUTOAGREGAÇÃO	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 CRESCIMENTO DE <i>Lactobacillus</i> E DE PATÓGENOS	34
4.1.1 Crescimento de <i>L. plantarum</i> (Lac-01) com os diferentes patógenos	34
4.1.2 Crescimento de <i>L. plantarum</i> (Lac-02) com os diferentes patógenos	37
4.1.3 Crescimento de <i>L. fermentum</i> (Lac-03) com os diferentes patógenos	39
4.1.4 Crescimento de <i>L. fermentum</i> (Lac-04) com os diferentes patógenos	41
4.1.5 Crescimento de <i>L. fermentum</i> (Lac-05) com os diferentes patógenos	43
4.2 EFEITO DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUZIDAS POR <i>Lactobacillus</i> SOBRE ESPÉCIES PATOGÊNICAS	46

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUZIDAS PELAS CEPAS DE <i>Lactobacillus</i>	49
4.4 INDUÇÃO DE AUTOAGREGAÇÃO E COAGREGAÇÃO	51
5 CONCLUSÕES.....	55
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	56
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICES	65

1 INTRODUÇÃO

O avanço da tecnologia tem provocado grandes mudanças no estilo e na manutenção da vida humana. A fim de acompanhar este desenvolvimento o homem cria maneiras rápidas de manter sua mente e seu corpo em equilíbrio, na tentativa de melhorar a sua qualidade de vida e aumentar a expectativa da mesma. A nutrição precisa se adaptar a esses novos desafios, através do desenvolvimento de novos conceitos. A nutrição otimizada é um desses novos conceitos, dirigida no sentido de maximizar as funções fisiológicas de cada indivíduo de maneira a assegurar tanto o bem-estar quanto à saúde como o risco mínimo de desenvolvimento de doenças ao longo da vida.

O organismo humano vive em constante equilíbrio com os microrganismos que habitam suas mucosas e epitélios. Esses microrganismos crescem e se desenvolvem a partir dos nutrientes fornecidos pela alimentação humana. A microbiota endógena é estável, porém alguns patógenos podem se instalar e desta forma, abalar essa estabilidade provocando patologias.

A estabilidade do intestino humano é mantida por microrganismos que colonizam e aderem as paredes intestinais. Hoje já se encontram no mercado produtos fermentados que contém microrganismos vivos, e que auxiliam na manutenção da homeostase humana. Esses microrganismos são conhecidos como probióticos, e estão presentes em suplementos alimentares com a função de promover efeitos benéficos em animais e humanos, balanceando a microbiota intestinal.

Através de avanços tecnológicos, esses microrganismos foram incorporados em alimentos, como leites fermentados. As bactérias lácticas presentes nos produtos probióticos são provenientes do trato intestinal e na sua maioria são gram positivos, em forma de cocos ou bacilos, fermentadores de açúcares, produzindo principalmente ácido láctico, não esporulam; são anaeróbios, anaeróbios facultativos ou microaerófilos, quase sempre catalase negativa.

Existem inúmeras pesquisas que comprovam diversos efeitos benéficos promovidos pelos microrganismos probióticos, podendo ser ressaltado o efeito antagônico direto contra microrganismos patogênicos, diminuindo assim sua população no intestino. Esse controle de crescimento pode ser mediado pela síntese de substâncias antimicrobianas que interferem no metabolismo de patógenos, pela disputa por nutrientes e por sítios de adesão no epitélio intestinal. Desta forma, a utilização de bactérias ácido lácticas no controle de infecções intestinais cresce a cada ano, haja visto que os patógenos apresentam-se multiresistências às drogas antimicrobianas e os probióticos ajudam a controlar o seu crescimento. Outros efeitos

ainda são descritos como sua atividade na estimulação do sistema imunológico, na síntese de enzimas anticarcinogênicas e na diminuição do colesterol sanguíneo.

Desta foram foi objetivo deste estudo caracterizar espécies de *Lactobacillus* que apresentam propriedades probióticas, visando sua utilização em suplementos alimentares. Para isso identificou-se espécies de *Lactobacillus* que exercem efeito de inibição sobre os patógenos *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Listeria* spp., *Salmonella typhi* e *Shigella* spp, empregando-se algumas técnicas como cocultura, ‘spot-test’, coagregação e autoagregação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PROBIÓTICO: DEFINIÇÃO, HISTÓRICO E MICROBIOTA INTESTINAL

A palavra probiótico é derivada do Grego e significa ‘pro vida’ e recebeu diversas denominações com o passar dos anos (FULLER, 1992).

Probióticos são microrganismos vivos presentes em suplementos alimentares com efeitos benéficos, que promovem o balanço da microbiota intestinal (FULLER, 1992). Esta definição enfatiza a importância das células vivas como componente essencial no efeito probiótico (FULLER, 1989).

As bactérias ácido lácticas, têm sido usadas para promover a saúde, sendo que seu efeito mais importante seria a inibição do crescimento de patógenos (SANDERS, 1993). De acordo com a definição de probióticos, este termo é restrito a suplementos alimentares, não podendo ser utilizado para administração de microrganismos vivos em outros meios que não os de origem alimentar, no que se refere à aplicação em humanos (HAVENAAR; VELD, 1996).

Charteris et al. (1997), definiram probiótico como microrganismos que quando ingeridos, podem ter um efeito positivo na prevenção e tratamento de condições patológicas específicas.

Um microrganismo é considerado probiótico se o mesmo for habitante normal do trato gastrointestinal, sobreviver à passagem pelo estômago, manter sua própria viabilidade e a atividade no intestino (SILVA; STAMFORD, 2000).

Segundo Borba; Ferreira (2003), em crianças a ação dos probióticos está relacionada especialmente ao equilíbrio da microbiota intestinal, o qual tem correlação direta com o efeito barreira do epitélio intestinal e a estimulação do sistema imunológico.

Para Marteau; Seksik; Jian (2002), probióticos são definidos como microrganismos não patogênicos que, quando ingeridos, exercem uma influência positiva na fisiologia e saúde do hospedeiro.

De acordo com Gorbach (2002), Weese; Anderson (2002), Misha; Prasad (2005) e Saad (2006), os probióticos são definidos como microrganismos vivos que ao serem administrados em quantidades adequadas, exercem benefícios a saúde e a nutrição em geral.

Fioramonti; Theodorou; Bueno (2004), definiram probiótico como sendo um preparado de células microbianas ou componentes de células microbianas que apresentam efeito benéfico na saúde e no bem-estar.

A utilização de alimentos fermentados pelo homem vem sendo praticada há milhares de anos. A princípio, a fermentação era empregada como maneira de aumentar a vida útil dos alimentos e, posteriormente, em decorrência das características sensoriais agradáveis que tais produtos passavam a apresentar (CARLOS, 2003).

Segundo Silva; Stamford (2000), os alimentos probióticos surgiram em 1908, em pesquisas desenvolvidas por Elie Metchnikoff com a produção de iogurtes contendo *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*. Desde épocas remotas, Hipócrates, Galeno, Avicena, e outros consideram o leite não apenas como um alimento, mas também como um remédio; prescreviam, assim, leites fermentados para extinguir desordens do sistema digestório.

Em 1965, Lilly e Stillwell, classificaram os probióticos como sendo substâncias secretadas por um microrganismo, que estimulam o crescimento de outros microrganismos benéficos. Desta maneira os probióticos apresentam significado totalmente oposto a antimicrobianos. No entanto, subsequente Sperti modifica este conceito para, extratos de tecidos que estimulam o crescimento microbiano. (FULLER, 1992).

Parker, em 1974, definiu os probióticos como sendo organismos e substâncias que contribuem para otimização do balanço da microbiota intestinal (FULLER, 1989). Mais tarde, em 1992, Fuller redefiniu este conceito como suplemento alimentar contendo microrganismos vivos que afetam a microbiota animal benéficamente pelo estabelecimento do equilíbrio microbiano intestinal.

Em meados dos anos 80, crescia no Japão o interesse por alimentos que além de satisfazer requerimentos nutricionais e sensoriais básicos desempenhassem também efeitos fisiológicos benéficos. Estes alimentos devem apresentar propriedades medicinais e salutares, na forma de alimentos comuns, consumidos em dietas convencionais, mas que demonstrem capacidade de regular as funções corporais, de forma a auxiliar na proteção contra doenças (GOLDIN et al; 1992).

Segundo Borba; Ferreira (2003), o trato gastrointestinal do feto normal é estéril, porém durante o processo de nascimento, e logo após, a exposição aos microrganismos provenientes da mãe e do meio ambiente iniciam o desenvolvimento lento e gradual de uma microbiota densa, amplamente diversa, e relativamente estável ao longo da vida. Esta microbiota é derivada da alimentação, que inicia-se com a amamentação, já que o colostro apresenta uma carga microbiana secundária originada do mamilo, ductos lactíferos, pele circundante e mãos.

Um pediatra francês propôs no início de 1900 que bifidobactérias podem ser efetivas na prevenção de infecções infantis, já que elas são componentes predominantes da microbiota intestinal de crianças que se alimentam de leite materno (STANTON et al., 2005).

É estimado que o intestino humano contenha mais de 400 espécies de bactérias diferentes atingindo aproximadamente 10^{14} células bacterianas. Diversos são os fatores que alteram a composição em relação as bactérias presentes no intestino, destacando-se a idade do indivíduo, a sua nutrição, o uso de antibióticos, o estresse, o consumo de álcool e o trânsito de substâncias (KOOP-HOOLIHAM, 2001 e PINTO et al, 2006).

Os microrganismos presentes no trato gastrointestinal, interagem com as células da mucosa do epitélio intestinal e com células imunológicas, para através disto conseguirem se manter viáveis no intestino (MARTEAU; SEKSIK; JIAN, 2002).

Os primeiros microrganismos a colonizarem o intestino são aeróbios ou anaeróbios facultativos, como enterobactérias, enterococos e estafilococos. Com o consumo de oxigênio por estas bactérias ocorre a redução do potencial de óxido-redução, e o intestino torna-se um ambiente próprio para microrganismos estritamente anaeróbios, promovendo a proliferação de bacterióides, bifidobactérias, lactobacilos e clostrídios (ISOLAURI; SALMINEM; OUWEHAND, 2004).

A mucosa intestinal é coberta somente por uma única camada de células cilíndricas e justapostas, que excluem peptídios e macromoléculas. No entanto bactérias viáveis e componentes bacterianos podem ser translocados através da barreira mucóide e podem ser encontrados na lâmina própria, onde entram em contato com células do sistema imunológico (HELLER; DUCHMANN, 2003).

A microbiota exerce influência considerável sobre uma série de reações bioquímicas do hospedeiro. Paralelamente, quando em equilíbrio impede que microrganismos potencialmente patogênicos nela presentes exerçam seus efeitos patogênicos (FIORAMONT; THEODOROU; BUENO, 2003). Este fenômeno tem sido denominado de exclusão competitiva, efeito barreira, antagonismo bacteriano, podendo ser observado em animais “germ free”, que são mais susceptíveis a doenças quando comparados com animais com a microbiota intestinal estável (WALLACE; NEWBOLD, 1992). Por outro lado, o desequilíbrio dessa microbiota pode resultar na proliferação de patógenos com conseqüente infecção bacteriana.

2.2 PRINCIPAIS MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

As bactérias consideradas probióticas são gram positivas, na forma de coco ou bacilo, não esporogênicas e fermentadoras de açúcares produzindo principalmente ácido láctico, ou ácido láctico acompanhados de outros componentes (ácido acético, etanol, CO₂). São anaeróbios, anaeróbios facultativos ou microaerófilos, quase sempre catalase negativa. São descritos como bactérias lácticas pertencentes a 15 gêneros: *Aerococcus*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (SAAD, 2006).

Sullivan; Nord (2002), destacam que existem outras espécies probióticas que apresentam propriedades menos comuns, como *Escherichia coli* e *Saccharomyces*. Na Europa Central as cepas de *E. coli* têm sido utilizadas no tratamento de várias doenças intestinal. *Saccharomyces* é uma levedura usada na produção de vinhos e cervejas. Sabe-se que as drogas antimicrobianas apresentam maiores dificuldades de afetar cepas probióticas, e desta forma a ingestão destes microrganismos em bebidas fermentadas passa a ser uma vantagem, para a sobrevivência destes microrganismos no intestino. A espécie *S. boulardii* tem sido usada por produzir uma protease que interfere na toxina A sintetizada por *Clostridium difficile*, em ratos.

Os gêneros de microrganismos mais utilizados em produtos probióticos são *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

O gênero *Lactobacillus* foi isolado e identificado em 1901, por Otto Kandler e Norbert, sendo que hoje já são conhecidas mais de 44 espécies (SILVA; STAMFORD; 2000 e HOLT et al; 1994).

Os componentes do gênero *Lactobacillus* são gram positivos, de formas longas a delgadas, às vezes tendem a formar hastes curtas, denominada cocobacilos, normalmente não apresentam motilidade, não esporulam, o produto final do metabolismo de carbono é a lactato, que normalmente não é fermentado e são microaerofílicos (KANDLER e WEISS, 1986).

Os *Lactobacillus* são estritamente fermentativos e exigentes em termos de uma nutrição complexa a base de carboidratos, aminoácidos, peptídeos, derivados de ácidos nucléicos, e vitaminas. As condições físico-químicas influenciam e controlam a população de

microrganismos presentes no intestino. A produção de substâncias antimicrobianas pelos lactobacilos do intestino, contribuem para o efeito de proteção contra o ataque de patógenos. Neste contexto a espécie *Lactobacillus acidophilus* provavelmente é a mais importante do gênero (HAMMES; WEISS; HOLZAPFEL, 1992). O câncer do cólon é uma das causas mais importantes de morbidade por câncer entre homens e mulheres. Criptas aberrantes são lesões precursoras putrefativas, a partir das quais os adenomas e carcinomas podem se desenvolver no cólon.

Johansson et al. (1993), testaram o efeito da administração de leite fermentado constando de 19 espécies diferentes de *Lactobacillus* para humanos, e observaram um aumento significativo do número destas bactérias no trato intestinal, sendo este efeito notado principalmente em jejum.

Sabe-se que para atingir e se alojar no intestino, as bactérias devem resistir à passagem pelo estômago, não sendo sensíveis ao baixo pH estomacal. Hood; Zottola (1987), incubaram *L. acidophilus* com suco gástrico e observaram que este foi capaz de sobreviver em grande número populacional, mostrando resistência à acidez.

Para serem inseridos em alimentos as espécies de *Lactobacillus* devem passar por vários testes a fim de assegurar sua inocuidade. Desta forma, os lactobacilos mais usados para a produção de leites fermentados são os *L. delbrueckii* subespécie *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei* e *L. kefir* (SILVA; STAMFORD, 2000).

