



**LUIZ GUSTAVO DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE CEPAS  
ISOLADAS DE AZEITONA “IN NATURA” E  
FERMENTADAS NATURALMENTE**

**LAVRAS - MG**

**2019**

**LUIZ GUSTAVO DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE CEPAS ISOLADAS DE  
AZEITONA “IN NATURA” E FERMENTADAS NATURALMENTE**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Federal de Lavras, como parte  
das exigências do Curso de Nutrição, para  
a obtenção do título de Bacharel.

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias

Orientador

Profa. Dra. Sabrina Carvalho Bastos

MSc. Luara Aparecida Simões

Co-orientadoras

**LAVRAS - MG**

**2019**

# SUMÁRIO

ABSTRACT .....	6
RESUMO .....	7
<b>Palavras-chave:</b> Bactérias ácido-láticas, probióticos, adesão CACO-2/ HT-29 .....	7
1 INTRODUÇÃO .....	9
2 OBJETIVO GERAL .....	10
3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10
4 REVISÃO DE LITERATURA .....	10
<b>4.1 Probióticos</b> .....	10
Tabela 1 - Lista de critérios de elegibilidade de benefícios probióticos .....	11
Tabela 2 - Linhagens de microrganismos avaliadas pela ANVISA para inclusão na lista de probióticos autorizados .....	12
Tabela 3 - Principais probióticos comercializados .....	13
<b>4.2 Efeito de cepas probióticos à saúde do hospedeiro</b> .....	14
Tabela 4 - Microrganismos e sua relevância clínica .....	15
<b>4.3 Mecanismo de ação probiótica</b> .....	16
<b>4.4 ALIMENTOS FUNCIONAIS: probióticos</b> .....	19
<b>4.5 ADERÊNCIA MICROBIANA: principal alegação da capacidade probiótica</b> .....	20
<b>4.6 Resistência a baixo pH e tolerância a sais biliares</b> .....	22
<b>4.7 Coagregação e Autoagregação</b> .....	22
5 MATERIAIS E MÉTODOS .....	23
<b>5.1 Obtenção das estirpes de bactérias</b> .....	23
Tabela 5 - Identificação dos microrganismos isolados a partir das cultivares <i>GRAPPOLO 541</i> e <i>ASCOLANO</i> promissores nos testes iniciais.....	23
<b>5.2 Análises microbiológica</b> .....	23
<b>5.3 Seleção de microrganismos potencialmente probióticos</b> .....	24
<b>5.4 Teste de tolerância a baixo pH</b> .....	24
<b>5.5 Avaliação de tolerância aos ácidos biliares</b> .....	24
<b>5.6 Avaliação da capacidade de autoagregação e coagregação</b> .....	25
<b>5.7 Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade de adesão em células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2 e HT-29)</b> .....	26
<b>5.8 Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade de exclusão das estirpes potencialmente probióticas à <i>Salmonella enteritidis</i> s64</b> .....	27

6	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
6.1	Teste de tolerância ao baixo pH e ácidos biliares.....	27
6.2	Avaliação da capacidade de autoagregação e coagregação .....	31
6.3	Teste de adesão <i>in vitro</i> das estirpes potencialmente probióticas .....	32
6.4	Teste de exclusão <i>in vitro</i> das estirpes potencialmente probióticas .....	34
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	36
8	AGRADECIMENTOS.....	37
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	38

**AVALIAÇÃO DO POTÊNCIAL PROBIÓTICO DE CEPAS ISOLADAS DE AZEITONA “IN  
NATURA” E FERMENTADAS NATURALMENTE**

**Luiz Gustavo dos Santos<sup>I\*</sup>; Luara Aparecida Simões<sup>II</sup>; Dr. Disney Ribeiro Dias<sup>III</sup>; Dra. Sabrina  
Carvalho Bastos<sup>IV</sup>; Dirceu de Sousa Melo<sup>V</sup>**

<sup>I</sup>Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

<sup>II</sup>Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

<sup>III</sup>Departamento de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

<sup>IV</sup>Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

<sup>V</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

\*Autor correspondente: Luiz Gustavo dos Santos, [gustavosantos.nutri@gmail.com](mailto:gustavosantos.nutri@gmail.com), +5535991360674

## ABSTRACT

The present work was designed to analyze and identify probiotics in lactic acid bacteria (BAL) isolated from olives. To perform test works that simulate as conditions of the gastrointestinal tract (TGI) to evaluate 06 selected probiotic applications, belonging to the genus *Lactobacillus*. We eliminated 06 BALs as which were submitted to the survival test at pH 2.0, all promising results obtained and were selected to proceed with the analyzes. These were identified as *Lactobacillus pentosus* (CCMA 1768); *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1771); *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1774); *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1770); *Lactobacillus brevis* (CCMA 1766); *Lactobacillus brevis* (CCMA 1762) as well as positive control LBC-81: *Lactobacillus paracasei*. *Lactobacillus brevis* (CCMA 1762) showed higher resistance at low pH 11.15 (Log. CFU / ml) followed by *Lactobacillus pentosus* (CCMA 1768) and *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1771) which showed the same count 9.88 (Log. CFU / ml). m) For assessment of bile salt tolerance *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1774), higher bile salt tolerance (0.3%) at a count of 10.64 (Log. CFU / ml) followed by); *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1771) counting 10.44 (Log. CFU / ml) and *Lactobacillus brevis* (CCMA 1762) counting 10.36 (Log. Ufc / ml). *Lactobacillus brevis* (CCMA 1762) showed satisfactory results only for the coagulation test (62%), *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1770) and *Lactobacillus pentosus* (CCMA 1768), satisfactory results for both self-aggregation and coaggregation tests. *Lactobacillus brevis* (CCMA 1762) has high adhesion percentages for the CACO-2 (17.86%) and HT-29 (55.00%), *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1774) and *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1771) cell lines and obtain satisfactory results for adherence to CACO-2. In contrast *Lactobacillus brevis* (CCMA 1762) presents undesirable pathogen exclusion ability in CACO-2 models, while for model HT-29 it shows satisfactory results, *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1771) shows the best results for CACO-2 as for HT-29. The numbers show promising results when tested against medium acidification, bile salt tolerance, self-aggregating and coaggregating capacity. Characteristics required by current legislation for probiotic capacity claims.

**Key words:** Lactic acid bacteria, probiotics, adhesion CACO-2 / HT-29

---

## RESUMO

O presente trabalho foi elaborado com o objetivo de analisar e identificar capacidades probióticas em bactérias ácido-láticas (BAL) isoladas de azeitonas. Para realização do trabalho foram executados testes que simulam as condições do trato gastrointestinal (TGI) para avaliação de 06 potenciais probióticos selecionados, pertencentes ao gênero *Lactobacillus*. Avaliou-se 06 BALs as quais foram submetidas ao teste de sobrevivência em pH 2,0, todas obtiveram resultados promissores e foram selecionadas para prosseguir com as análises. Estas foram identificadas como *Lactobacillus pentosus* (CCMA 1768); *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1771); *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1774); *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1770); *Lactobacillus brevis* (CCMA 1766); *Lactobacillus brevis* (CCMA 1762) bem como controle positivo LBC-81: *Lactobacillus paracasei*. *Lactobacillus brevis* (CCMA 1762) apresentou maior resistência em pH baixo 11,15 (Log. UFC/ ml) seguido pelas *Lactobacillus pentosus* (CCMA 1768) e *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1771) que demonstraram a mesma contagem 9,88 (Log. UFC/ m). Para avaliação de tolerância a sais biliares *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1774) apresentou maior tolerância aos sais biliares (0,3%) numa contagem de 10,64 (Log. UFC/ ml) seguida por ); *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1771) com a contagem 10,44 (Log. UFC/ ml) e *Lactobacillus brevis* (CCMA 1762) com a contagem 10,36 (Log. ufc/ ml). *Lactobacillus brevis* (CCMA 1762) demonstrou resultados satisfatórios apenas para o teste de coagregação (62%), *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1770) e *Lactobacillus pentosus* (CCMA 1768) apresentaram resultados satisfatórios tanto para os testes de autoagregação como coagregação. *Lactobacillus brevis* (CCMA 1762) apresentou elevados percentuais de adesão para linhagem celular CACO-2 (17,86%) e HT-29 (55,00%), *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1774) e *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1771) obtiveram resultados satisfatórios para adesão em CACO-2. Em contrapartida *Lactobacillus brevis* (CCMA 1762) apresentou capacidade indesejável para exclusão de patógenos em modelos CACO-2, já para o modelo HT-29 demonstra resultados satisfatórios, *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1771) demonstrou os melhores resultados tanto para exclusão em CACO-2 como para HT-29. Os isolados demonstram resultados promissores quando testados frente a acidificação do meio, tolerância a sais biliares, capacidade autoagregativa e coagregativa. Características estas exigidas pela legislação vigente para alegação de capacidade probiótica.

**Palavras-chave:** Bactérias ácido-láticas, probióticos, adesão CACO-2/ HT-29

---

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de microrganismos probióticos tem conquistado novos aspectos em sua aplicabilidade, principalmente, no setor de saúde e bem estar, em função da maior demanda por alimentos saudáveis e com apelo funcional. Os benefícios dos probióticos à saúde humana e animal vêm sendo provados em centenas de pesquisas científicas [1] e, seu apelo, antes limitado a obtenção de novas características tecnológicas em produtos alimentícios, passa por um processo de ressignificação.

Na atualidade, as principais cepas comercializadas com esse apelo são, originalmente, isoladas de amostras de fezes humanas de forma a maximizar a probabilidade de compatibilidade com a microbiota intestinal e melhorar suas chances de sobrevivência a esse ambiente [2]. Entretanto, tal metodologia não é capaz de replicar a gama colônica encontrada no trato gastrointestinal do hospedeiro. Haja vista, que a relação ecológica entre tais organismos remonta uma origem longínqua, visto que a colonização intestinal começará durante o parto e, posteriormente, outros microrganismos serão introduzidos juntamente com os primeiros alimentos [3]. No que concerne a tal diversidade, deve-se considerar as inúmeras sucessões ecológicas microbianas nas quais temos envolvidas mais que 400 espécies bacterianas [1] fato este que corrobora com a grande dificuldade na obtenção de um inóculo similar.

Por vários anos, pesquisadores têm tentado fazer o isolamento, a identificação e a caracterização dos microrganismos existentes no intestino humano o que, contudo, é um processo extremamente difícil [3], considerando que cerca de 70% de seu microbioma é caracterizado por bactérias não passíveis de cultivo [4].

A limitada variabilidade de gêneros microbianos isolados de fezes humanas diminui o potencial dos efeitos benéficos apresentados por um ecossistema intestinal diversificado, haja vista a complexa relação simbiótica entre microrganismos e seu hospedeiro. Nesse contexto, torna-se evidente a necessidade em descobrir novas fontes alimentares capazes de fornecer tal abundância.

Alimentos fermentados podem servir de matriz para microrganismos potencialmente probióticos, pois, em geral, nestes alimentos são identificadas cepas que naturalmente colonizam o intestino humano sem causar risco à saúde. A obtenção de cepas com origem não láctica apresenta-se como alternativa promissora, pois a disponibilidade de alimentos fermentados naturalmente é extensa, de baixo custo e fácil obtenção.

As pesquisas contemporâneas tem se enveredado para elucidação das especificidades de estirpes já tidas como probióticas, bem como a busca por novos microrganismos e suas respectivas funções no combate e controle de doenças gastroentéricas. É incontestável que a grande vantagem da terapia com probióticos é a ausência de efeitos secundários, como a seleção de bactérias resistentes [5].

É nesse sentido que a descoberta de novos reservatórios microbianos de fontes não lácteas é extremamente positiva. Pois, tais estirpes têm demonstrado habilidades probióticas em estudos “in vitro”, portanto, alimentos fermentados tradicionais constituem reservatórios para pesquisa por novas cepas [2].

## 2 OBJETIVO GERAL

Esse trabalho tem como objetivo avaliar *in vitro* a capacidade potencialmente probiótica de bactérias lácticas isoladas de azeitona *in natura* e azeitonas fermentadas.

## 3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Incubar os isolados em condições que simulem as adversidades do TGI avaliando: tolerância a baixo pH e sais biliares, bem como capacidade de auto e coagregação;
- II. Testar a capacidade de adesão, *in vitro*, às monocamadas de linhagens celulares CACO-2 e HT-29;
- III. Co-incubar os isolados microbianos potencialmente probióticos com cepas patogênicas em modelos de linhagens celulares CACO-2 e HT-29 avaliando sua capacidade de exclusão à patógenos.

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Probióticos

O termo probiótico, de origem grega “para a vida”, caracteriza o grupo de microrganismos vivos não patogênicos que, administrados em quantidade adequada, conferem melhoras ao microbioma intestinal acarretando benefícios à saúde de seu hospedeiro [6]. Esse termo foi designado para abarcar os diversos grupos de microrganismos com ação benéfica à saúde humana e animal, entre seus representantes pode-se destacar estirpes dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Pedococcus* e algumas leveduras [1]. Dos quais, a maioria em uso são classificadas nos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* [7] ambos contemplam o grupo funcional de bactérias ácido-láticas. O gênero de *Lactobacillus* é representado por microrganismos (M.O.s) anaeróbicos facultativos, gram-positivos e normalmente colonizam o intestino delgado, já o gênero *Bifidobacterium* é composto por M.O.s aeróbicos estritos ou anaeróbicos corados pela técnica de GRAM, encontrados no cólon. O principal aspecto que garante ao microrganismos a atribuição de benéfico à saúde de seu hospedeiro é que, em geral, estes não produzem toxinas a partir da fermentação de carboidratos.

O crescimento e sobrevivência de microrganismos probióticos são afetados diretamente por características de seu reservatório, ou seja, a matriz em que se encontra inoculado. Nesse sentido, deve-se considerar fatores como: conteúdo de gorduras, tipo de proteínas e carboidratos, bem como o pH. De forma geral, os produtos lácteos são as matrizes mais utilizadas pela indústria, contudo produtos fermentados de origem não láctea vêm sendo cotados para tal finalidade.

A diversidade microbiana capaz de beneficiar à saúde humana é uma questão que demanda empenho da comunidade científica, visto que existe uma gama incalculável de estirpes com tal potencial e que necessitam de identificação. Considerando que cada estirpe possui um padrão peculiar de ação é preciso conhecer profundamente seus mecanismos de atuação. Por certo, diferentes estirpes da mesma espécie são sempre únicas e podem apresentar: áreas distintas de aderência (sítio-específico), efeitos imunológicos específicos e distintas ações em uma mucosa saudável e inflamada[1].

É válido ressaltar que a biota colônica do trato gastrointestinal (TGI) humano sofre sucessões ecológicas conforme a fase de vida do indivíduo. Sendo que os *Lactobacillus* são os primeiros componentes até que o lactente comece a ingerir alimentos sólidos [8]. Tais sucessões são influenciadas por fatores extrínsecos (ambientais) e intrínsecos (genéticos, imunes, entre outros) sendo que os primeiros são completamente moduláveis e onde os probióticos apresentam promissores benefícios[9].

Para seleção de uma nova cepa assegurando o conceito e a segurança é imprescindível o isolamento e identificação das estirpes com rigor, caso contrário pode-se acarretar quadros infecciosos e até a morte de seu hospedeiro. A fim de resguardar o consumidor a comunidade científica internacional tem exigências para garantir a segurança alimentar (S.A.) para aplicação de probióticos. Nos Estados Unidos da América foi proposto o status de segurança (Generally Recognised As Safe - GRAS) pela Food and Drug Administration (FDA) respaldando a utilização do mesmo.

No território brasileiro, o órgão responsável por regulamentar questões concernentes à temática é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária conforme trata a Resolução da Diretoria Colegiada nº 33 em seu inciso 3.4.3 onde apresenta que cada caso deve ser avaliado individualmente.

Além de garantir a S.A. é indispensável aplicar parâmetros que assegurem a efetivação dos benefícios das estirpes sendo, portanto, compulsório o cumprimento de pré-requisitos conforme demonstrado na Tabela 1

Tabela 1 - Lista de critérios de elegibilidade de benefícios probióticos

Adaptado de Soccol et al [1].	Adaptado de Gonçalves e Nogueira [6].
<p>Apresentar atividade antimicrobiana  Inibir adesão de patógenos  Tolerante aos aditivos alimentares  Ser estável na matriz alimentar</p>	<p>Ter origem humana  Resistir ao processamento  Aderir-se à célula epitelial  Persistir no trato gastrointestinal  Não ser patogênico  Influenciar atividade metabólica local  Ser estável e permanecer viável após a exposição aos sucos digestivos</p>

Fonte: adaptado de soccol et al [1] e gonçalves e noqueira [6].

Em vista da complexidade do tema e a crescente exploração mercadológica é evidente a demanda por uma legislação específica e, ao mesmo tempo, um órgão responsável pela fiscalização. Nesse sentido, a ANVISA expediu uma lista de estirpes avaliadas (Tabela 2).

Tabela 2 - Linhagens de microrganismos avaliadas pela ANVISA para inclusão na lista de probióticos autorizados

Estirpe	Varição
<i>Bacillus coagulans</i>	GBI-30
<i>Bifidobacterium lactis</i>	HN019
<i>Bifidobacterium</i>	BL-04
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA-14
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NCFM
<i>Lactobacillus casei</i>	LC-11
<i>Lactobacillus paracasei</i>	LPC-37
<i>Lactobacillus reuteri</i>	DSM 17938

Fonte: adaptado de ANVISA [10].

Com a crescente demanda de mercado a indústria tem comercializado diversos suplementos probióticos, conforme apresentado na Tabela 3, tendo em vista atender um segmento de mercado. A priori, os probióticos foram introduzidos no mercado por meio de alimentos convencionais, entretanto, seu consumo se expandiu na forma de suplementos[10], tal ascensão é explicitada nos dados obtidos em uma recente análise do mercado global de probióticos que estima um crescimento de 7% anualmente com estimativa financeira de 48 bilhões de dólares nos próximos cinco anos [11].

Tabela 3 - Principais probióticos comercializados

Nome	Lactobacillus	Bifidobactérias	Outros	UFC/ cápsula	Posologia
Life flora	<i>L. acidophilus</i> ; <i>L. paracasei</i> subsp <sup>paracasei</sup>	<i>B. lacti</i> ; <i>B. longum</i>	<i>S. termophilus</i>	5 bilhões	Adultos: 1 cápsula 3x dia nos 1 <sup>os</sup> 4 dias e 1 ao dia depois
Multidophils	<i>L. acidophilus</i> <i>L. bulgaricus</i>	<i>B. bifidum</i>	-	5 bilhões	-
Vital Imune	<i>L. rhamnosus</i> ; <i>L. casei</i> <i>L. acidophilus</i>	<i>B. longum</i>	-	3 bilhões	Adultos: 1 a 2 cápsulas/dia
Vital plex	<i>L. acidophilus</i> <i>L. rhamnosus</i>	<i>B. bifidum</i> ; <i>B. lactis</i>	-	2,5 bilhões	Adultos: 1 cápsula/dia
Lactofos	<i>L. casei</i> ; <i>L. rhamnosus</i> <i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	FOS 6g	4 bilhões	Adultos/crianças:>de 2anos: 1 a 2 saches/dia; crianças<2anos: ½ a 1/dia
Symbiofort	<i>L. acidophilus</i> ; <i>L. casei</i> <i>L. lactis</i>	<i>B. bifidum</i>	-	4 bilhões	Adultos: 1 a 2 saches/dia
Lactivos	<i>L. acidophilus</i>	-	Vitamina B1 (0,9mg); Vitamina B2 (1,1mg); Vitamina B6 (1,1mg); Vitamina C (45mg); Cálcio quelado; fibra (6,89 g) e Magnésio quelado (120 mg)	1 bilhão	1 a 3 saches de 7,5g/dia durante 10 dias
Lacto b	<i>L. paracasei</i>	<i>B. lactis</i>	Fibra 0,9g	2 bilhões	Adultos/crianças:> 2 anos: 1 a 2 saches/dia; crianças<2 anos: ½ a 1/dia
Lactopro	<i>L. paracasei</i> ; <i>L. rhamnosus</i> <i>L. acidophilus</i>	<i>B. lactis</i>	Fibra 0,9g	3 bilhões	Adultos/crianças:>2anos: 1 a 2 saches/dia; crianças<2anos: ½ a 1/dia

Fonte: ANVISA [12].