Segundo Saad (2006), dentre as bactérias pretencentes ao gênero *Bifidobacterium*, destacam-se *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. longum* e *B. thermophilum*.

2.3 MECANISMOS DE AÇÃO DOS PROBIÓTICOS

Inúmeros mecanismos estão sendo descritos para classificar os microrganismos como bons probióticos. Os principais mecanismos divulgados até então, são a capacidade das células probióticas em aderir ao epitélio intestinal, sua agregação aos microrganismos patogênicos, o efeito hipocolesterolêmico, a imunomodulação, o efeito anti-carcinogênico e a exclusão competitiva.

A maioria dos probióticos pode interagir com a membrana intestinal, formando uma parede de defesa contra os patógenos, ou seja, formam uma película biológica, que evita a

aderência dos microrganismos indesejáveis. No caso das leveduras do gênero *Saccharomyces*, elas aderem aos microrganismos patogênicos na parede celular, com a formação de um “complexo levedura-bactéria”, que aumenta a susceptibilidade aos mecanismos eliminam os patógenos (ROSTAGNO, 2003).

De acordo com Fuller (1992), não está claro se a adesão no epitélio intestinal é essencial para a persistência do probiótico no trato intestinal de humanos. No entanto a adesão parece ser uma propriedade que aumenta o tempo de sobrevivência dos probióticos e a habilidade do microrganismo em aderir no epitélio varia entre outras espécies.

Os mecanismos de adesão são diversos e complexos. No entanto, a retenção da bactéria no intestino humano pode resultar de uma aderência específica nas células do epitélio (SANDERS, 1993).

A agregação celular é causada pela interação de dois componentes da superfície da célula. Um é ativo apenas após o rearranjo molecular do plasmídeo da lactose, e então o seu gene é codificado pelo fator sexual plasmidial. O segundo componente é constitutivamente expresso e é codificado por gene cromossômico (LELIE et al., 1991).

As células que promovem agregação interagem com os componentes da superfície de outras células como os ácidos lipoteicóicos, proteínas e carboidratos. Desta forma os *Lactobacillus* agregam em outros microrganismos e os elimina juntamente com as fezes, eliminando assim o possível patógeno do intestino. Por outro lado a coagregação aumenta a frequência de conjugação em algumas espécies de *Lactobacillus* e *Lactococcus* (RENIERO et al., 1992).

Em bactérias Gram positivas a conjugação e a agregação são associações fenotípicas, ainda não se tem nenhuma informação disponível sobre a eficiência da agregação de espécies de *Lactobacillus* (RENIERO et al., 1992).

Os efeitos fisiológicos da administração oral de probióticos, têm sido estudados na última década a fim de ressaltar o acúmulo de informações sobre a atuação desses componentes no metabolismo de colesterol de diversos modelos animais e humanos. Alguns mecanismos têm sido propostos para demonstrar a forma de atuação dos *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* sobre o metabolismo do colesterol, entre os quais destacam-se a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), a assimilação de colesterol e a desconjugação de ácidos biliares. Para a fermentação bacteriana ocorrer, os microrganismos retiram seus substratos da dieta do hospedeiro. Alguns gêneros como *Bifidobacterium* e *Bacterioides*

degradam carboidratos em ácidos graxos de cadeia curta. A ingestão de propionato (AGCC) reduz a colesterolemia. A ingestão oral de propionato resulta em rápida absorção intestinal, enquanto que o propionato bacteriano é absorvido de forma gradual. Desse modo, as bactérias bífidas poderiam favorecer a produção de propionato, capaz de inibir a síntese de colesterol (MACHADO, 2003).

É sabido que os produtos alimentares que contém *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus plantarum* reduzem o nível de colesterol. Este efeito é provavelmente exercido pela promoção da degradação dos ácidos biliares (BUKOWSKA et al., 1998).

A capacidade da microbiota intestinal em desconjugar ácidos biliares pode também influenciar o nível de colesterol. Os ácidos biliares desconjugados fazem com que ocorra baixa absorção de lipídios. A co-precipitação do colesterol com ácidos biliares desconjugados pode tornar os ácidos biliares indisponíveis para reabsorção no fígado, sendo eliminados nas fezes. Uma vez que os ácidos biliares desconjugados são eliminados, mais colesterol é requerido para síntese de novos ácidos biliares no fígado, diminuindo assim os níveis de colesterol (SOUZA, 2004).

Sabe-se que a modulação da colesterolemia pelo emprego de probióticos, envolve diversos mecanismos de ação sobre o metabolismo de lipídios, sendo alguns semelhantes àqueles verificados nas drogas hipolipemiantes, quais sejam: i) reduzir a absorção intestinal de colesterol; ii) aumento da excreção de esteróides fecais; iii) bloqueio da síntese de colesterol ou favorecendo a sua excreção. No entanto o mecanismo pelo qual esses produtos favorecem a redução do colesterol sérico ainda não está devidamente esclarecido (AHN, 2003).

Gilliand et al. (1985) apud Havenaar; Veld (1992), estudaram o efeito da ingestão de bebida probiótica por porcos com alto nível de colesterol e com alimentação direcionada para o aumento da taxa de colesterol sanguíneo. Quando os porcos passaram a se alimentar simultaneamente com *L. acidophilus*, o nível de colesterol parou de aumentar, mantendo-se desta forma estável.

Machado et al. (2003), pesquisaram o efeito de probióticos na modulação dos níveis de colesterol sérico e no peso físico do fígado de ratos alimentados com dieta rica em colesterol. Os resultados revelaram que *L. acidophilus* diminuiu peso do fígado desses animais, e estes não tiveram seus níveis de colesterol total, LDL-colesterol e HDL-colesterol afetados pela ingestão de *L. acidophilus*.

El-Gawad et al. (2005) verificaram a diminuição dos níveis de colesterol plasmáticos de VLDL+LDL (very low density lipoprotein + low density lipoprotein) em ratos alimentados

com dietas ricas em colesterol e suplementados com leite fermentado contendo diversas espécies de *Bifidobacterium*. Todos os ratos que receberam leites fermentados contendo espécies de bifidobactérias apresentaram diminuição nos níveis de colesterol plasmático e de VLDL+LDL, quando comparados com o grupo que recebeu dieta rica em colesterol porém não ingeriu leite fermentado contendo bifidobactérias.

Desta forma, leites fermentados contendo microrganismos probióticos tem sido recomendado como suplemento alimentar, devido a seus efeitos hipocolesterolêmicos em humanos e em ratos. Porém ainda não se sabe exatamente como estes microrganismos agem diminuindo os níveis de colesterol (CHOU; HOU; 2000).

A microbiota intestinal tem uma profunda influência no status do sistema imunológico. Os microrganismos, ou seus antígenos, podem penetrar na barreira do epitélio intestinal, estimulando as células do sistema imunitário, que produz células *helper* e supressoras e estimula a diferenciação dos linfócitos (HAVENAAR; VELD, 1992).

O efeito probiótico sobre a resposta imune tem sido bastante estudado. Grande parte das evidências de sistemas *in vitro* e de modelos animais e humanos sugere que os probióticos podem estimular tanto a resposta imune não-específica quanto específica. Acredita-se que esses efeitos sejam mediados por uma ativação dos macrófagos, por um aumento nos níveis de citocinas, por um aumento da atividade das células destruidoras naturais (“natural killer”) ou dos níveis de imunoglobulinas (KOOP-HOOLIHAN, 2001).

Em trabalho usando ratos alimentados com iogurte de soja fermentado contendo *L. helveticus* e *Enterococcus faecium*, Carlos (2003) analisou a presença de citocinas e de intermediários de oxigênio (H_2O_2) e nitrogênio (NO), que são mediadores liberados pelos macrófagos. Os animais foram divididos em três grupos: I) os que receberam alimentos fermentados; II) produtos não fermentados e III) água. Nos animais que receberam produto fermentado de soja, observou-se maior capacidade de indução de liberação das citocinas. Os animais que receberam o produto sem o processo de fermentação de soja (I), apresentaram valores maiores do que os animais que se alimentaram com água (III), o que evidenciou a participação dos componentes da soja na liberação de citocinas e na indução da liberação de compostos intermediários do oxigênio e nitrogênio.

Salinas et al. (2004), testou a influência de bactérias lácticas no sistema imunológico de peixes. Estes animais receberam uma alimentação a base de *Lactobacillus delbrueckii* e

Bifidobacterium subtilis, por três semanas, e ao final observou-se que houve um aumento significativo da taxa de citocinas e de leucócitos.

Alguns dos mecanismos citados como preventivos exercidos pelos produtos contendo microrganismos probióticos incluem a degradação, conversão e absorção de compostos carcinogênicos (O'SULLIVAN et al. 1992).

Conforme Saad (2006), o câncer de cólon é uma das causas mais importantes de morbidade por câncer entre homens e mulheres. Criptas aberrantes são lesões precursoras putrefativas, a partir das quais os adenomas e carcinomas podem se desenvolver no cólon. Estudo com ratos mostraram que a administração de oligofrutose e inulina na dieta suprimiu significativamente o número de focos de criptas aberrantes no cólon quando comparado com à dieta controle.

Segundo Teshima (2003), algumas evidências sugerem a participação de certos microrganismos na tumorigênese. Números elevados de tumores no fígado foram desenvolvidos em camundongos gnotobióticos associados com *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Clostridium paraputrificum*. A proliferação de tumores diminuiu consideravelmente na presença de *Bifidobacterium longum*.

Havenaar; Veld (1992), observaram que uma certa população humana, que apresentavam baixo consumo de produtos fermentados, era alto o número o casos de câncer de mama, quando comparado com humanos que ingeriam quantidades elevadas de produtos probióticos, demonstrando desta forma uma relação entre a ingestão de alimentos probióticos e o efeito anti-carcinogênico.

De acordo com Commane et al. (2005), os lactobacilos exercem efeitos em diferentes estágios da formação de tumores e por isso conseguem diminuir a carcinogênese. Dentre os efeitos listados por eles, estão a transformação de componentes do lúmen pelos lactobacilos, podendo desta forma aumentar a atividade anticarcinogênica, a inibição de enzimas que estimulam a carcinogênese e o controle do crescimento de bactérias prejudiciais ao organismo humano.

O mecanismo através do qual os probióticos poderiam inibir o desenvolvimento de câncer de cólon ainda são desconhecidos. Entretanto, vários mecanismos de atuação são sugeridos, incluindo, o estímulo da resposta imune do hospedeiro, a ligação e a degradação de compostos com potencial carcinogênico, alterações qualitativas e quantitativas na microbiota intestinal envolvidas na produção de carcinógenos e de promotores (degradação de ácidos

biliares), produção de compostos antitumorígenos ou antimutagênicos no cólon e efeitos sobre a fisiologia do hospedeiro (RAFTER, 2003).

Segundo Kaur; Gupta (2002), as bifidobactérias, que colonizam o cólon em detrimento dos enteropatógenos, podem ligar-se ao carcinógeno final, promovendo sua remoção.

A microbiota intestinal contribui para a segurança do trato intestinal contra a instalação de patógenos exógenos. Este acontecimento recebe o nome de inibição competitiva, resistência à colonização ou efeito barreira (FULLER, 1995).

Os probióticos auxiliam a recompor a microbiota intestinal, através da adesão e colonização da mucosa intestinal, ação esta que impede a adesão e subsequente produção de toxinas ou invasão das células epiteliais por bactérias patogênicas. Adicionalmente, os probióticos competem com as bactérias indesejáveis pelos nutrientes disponíveis no nicho ecológico. O hospedeiro fornece as quantidades de nutrientes que as bactérias intestinais necessitam e estas indicam ativamente as suas necessidades. Essa relação simbiótica impede uma produção excessiva de nutrientes, a qual favoreceria o estabelecimento de competidores microbianos com potencial patogêncio ao hospedeiro. Além disso, os probióticos podem impedir a multiplicação de seus competidores, através de compostos antimicrobianos, principalmente as bacteriocinas (GUARNER; MALAGELADA, 2003)

Segundo Teshima (2003), tanto a ingestão de células viáveis de bifidobactérias, como o estímulo do crescimento de bactérias bífidas endógenas podem auxiliar no restabelecimento da microbiota intestinal, reduzindo assim a oportunidade de colonização de organismos patogênicos. A produção de ácidos orgânicos, como ácido acético e láctico, e a concomitante redução do pH, restringem o crescimento de organismos patogênicos e putrefativos.

Conforme Rautara; Kalliomaki; Isolauri (2005), a barreira intestinal consiste de fatores fisiológicos e imunológicos que restringem a colonização da mucosa intestinal por microrganismos patogênicos. A microbiota intestinal constitui um importante aspecto na mucosa intestinal através de sua atividade metabólica e de efeitos tróficos (crescimento). Todos esses aspectos da função da barreira intestinal são alvos potenciais para intervenção dos probióticos.

Em alguns casos microrganismos patogênicos são capazes de penetrar e colonizar as superfícies epiteliais, como mucosas, e assim reduzir o número de microrganismos benéficos no hospedeiro (HAVENAAR; VELD, et al., 1992).

De acordo com Stanton et al. (2005), durante a fermentação as bactérias ácido lácticas produzem uma série de metabólitos secundários, alguns deles tem sido associados com

propriedades de promoção de saúde. A maioria dessas substâncias são vitaminas B e peptídeos bioativos.

Gagnon et al. (2004), pesquisou a inibição *in vitro* de *Escherichia coli* O157:H7, pela ação de bifidobactérias. Eles observaram que houve um aumento populacional de bifidobactérias e sucessiva redução de 50% da população de *Escherichia coli* O157:H7.

Drago et al. (1997), demonstraram que cepas de *Lactobacillus* foram capazes de inibir o crescimento de patógenos intestinais. Os *Lactobacillus* inibiram o crescimento de *E. coli*, porém não inibiram o aumento bacteriano de *Vibrio cholerae*. E desta forma, o crescimento das cepas de *Lactobacillus* não foram influenciadas pela presença simultânea de nenhum patógeno.

Mishra; Prasad (2005), selecionaram cepas de *Lactobacillus casei* para verificar sua capacidade de atuar como probióticos e desta foram incorporadas em um leite fermentado tradicional da Índia. Eles utilizaram 7 cepas diferentes de *L. casei* e 5 patógenos de espécies diferentes. Eles verificaram que todos as cepas de lactobacilos foram capazes de inibir os patógenos, porém o microrganismo patogênico mais inibido foi a *S. typhi*.

Santos et al. (2003), usaram 58 cepas de *Lactobacillus* de espécies diferentes e as testaram contra diversos microrganismos para verificar sua atividade antimicrobiana, utilizando o método do “spot-test”. Eles verificaram que 75% dos *Lactobacillus* mostraram atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *Y. enterocolitica*. 64% das cepas foram ativas contra *Shigella flexneri*, 50% contra *Listeria monocytogenes*, 40% contra *S. Enteritidis* e 81% contra *S. typhimurium*.

2.4 BACTÉRIAS PATOGÊNICAS

2.4.1 *Escherichia coli*

E. coli é um cocobacilo Gram negativo mais comumente isolada em laboratórios clínicos e associado a doenças infecciosas envolvendo virtualmente todos os tecidos e sistemas orgânicos humanos. *E. coli* é um dos microrganismos comumente envolvidos em septicemias por Gram negativos e em choque induzido por endotoxina (PELCZAR, 2000).

De acordo com Koneman (2001), estas espécies compreendem grande número de grupos e tipos sorológicos, identificados por meio de anti-soros preparados contra as três variedades de antígenos que ocorrem na espécie, ou seja, os antígenos O, K e H.

Com relação às infecções intestinais são conhecidos pelo menos cinco grupos de *E. coli* destacam-se: *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EaggEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC) na qual a bactéria *E. coli* O157:H7 está inserida (SILVA, 1999).

Segundo Pelczar (1999), existem atualmente mais de 50 sorotipos pertencentes ao grupo EHEC, mas *E. coli* O157:H7 é o protótipo desta categoria, sendo a mais comum e a mais bem caracterizada, sendo que 80% das espécies isoladas pertencem a este sorotipo. Ultimamente, este sorotipo vem despertando bastante interesse devido ao número relativamente grande de surtos de intoxicação alimentar decorrentes da ingestão de hambúrgueres contaminados com esta bactéria. A transmissão entre indivíduos também pode ocorrer pela via fecal-oral (PELCZAR, 1999). As carnes cruas e mal cozidas contaminadas têm sido atribuídas como potentes fontes de contaminação humana (SILVA, 1999).

Segundo Campos; Trabulsi (1999), as bactérias do grupo EHEC podem causar diarreia branda, sanguinolenta (colite hemorrágica) e síndrome hemolítica urêmica (HUS) em crianças e adultos. Estes autores ressaltam que sem dúvida, a HUS é a principal infecção causada por EHEC, desenvolvendo-se em torno de 2% a 7% dos casos. Esta síndrome é caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia e falha renal aguda, que às vezes pode se estender a outros órgãos, incluindo o sistema nervoso central. Os pacientes com HUS apresentam taxa de mortalidade de 3% a 10%.

Estas bactérias produzem duas potentes citotoxinas, codificadas por bacteriófagos lisogênicos e ativas contra células Vero e HeLa: *Shigalike toxin* I e II (SLT-I e STL-II) ou verotoxinas I e II (VT-I e VT-II). A STL-I é essencialmente idêntica à citotoxina produzida por *Shigella dysenteriae* tipo I (toxina de Shiga), sendo sua atividade biologicamente neutralizada por anti-soros contra a toxina de Shiga. A STL-II é antigenicamente distinta desta toxina. Por outro lado, ambas citotoxinas apresentam a mesma estrutura e atividade da toxina de Shiga, as quais são formadas por uma subunidade A e cinco subunidades B, e atuam inibindo a síntese protéica da célula hospedeira (KONEMAN et al, 2001).

Segundo Kanitpun; Wagner; Waghela (2004), a bactéria *E. coli* O157:H7, é a causadora de uma doença emergente provocada pela ingestão de carne, que ocorre em uma estimativa de 20 mil casos de infecção e 250 mortes a cada ano nos Estados Unidos, e tem sido registrada também em vários países do mundo.

onforme Grif et al. (2005), um surto epidêmico de *E. coli* entero-hemorragia, do sorotipo O157:H7, produzindo toxina de shiga, foi a causadora de vários casos de HUS, sendo que a transmissão da doença ocorreu via ambiental.

De acordo com Leblanc; Fliss; Matar (2004), ratos infectados com *E. coli* O157:H7, submetidos a ingestão de leite fermentado contendo *Lactobacillus helveticus*, apresentaram um aumento do número de imunoglobulina A (IgA) e aumentaram a secreção de linfócitos B.

2.4.2 *Listeria monocytogenes*

Segundo Pelczar (1999), todas as espécies de *Listeria* apresentam forma de bacilos Gram positivos pequenos, algumas vezes organizados em pequenas cadeias. Em alguns esfregaços estas podem apresentar uma forma cocóide, facilmente confundida com estreptococos. *Listeria monocytogenes* pode ser tipada tendo-se como base seu antígenos O e H, que permitem subdividir a espécie em 13 sorotipos dos quais 1a, 1b e 4b são predominantes.

De acordo com Koneman et al. (2001), *L. monocytogenes* pode ser isolada de uma ampla variedade de fontes, como água doce, água salgada, esgoto, solo, forragem, fertilizantes e vegetais em decomposição, além de alimentos crus de origem animal, incluindo aves frescas e congeladas, carnes vermelhas e produtos à base de carne, pescado, produtos lácteos, como queijo, frutas e vegetais crus, além de fezes de pessoas saudáveis e sintomáticas.

L. monocytogenes não é frequentemente isolada em ambientes clínicos, mas é potencialmente séria, sendo capaz de causar infecções alimentares, apresentando um percentual 30% de casos fatais. O maior número de mortes está relacionado com fetos, neonatos, gestantes e imunocomprometidos, que constituem grupo de risco (SILVA, 1999).

Conforme Lacir et al. (2000), em mulheres grávidas a doença normalmente aparece como sintoma de uma rápida gripe, mas desaparecem rapidamente com o tratamento, mas pode levar a sérios problemas infecciosos, que em 20 % dos casos leva ao aborto. Na Argentina, a taxa de morbidade em recém nascidos atinge 78,6%, devido a listeriose.

Segundo De Martinis; Santarosa; Franco (2003), tem sido reportado a presença de *Listeria* entre 5 a 13% nos produtos cárneos, mas no Brasil está incidência tem sido maior, pois o microrganismo apresenta habilidade para sobreviver e se proliferar em temperaturas de refrigeração, toleram ambientes em condições adversas, causados pelo baixo pH e pela alta concentração de sais.

O microrganismo desenvolveu estratégia para movimentar-se e infectar cada vez mais células do hospedeiro. *L. monocytogenes* necessita de actina, sendo esta requerida da célula hospedeira. Quando a bactéria *L. monocytogenes* é fagocitada por uma célula, esta secreta uma hemolisina e fosfolipases C que rompem a membrana do fagossoma, alcançando o citoplasma da célula hospedeira. Após sua multiplicação no citoplasma induz a formação de numerosos filamentos de actina da célula hospedeira. Com auxílio da cauda de actina o patógeno consegue migrar para célula vizinha e também infectá-la (SILVA, 1999).

Agentes antimicrobianos são os principais suportes no tratamento da listeriose. A maioria dos antibióticos são ativos contra *L. monocytogenes in vitro*. *In vivo*, a ampicilina combinada com um aminoglicosídeos tem dado melhores resultados.

2.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* compreende grande número de espécies de bacilos Gram negativos, normalmente diferenciados por meio de provas bioquímicas, testes de sensibilidades a antibióticos, formação de pigmentos, número e localização de flagelos. As espécies relacionadas ao homem são em torno de 25, a maioria sendo raramente encontrada (PELCZAR, 1999).

Uma das características mais destacadas da espécie *P. aeruginosa*, é a capacidade de produzir um pigmento azul-esverdeado, denominado piocianina. A *P. aeruginosa* normalmente habita o solo, a água e vegetais, podendo ser encontrada na pele tem sido isolada das fezes e garganta de 3% a 5% dos indivíduos normais. Em pacientes hospitalizados, a taxa de portadores pode ser bastante elevada. A frequência das infecções pela *P. aeruginosa* vem aumentando progressivamente. Atualmente esta bactéria é responsável por aproximadamente, 15% dos casos de bacteremias causadas por microrganismos Gram negativos (KONEMAN, et al., 2001).

A infecção por *Pseudomonas* é especialmente prevalente em pacientes por com queimaduras, fibrose cística, leucemia aguda, transplante de órgãos e drogas endovenosas. As infecções são em geral observadas em sítios onde existe tendência ao acúmulo de umidade. A *P. aeruginosa* também produz infecções no trato urinário e no trato respiratório inferior, inclusive colocando em risco a vida de paciente imunocomprometidos (TRABULSI, 1999).

A *P. aeruginosa* é naturalmente resistente a vários antibióticos betalactâmicos, e também as tetraciclina, clorafenicol, cotrimoxazol e outros. Os antibióticos mais eficientes são a gentamicina, amicacina e algumas penicilinas. A bactéria pode adquirir resistência a

qualquer um destes agentes terapêuticos, através de mutações ou da aquisição de plasmídeos de resistência (PELCZAR, 1999).

Yetkin et al. (2006), isolaram 105 cepas de *P. aeruginosa*, em um hospital universitário, a fim de verificar as características epidemiológicas e clínicas desse microrganismo em infecções nosocomiais. 35% dos isolados foram de urina e 24% de traquéia, eles observaram também que 34% das cepas eram resistentes a ciprofloxacina, 29% resistente a imipenem, 57% a aztreonam e 49% a gentamicina.

2.4.4 *Salmonella typhi*

Espécies de salmonela são encontradas na forma de bastonetes Gram negativos, flagelados, anaeróbios facultativos. Assim como outros bastonetes Gram negativos, o envelope celular destas espécies contém uma complexa estrutura polissacarídica (LPS) que é liberada para o meio externo quando ocorre lise celular. O LPS é um fator importante na virulência destes microrganismos (PELCZAR, 2000).

Conforme Koneman et al. (2001), as infecções humanas produzidas por salmonelas em geral ocorrem por ingestão de alimentos, água ou leite contaminados por fezes humanas ou de animais. Espécies de salmonelas são primariamente patógenos de animais, as quais são as principais fontes de salmonelose não-tifóide em humanos.

O potencial patogênico, das espécies de salmonela se deve a uma variedade de atributos denominados fatores de virulência. Estes incluem: habilidade de invadir células, um complexo arcabouço lipopolissacarídico, habilidade de se dividir intracelularmente e possibilidade de produção de toxina (SILVA, 1999).

De acordo com Campos (1999), as infecções por *Salmonella* são geralmente autolimitadas e a administração de antibióticos no tratamento das gastroenterites nem sempre acelera a recuperação clínica do paciente, sendo, inclusive, responsável pelo prolongamento do período de excreção do agente, além de desenvolver uma característica de multirresistência nas bactérias. Ampicilina, clorafenicol e a associação sulfametoxazol-trimetropim são as drogas mais utilizadas para o tratamento destes casos.

Em estudo desenvolvido por Rodriguez-Avial et al. (2005), demonstrou-se que de 771 amostras clínicas de salmonelas não tifóide 79% são *S. Enteritidis*, sendo que destas, 46% aumentaram seu índice de resistência para a droga ácido nalidíxico, tornando mais difícil o tratamento.

De acordo com Erden et al. (2005), de 620 amostras de laboratórios de análises clínicas de salmonelas, 47,7% são do sorotipo Enteritidis, sendo ainda que essas cepas demonstraram um aumento de resistência para ciprofloxacina e grande parte delas são cepas multirresistentes.

2.4.5 *Shigella* spp.

De acordo com Pelczar (2000), o gênero *Shigella* é composto de bastonetes Gram negativos, anaeróbios facultativos e são os principais agentes de disenteria bacilar. Esta doença difere daquela comumente observada na diarreia colérica ou por cepas enterotoxigênicas de *E. coli* (diarreia aquosa profunda), uma vez que as fezes contêm sangue, muco e leucócitos polimorfonucleares (PMN).

Segundo Niyogi (2005), a shigelose é um problema mundial de saúde e quatro espécies do gênero são capazes de causar esta doença: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei*. Estas espécies são divididas em sorotipos com base no polissacarídeo “O”. A espécie *S. dysenteriae* do tipo 1 causa várias doenças e pode ser associada com complicações mortais.

Os humanos servem como hospedeiros naturais e a doença é transmissível por via fecal-oral; sendo que apenas 200 microrganismos viáveis são suficientes para causar a doença, sendo reportados anualmente entre 25000 e 30000 casos de shigelose nos Estados Unidos (KONEMAN et al., 2001).

Segundo Campos (1999), os mecanismos de virulência das espécies de *Shigella* são relativamente conhecidos. Em presença de culturas de tecidos, as shigelas são prontamente fagocitadas, e rapidamente destroem a membrana do vacúolo fagocitário produzido pelas células das culturas de tecidos, e assim passam para o citoplasma da célula. Uma vez no citoplasma, elas se movimentam em direção as células adjacentes, que também são infectadas e ocorre o envolvimento de praticamente toda camada celular.

Com o surto global de resistência às drogas, a escolha por agente antimicrobiano para o tratamento da shigelose é limitada. No entanto doses únicas de norfloxacina e ciprofloxacina estão demonstrando eficácia (NIYOGI, 2005).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMOS

Os microrganismos probióticos que foram testados no presente trabalho pertencem a 5 cepas de *Lactobacillus* isolados de fezes humanas, a saber: *L. plantarum* Lac-01, *L. plantarum* Lac-02, *L. plantarum* Lac-03, *L. fermentum* Lac-04 e *L. fermentum* Lac-05. Estes microrganismos foram doados pelo Centro Universitário Geraldo Di Biase (UGB), Volta Redonda, RJ. As cepas foram mantidas em ágar Man Rugosa Shape (MRS), composto por 10 g/l de peptona de caseína, 8 g/l extrato de carne, 4 g/l extrato de levedura, 20 g/l de D-glicose, 2 g/l fosfato hidrogenado de potássio, 1 ml/l tween 80, 2 g/l citrato de amônio, 5 g/l acetato de sódio, 0,2 g/l de sulfato de magnésio heptahidratado, 0,04 g/l sulfato de manganês tetra-hidratado e 14 g/l ágar bacteriológico. Após ativação as culturas de *Lactobacillus* foram mantidas a temperatura de -4°C, e reativadas semanalmente.

No que se refere aos microrganismos patógenos foram estudadas 5 espécies incluindo: *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Listeria* spp., *Salmonella typhi*, *Shigella* spp. Estas cepas foram doadas pelo laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro e conservadas à -4°C em ágar Müller-Hinton, tendo em sua composição 5 g/l de infusão de carne, 17,5 g/l de caseína hidrolizada e 15 g/l de amido.

3.2 CRESCIMENTO DE *Lactobacillus* E DE PATÓGENOS QUANDO INCUBADOS SIMULTANEAMENTE

Os cultivos de *Lactobacillus* foram testados frente aos cultivos de patógenos seguindo os métodos descritos por Pereira; Luchese; Valadão (2004), modificados, sendo que cada se avaliou a cocultura com três repetições.