## 4.2 Efeito de cepas probióticas à saúde do hospedeiro

Associar probióticos e prebióticos -simbiontes- tem se apresentado como uma tendência positiva para humanos, entretanto, é necessário identificar combinações adequadas entre estes para que possamos obter os efeitos clínicos desejados. Como já mencionado neste trabalho, cada estirpe age de maneira diferente em seu alvo a depender do método de processamento empregado, matriz de veiculação e dosagem tendo ação direta nos mecanismos de ação dos microrganismos [13].

Por exemplo, um probiótico (conjugado a um prebiótico) foi capaz de reduzir significativamente quadros de sepse em crianças, enquanto que uma formulação diferente falhou em prevenir enterocolite necrotizante em bebês prematuros [14].

Diversos probióticos têm demonstrado cientificamente influência na composição e atividade da microbiota intestinal tendo efeitos benéficos para o hospedeiro por prevenir ou reduzir a duração de algumas infecções gastrointestinais [15].

Ademais, vêm exibindo promissor potencial para o tratamento e prevenção de alergias, síndrome do intestino irritável, diarreia virais, constipação, imunomodulação e promoção da saúde oral [7]. Visto o exposto, devemos considerar que o campo de microbiologia clínica tem diversas indagações a despeito do tema, contudo é irrefutável que probióticos têm papel fundamental para metabolização de fatores nutricionais assim como para modulação do sistema imunitário de seu hospedeiro, bem como modular diversos fatores fisiológicos. Além de participar do processo final de digestão e absorção de alimentos, as bactérias presentes no intestino também são essenciais para o correto funcionamento do sistema imunológico [16]. Alguns efeitos identificados à saúde de hospedeiros humanos foram relacionados na Tabela 4.

A manutenção do ambiente intestinal, microbiologicamente, homeostático e saudável, conforme já mencionado, potencial benefício ao hospedeiro inclusive no combate e prevenção de doenças, bem como para melhora de funções fisiológicas [17]. Alvo de diversas linhas de pesquisa, o microbioma intestinal tem relevantes evidências clínicas que corroboram positivamente para sua utilização como as apresentadas na Tabela 4. Sendo, portanto, fundamental o estabelecimento de correlações clínicas entre as cepas utilizadas e o combate de doenças para que possamos apresentar uma diretriz de utilização assim como já está disponível para outras condutas em saúde.

Tabela 4 - Microrganismos e sua relevância clínica

MICROORGANISMO/ GÊNERO	AÇÃO	REFERENCIA
<i>Bifidobacterium</i>	Redução dos níveis de colesterol total pela diminuição do colesterol LDL e aumento ligeiro de HDL.	Santos, A. C. A.[9]
<i>L. plantarum</i>	Prevenção de septicemia em pacientes com pancreatite aguda.	Gill, H S [18]
<i>L. casei</i>	Apresenta efeito antiinflamatório reduzindo o perfil de marcadores inflamatórios teciduais levando a alterações no perfil de linfócitos residentes.	Gill, H S [18]
	Tem capacidade de indução de uma resposta Th1.	M., Claudia et. al. [17]
<i>Lactobacillus GG</i>	Reduz a resposta inflamatória.	Gill, H S [18]
<i>L. rhamnosus 19070-2</i> <i>L. reutri</i> DSM 122460	Melhoram quadros de Eczema.	Gill, H S [18]
<i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>L. rhamnosus GG</i> isolados ou combinados a: <i>L. acidophilus e</i> <i>L. bulgaricus</i> ; <i>L. acidophilus e</i> <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>L. acidophilus e</i> <i>Bifidobacterium infantis</i> .	Redução da incidência de diarreias por antibióticoterapia em indivíduos hospitalizados.	González-molero, G OlveiraFuster I [19]
<i>L. acidophilus</i>	Controle do número de eosinófilos e aumento de gama-gt em adultos com asma.	De M. B. Mauro; J. A. M Cristina [20]
<i>L. brevis HY7401</i>	Melhora na homeostase energética e função hepática em pacientes com síndrome do intestino irritável.	E., Akihito; G., Miguel [7]
<i>L. paracasei K71</i>	Utilizada como parabiótica (inativada) tem ação na redução da síntese de IgE, ocasiona melhora em dermatites atópica.	E., Akihito; G., Miguel [7]
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Auxilia no processo de digestão de lactose, melhorando quadros de intolerância à lactose.	S., E. Mary et al.[14]
<i>L. rhamnosus GG</i>	Melhoram a função de barreira por meio do aumento da expressão de genes que estimulam a secreção de muco.	S., E. Mary et al.[14]

### 4.3 Mecanismo de ação probiótica

Os efeitos benéficos das cepas probióticas têm recebido grande interesse, haja vista que suas atividades no TGI são complexas e ainda não foram integralmente compreendidas. Tais implicações são nada mais que resultado da interação entre organismos onde, por um lado, há o fornecimento de substrato e por outro a metabolização deste com liberação de compostos bioativos [9].

Atualmente, começa a despontar o interesse pelo método de transito das estirpes, ou melhor, em seu comportamento durante a passagem pelo trato digestório. Esse comportamento pode ser caracterizado de duas formas, sendo eles: estirpes residentes ou comensais e microrganismos de passagem (temporários). A muito, apenas o processo de colonização da mucosa parecia ser eficiente na garantia dos benefícios probióticos o que, por sua vez, desconsiderava as estirpes em transito e, portanto, seus possíveis efeitos benéficos. A saber, os probióticos são temporários, embora alguns deles possam pertencer a espécies que também são organismos comensais usuais [21].

A estreita interação pode ser atestada, a priori, por meio do grau de dependência que se constitui entre os indivíduos, pois a partir da colonização microbiana temos o desenvolvimento de uma relação simbiótica deveras complexa e capaz de promover modulações em diversos sistemas fisiológicos no hospedeiro. [21],[22],[23],[16]

Apesar dos mecanismos de ação implicados nos efeitos probióticos ainda serem pouco caracterizados podemos agrupá-los em três principais categorias: (I) alteração da diversidade microbiana, (II) o aumento da barreira epitelial, e (III) a modulação da resposta imune [4]. Não só as propriedades supramencionadas como as que se seguem devem ser destacadas: (01) manutenção da integridade de mucosa (02) ação de barreira física e estímulo de produção de mucina (03) produção de bacteriocinas (04) metabolização de nutrientes não digeríveis (05) síntese de compostos (06) modulações químicas do ambiente (07) síntese de exopolissacarídeo (EPS) e (08) imunomodulação.

A barreira epitelial intestinal consiste em uma monocamada de células epiteliais as quais apresentam conexões célula-célula ligando células adjacentes, a camada de muco, peptídeos antimicrobianos e IgA secretora [22]. Apesar desses mecanismos de proteção garantirem que microrganismos não sejam capazes de invadir a mucosa, indivíduos com epitélio não íntegro, podem sofrer invasões até mesmo por estirpes comensais. Nesse sentido, até o dado momento é viável utilizar terapias com microrganismos apenas em indivíduos com mucosa íntegra, visto que a disposição celular é passível de estimulação. Tais estímulos podem ser provenientes da colonização microbiana, pois seus metabólitos têm propriedades para tanto.

Os componentes bacterianos responsáveis por fortalecer a barreira epitelial incluem fatores de superfície celular, proteínas secretadas, proteínas solúveis e DNA bacteriano [22]. Ademais, o conteúdo de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), provenientes do metabolismo microbiano, é utilizado como principal fonte de energia dos enterócitos garantindo à manutenção do ciclo celular e, desse modo, a integridade de mucosa.

A manutenção da integridade garante uma menor permeabilidade, ao passo que a quebra dessa aumenta a permeação de macromoléculas que por sua vez tem sido associado a mecanismos etiopatológicos comuns a várias doenças de caráter inflamatório do trato digestivo, bem como a doenças auto-imunes, como diabetes mellitus e a dermatite atópica [23].

Além da camada epitelial o hospedeiro dispõe de outras barreiras físicas responsáveis por garantir a segurança de mucosa, especialmente, em sua porção inferior. Para tanto, tem-se a presença das barreiras de muco e a rede de microrganismos autoagregados, ambas funcionam como mecanismo de contenção que evitam à perfusão de substâncias danosas a saúde. A microbiota intestinal saudável forma uma barreira contra microrganismos invasores, potencializando os mecanismos de defesa do hospedeiro contra os patógenos, melhorando a imunidade intestinal pela aderência a mucosa e estimulando as respostas imunes locais[9].

Ao se tratar do muco é válido ressaltar que o mesmo é produzido por células especializadas dispostas ao longo de todo o TGI denominadas células caliciformes. Alguns probióticos podem melhorar a função de barreira da camada de muco ou das células epiteliais. Evidências de estudos com culturas de células indicam que um aumento na produção de mucinas pode ser obtido com melhora da expressão gênica nas células caliciformes[21]. Por certo, tais mecanismos garantem a manutenção da arquitetura de mucosa e diminuem a disponibilidade de sítios de ligação localizados na membrana celular das células epiteliais de mucosa.

Para além dos mecanismos supramencionados a microbiota comensal tem capacidade de controlar as estirpes que co-habitam o TGI, isso acontece devido à biossíntese de compostos químicos com atividade antimicrobiana, as bacteriocinas. São caracterizados como peptídeos, sintetizados nos ribossomos microbianos sendo associados, intimamente, à competição em um mesmo nicho ecológico, representando uma característica vantajosa por parte do microrganismo produtor[24]. Esses compostos são tidos como promissores no controle microbiano, pois reduzem a capacidade de adesão e invasão de patógenos às células intestinais, ademais não apresentam riscos à saúde do hospedeiro. Bacteriocinas de bactérias gram-positivas, incluindo as que são produzidas por bactérias ácido-láticas (BAL), tem atraído grande atenção por causa de seu status GRAS [22].