Neste teste utilizou-se tubo de ensaio contendo 3,5 ml de caldo MRS, contendo 2 g/l de bicarbonato de sódio, onde os lactobacilos foram inoculados e incubados por 24 horas à 37°C, afim de promover o crescimento à uma concentração de células de $ca 10^{17}$ UFC/ml, que foi determinado pela técnica de pour-plate em ágar MRS.

Em um outro tubo contendo 2,5 ml de caldo Mueller-Hinton promoveu-se o crescimento dos microrganismos patogênicos, por 24 horas à 37°C, para se obter uma concentração de células de $ca 10^5$ UFC/ml.

Aos tubos contendo a suspensão de *Lactobacillus*, adicionou-se 2,5 ml de caldo Muller-Hinton contendo o patógeno. Amostras foram retiradas após 0, 4, 8, 12 e 24 horas de incubação, para determinação da população de *Lactobacillus* em agar MRS. Os patógenos Gram negativos (*E. coli* O157:H7, *Shigella* spp., *S. typhi* e *P. aeruginosa* ATCC 27853) foram plaquemados em Ágar MacConkey e a *Listeria* spp. em Ágar base para *Listeria* (23 g/l de Peptídeos, 5 g/l de cloreto de sódio, 10 g/l de manitol, 5 g/l de citrato férrico de amônio, 0,80 g/l de esculina, 0,50 g/l de dextrose, 15 g/l de cloreto de lítio, 0,080 g/l de vermelho de fenol e 13 g/l de agar).

Em intervalos de 1 hora adicionou-se aos tubos de ensaio 0,5 ml de caldo MRS e 0,5 ml de caldo Muller-Hinton a fim de manter as condições de crescimento otimizadas. Ajustava-se o pH da solução para 7,0 a cada 1 hora utilizando-se NaOH 1 M, a fim de evitar que os ácidos gerados pelos *Lactobacillus* modificassem os resultados.

A fim de determinar o crescimento das cepas de *Lactobacillus* sem a interferência das células patogênicas, procedeu-se o cultivo das cepas de *Lactobacillus* isolados, com concentração inicial de $ca 10^{17}$ UFC/mL, durante 24 horas à 37°C, em caldo MRS. Amostras foram retiradas após 0, 4, 8, 12 e 24 horas de incubação, para determinar a população de *Lactobacillus* em agar MRS pelo método de “pour-plate”.

Da mesma forma os patógenos foram cultivados isoladamente em caldo Muller-Hinton a uma concentração inicial de 10^5 UFC/mL. Amostras foram coletadas após 4, 8, 12 e 24 horas de incubação devidamente diluídas e plaqueadas em ágar Mac Conkey para os patógenos Gram negativos, e Ágar base para *Listeria* para *Listeria* spp.

3.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUZIDAS POR *Lactobacillus* SOBRE ESPÉCIES PATOGÊNICAS

Para detecção da atividade antimicrobiana de substâncias produzidas pelas cepas de *Lactobacillus* sobre os patógenos, foi empregado o método do ágar “spot test”. As culturas ativadas de *Lactobacillus* puras, numa concentração de $ca 10^5$ UFC/mL, foram inoculadas em “spots” contendo 5 µL, em placa de Petri contendo ágar MRS, adicionado de 2 g/L de

bicarbonato de sódio, secas a temperatura ambiente por 30 minutos, e incubadas à 37°C por 18 horas.

Após 18 horas as placas foram deixadas em contato com vapor de cloróformio, através de algodão embebido em clorofórmio por 40 minutos, após este tempo as placas foram deixadas por mais 40 minutos abertas para liberação dos vapores de clorofórmio. Em seguida foram adicionados às placas 10 mL de ágar Brain Heart Infuse (BHI) semi-sólido, composto por cloreto de sódio (5 g/L), dextrose (2 g/L), fosfato bibásico de sódio (2,5 g/L), infuso cérebro e coração (17,5 g/L), peptona de carne (5 g/L) e de caseína (5 g/L), contendo células dos patógenos numa concentração de $ca 10^5$ UFC/mL. Em seguida as placas foram incubadas por mais 18 horas à 37°C, e observadas as zonas de inibição por meio da formação de halos ao redor das colônias de *Lactobacillus* (DE MARTINS et al, 2002) (Apêndice A).

3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUZIDAS PELOS *Lactobacillus*

As cepas de *Lactobacillus* que apresentarem atividade inibitória sobre os patógenos, foram testadas a fim de se observar a natureza protéica das substâncias produzidas, visando estimar o mecanismo de ação das mesmas como bacteriocina.

Para tanto se empregou o método de difusão em ágar, onde as suspensões de *Lactobacillus* foram semeadas (5 µL) em “spots”, em placas de Petri contendo meio MRS, e incubadas a 37°C por 18 horas. Em seguida, foram inoculados individualmente, a 20 milímetros de distâncias dos spots de *Lactobacillus*, 20µL de pepsina, 20 µL de proteinase, 20 µL de papaína e 20 µL de água destilada esterilizada como controle negativo. A natureza protéica das referidas substâncias foi observada por meio de formação de halo de inibição deformado conforme descrito por De Martinis; Franco (1998) (Apêndice B).

3.5 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DO MECANISMO DE COAGREGAÇÃO E AUTOAGREGAÇÃO.

A indução do mecanismo de agregação por células de *Lactobacillus* foi testada em conformidade com a metodologia descrita por Drago et al. (1997) e Reid et al. (1998). Para tanto, as cepas de lactobacilos foram crescidas em tubos de ensaio contendo caldo MRS e os

patógenos caldo Mueller-Hinton, por 24 horas à 37°C, em seguida foram centrifugados por 20 minutos a 10.000 x g à 4°C, e lavados três vezes em solução de PBS (5,2 g/l de fosfato monobásico de potássio e 10,80 g/l de fosfato dibásico de potássio).

Para se observar o fenômeno de agregação usou-se uma concentração *ca* de 10⁹ UFC/mL. Transferiu-se um volume de 0,5 mL da respectiva suspensão de patógenos e 0,5 mL da suspensão de lactobacilos para tubo eppendorf.

No teste de auto-agregação entre células, utilizou-se o mesmo procedimento citado acima, onde 0,5 mL da suspensão do respectivo microrganismo foi incubado com 0,5 mL de PBS em tubos de eppendorf, incubados a 30°C sendo observada a formação de agregados a cada 30 minutos durante 4 horas.

A agregação foi considerada positiva quando partículas visíveis formadas pelas células agregadas são observadas no fundo do tubo ou quando aderidas sobre a parede do tubo resultando na formação de um sobrenadante límpido. Classificou-se a autoagregação e a coagregação em diferentes níveis de acordo com a figura 1.

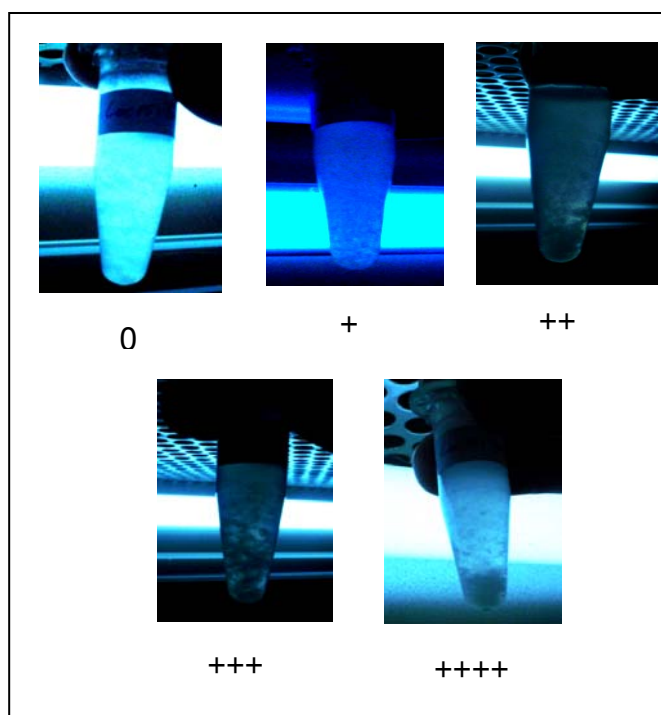


Figura 1 – Escala de classificação de autoagregação e coagregação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CRESCIMENTO DE *Lactobacillus* NA PRESENÇA DE PATÓGENOS

A capacidade das cepas de *Lactobacillus* em inibir o crescimento de microrganismos patogênicos, foi avaliada em ensaios de cocultura com três repetições. Para tanto, as cepas de *Lactobacillus plantarum* Lac-01, Lac-02, *Lactobacillus fermentum* Lac-03, Lac-04 e Lac-05, foram inoculadas em meio líquido, individualmente e simultaneamente com *E. coli* O157:H7, *Listeria* spp., *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Salmonella typhi* e *Shigella* spp. Em intervalos de 1 hora o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1 M, para impedir a ação dos ácidos sobre o crescimento dos microrganismos patogênicos

Alíquotas foram retiradas nos tempos de 0, 4, 8, 12 e 24 horas de incubação para determinação do número de células de cada um dos microrganismos para plotar as respectivas curvas de crescimento.

As curvas de crescimento das cepas de *Lactobacillus plantarum* cultivadas isoladamente em caldo MRS e na presença dos patógenos em caldo MRS + Mueller-Hinton, bem como as curvas de crescimento dos patógenos, cultivados em meio Mueller-Hinton isoladamente, encontram-se representadas na Figura 2, 3, 4, 5 e 6.

4.1.1 Crescimento de *L. plantarum* (Lac-01) na presença de patógenos

Observa-se na Figura 2 que a cepa Lac-01 quando cultivada de forma isolada em caldo MRS apresentou crescimento correspondendo a uma variação de 18,67 log UFC/mL para 21,92 log UFC/mL após 24 horas de incubação. Nota-se ainda que a presença dos respectivos patógenos não interferiu no crescimento desta cepa.

Verifica-se que a cepa Lac-01 foi capaz de inibir o crescimento de *E. coli* O157:H7 e *Listeria* spp., que apresentaram redução de 2 log UFC/mL e 2,5 log UFC/mL respectivamente, nas primeiras 24 horas de incubação (Figura 2A e 2B). Desta forma, se o experimento fosse prolongado poderia se observar a significância desta redução, devido provavelmente a maior produção de substâncias antimicrobianas. No tocante a *P. aeruginosa* (Figura 2C) observa-se que o efeito de inibição começou a ser percebido a partir de 8 horas de crescimento, acarretando em uma redução de 43% na população deste patógeno após 24 horas de incubação.

No que se refere às cepas *Salmonella typhi* e *Shigella* spp. (Figuras 2D e 2E), verifica-se um efeito marcante de inibição de crescimento por parte da cepa Lac-01 a partir de 4 e 8 horas de incubação, respectivamente, sendo observado a total eliminação de ambas as espécies após 12 horas de incubação. Esta observação sugere que a cepa Lac-01 exerce efeito bactericida sobre estes patógenos.

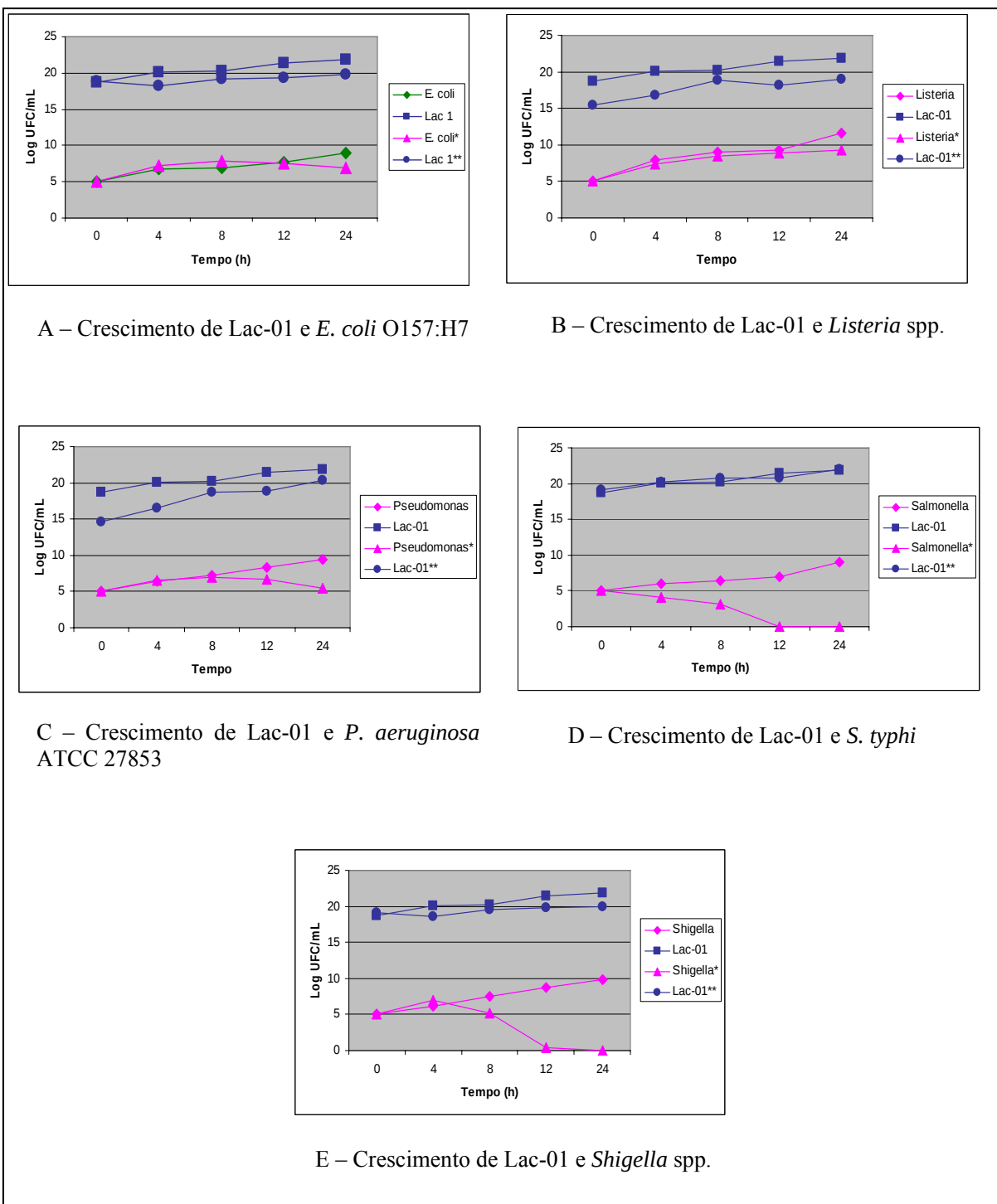


Figura 2 – Crescimento de Lac-01 na presença de patógenos.

*Crescimento de patógeno na presença de Lactobacilos.

**Crescimento de Lactobacilos na presença do patógeno.

4.1.2 Crescimento de *L. plantarum* (Lac-02) na presença de patógenos

Verifica-se na Figura 3 que a cepa Lac-02 quando incubada isoladamente apresentou um crescimento correspondente a variação de 19,38 para 21,48 log UFC/mL após 24 horas de incubação. Nota-se ainda que a presença das respectivas cepas de microrganismos patógenos não interferiu neste crescimento

Observa-se nas Figuras 3A e 3B que a cepa Lac-02 inibiu o crescimento de *E. coli* O157:H7 e *Listeria* spp., em 2 log UFC/mL e 2,4 log UFC/mL, quando comparado com o crescimento desses patógenos isoladamente. No que se refere a *P.aeruginosa* (Figura 3C) observa-se que a cepa Lac-02 inibiu o seu crescimento a partir de 4 horas de incubação, acarretando numa diminuição de 24,6% em sua população após 24 horas de crescimento. No tocante a cepa *Salmonella typhi* nota-se que a presença de Lac-02 (Figura 3D) inibiu totalmente o seu desenvolvimento após 8 horas de incubação. Verifica-se ainda que o mesmo efeito foi observado para *Shigella* spp. (Figura 3E), cujo crescimento foi totalmente inibido após 24 horas de incubação.

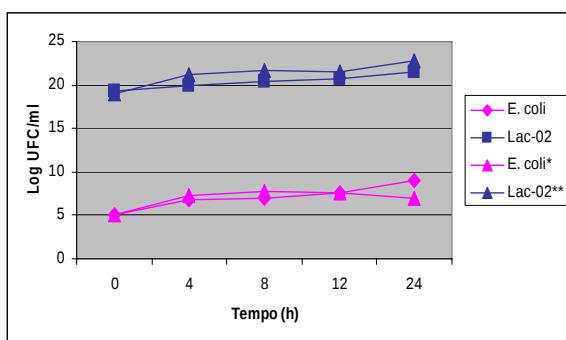
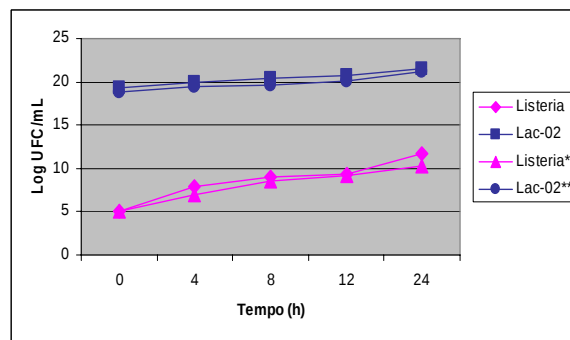
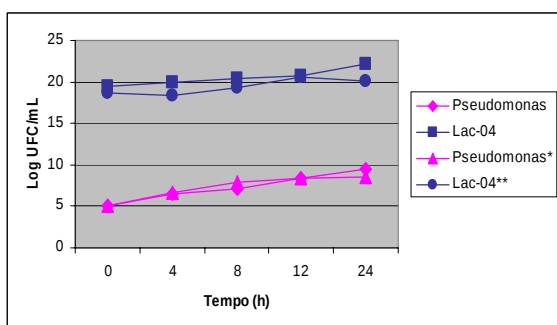
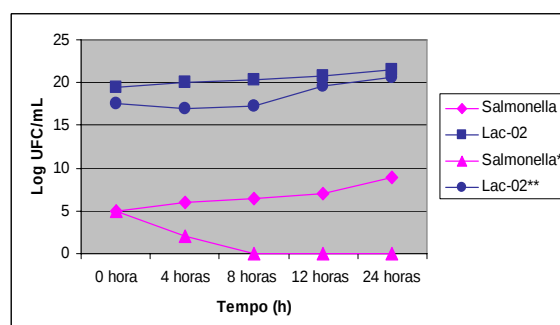
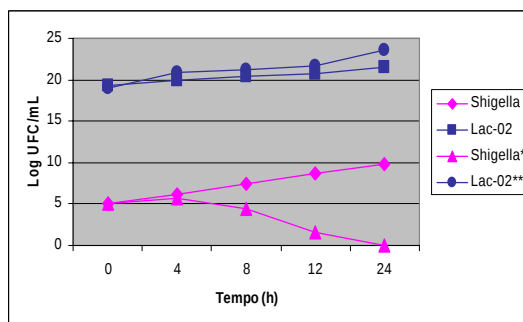
A – Crescimento de Lac-02 e *E. coli* O157:H7B – Crescimento de Lac-02 e *Listeria* spp.C – Crescimento de Lac-02 e *P. aeruginosa* ATCC 27853D – Crescimento de Lac-02 e *S. typhi*E – Crescimento de Lac-02 e *Shigella* spp.

Figura 3 – Crescimento de Lac-02 na presença de patógenos.

*Crescimento de patógeno na presença de Lactobacilos.

**Crescimento de Lactobacilos na presença do patógeno.

4.1.3 Crescimento de *L. fermentum* (Lac-03) na presença de patógenos

Observa-se na Figura 4 que a cepa *L. fermentum* Lac-03 quando crescida em caldo MRS apresentou crescimento, cuja população variou de 17,21 log UFC/mL para 20,67 log UFC/mL após 24 horas de incubação. Verifica-se ainda que a presença das cepas patogênicas não interferiu no seu crescimento.

Verifica-se ainda (Figura 4A) que o crescimento da cepa *E. coli* O157:H7, na presença de Lac-03 foi 33,78% menor, após 24 horas de incubação, quando comparado com o crescimento deste patógeno de forma isolada, demonstrando que existe uma tendência de aumento deste efeito de inibição em períodos maiores que 24 horas. No que se refere a cepa de *Listeria* spp. nota-se (Figura 4B) que Lac-03 acarretou uma diminuição de 20% em sua população após 24 horas de experimento, quando comparado com o crescimento de *Listeria* spp. isoladamente. No tocante a *P. aeruginosa* observa-se (Figura 4C) um efeito de inibição exercido pela cepa Lac-03 a partir de 8 horas de incubação promovendo uma diminuição de 36% na população deste patógeno após 24 horas de incubação. Quanto às cepas *S. typhi* e *Shigella* spp. observa-se (Figuras 4D e 4E) um efeito acentuado de inibição exercido por Lac-03 a partir do tempo inicial de incubação sendo que estas cepas foram totalmente eliminadas do meio após 8 e 24 horas de incubação, respectivamente.

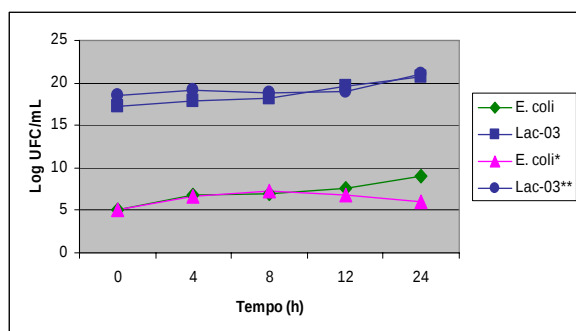
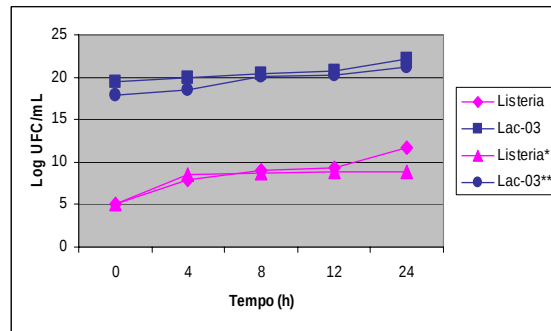
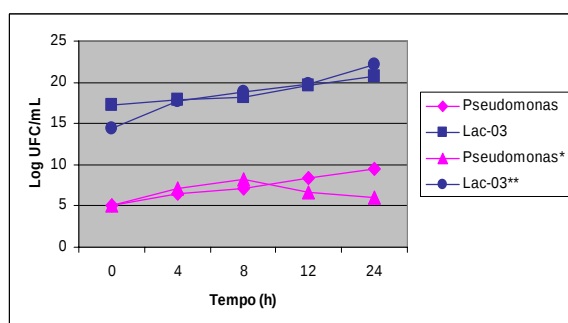
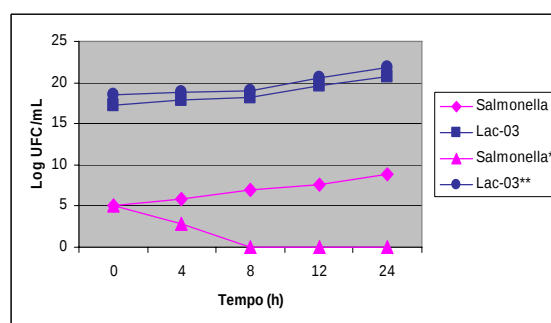
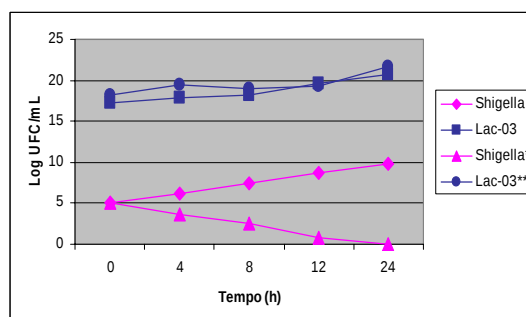
A – Crescimento de Lac-03 e *E. coli* O157:H7B – Crescimento de Lac-03 e *Listeria* spp.C – Crescimento de Lac-03 e *P. aeruginosa* ATCC 27853D – Crescimento de Lac-03 e *S. typhi*E – Crescimento de Lac-03 e *Shigella* spp.

Figura 4 – Crescimento de Lac-03 na presença de patógenos.

*Crescimento de patógeno na presença de Lactobacilos.

**Crescimento de Lactobacilos na presença do patógeno.

4.1.4 Crescimento de *L. fermentum* (Lac-04) na presença de patógenos

Analisando os resultados representados na Figura 5 verifica-se que a cepa *L. fermentum* (Lac-04) apresentou crescimento, em caldo MRS, variando de 19,48 para 22,13 log UFC/mL após 24 horas de incubação e que a presença dos respectivos patógenos não interferiu no seu desenvolvimento. Observa-se ainda que o crescimento de *E. coli* O157:H7 e *P. aeruginosa* não foi inibido por Lac-04 (Figura 5A e 5C), sendo verificado um início de inibição do crescimento de *Listeria spp* por Lac-04 a partir de 24 horas de incubação (Figura 5B). Quanto as cepas *S. typhi* e *Shigella spp.* nota-se (Figuras 5D e 5E) um efeito acentuado de inibição exercido por Lac-04 a partir do tempo inicial de incubação sendo que estas cepas foram totalmente eliminadas do meio após 8 e 24 horas de incubação, respectivamente.

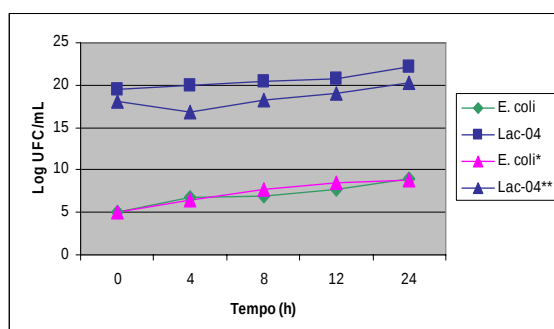
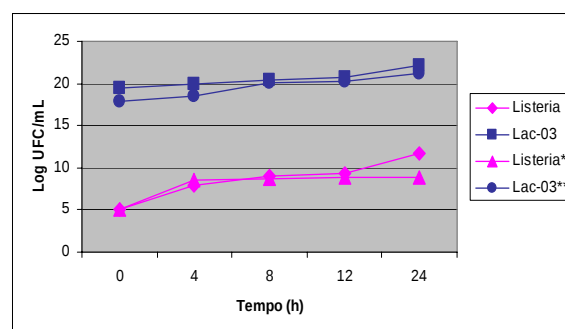
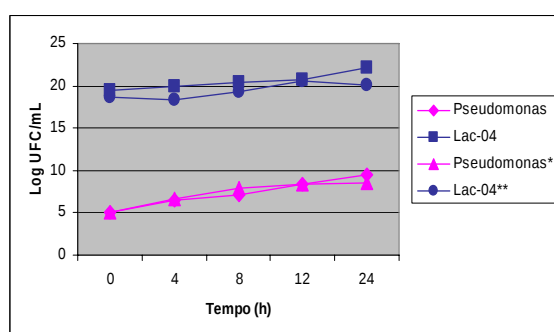
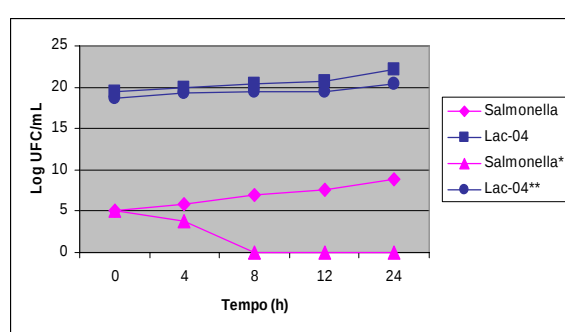
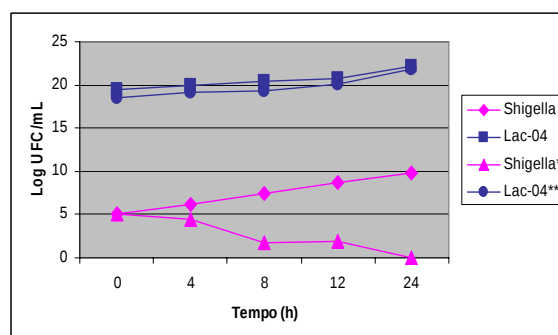
A – Crescimento de Lac-04 e *E. coli* O157:H7B – Crescimento de Lac-04 e *Listeria* spp.C – Crescimento de Lac-04 e *P. aeruginosa* ATCC 27853D – Crescimento de Lac-04 e *S. typhi*E – Crescimento de Lac-04 e *Shigella* spp.

Figura 5 – Crescimento de Lac-04 na presença de patógenos.

*Crescimento de patógeno na presença de Lactobacilos.

**Crescimento de Lactobacilos na presença do patógeno.

4.1.5 Crescimento de *L. fermentum* (Lac-05) na presença de patógenos

As curvas de crescimento representadas na Figura 6 revelam que a cepa *L. fermentum* Lac-05 apresentou crescimento correspondendo a um aumento de sua população que variou de 19,17 para 20,83 log UFC/mL, após 24 horas de incubação e que a presença dos respectivos patógenos não interferiu no seu desenvolvimento.