Durante o processo de digestão os alimentos ingeridos passam por hidrolises para que possam ser absorvidos, entretanto alguns polissacarídeos (celulose, amidos resistentes, xilano e glicanos) não são degradados o que, por sua vez, faz necessário a presença de outros seres capazes de usar esses substratos. A saber, cerca de 90 a 97% dos alimentos são digeridos e absorvidos. Nesse caso, probióticos agem aliando-se ao processo inicial e fermentam esses recursos alimentares disponibilizando certos compostos, como: vitaminas do complexo B, vitamina K, AGCCs (acetato, propionato e butirato) e enzimas P450-like. Nessa condição, as bactérias utilizam do substrato não degradado (carboidratos mal absorvidos ou resistentes) para obter a energia necessária garantindo sua sobrevivência e, conseqüentemente, liberam compostos que serão importantíssimos a seu hospedeiro[21][9].

Dentre os principais metabólitos liberados temos: vitaminas (k, B12, B1 e B2), ácidos graxos de cadeia curta (butirato, propionato, acetato e lactato)[21][9]. A ação microbiana não se restringe ao substrato mencionado, agindo, concomitantemente, na hidrólise de ésteres de colesterol, de andrôgenos, estrógenos, sais biliares, bem como proteínas e lipídeos[9]. Diretamente ligado à capacidade de metabolização dos

microrganismos está à disponibilidade de nutrientes no TGI, pois à medida que um grupo se estabelece e utiliza o substrato outras estirpes deixam de obter nutrientes para seu desenvolvimento. Sendo que, indubitavelmente, um dos fatores mais relevantes para o crescimento microbiano é a disponibilidade de nutrientes o que leva a competição e a sobreposição entre estirpes [4].

Não bastasse a síntese de compostos, os processos metabólicos garantem a manutenção de um pH mais ácido por consequência da produção AGCC oriundos dos processos fermentativos. Os benefícios de um pH mais baixo, no cólon, estimulam a multiplicação e a sobrevivência dos organismos comensais, que preferem condições mais ácidas, e inibe a capacidade de alguns patógenos de se aderirem, crescerem translocarem-se no epitélio ou colonizarem o TGI [21].

Paralelamente, às mudanças físico-químicas e sínteses de compostos do metabolismo microbiano temos a produção de biopolímeros ou goma hidrossolúveis denominadas de exopolissacarídeo (EPS). Tal biocomposto apresenta diversas funcionalidades dentre elas atividade antitumoral, redução dos fatores de risco da saúde cardiovascular, controle do processo de obesidade e diabetes tipo II, redução de colesterol sérico, propriedades prebióticas, defesa biológica contra fagocitose, inibe a adesão de patógenos além de ter ação imunomodulatória etc [7].

É incontestável que além das funções absorptivo-seletiva e de barreira física, o epitélio intestinal está diretamente relacionado ao sistema imune. Dessa maneira, a compreensão da interação entre microrganismos endógenos, probióticos e células imunológicas é um dos temas mais complexos a serem elucidados.

Nesse sentido, partindo das características morfológicas das células epiteliais da mucosa intestinal é possível afirmar que o intestino é o órgão de maior superfície em contato com ambiente externo, ou seja, possui uma tarefa árdua ao lidar com diversas formas de agressão.

Certamente, tais características são as responsáveis pelo desenvolvimento do tecido linfóide associado ao intestino o maior órgão imune do corpo humano[4]. Esse sistema deve criar e, posteriormente, desativar um ataque contra patógenos invasores transitórios que vão em direção ao sistema gastrointestinal (SGI), impedir que os componentes antigênicos de peptídios produzam reações alérgicas local e sistemicamente, e tolerar milhares de espécies diferentes de bactérias “normais” que residem no SGI, em suas secreções e na degradação de componentes celular, fragmentos de DNA e peptídios[8]. Nesse contexto, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de caracterizar as propriedades imunomoduladoras desempenhadas por algumas cepas microbianas.

Por fim, não se pode deixar de mencionar que probióticos podem afetar as células epiteliais intestinais de várias formas, algumas delas são aumentando a função de barreira e modulando as rotas de sinalização inflamatórias, onde um de seus mecanismos é modular a resposta de NF- $\kappa$ B e reduzir a secreção de citocinas[4]. Ademais, a ativação de células imunes pode desencadear a diferenciação de células-B e produção de anticorpos protetores como IgA secretados no lúmen.

A partir desse conceito foi verificado que a ingestão de estirpes específicas de probióticos ou de prebióticos estimula o aumento de citocinas antiinflamatórias e reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias[21]. Contudo, maiores estudos são necessários, principalmente para a completa compreensão e

atribuição de sinais clínicos com a utilização destas estirpes. Nesse sentido, a seleção de probióticos para aplicações específicas inclui desde a escolha da espécie apropriada até sua fase de desenvolvimento[4].

#### **4.4 ALIMENTOS FUNCIONAIS: probióticos**

A muito se sabe que hábitos alimentares saudáveis devem ser praticados como mecanismo de fomento de uma melhor qualidade de vida, entretanto não se enfatizava questões pertinentes a composição química dos alimentos, ou seja, os compostos responsáveis por esse efeito. Tal entendimento é recente e tem ganhado cada vez mais destaque entre os consumidores. Podemos atribuir tal transição a alguns aspectos, sendo eles: [1] consumidores optando por prevenir ao invés de curar doenças [2] aumento dos custos médicos [3] os consumidores estão mais cientes sobre relação entre a saúde e a nutrição [4] envelhecimento da população [5] desejo de combater os males causados pela poluição, por microrganismos e agentes químicos no ar, na água e nos alimentos e [6] aumento das evidências científicas sobre a sua eficiência[25]. Considerando essa mudança no padrão de consumo a busca por alimentos e ou desenvolvimento de produtos alimentícios com propriedades funcionais tem recebido grande visibilidade da indústria.

Os alimentos funcionais apresentam características peculiares e necessárias para que assim possam ser classificados. Deste modo, devem apresentar propriedades benéficas além das nutricionais básicas, sendo encontrados na forma de alimentos comuns, trazendo benefícios fisiológicos específicos, regulando funções corporais de forma a auxiliar na proteção contra doenças como hipertensão, diabetes, câncer, osteoporose e coronariopatias [26]. Tendo, portanto, como objetivo primário melhorar, manter e reforçar a saúde dos consumidores via alimentação [25].

Propriedades funcionais podem ser atribuídas a alimentos através da incorporação de componentes e ou aditivos alimentares devidamente testados e que devem se apresentar, no território brasileiro, em conformidade com as portarias ANVS/MS 18 e 19 de 1999. Nesse contexto, bactérias probióticas através de seus mecanismos de ação são capazes de cumprir tais exigências beneficiando, portanto, a saúde do consumidor. Além de apresentar tais benefícios se caracteriza como produto de amplo espectro de utilização, pois apresenta aplicabilidade em inúmeros produtos alimentícios resultando em um produto funcional sem ocasionar mudanças sensoriais indesejáveis nos mesmos.

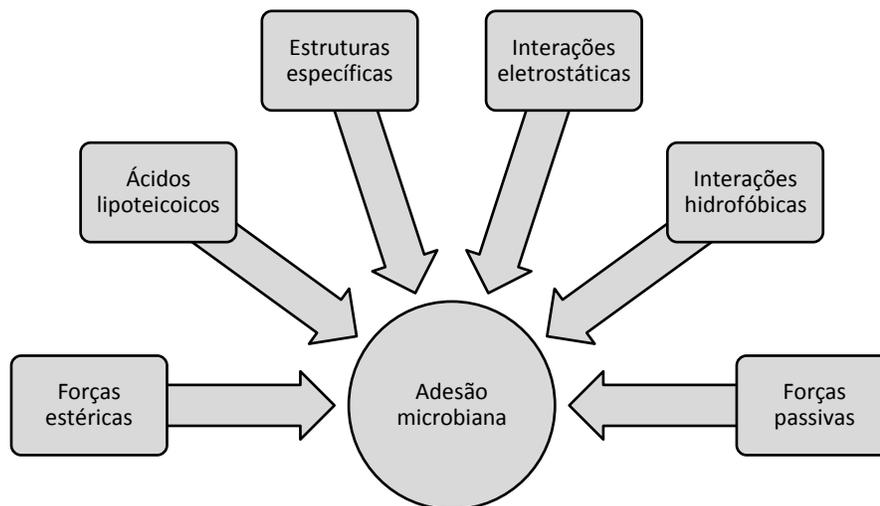
Atualmente, prebióticos e probióticos são utilizados como ferramenta na produção de alimentos funcionais. Produtos ricos em lactose, em especial, são considerados ótimos reservatórios para enriquecimento com probióticos, haja vista que tal carboidrato é utilizado como substrato pelas BAL. A administração de ambos em reservatórios alimentares propicia ação simbiótica e mais eficiente, visto que, a presença de substrato (prebióticos) associado a microrganismos (probióticos) tem capacidade de manter estes últimos viáveis por um maior período de tempo haja vista que os primeiros servem de fonte de carbono e energia para os microrganismos, garantindo sua chegada ao TGI [27].

#### 4.5 ADERÊNCIA MICROBIANA: principal alegação da capacidade probiótica

Apesar de pouco se saber sobre os mecanismos que *Lactobacillus* e outros membros nativos da microbiota intestinal utilizem para se estabelecerem e persistirem no intestino[28]tem-se, entre as principais alegações da capacidade probiótica aderência microbiana às células epiteliais de mucosa. Tal capacidade vem sendo descrita como balanço de interações físico-químicas atrativas e repulsivas entre bactérias e superfícies [29] se caracterizando pelo processo de ancoragem física mediada por fatores como: organização de membrana, características morfológicas de superfície, composição e estrutura de membrana.

Para além destas, devemos considerar propriedades do microbioma nativa aderida à mucosa do hospedeiro[14]; influência de forças básicas presentes na natureza como Van Der Waals, Eletrostática, Interações de Hidrogênio e Brownianmotion [30] e fatores descritos na Figura 1 -

**Figura 1 - Determinante para adesão**



Fonte: adaptado de A. L. Servin, M. H. Coconnier [31].