Observa-se nas Figuras 6A e 6B que *E. coli* O157:H7 e *Listeria* spp. não tiveram seus crescimentos inibidos por Lac-05. Por outro lado, nota-se (Figura 5C) um efeito de inibição de Lac-05 sobre o crescimento de *P. aeruginosa* a partir de 8 horas de incubação acarretando numa diminuição na população desta patógeno equivalente a 45% após 24 horas de crescimento. No que se refere as cepas *S. typhi* e *Shigella* spp. verifica-se (Figuras 6D e 6E) um efeito acentuado de inibição exercido por Lac-05 a partir do tempo inicial de incubação sendo que estas cepas foram totalmente eliminadas do meio após 12 e 24 horas de incubação, respectivamente.

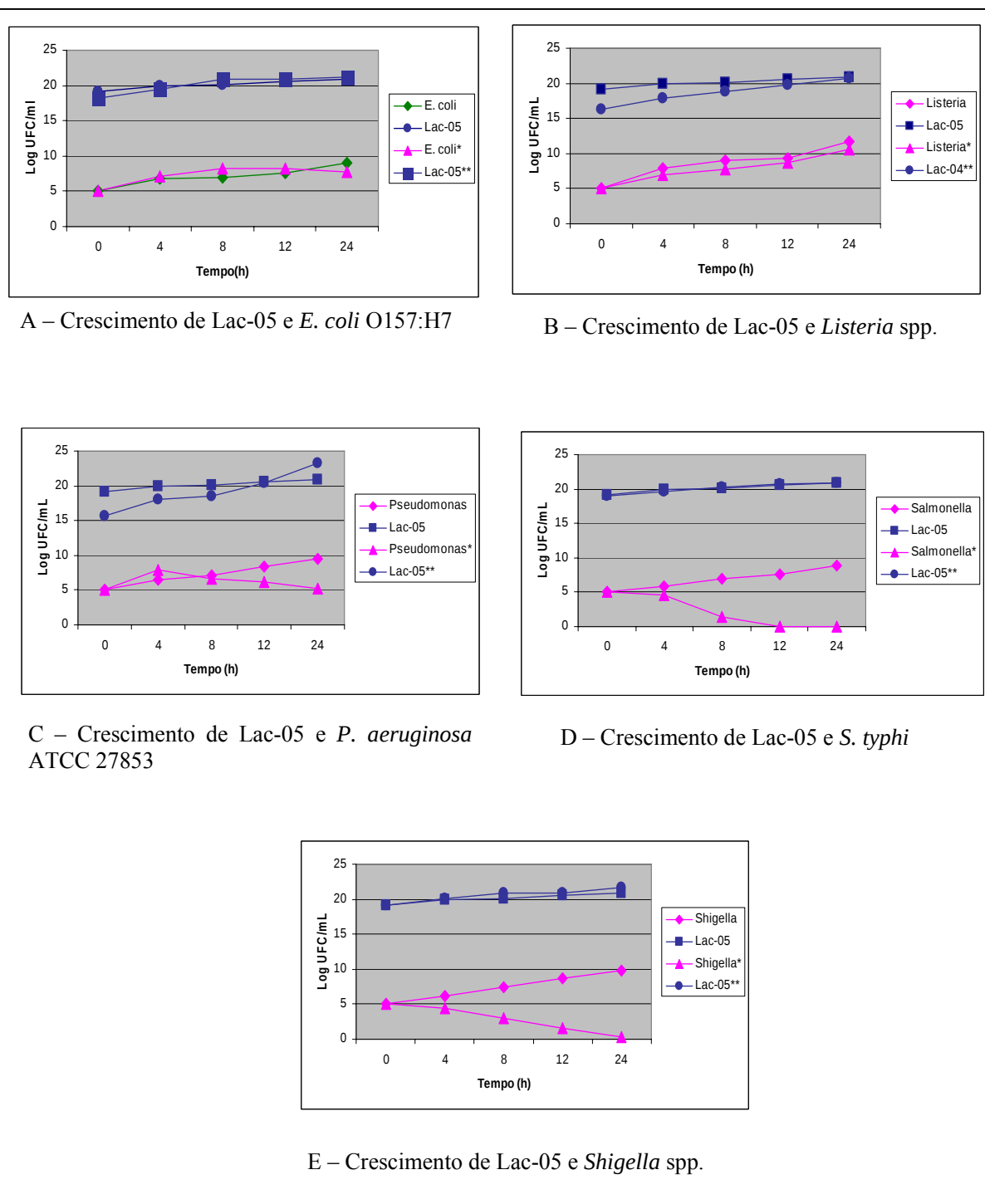


Figura 6 – Crescimento de Lac-05 na presença de patógenos.

*Crescimento de patógeno na presença de Lactobacilos.

**Crescimento de Lactobacilos na presença do patógeno.

Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho permitem observar que as cepas Lac-01, Lac-02 e Lac-03 foram capazes de inibir, em diferentes níveis, o crescimento das cepas patogênicas avaliadas, sendo este efeito mais acentuado para *S. typhi* e *Shigella* spp. Observou-se ainda que a cepa Lac-04 não apresentou efeito de inibição sobre *E. coli* O157:H7 e *P. aeruginosa*, ao passo que a cepa Lac-05 inibiu o crescimento de *P. aeruginosa*, *S. typhi* e *Shigella* spp., sendo incapaz de inibir *E. coli* O157:H7 e *Listeria* spp, nas condições estudadas. Vale destacar ainda que, em alguns casos observou-se uma tendência de inibição o que sugere que este efeito pode ser acentuado em períodos de tempo superiores a 24 horas.

O mecanismo de ação de microrganismos probióticos sobre o crescimento das espécies patogênicas não pôde ser elucidado no presente experimento, porém sabe-se que este efeito de inibição se deve, possivelmente, à síntese de peróxido de oxigênio, ácidos orgânicos de cadeia curta, bacteriocinas ou pela liberação de diacetil, CO₂ ou acetaldeído, conforme sugerido por Ouwehand (1998). Desta forma, o efeito dos ácidos orgânicos de cadeia curta pode ser descartado tendo em vista que o pH do meio foi constantemente corrigido.

No tocante ao efeito de bacteriocinas, observa-se que este não pode ser descartado uma vez que a síntese de substâncias antimicrobianas por espécies de *Lactobacillus* é mais eficaz em pH abaixo de 5,0, acarretando em aumento da solubilidade destas substâncias, ocorrendo menos agregação de peptídeos hidrofóbicos e menor imobilização de bacteriocinas na superfície celular (MESSES; DE VUYST, 2002). Neste contexto, é válido mencionar que no presente trabalho o pH do meio foi constantemente corrigido para 7,0.

Resultados semelhantes foram obtidos por DRAGO et al (1997), que verificaram o efeito de inibição de cepas de *Lactobacillus* sobre espécies patogênicas em condições semelhantes a do presente trabalho. Estes autores avaliaram o efeito de duas cepas de *L. paracasei* e uma de *L. acidophilus* sobre o crescimento de *E. coli*, *Salmonella enteritidis* e *Vibrio cholerae*. Os resultados revelaram que estas cepas de *Lactobacillus* foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli* e *S. enteritidis* após 24 e 48 horas de incubação respectivamente, ao passo que este efeito não foi observado sobre o crescimento de *V. cholerae*.

De forma similar, Pereira; Luchese; Valadão (2004), avaliaram o efeito de inibição de cepas de *L. plantarum* (ATCC 8014 e ATCC 10012), *L. fermentum* (ATCC 9398), *L. acidophilus* (ATCC 4356) e *L. casei* Shirota sobre o crescimento de *E. coli* ETEC e EPEC, em testes de cocultura. Estes autores observaram que as cepas patogênicas foram inibidas, após 24 horas de incubação a valores menores do que 1 log UFC/mL pelas células de *Lactobacillus*. Quando o mesmo experimento foi realizado na presença de filtrados de

suspensões de células de *Lactobacillus*, os autores verificaram que em meio a pH 4,0 os patógenos foram totalmente inibidos, ao passo que este efeito não foi observado em meio a pH 7,0. Desta forma, concluíram que a ação inibitória observada não se deveu à presença de ácidos orgânicos, e possivelmente a síntese de compostos antimicrobianos, como bacteriocinas.

4.2 EFEITO DE SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUZIDAS POR *Lactobacillus* SOBRE ESPÉCIES PATOGÊNICAS

A avaliação do efeito de substâncias antimicrobianas produzidos pelas diferentes cepas de lactobacilos estudadas foi testada por meio da técnica de “spot-test”, que avalia este efeito por meio da formação de halos de inibição, cujos resultados encontram demonstrados na Tabela 1.

Segundo Gonzalez et al. (2006), o efeito de inibição é considerado positivo quando o halo formado se apresentar com diâmetro maior que 2 milímetros. Desta forma, observa-se que todas as cepas de *Lactobacillus* estudadas exerceram efeito acentuado de inibição sobre os patógenos testados. Nota-se ainda que, embora tenha sido observado diferentes diâmetros nos halos de inibição entre as cepas de *Lactobacillus* sobre os patógenos, esta diferença não foi significativa ($p < 0,05$) pelo teste de ANOVA.

O fato de uma espécie ser capaz de produzir substâncias antimicrobianas, e afetar o crescimento de microrganismos de importância clínica, leva a crer que o mesmo seja uma espécie com boas características probióticas (FULLER, 1989).

A ação antimicrobiana observada pode ter sido exercida pela liberação de peróxido de hidrogênio, diacetil, CO₂, acetoaldeído, etanol ou ácidos orgânicos, como ácido láctico, ácido acético ou ácido piroglutâmico (OUWEHAND, 1998).

Espécies de *Lactobacillus* apresentam habilidade de produzir peróxido de hidrogênio durante o seu crescimento. De acordo com Daeschel (1989), o acúmulo do peróxido de hidrogênio no meio de cultura ocorre porque os lactobacilos não sintetizam a enzima catalase. Desta forma, o peróxido de hidrogênio pode reagir com outros componentes presentes no meio de cultura e formar substâncias inibidoras, como por exemplo, a reação do peróxido de hidrogênio com tiocianato, a qual é catalisada pela enzima lactoperoxidase com a formação de um composto intermediário, hipotiocinato, que apresenta ação inibitória contra algumas espécies de microrganismos. O autor enfatiza que este processo é conhecido como sistema antimicrobiano lactoperoxidase ou LP.

A membrana plasmática de microrganismos expostos ao sistema LP é a estrutura mais danificada da célula e admite-se que células de bactérias Gram positivas possam oferecer uma barreira mais efetiva contra o peróxido de hidrogênio que as Gram negativas (RIBEIRO, 1995).

Tabela 1 – Atividade antimicrobiana de substâncias produzidas pelas cepas de *Lactobacillus* contra patógenos (halos de inibição em milímetros)

	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Listeria</i> spp.	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. typhi</i>	<i>Shigella</i> spp.
<i>L. plantarum</i> Lac -01	19,3 ± 3,78	23,6 ± 4,16	18 ± 4,35	20,3 ± 7,02	17,3 ± 2,51
<i>L. plantarum</i> Lac -02	17,6 ± 6,08	19,3 ± 3,05	25 ± 2,08	20,3 ± 4,35	31,3 ± 3,60
<i>L. fermentum</i> Lac -03	17,6 ± 3,05	23,6 ± 5,03	22,3 ± 5,03	20,3 ± 9,01	22,3 ± 4,16
<i>L. fermentum</i> Lac -04	26 ± 4,61	17,6 ± 4,04	21,3 ± 10,3	18 ± 2,08	16 ± 7,76
<i>L. fermentum</i> Lac -05	21 ± 2,0	23,6 ± 4,16	22,6 ± 3,21	21,6 ± 3,05	22,6 ± 11,6

Valores médios de 3 repetições.

Para Ribeiro (1995), o peróxido de hidrogênio é a substância mais importante envolvida nesta ação antimicrobiana, uma vez que a cepa *L. acidophilus* UFV H2b20, perdeu completamente sua ação antimicrobiana quando foi tratada com catalase.

Um outro composto que pode estar envolvido na inibição dos patógenos é o diacetil (2,3-butanodiona), que é um produto do metabolismo final de bactérias ácido lácticas sendo sintetizado a partir de intermediários como o piruvato. O diacetil apresenta efeito aromatizante em produtos derivados de leite, como a manteiga. Jay (1982), demonstrou que o diacetil pode inibir bactérias Gram negativas quando presente em uma concentração de 200 µg/ml e para bactérias Gram positivas em concentração de 300 µg/ml. Este autor sugere ainda que o diacetil pode ser utilizado por indústrias alimentícias, como antimicrobiano em superfícies, pela sua alta volatilidade. Para este autor a ação do diacetil é considerada bacteriostática para bactérias Gram positivas e bactericidas para Gram negativas.

A produção de bacteriocinas tem sido verificada em bactérias ácido-láticas associadas a alimentos, incluindo representantes dos gêneros *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Pediococcus* spp. O uso de bacteriocinas pode ser considerado como uma biotecnologia com ampla aplicação em sistemas alimentares. As bacteriocinas contrastam com os antibióticos, considerados como ilegais como conservantes. As bacteriocinas sintetizadas por bactérias ácido láticas investigadas até o momento diferem em seus espectros de atividade, características bioquímicas e determinantes genéticos. Entretanto a maioria destas substâncias possui baixa massa molecular (3 a 10 KDa), alto ponto isoelétrico, e possuem regiões hidrofílicas e hidrofóbicas na sua molécula (DE MARTINIS; ALVES; FRANCO, 2002).

Os resultados do presente trabalho são semelhantes aos obtidos por Aslim et al., (2005) que determinaram a habilidade apresentada por bactérias ácido-láticas em produzir bacteriocinas com ação sobre bactérias patogênicas encontradas em alimentos. Por meio do método de difusão em ágar, com o auxílio de discos embebidos em filtrados de *Lactobacillus*, os autores observaram resultados semelhantes, que as cepas de *L. plantarum*, *L. fermentum* e *L. acidophilus*, foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus*, *E. coli* e *Yersinia enterocolitica*.

Gonzalez et al. avaliaram a ação antimicrobiana apresentada por 137 espécies de *Lactobacillus*, 125 espécies de *Lactococcus*, 58 espécies de *Leuconostoc* e 75 espécies de *Enterococcus* sobre alguns patógenos, empregando a técnica de ágar spot-test. Antes de avaliar a ação antimicrobiana, estas cepas foram tratadas com substâncias neutralizantes e com catalase, para que as ações dos ácidos orgânicos e do peróxido de hidrogênio, fossem excluídas. Ao contrário dos resultados do presente trabalho, os autores não verificaram ação inibitória de nenhuma das cepas de lactobacilos contra *Listeria monocytogenes*, com isso concluíram que as cepas de lactobacilos testadas não sintetizaram substâncias capazes de promover a morte deste patógeno.

Mishra; Prasad (2005), avaliaram cepas de *L. casei* quanto ao efeito de inibição sobre patógenos como, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Streptococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, empregando a técnica do ágar spot-test e verificaram resultados semelhantes ao do presente trabalho. Os resultados demonstraram que duas cepas apresentaram efeitos de inibição sobre *S. typhi*, sendo que *S. typhimurium* foi inibida por todas as cepas avaliadas, enquanto que *S. aureus* foi inibida apenas por uma cepa.

Maragkoudakis, et al. (2006), avaliaram a atividade antimicrobiana de 29 espécies de *Lactobacillus* sobre patógenos Gram negativos, incluindo duas cepas de *E. coli*, uma de *S. typhimurium* e quatro de *Helicobacter pylori*, por meio dos métodos de “spot-on-lawn” e

difusão em discos. Os resultados demonstraram que nenhum dos sobrenadantes das suspensões de *Lactobacillus* testados, com pH entre 4.5-6.5 inibiram o crescimento dos patógenos estudados. Quando os respectivos sobrenadantes não foram neutralizados, os autores observaram que o crescimento dos patógenos foi interrompido, concluindo que o efeito de inibição não foi exercido por bacteriocinas, e sim, provavelmente pela produção de ácidos orgânicos, resultando na redução do pH.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUZIDAS PELAS CEPAS DE *Lactobacillus*.

Estudos têm revelado que a inibição de bactérias patogênicas pode ser provocada por bacteriocinas sintetizadas pelas bactérias ácido-láticas. Estas substâncias apresentam estrutura de natureza protéica com ação bactericida. A fim de verificar se as substâncias produzidas pelas cepas de *Lactobacillus* avaliados são de natureza protéica, utilizou-se método “spot-test” modificado, conforme sugerido por De Martinis; Alves; Franco (2002). Nessa técnica, antes de se adicionar a sobrecamada de microrganismo indicador, adicionou-se individualmente ao meio de cultura, proteinase K, papaína e pepsina, além de água destilada, como controle negativo. Desta forma, quando se observa deformação dos halos de inibição, assume-se que as substâncias produzidas são sensíveis às respectivas enzimas, e desta forma podem ser consideradas de natureza proteica.

As proteases avaliadas foram proteinase K, pepsina e papaína. A proteinase K (E. C. 3.4.21.64) é uma protease endolítica, que cliva as ligações peptídicas, sendo que esta enzima é produzida pelo fungo *Tritirachium album*. No presente trabalho, observou-se que nenhuma das cepas de *Lactobacillus* testadas apresentou resultados positivos, ou seja, quando as substâncias antimicrobianas produzidas pelos lactobacilos, foram colocadas em contato com as respectivas enzimas proteolíticas, não se notou a deformação dos halos de inibição.

Desta forma, demonstrou-se que as substâncias antimicrobianas produzidas pelas cinco cepas de *Lactobacillus* foram resistentes à ação das respectivas enzimas, porém somente com estes resultados não se pode afirmar que estas substâncias não são bacteriocinas, pois muitas bacteriocinas já testadas apresentam resistência a algumas enzimas proteolíticas e sensibilidade a outras. Neste contexto, a nisina, bacteriocina produzida por *Lactococcus*, só é sensível a ação da α -quimiotripsina, sendo resistente às demais enzimas proteolíticas (KLANHAMMER, 1988).

O estudo da sensibilidade a enzimas, pode fornecer noções sobre a estrutura da molécula de bacteriocina. A sensibilidade a ação da α -amilase, indica a presença de moléculas de carboidratos na estrutura da bacteriocina, e com isso a fração glicídica seria importante para sua atividade (KEPPLER; GEISEN; HOLZAPFEL, 1994).

De Martinis; Franco (1998), estudaram a cepa *L. sake* ATCC 15521, para verificar se a mesma produzia substâncias inibidoras de origem protéica e obtiveram resultados distintos aos observados neste trabalho. Estes autores avaliaram α -quimiotripsina e água destilada esterilizada como controle negativo. Por meio do teste de spot-on-law os autores mostraram que as substâncias produzidas pelo *L. sake* ATCC 15521, foram sensíveis a enzima avaliada, sugerindo que este composto seja uma bacteriocina.

Dave; Shah (1997), avaliaram a ação de várias enzimas, proteolíticas, lipolíticas e amilolíticas, para determinar a sensibilidade das substâncias antimicrobianas produzidas por *L. acidophilus* sobre cepas patogênicas. Os autores observaram que a atividade inibitória da substância produzida por esta cepa, foi perdida após reação com as enzimas proteolíticas, como tripsina, α e β -quimiotripsina, papaína e proteinase-K. No entanto, a atividade destas substâncias não foi afetada quando expostas a ação das amilases, lipases e fosfolipases. Com isto os autores demonstraram que os compostos protéicos foram os responsáveis pela inibição dos microrganismos patogênicos.

De Martinis; Santarosa; Freitas (2003), caracterizaram o perfil de sensibilidade de substâncias antimicrobianas frente as enzimas pepsina A, proteinase K, tripsina e α -amilase. Foram estudadas seis cepas de bactérias lácticas isoladas a partir de produtos cárneos brasileiros. Os autores cultivaram as bactérias lácticas em caldo MRS e empregando uma solução enzimática esterilizada numa concentração de 10 mg/ml avaliaram a inativação das substâncias antimicrobianas produzidas pelas respectivas cepas de bactérias ácido lácticas. Foi observado que os compostos inibidores produzidos por estas cepas foram sensíveis a ação da proteinase K a tripsina e a α -amilase, porém nenhuma das substâncias inibidoras foi sensível à ação da pepsina. Desta forma, os autores concluíram que as bacteriocinas produzidas eram de natureza distintas, apresentando variação quanto à sensibilidade a proteases.

Contrastando com os resultados obtidos no presente trabalho, Bromberg et al. (2004), isolaram substâncias antimicrobianas presentes em produtos cárneos e as classificaram como bacteriocinas, uma vez que estas foram inativadas pela ação da α -quimiotripsina e pronase e somente uma bacteriocina foi resistente à tripsina, empregando-se o método de diluição crítica. Nesta metodologia as soluções de enzimas (pronase, tripsina, α -quimiotripsina,

pepsina, lipase e papaína) esterilizadas por filtração foram misturadas com as respectivas bacteriocinas na proporção 1:1 (v/v), e incubadas a 37°C/1h, e em seguida foi realizada inativação enzimática por meio de um tratamento térmico em água em ebulição, durante cinco minutos. Utilizou-se *B. cereus* CTC001 como indicadora da atividade antimicrobiana das bacteriocinas por meio da formação de zonas de inibição em ágar. Os autores observaram que a maioria das substâncias antimicrobianas forma inativadas pelas enzimas e desta foram classificadas como bacteriocinas.

4.4 INDUÇÃO DE AUTOAGREGAÇÃO E COAGREGAÇÃO

Segundo Pereira; Luchese; Valadão (2004), a coagregação é a capacidade que alguns microrganismos apresentam quando em contato com cepas de bactérias de diferentes espécies formando grupos aglutinados heterogêneos. A autoagregação é observada quando o microrganismo é capazes de formar aglutinações entre as próprias células.

Para realização do teste de autoagregação e coagregação as cepas, de *Lactobacillus* e dos patógenos, após crescimento foram lavadas três vezes com solução PBS e ressuspensas na mesma solução. Em seguida transferiu-se 0,5 ml de cada cultura para tubos eppendorf que foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C afim de se observar o fenômeno de autoagregação e coagregação, pela formação de aglutinações.

Para o teste de coagregação as cepas de lactobacilos foram testadas frente aos cinco patógenos, cujos resultados encontram-se demonstrados na Tabela 2.

Verifica-se que a cepa Lac-01 (*L.plantarum*) promoveu agregação parcial com todos os microrganismos patogênicos testados. Nota-se ainda que a cepa Lac-02 promoveu boa agregação com *E. coli*, *S. typhi* e *Shigella* spp, ao passo que com *Listeria* spp.este fenômeno foi parcial, sendo ausente com *P. aeruginosa*.. Observa-se ainda que a cepa Lac-03 não promoveu agregação com nenhum dos microrganismos patogênicos testados, sendo que a cepa Lac-04 promoveu agregação acentuada com *E. coli*., boa agregação com *S. typhi* e *Shigella* spp, e agregação parcial com *P. aeruginosa*.. No que se refere a cepa Lac-05 observa-se uma agregação acentuada com *S. typhi*, boa agregação com *E. coli* e parcial com *Shigella* spp., *Listeria* spp e *P. aeruginosa*..

No que se refere a cepa LAC-05 (*L. fermentum*) observa-se uma agregação acentuada com *S. typhi* e boa agregação com *E. coli*. Com os patógenos *Shigella* spp., *Listeria* spp e *P. aeruginosa* a agregação foi parcial.

Observa-se ainda que as cepas Lac-01, Lac-02, Lac-04 e Lac-05 foram capazes de agregar, em diferentes níveis, praticamente com todos os patógenos. A partir destes resultados pode-se sugerir que as cepas de *Lactobacillus* que demonstraram resultados positivos seriam capazes de auxiliar na inibição do desenvolvimento de microrganismos patogênicos, uma vez que por meio do fenômeno de agregação os lactobacilos impedirão os patógenos de aderirem à mucosa intestinal e assim os mesmos seriam eliminados do organismo juntamente com as fezes, através dos movimentos peristálticos intestinais (PEREIRA; LUCHESE; VALADÃO, 2004).

Tabela 2 - Capacidade de coagregação de cepas de *Lactobacillus* frente as espécies patogênicas.

	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>Listeria</i> spp.	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. typhi</i>	<i>Shigella</i> spp.
<i>L. plantarum</i> Lac -01	+	+	+	+	+
<i>L. plantarum</i> Lac -02	++	+	0	++	++
<i>L. fermentum</i> Lac -03	0	0	0	0	0
<i>L. fermentum</i> Lac -04	+++	+	+	++	++
<i>L. fermentum</i> Lac -05	++	+	+	+++	+

Legenda: 0 = sem agregação; + = agregação parcial; ++ = boa agregação; +++ = agregação acentuada; ++++ = agregação máxima.

As células que promovem o fenômeno de agregação interagem com os componentes da superfície de outras células como os ácidos lipoteicóicos, proteínas e carboidratos. Desta forma os *Lactobacillus* agregam-se a outros microrganismos e os elimina juntamente com as fezes, eliminando assim o possível patógeno do intestino. Por outro lado a coagregação aumenta a freqüência de conjugação em algumas espécies de *Lactobacillus* e *Lactococcus*, e com isso informações genéticas em nível plasmidial, como a resistência a determinados antimicrobianos, poderiam ser transferidas para os microrganismos patogênicos e assim aumentar sua patogenicidade (RENIERO et al., 1992).

A partir dos testes de autoagregação entre as cepas de lactobacilos e espécies patogênicas, cujos resultados encontram-se apresentados na Tabela 3, observa-se que todas as cepas, exceto Lac-03 e as patogênicas, foram capazes de promover autoagregação em diferentes níveis.

Drago et al (1997) avaliaram a coagregação entre cepas de *Lactobacillus* e de *E. coli*. Foram avaliadas neste experimento três cepas de lactobacillus, identificadas como B21070, B21060 e B21190 e duas cepas de *E. coli* ATCC 35401 e ATCC 25922. Os resultados revelaram que duas cepas de Lactobacilos foram capazes de coagregarem com as cepas de patógenos estudadas, sendo que esta coagregação variou de parcial a total. A cepa de lactobacilos B21070 revelou maior grau de coagregação com ambos os patógenos.

As reações de agregação envolvem uma proteína extracelular que necessita de um receptor específico na membrana das células sensíveis. Portanto pode-se sugerir que esta proteína foi produzida por todas as cepas de lactobacilos estudadas no presente trabalho, exceto LAC -03 (*L. fermentum*).

Tabela 3 – Autoagregação de cepas de *Lactobacillus* e espécies patogênicas

Microrganismos	Autoagregação
<i>L. plantarum</i> (Lac-01)	+
<i>L. plantarum</i> (Lac-02)	++++
<i>L. fermentum</i> (Lac-03)	0
<i>L. fermentum</i> (Lac-04)	++++
<i>L. fermentum</i> (Lac-05)	+++
<i>E. coli</i> O157:H7	0
<i>Listeria</i> spp.	0
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0
<i>S. typhi</i>	0
<i>Shigella</i> spp.	0

Legenda: 0 = sem agregação; + = agregação parcial; ++ = boa agregação; +++ = agregação acentuada; ++++ = agregação máxima.

De acordo com Boris; Suarez; Barbés (1997) e Garcia, (1999), a agregação ou coagregação entre lactobacilos seria causada por um peptídeo semelhante a um feromônio, que induz a síntese de proteínas na parede celular do outro lactobacilo, provocando a agregação, sendo importante na formação de biofilmes bacterianos em superfícies que impedem o acesso de microrganismos indesejáveis.

Para que as células se agregem sob a influência do fator promotor de agregação é necessária a presença de ácidos lipoteicóico ou teicóico que atuam como receptores para a proteína que promove a agregação. Estes componentes da superfície da célula foram denominados de substâncias de união e substâncias de agregação (BORIS; SUAREZ; BARBÉS; 1997; RENIERO et al., 1991; VAN DER LELIE et al., 1991).

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que::

As cepas *L. plantarum* Lac-01 ,Lac-02 e *L. fermentum* Lac-03 foram capazes de inibir, em diferentes níveis, o crescimento dos patógenos estudados.

A cepa *L. fermentum* Lac-04 inibiu o crescimento de *Listeria* spp., *S. typhi* e *Shigella* spp., enquanto que a cepa *L. fermentum* Lac-05 não apresentou efeito de inibição sobre o crescimento de *E. coli* O157:H7 e *Listeria* spp.

As substâncias antimicrobianas sintetizadas pelas cepas de *Lactobacillus* avaliadas inibiram o desenvolvimento de todos os patógenos estudados.

Os testes enzimáticos não possibilitaram constatar a natureza protéica destas substâncias o que não permite caracterizá-las como bacteriocinas.

As cepas Lac-01, Lac- 02, Lac-04 e Lac-05 foram capazes de se agregar, em diferentes níveis, com as cepas de patógenos estudadas.

A cepa Lac-02 coagregou-se à *E. coli* O157:H7, *Listeria* spp, *S. typhi* e *Shigella* spp.

A cepa Lac-03 não promoveu coagregação com os patógenos avaliados.

As cepas Lac-01, Lac-02, Lac-04 e Lac-05 apresentaram efeito positivo de autoagregação, sendo que as demais cepas avaliadas não apresentaram esta característica.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Visando um melhor entendimento sobre a ação das cepas de *Lactobacillus* avaliadas, sugere-se a realização de novos experimentos “*in vivo*”;

Avaliar as cepas que apresentaram efeito de inibição sobre os respectivos patógenos em processos de bioconservação em carnes de aves, suínos e bovinos.