No contexto das bactérias ácido-láticas a principal forma de associação à mucosa se dá através das adesinas não poliméricas que reconhecem diferentes elementos da superfície da célula hospedeira, incluindo componentes da matriz extracelular, como colágenos, lamininas, elastina, proteoglicanos e ácido hialurônico. De forma similar são capazes de reconhecer glicoproteínas adesivas como vitronectina, fibrinogênio e, especialmente, fibronectina [29] o que possibilita a fixação na superfície.

Para avaliar tal característica, dada a dificuldade de investigação de adesão bacteriana “in vivo”, são utilizadas linhagens celulares originalmente humanas em modelos de epitélio intestinal “in vitro”[32]estando disponíveis para este fim linhagens como: Caco-2, HT-29 e de mucosa intestinal [33].

A Adesão de *Lactobacillus* ao epitélio foi definida como uma característica para seleção de cepas probióticas, uma vez que, apresenta o primeiro passo na formação de uma barreira para prevenir a colonização por microrganismos indesejáveis devido à competição por sítios de aderência e nutrientes, além de prevenir sua eliminação imediata por peristaltismo intestinal[33].

Para que a ANVISA conceda a outorga de comercialização de microrganismos com alegações probióticas é prevista a apresentação de um dossiê técnico-científico constante de informações sobre a estirpe em questão. Listada entre as exigências está o teste “in vitro”, o qual é responsável pela elucidação de certos critérios, entre eles as propriedades intrínsecas da linhagem que, por sua vez, avalia o processo de adesão e translocação microbiana. Aderir à mucosa consta de uma propriedade de destaque pela qual se garante a permanência, multiplicação e, conseqüentemente, amplia-se as chances de colonização da mucosa intestinal. Todo conhecimento a respeito das propriedades de adesão dos organismos probióticos podem, portanto, dar informações sobre a possibilidade de colonizar e modular o sistema imune [34] do hospedeiro.

Apesar das mais sofisticadas metodologias de caracterização, a capacidade de adesão bacteriana é o mais comum estudo “in vitro” com células epiteliais, muco intestinal ou moléculas de matriz extracelular. Acredita-se que um dos fatores que promovem essa colonização e a persistência no intestino pode ser a expressão de adesinas bacterianas conferindo ligação às células epiteliais intestinais ou mucina[28]. Sendo as adesinas proteínas responsáveis pelo processo de ancoragem microbiano as quais sofrem influência de forças como mencionado anteriormente.

Naturalmente, a presença de adesinas específicas em uma parte significativa da superfície celular microbiana será acompanhada por uma perceptível hidrofobicidade e carga, mas a presença de poucas adesinas específica não expressa, de forma geral, as propriedades físico-químicas celulares[30].

O conhecimento detalhado dos mecanismos de adesão proporciona uma maior compreensão da colonização bacteriana das superfícies [29], sendo fundamental para o desenvolvimento de estratégias que promovam uma melhor capacidade de fixação dos microrganismos ao TGI haja vista que o processo de adesão é crucial para que as cepas possam exercer de maneira mais eficiente suas atividades benéficas à saúde de seu hospedeiro.

Autoagregação caracteriza-se pela capacidade que os microrganismos têm de aderir ao epitélio intestinal sendo, então uma importante condição para que os mesmos possam fazer parte da microbiota intestinal[35]. Já o potencial de coagregação, segundo Duarte[36] é definido como a capacidade que alguns microrganismos apresentam quando em contato com cepas de bactérias de diferentes espécies formando grupos aglutinados heterogêneos.

#### 4.6 Resistência a baixo pH e tolerância a sais biliares

Durante o transito pelo TGI as cepas devem ser capazes de suportar a mudança de pH, característica do TGI superior, e, posteriormente, manter sua viabilidade frente a presença dos sais biliares. Segundo, C. P., Claude et al. [37] a sobrevivência às condições ácidas do estômago e aos sais biliares são preocupação primordial. Pois, os efeitos benéficos das cepas probióticas só podem ser observados desde que estas atinjam porções inferiores do intestino ainda viáveis.

Segundo, C. P. Claude et al. [37] elevadas contagens viáveis e taxas de sobrevivência durante a passagem pelo estômago são necessárias para permitir que *bifidobacteria* vivas, de produtos lácteos fermentados, desempenhem papel biológico no intestino do ser humano.

Nesse sentido o baixo pH do estômago entre 1 e 4 [8] é a primeira barreira natural enfrentada pelos microrganismos para desenvolver sua capacidade probiótica, estes devem ultrapassar tal barreira e alcançar o intestino ainda viáveis. O tempo de exposição ao ácido clorídrico varia de acordo com o estado físico do alimento sendo que, para líquidos, o esvaziamento gástrico leva cerca de 1 a 2 horas e, para sólidos, o tempo médio é de 2 a 3 horas[8].

Para C. L. Ramos [38] ambientes ácidos são importantes causas de estresse para BAL, mesmo que as cepas apresentem mecanismos de defesa pode ocorrer acidificação do ambiente interno celular reduzindo, portanto, a atividade de enzimas sensíveis a ácido e levando a danos em proteínas e no DNA.

A presença de sais biliares na primeira porção do intestino delgado (duodeno) é tida como a segunda barreira contra a colonização de certos microrganismos. Segundo Flores [49] a função dos sais biliares é responsável por conter o crescimento de bactérias, sendo mais intenso sobre as gram-positivas, suas capacidades bacteriostáticas estão relacionadas à suas propriedades detergentes e hidrofóbicas.

O estresse causado pela presença de bile, segundo C. L. Ramos [38], pode ser caracterizado por apresentar certa toxicidade, pois é capaz de acidificar o ambiente intracelular de forma similar aos ácidos orgânicos. Portanto, a redução de pH e a presença de sais biliares influenciam, respectivamente, a viabilidade e o crescimento das cepas, sendo, de suma importância no processo investigatório da capacidade probiótica.

Portanto, um critério de grande importância para manutenção da viabilidade e fixação bacteriana é a capacidade de suportar um ambientes com baixo pH e ricos em sais biliares.

#### 4.7 Coagregação e Autoagregação

A capacidade de aglutinação desenvolvida pelas cepas bacterianas é uma característica de grande importância tanto entre espécies diferentes (coagregação) como entre indivíduos da mesma espécie (autoagregação).

Para a primeira condição, Coagregação, R. C. Nadia [39] define que tal característica constiu-se num importante mecanismo de defesa para o organismo contra infecções tanto para o trato urogenital como para o TGI. O mecanismo garante a remoção de células patogênicas inviabilizando sua ancoragem às células de

mucosa. Além disso, o mesmo autor afirma que há uma atividade antagônica produzida por *Lactobacillus* durante a coagregação sendo de grande valia na caracterização de sua capacidade probiótica.

Durante o processo de autoagregação a aglutinação de células de mesma espécie promove a formação de conglomerados celulares que trazem benefícios à seu hospedeiro. Para R. C. Nadia [39] autoagregação está diretamente relacionada a capacidade de adesão ao epitélio intestinal, estando associada a vários mecanismos moleculares como os receptores de membrana. Por certo, ambas avaliações são extremamente necessárias para compor as alegações probióticas de dada cepa.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Obtenção das estirpes de bactérias

Um total de 06 bactérias lácticas foi isolado da fermentação de azeitonas das cultivares *GRAPPOLO 541* e *ASCOLANO*, protegidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e mantidas na Fazenda Experimental de Maria da Fé – Minas Gerais. Tais bactérias foram testadas em relação ao potencial probiótico e estão listadas na Tabela 5.

As bactérias lácticas foram cultivadas em meio MRS acrescido de nistatina (10 g/l peptona, 10 g/l extrato de carne, 5 g/l extrato de levedura, 20 g/l glicose, 1 g/l tween 80, 2 g/l fosfato de potássio dibásico, 5 g/l acetato de sódio, 2 g/l citrato de amônio, 0,05 g/l sulfato de magnésio-7H<sub>2</sub>O, 0,05 g/l sulfato de manganês-7 H<sub>2</sub>O, 15 g/l ágar, 400 mg/L nistatina) e armazenadas congeladas na presença de glicerol 20% (v/v).

Tabela 5 - Identificação dos microrganismos isolados a partir das cultivares *GRAPPOLO 541* e *ASCOLANO* promissores nos testes iniciais

Estirpe	Número de identificação	Origem
<i>Lactobacillus pentosus</i>	CCMA 1768	EPAMIG
<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCMA 1771	
<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCMA 1774	
<i>Lactobacillus paracasei</i>	CCMA 1770	
<i>Lactobacillus brevis</i>	CCMA 1766	
<i>Lactobacillus brevis</i>	CCMA 1762	
<i>Lactobacillus paracasei</i> *	LBC-81	DANISCO A/S

\*estirpe comercial - controle positivo

### 5.2 Análises microbiológica

As análises microbiológicas foram realizadas no laboratório de Microbiologia das Fermentações, no setor de Microbiologia, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

A cepa patogênica *Salmonella enteritidis* S64, foi fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Lavras. Para os ensaios, os patógenos

foram cultivados em caldo Brain Heart Infusion (BHI; Oxoid, Roskilde, Dinamarca) a 37 ° C durante 24 horas.

A bactéria *Lactobacillus paracasei* LBC-81 (Danisco A/S, Copenhagen, Dinamarca) foi empregada como cepa de referência para todos os ensaios, pois apresenta resultados probióticos apresentados em diversas investigações científicas como em R. Jordi e M. Beatriz [40] e S.R. Carlos et al. [1]. Esta cepa bacteriana foi reativada em caldo MRS e cultivada a 37 °C por 24 horas para os ensaios, conforme realizado para as demais bactérias estudadas.

### **5.3 Seleção de microrganismos potencialmente probióticos**

As bactérias lácticas isoladas das azeitonas foram testadas quanto a seu potencial probiótico por meio dos seguintes testes: resistência ao pH, tolerância aos ácidos biliares, autoagregação e coagregação bacteriana, aderência em células CACO-2 e HT-29. Cada isolado de bactéria foi cultivado em caldo MRS, a 37°C por 24 horas.