Avaliar as propriedades probióticas das cepas de *Lactobacillus*, “*in vitro*”, quanto à resistência aos sais biliares, resistência à acidez estomacal e produção de bacteriocinas.

Avaliar as propriedades probióticas das cepas de *Lactobacillus*, “*in vivo*”, quanto ao efeito imunomodulador, efeito hipocolesterolêmico e adesão intestinal.

REFERÊNCIAS

- AHN, Y. T. Deconjugation os bile salts by *Lactobacillus acidophilus* isolates. **International Dairy journal**, v. 13, p. 303-311, 2003.
- ASLIM, B. et al. Determination of the bacterion-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. **LWT**, v. 38, p. 691-694, 2005.
- BARRANTEM X. et al. Evaluation of the effect of probiotic cultures added to commercial yogurt over a known population of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. **Archieve Latinoamerican Nutrition**, v. 54, n. 3, p. 293-297, 2004.
- BORBA, L. M.; FERREIRA, C. L. F. Probióticos em Leite Humano. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRÉ E PROBIÓTICOS, 1, 2003, Viçosa: (UFV). **Prebióticos e probióticos: Atualização e Prospeção**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. p. 7-33.
- BORIS, S; SUAREZ, J. E.; BARBÉS, C. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. **Journal of Applied Microbiology**. v. 83, p. 413-420, 1997.
- BROMBERG, R. et al. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibition activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 137-144, 2004.
- BUKOWSKA, H. et al. Decrease in fibrinogen and LDL-cholesterol levels upon supplementation of diet with *Lactobacillus plantarum* in subjects with moderately elevated cholesterol. **Atherolclerosis**, v. 137, p. 437-438, 1998.
- CAMPOS, L. C. *Shigella*. In: TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 1999. p. 235-238.
- CAMPOS, L. C. *Salmonella* In: TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 1999. p. 229-234.
- CAMPOS, L.C.; TRABULSI, L. R. *Escherichia*. In: TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 1999. p. 215-228.

CARLOS, I. Z. et al. Influencia de nutrientes no sistema imune: papel das citocinas, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRÉ E PROBIÓTICOS, 1., 2003, Viçosa. **Prebióticos e probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. p. 135-154.

CHARTERIS, W. P., et al. Selectiva detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. **Journal of Food Microbiology**, v. 35, p. 1-27, 1997.

CHOU, C. C.; HOW, J. W. Growth of Bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk drink during storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 113-121, 2000.

COMMANE, D. et al. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotic. **Mutation Research**, v. 591, p. 279-289, 2005.

DAESCHEL, M. A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Technology**, p. 164-167, 1989.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Characteristics of bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LA-1. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 707-715, 1997.

DE MARTINIS, E. C. P.; FRANCO, B. D. G. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 119-126, 1998.

DE MARTINIS, E. C. P. et al. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Review International**, v. 18, n. 23, p. 191-208, 2002.

DE MARTINIS, E. C. P.; ALVES, V. F.; FRANCO, B. D. G. M. Bioconservação de Alimentos: Aplicação de bactérias lácticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. **Biotechnology Ciência e Desenvolvimento**, n. 29, 114-120, 2002.

DE MARTINIS, E. C. P.; SANTAROSA, P. R.; FREITAS, F. Z. Caracterização preliminar de bacteriocinas produzidas por seis cepas de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos embalados a vácuo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 195-199, 2003.

DRAGO, L. et al. Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolated of human intestinal origin. **FEMS Microbiology Letters**, v. 153, p. 455-463, 1997.

EL-GAWAD, I. A. A., et al. The hipcholesterolaemic effect of milk yogurt and soy-yogurt containing bifidobacteria in rats fed on a cholesterol-enriched diet. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 37-44, 2005.

ERDEM, B. et al. Antimicrobial resistance patterns and sorotype distribution among *Salmonella enterica* strain in Turkey, 2000-2002. **European Journal Clinical Microbiology Infection Disease**, v. 24, n. 3, p. 220-225, 2005.

FERREIRA, C. L. L. F. Grupo de bactérias láctica - caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRÉ E PROBIÓTICOS, 1., 2003, Viçosa. **Prebióticos e probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. p. 7-33.

FIORAMONTI, J.; THEODOROU, V.; BUENO, L. Probiotics: What are they? What are their effects on gut physiology? **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, n. 5, p. 711-724, 2003.

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

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

GAGNON, M. et al. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, p. 69-78, 2004.

GOLDIN, B. R. et al. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. **Digestive Diseases and Science**, v. 37, n. 1, p. 121-128, 1992.

GONZÁLEZ, L. et al. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese thoroughput ripening and study of their antimicrobial activity. **Food Control**, p. 1-7, 2006.

GORBACH, S. L. Probiotics in the third millennium. **Digestion Liver Disease**, v. 34, p. 52-58, 2002.

GRIF, K. et al. Importance of environmental transmission in cases of EHEC O157 causing hemolytic uremic syndrome. **European Journal Clinical Microbiology Infected Disease**, v. 24, n. 4, p. 268-271, 2005.

GUARNER, J.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 360, p. 512-518, 2003.

HAMMES, W. P.; WEISS, N.; HOLZAPFEL, W. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: BALOWS, A. et al. **The Prokariotes**. New York: Springer-Verlag, 1991. p. 1535-1594.

HAVENAAR, R. ; VELD, J. H. J. Probiotics: A general view. In: WOOD, B. J. B. **The Lactic Acid Bacteria**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1992. p.151-170.

HELLER, F.; DUCHMANN, R. Intestinal Flora and mucosal immune response. **International Journal Medical Microbiology**, v. 293, p. 77-86, 2003.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's Manual of determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1994.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. Electron microscopic study of adherence properties of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal Food Science**, v. 52, p. 791-805, 1987.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Probiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p. 299-313, 2004.

JAY, J. M. Antimicrobial properties of diacetyl. **Applied Environmental Microbiology**, v. 44, 1982.

JOHANSSON, M. L. et al. Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: in vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 1, p. 15-20, 1992.

KANDLER, O.; WEISS, N. Regular, nonsporing, gram-positive rods. In: SNEATH, P. H. A. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. p.1209-1234.

KANITPUN, R.; WAGNER, G. G.; WAGHELA, S. D. Characterization of recombinant antibodies developed for capturing enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **Southeast Asian Journal Tropical Med. Public Health**, v. 35, n. 4, p. 902-912, 2004.

KAUR, N.; GUPTA, A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition. **Journal Bioscience**, v. 27, p. 703-714, 2002.

KEPPLER, K.; GEISEN, R.; HOLZAPFEL, W. H. An a amilase sensitive bacteriocin of *Leuconostoc camosum*. **Food Microbiology**, v. 11, p. 39-45, 1994.

KLANHAMMER, T. R. Bacteriocin of lactic acid bactéria. **Biochimic**, v. 70, p. 337-349, 1988.

KONEMAN, , E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 5. ed. São Paulo: Medsi. 2001. 586 p.

KOOP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and Theraupeutic: Uses os Probiotics – A review. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 101, n. 2, p. 229.241, 2001.

LACIR, A. L. et al. Symptomatic hydrocephalus in a newborn infected with *Listeria monocytogenes*. **Brazilian Journal of Microbiaology**, v. 31, n. 1, p. 09-11, 2000.

LEBLANC, J.; FLISS, I.; MATAR, C. Induction of humoral immune response following an *Escherichia coli* O157:H7 infection with an immunimodulatory peptidic fraction derived from *Lactobacillus helveticus*-fermented milk. **Clinical Diagnostic Lab. Immunology**, v. 11, n. 6, p. 1171-1181, 2004.

LELIE, D. et al. Identification os a new genetic determinant for cell aggregation associated with lactose plasmid trasfer in *Lactococcus lactis*. **Applie and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 201-206, Jan. 1991.

MACHADO, D. F. et al. Efeito de probiótico na modulação nos níveis de colesterol sérico e no peso do fígado de ratos alimentados com dieta rica em colesterol e ácido fólico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 3, p. 270-275, 2003.

MARAGKOUidakis, P. A., et al. Probiotic potencial of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 189-199, 2006.

MARTEAU, P.; SEKSIK, P.; JIAN, R. Probiotics and health: new facts and ideas. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 486-489, 2002.

MESSES, W.; DE VUYST, L. Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 31-43, 2002.

MISHRA, V.; PRASAD, D. N. Application of in vitro methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potencial probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 109-115, 2005.

NIYOGI, S. K. Shigellosis. **Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 133-143, Abril, 2005.

O'SULLIVAN, M. G. et al. Probiotic bacteria: myth or reality? **Trends in Food Science e Technology**, v. 3, p. 309-314, 1992.

OUWEHAND, A. C. Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. In: Salminen, S. J. Vonwright A., Ed. **Lactic Acid Bacteria**. Microbiology. New York: Marcel Dekker, 1998.

PEREIRA, C. A. S.; LUCHESE, R. H.; VALADÃO, R. C. Potencial probiótico de linajes de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum*. **Alimentaria**, p. 53-59, 2004.

PINTO, M. G. V. et al. *Lactobacillus* spp. in vitro probiotics properties from humam faecesand traditional fermented products. **International Journal of Food Microbiology**, p. 1-10, 2006.

RAFTER, J. Probiotics and color cancer. **Best Praticce & Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, p. 849-859, 2003.

RAUTARA, S.; KALLIOMAKI, M.; ISOLAURI, E. New therapeutic strategy for combating the increasing burden of allergic disease: Probiotic – a nutrition, allergy, mucosal immunology and intestinal microbiota (NAMI) research group report. **Journal allergy clinical immunological**, p. 1-7, 2005.

REID, G. et al. Lactobacillus inhibitor production against *Escherichia coli* and coaggregation ability with uropathogens. **Canadian Journal Microbiology**, v. 34, p. 344-351, 1988.

RENIERO, R. et al. High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promotion factor. **Journal of General Microbiolgy**, v. 138, p. 763-768, 1992.

RIBEIRO, M. A. 1995. **Aspectos da produção de peróxido de hidrogênio e inibição de bactérias por *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. 1995. 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, MG. 1995.

RODRIGUEZ-AVIAL, I. et al. Trends in nalidixic acid resistance in nontyphoidal Salmonella isolates from 1999 to 2002: decreased susceptibility to 6 fluoroquinolones. **Diagnostic Microbiological Infection Disease**, v.11, 2005.

ROSTAGNO, H. S. et al. Utilização de probióticos e prebióticos em aves. In: FERREIRA, C. L. L. F. **Prébióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. p.181-202.

SAAD, S. M. I. Probiótico e prebiótico: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-13, 2006.

SALINAS, I. et al. Dietary administrations of *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune response. **Fish e Selfish Immunology**, v. 19, p. 67-77, 2005.

SANDERS, M. E. Effect of consumption of lactic culture on human health. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 37, p. 67-130, 1993.

SANTOS, F. L.; FERREIRA, C. L. F.; COSTA, N. M. B. Modulação da colesterolemia por meio de prebióticos e probióticos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRÉ E PROBIÓTICOS, 1., 2003, Viçosa. **Prébióticos e probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. p. 61,78.

SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C. V. Epidemiology of human listeriosis. **Clinical Microbiology Rev.**, v. 4, p. 160-183. 1991.

SILVA, C. H. P. M. **Bacteriologia: um texto ilustrado**. Teresópolis: Ed. Eventos, 1999, 531 p.

SILVA, L. L.; STAMFORD, T. L. M. Alimentos probióticos: uma revisão. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 68/69, p. 41-50, 2000.

SOUZA, D. F. M. et al. Translocação de *Lactobacillus acidophilus* em ratos alimentados com dieta rica em colesterol e ácido cólico suplementada com probiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 522-526, 2004.

STATON, C. et al. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 198-203, 2005.

SULLIVAN, A.; NORD, C. E. The place of probiotics in human intestine infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 20, p. 313-319, 2002.

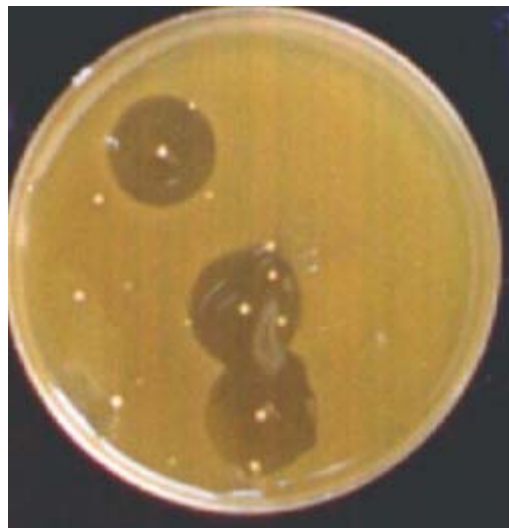
TESHIMA, E. Aspecto terapêutico de probióticos, prebióticos e simbióticos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE PRÉ E PROBIÓTICOS, 1., 2003, Viçosa. **Prebióticos e probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2003. p. 61-78.

VAN DER LELIE D; CHAVARRI, F; VENEMA, G; GASSON, M. J. Identification of a new genetic determinant for cell aggregation associated with lactose plasmid transfer in *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 201-206, 1991.

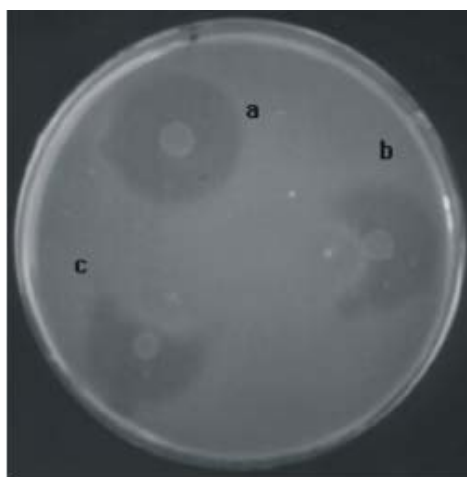
WALLACE, R. J.; NEWBOLD, C. J. Influence of *Yucca shidigera* extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1762-1767, 1992.

WEESE, J. S.; ANDERSON, M. E. C. Preliminary evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG, a potential probiotic in dogs. **Canadian Veterinary Journal**, v. 43, p. 771-774, 2002.

APÊNDICES



Apêndice A – Zonas de inibição observadas em placas de ágar MRS.
Fonte: De Martinis; Franco; 2002.



Apêndice B – Teste de sensibilidade a proteases utilizando *Lactobacillus sake*.
a-adição de 20 μ l de água destilada estéril; b-adição de 20 μ l de protease; c-adição 20 μ l de α -quimiotripsina.
Fonte: De Martinis; Franco; 2002.