Para os testes utilizamos duas condições distintas de incubação dos tratamentos, na primeira foi empregada a monocamada de linhagem celular de adenocarcinoma humano CACO-2 para coincubação das bactérias. Para a segunda as mesmas estirpes foram incubadas, analogamente, alterando apenas a linhagem celular para HT-29.

Todas as estirpes bacterianas foram padronizadas a concentração inicial de  $1 \times 10^8$  de acordo com Son et. al. [41] realizada através de leitura de densidade ótica (D.O.) com posterior plaqueamento em superfície utilizando meio MRS. As células humanas foram semeadas a uma concentração de  $1 \times 10^5$  de acordo com Son et. al. [41].

### **5.4 Teste de tolerância a baixo pH**

Os 6 isolados de bactérias lácticas foram submetidos a testes de tolerância ao pH 2,0 segundo Ramos et. al. [38], com algumas modificações. As células primeiramente foram incubadas a 37°C por 24 horas, em seguida foram centrifugadas por 5 minutos (4°C) e lavadas três vezes em solução salina tamponada de fosfato (PBS: 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  e 150 mM NaCl com pH ajustado para 7.0). Após esta lavagem, as células foram incubadas em tubos contendo o meio MRS em pH ajustado para 2,0 com ácido clorídrico a 1N, e incubadas a 37°C. Foram utilizados tubos contendo meio de cultivo MRS com pH 6,5 como controle. Amostras (10 µL) foram obtidas nos tempos de 0; 1; 2; 2,5 e 3 horas, e plaqueadas em triplicata em ágar MRS. A tolerância ao pH 2,0 foi observada por enumeração de células viáveis em ágar.

### **5.5 Avaliação de tolerância aos ácidos biliares**

A tolerância à bile bovina (Oxgall) foi avaliada pelo crescimento das bactérias lácticas em caldo seguindo o procedimento descrito por Matijasic e Rogelj [42] com algumas modificações. As células primeiramente

foram incubadas a 37°C por 24 horas, em seguida centrifugadas por 5 minutos e lavadas três vezes em solução salina tamponada de fosfato (PBS: 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>e 150 mM NaCl com pH ajustado para 7.0). Após a lavagem, as células foram incubadas em tubos contendo o meio MRS suplementado com bile bovina (SIGMA-Aldrich) na concentração de 0,3%, incubadas a 37° conforme realizado por Son et. al[41]. Um tubo com ausência de bile bovina foi utilizado como controle.

Após o período de incubação 0; 1; 2; 2,5 e 3 horas, foi realizado o plaqueamento em placas contendo ágar MRS em triplicata para a contagem de células viáveis. A tolerância à bile foi observada pelo crescimento das bactérias lácticas superior ou igual a 10<sup>8</sup> UFC/ml.

## 5.6 Avaliação da capacidade de autoagregação e coagregação

O procedimento se desenvolveu conforme descrito por Kos et. al. [43]. Os microrganismos selecionados foram cultivados em caldo MRS, por um período de 24 horas a 37°C, e foram centrifugados a 5000 g por 15 minutos, posteriormente foram lavados por três vezes e ressuspensos em solução salina tamponada de fosfato (PBS: 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 150 mM NaCl com pH ajustado para 7.0)

Para conferir a viabilidade das células em suspensão foi realizado o plaqueamento em meio MRS por um período de 24 a 48 horas a 37°C e, em sequência, a contagem da população.

Para o teste de autoagregação, 4 mL da suspensão celular contendo 10<sup>8</sup> ufc/mL foi homogeneizada em vortex durante 10 segundos e incubada a 37°C. Em seguida, foram retiradas alíquotas de 0,2mL nos tempos de 1, 2, 3, 4, estas alíquotas foram transferidas para microplacas de poliestireno de 96 poços e as absorbâncias foram lidas a 600 nm. Para o cálculo da porcentagem de autoagregação, foi utilizado a seguinte equação:  $1 - (A_t/A_0) \times 100$ , onde A<sub>t</sub> representa a absorbância nos tempos: 1; 2; 3; 4 horas e A<sub>0</sub> a absorbância no tempo zero.

No teste de coagregação, a metodologia empregada para a suspensão celular foi a mesma do teste de autoagregação, porém, foi utilizada uma estirpe patogênica (*Salmonella enteritidis* S64). Os microrganismos foram avaliados em pares (2 ml de suspensão celular de cada um). E realizou-se um grupo controle contendo os microrganismos separados. A absorbância foi lida nos tempos 0, 1; 2, e 3 horas. Para o cálculo da porcentagem de coagregação, foi utilizada a Equação 1[44].

$$\text{Coagrega\c{c}\~{a}o} = \frac{((Ax+Ay)/2)-A(x+y)}{Ax+Ay/2} \times 100 \quad (\text{eq. 1})$$

Em que Ax e Ay representam as absorbâncias de cada estirpe no tubo controle, e A (x + y) representa a absorbância destes microrganismos misturados.

### 5.7 Avaliação *in vitro* da capacidade de adesão em células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2 e HT-29)

Para verificar a adesão das estirpes isoladas foram utilizadas linhagens celulares da mucosa intestinal humana Caco-2 e HT-29 (células de adenocarcinoma colorretal). As células Caco-2 se diferenciam e se polarizam espontaneamente, mostrando uma membrana apical funcional com as microvilosidades completamente desenvolvidas; por isto é, constantemente, utilizada em estudos *in vitro* da organização e função de células intestinais humanas [45]. Já as células HT-29 são capazes de expressar aspectos de diferenciação característicos de células intestinais maduras tais como as células caliciformes. Ambas as células foram adquiridas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

Foram cultivadas em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> sendo nutridas com o Meio MEN/EBSS (Minimal Essential Medium with Earle's), contendo: 1,0g/l Glicose; 0,3 g/l L-glutamina; 2,2 g/l Bicarbonato de sódio; 0,002 % de antibiótico: Gentamicina; 0,005 % antifúngico: Anfotericina B e 10% Soro Fetal Bovino (SFB). O meio de crescimento foi substituído a cada dois dias até completar o período de maturação celular e obter as características de células maduras, bem como o estabelecimento da monocamada celular (aproximadamente 21 dias) com confluência no fundo da garrafa de cultivo maior ou igual a 80%. O desenvolvimento das células foi acompanhado em microscópio óptico invertido

As monocamadas foram sub-cultivadas em microplacas contendo 24 poços. Após 21 dias, as células foram lavadas com tampão salino-fosfato (PBS: 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 150 mM NaCl, pH 7,4) e adicionados 2 mL de meio MEN/EBSS não suplementado em cada poço com incubação a 37° C durante 1 hora. Após a incubação, o MEN/EBSS foi removido e substituído por 1 mL de suspensão de bactérias em tampão salino-fosfato (PBS: 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 150 mM NaCl, pH 7,4) contendo aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/ mL. A cultura inoculada foi incubada a 37° C durante 1 hora em 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as monocamadas foram lavadas por três vezes com (PBS: 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 150 mM NaCl, pH 7,4) estéril para remover bactérias não aderidas e mortas. Após a lavagem foi adicionado 1 mL de solução de Triton – X a 1% diluída em PBS durante 10 minutos para ocorrer à lise das células Caco-2 e liberação das células bacterianas potencialmente probióticas aderidas.

Após 10 minutos de incubação a 37°C, o lisado contendo as BALs foi diluído em série e feito o plaqueamento em Agar MRS. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas.

A capacidade de adesão foi expressa conforme Jensen et. al. [22] pela razão percentual entre as contagens de BALs inicialmente semeadas e as contagens de bactérias aderidas pós plaquemaneto convertidas (UFC / mL). Os plaqueamentos foram realizados em meio MRS, e o experimento foi realizado em duplicata.

## 5.8 Avaliação *in vitro* da capacidade de exclusão das estirpes potencialmente probióticas à *Salmonella enteritidis s64*

A inibição da adesão de *Salmonella enteritidis s64* às células Caco-2 e HT-29 por BALs potencialmente probióticas foi realizada de acordo com Gueimonde et al.[46] sofrendo pequenas modificações. A cepa patogênica foi obtida da Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola (CCMA) do laboratório de Microbiologia de Fermentações da Universidade Federal de Lavras - MG.

Os ensaios de exclusão foram conduzidos de forma que, inicialmente, as BALs foram inoculadas e co-cultivadas por 30 minutos junto às células humanas (CACO-2 e HT29), em seguida, à cepa patogênica foi inoculada por um período adicional de 60 minutos, totalizando 01h: 30min de contato.

As concentrações de BALs e *Salmonella enteritidis s64* foi ajustadas para  $10^8$  (Log. UFC/ml), conforme mencionado anteriormente, sendo ressuspensos em 1ml de tampão salino-fosfato (PBS: 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  e 150 mM NaCl, pH 7,4) e, posteriormente, adicionados conforme mencionado acima.

Para execução do estudo utilizamos células humanas cultivadas por 21 dias (diferenciadas) em microplacas de 24 poços de acordo com as seguintes condições: (I) inoculação de BALs  $10^8$  (Log. UFC/ml) isoladamente por 30 minutos; (II) inoculação de bactérias patogênicas  $10^8$  (Log. UFC/ml) após o tempo decorrido a primeira etapa – incubação durante 60 minutos adicionais (exclusão); (III) controle positivo: inoculação da patogênica por 90 minutos; (IV) inoculação da bactéria probiótica comercial isoladamente (Controle negativo).

Após incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS: 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  e 150 mM NaCl, pH 7,4) para remoção das não aderidas e depois recuperadas por tratamento com 1% (v / v) de Triton-X durante 10 minutos a 37°C. Após o tratamento com Triton-X, a solução de bactérias foi diluída em série e plaqueadas em ágar BHI (Brain heart infusion, Kasvi, Paraná) para determinar o número de células patogênicas viáveis associadas pela contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

A inibição de adesão do patógeno pelas cepas potencialmente probióticas foi avaliada conforme apresentado por Yu et al.(2010)[47]; comparou-se, portanto, as contagens finais à de inoculação. O experimento foi realizado em triplicata.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Teste de tolerância ao baixo pH e ácidos biliares

O efeito do suco gástrico (ácido hidrocloreídrico) foi simulado para avaliar a viabilidade das BALs potencialmente probióticas frente a acidificação do meio e se encontra apresentado na Figura 2. Para o tempo zero ( $T_0$ ) não houve diferença estatística entre as cepas, posteriormente, pode-se observar oscilações nas contagens para o período pós inoculação.

Para o tempo três ( $T_3$ ) percebe-se que as cepas *L. pentosus* (CCMA 1768), *L. paracasei* (CCMA 1770) e LBC-81 não apresentam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre si, mas foram diferentes das demais; *L. paracasei* (CCMA 1771) e *L. paracasei* (CCMA 1774) não apresentam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre si, mas diferem das demais; *L. brevis* (CCMA 1766) apresenta diferença estatística ( $p < 0,05$ ); *L. brevis* (CCMA 1762) demonstra diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

Quando comparamos os resultados obtidos em  $T_0$  com os observados em  $T_3$  a mudança logarítmica encontrada se apresenta conforme se segue (1) acréscimo logarítmico: (LBC-81 +0,68); (CCMA 1768 +0,23); (CCMA 1771 +0,23); (CCMA 1762 +1,23)/ (2) decréscimo logarítmico: (CCMA 1774 -1,21); (CCMA 1770 -0,97) e (CCMA 1766 -0,47).

De mesma maneira o efeito bacteriostático dos Sais Biliares foi simulado para avaliar o crescimento das BALs potencialmente probióticas, haja vista que seu potencial tóxico, supramencionado, pode inibir o crescimento bacteriano. Os resultados se encontram apresentados na Figura 3.

No  $T_0$  todas as estirpes apresentaram crescimento microbiano similar não diferindo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre si. Ao comparar os resultados obtidos em  $T_0$  com os observados em  $T_3$  nota-se as seguintes variações logarítmicas: (I) acréscimo logarítmico - *L. brevis* (CCMA 1766), *L. paracasei* (CCMA 1770), *L. brevis* (CCMA 1762), *L. paracasei* (CCMA 1771), *L. paracasei* (CCMA 1774) e LBC-81 apresentaram aumento na contagem variando entre (0,6 e 0,97 LOG UFC/ml); (II) decréscimo logarítmico - apenas a cepa *L. pentosus* (CCMA 1768) apresentou redução na contagem (0,04 LOG UFC/ ml).

A porção probiótica de um simbionte deve ter quantidade viável na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  UFC, como no mínimo  $10^7$  UFC para seu consumo [48].

Portanto, é possível afirmar que os isolados mantiveram sua viabilidade mesmo após expostos ao ambiente ácido evidenciando uma contagem mínima de 8,64 (Log. ufc/ml) para *L. paracasei* (CCMA 1774) e máxima de 11,15 (Log. UFC/ml) para *L. brevis* (CCMA 1762). O resultado promissor se aplica também ao ambiente enriquecido com sais biliares evidenciando uma contagem mínima de 9,38 (Log. ufc/ml) para *L. pentosus* (CCMA 1768) e máxima de 10,64 (Log. UFC/ml) para *L. paracasei* (CCMA 1774). Ambos respeitam o intervalo preconizado pelo órgão de regulação, ANVISA.

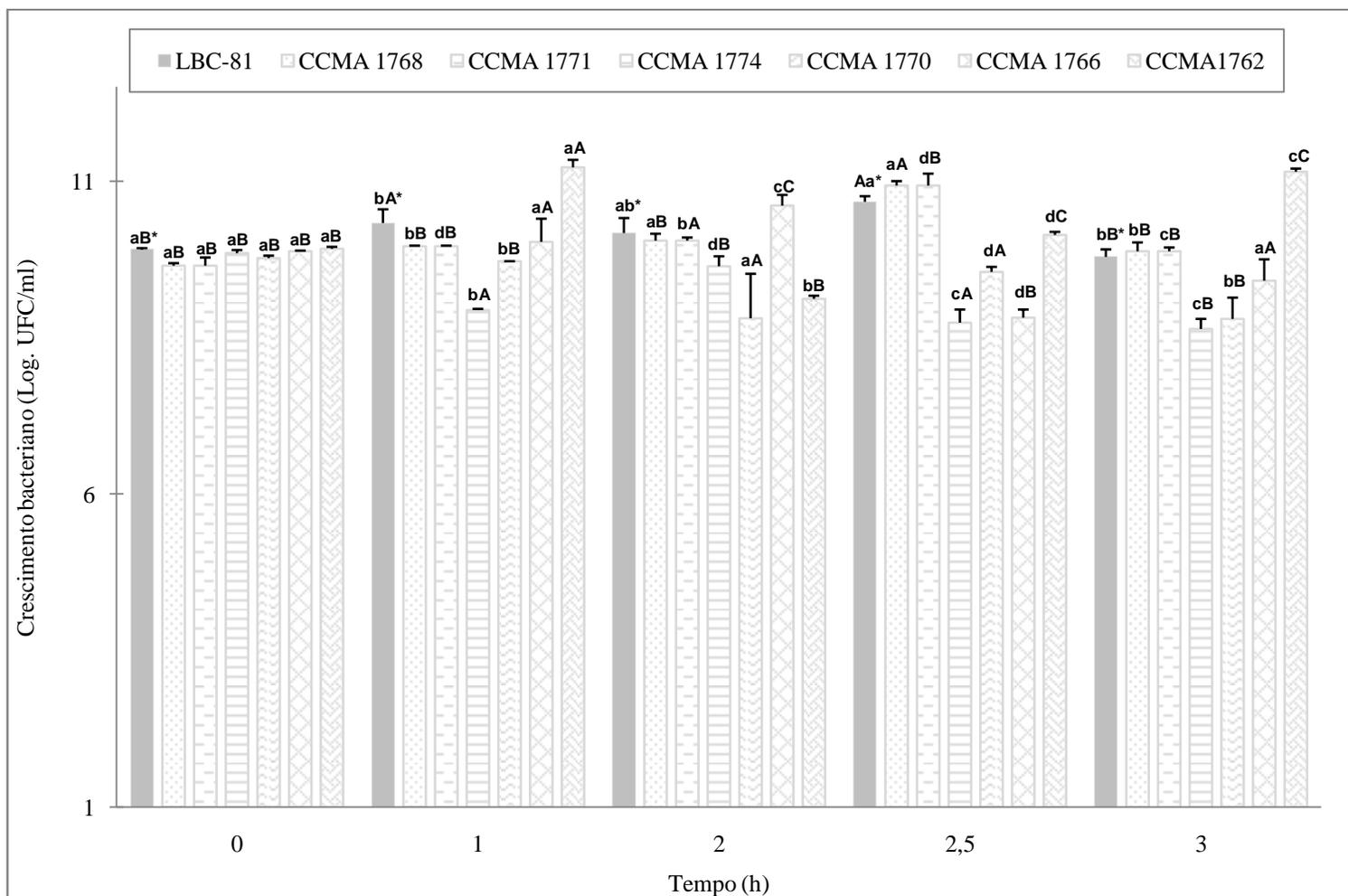


Figura 2 - Teste de tolerância a baixo pH em diferentes tempos amostrais. Valores apresentados foram determinados em triplicata; barras indicam desvio padrão da média. Valores médios seguidos de letras diferentes (maiúsculas entre os M.O.s, minúsculas entre os tempos) diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. Estirpes – LBC-81: *Lactobacillus paracasei* \*: cepa comercial (controle +); CCMA 1768: *Lactobacillus pentosus*; CCMA 1768: *Lactobacillus paracasei*; CCMA 1774: *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1770): *Lactobacillus paracasei*; CCMA 1766: *Lactobacillus brevis*; CCMA 1762: *Lactobacillus brevis*.

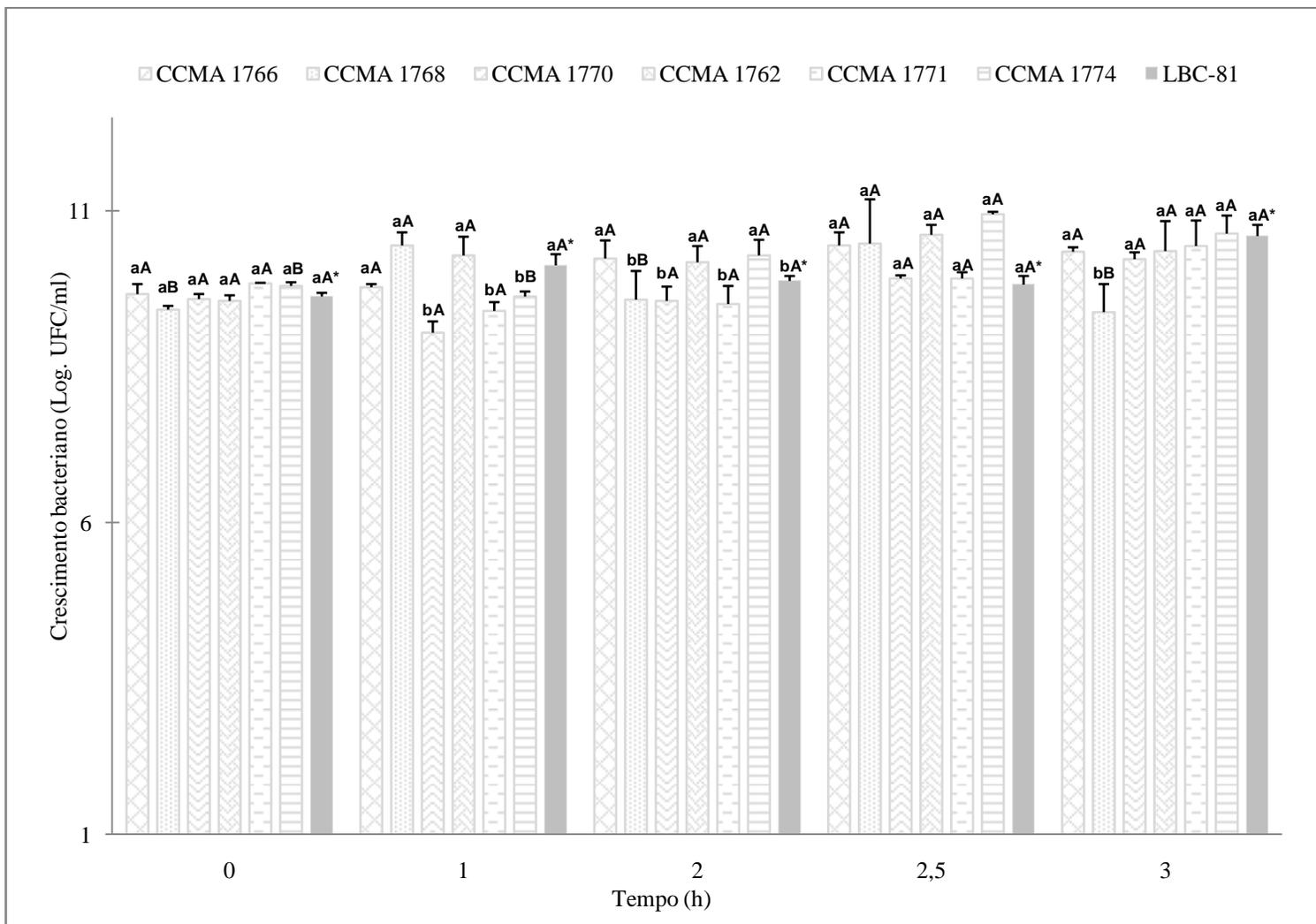


Figura 3 - Teste de tolerância a sais biliares. Valores apresentados foram determinados em triplicata; barras indicam desvio padrão da média. Valores médios seguidos de letras diferentes (maiúsculas entre os M.O.s, minúsculas entre os tempos) diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. Estirpes – CCMA 1766: *Lactobacillus brevis*; CCMA 1768: *Lactobacillus pentosus*; CCMA 1770: *Lactobacillus paracasei*; CCMA 1762: *Lactobacillus brevis*; CCMA 1768: *Lactobacillus paracasei*; CCMA 1774: *Lactobacillus paracasei*; LBC-81: *Lactobacillus paracasei* \*: cepa comercial (controle +).

## 6.2 Avaliação da capacidade de autoagregação e coagregação

A taxa de aglutinação ou autoagregação dos isolados foi avaliada e seus resultados estão apresentados na Figura 6. Todas as cepas demonstraram acentuada capacidade para autoagregação após 24 horas de incubação obtendo resultados entre 67 e 89%.

O isolado *L. pentosus* CCMA 1768 apresentou maior percentual entre as cepas, inclusive, quando comparado ao probiótico comercial LBC-81 *Lactobacillus paracasei*, as demais cepas apresentaram resultados muito similares. Em seus estudos Kos et. al. [43] encontrou resultados similares ao avaliar *Lactobacillus acidophilus* M92.

Para o ensaio de coagregação as cepas foram testadas frente a *S. enteritidis* s64 e seus resultados demonstrados na Figura 7.

Verifica-se que a cepa *L. paracasei* (CCMA 1768) e *L. paracasei* (CCMA 1774) só apresentaram capacidade coagregativa após três horas de incubação, já o LBC-81 (*Lactobacillus paracasei*) demonstrou ação coagregativa a partir da segunda hora de incubação. As demais cepas desenvolveram capacidade de aglutinação ao patógeno em todos os momentos amostrais mesmo que em reduzidos percentuais. No tempo 3 (t3) todas as cepas potencialmente probióticas obtiveram resultados superiores quando comparados aos da cepa comercial.

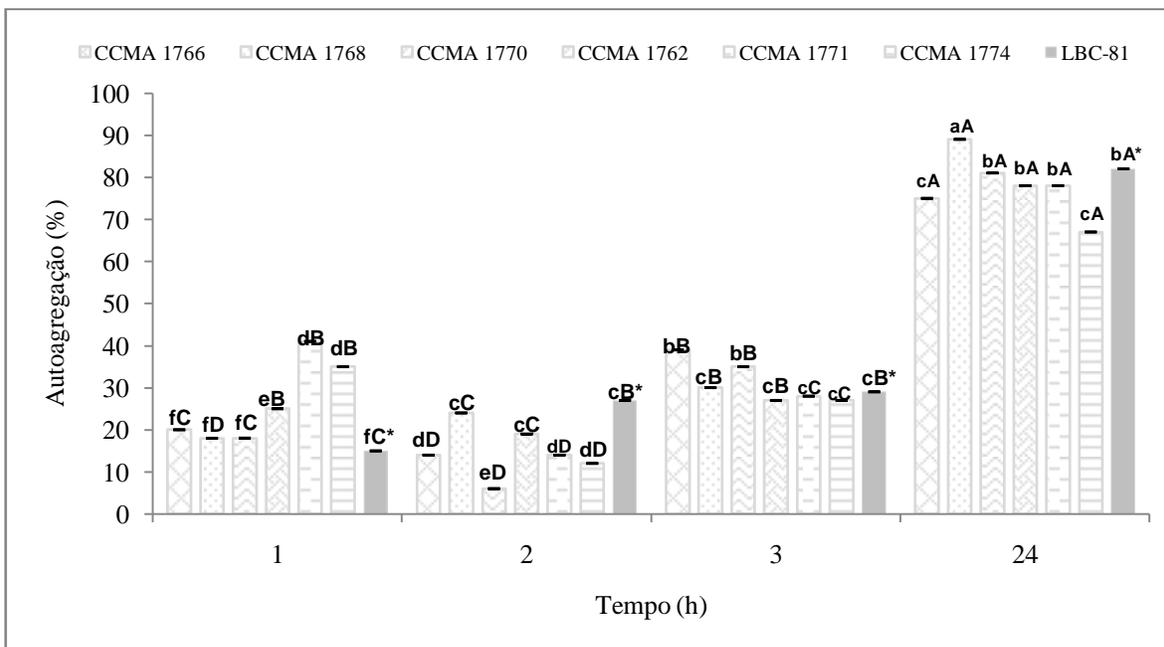


Figura 4 - Teste de Autoagregação. Valores apresentados foram determinados em duplicata;  $\pm$  indica desvio padrão da média. Valores indicados ( $\pm$  desvio padrão) seguidos por letras diferentes (**maiúsculas entre os M.O.s, minúsculas entre os tempos**) diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Scott-Knott. Estripes – CCMA 1768: *Lactobacillus pentosus*; CCMA 1768: *Lactobacillus paracasei*; CCMA 1774: *Lactobacillus paracasei*; CCMA 1770: *Lactobacillus paracasei*; CCMA 1766: *Lactobacillus brevis*; CCMA 1762: *Lactobacillus brevis*; LBC-81: *Lactobacillus paracasei*. \*: cepa comercial (controle +).

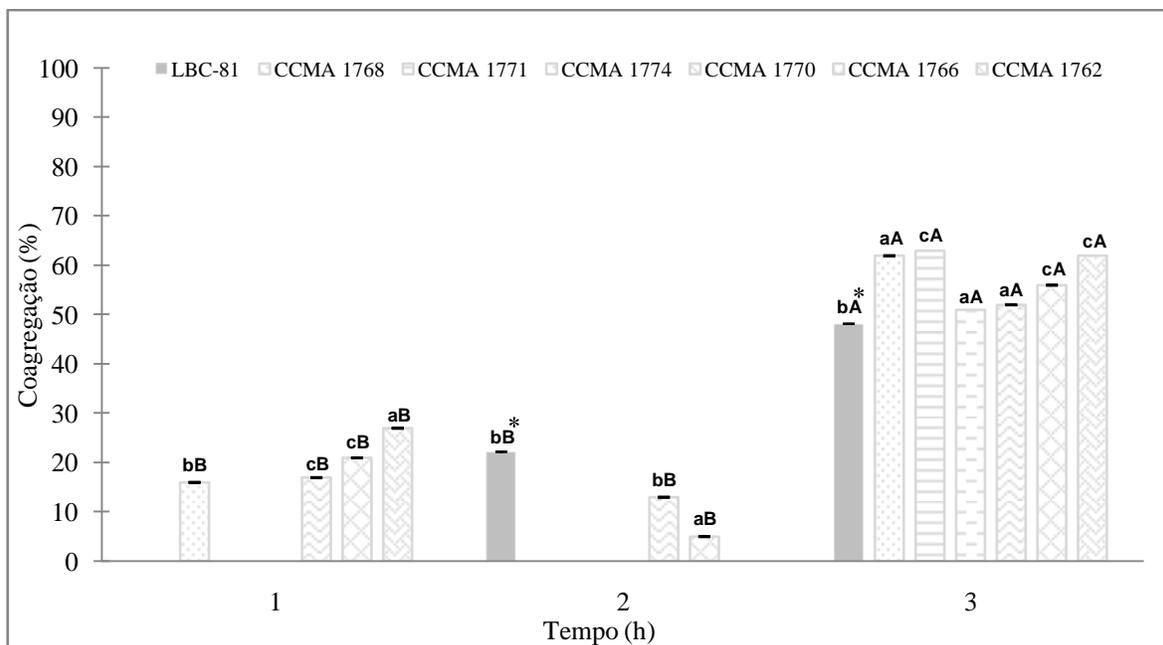


Figura 5 - Teste de Coagregação frente a *S. enteritidis* s64. Valores apresentados foram determinados em duplicata;  $\pm$  indica desvio padrão da média. Valores indicados ( $\pm$  desvio padrão) seguidos por letras diferentes (**maiúsculas entre os M.O.s, minúsculas entre os tempos**) diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Scott-Knott. Estirpes – CCMA 1768: *Lactobacillus pentosus*; CCMA 1768: *Lactobacillus paracasei*; CCMA 1774: *Lactobacillus paracasei*; CCMA 1770: *Lactobacillus paracasei*; CCMA 1766: *Lactobacillus brevis*; CCMA 1762: *Lactobacillus brevis*; LBC-81: *Lactobacillus paracasei*. \*: cepa comercial (controle +).

### 6.3 Teste de adesão *in vitro* das estirpes potencialmente probióticas

Os resultados da capacidade de adesão estão demonstrados na Figura 6. Os resultados observados variaram de acordo com a linhagem celular, bem como entre as estirpes empregadas. Os tratamentos submetidos à linhagem celular HT-29 variaram de 8,02 a 55%, já os que foram submetidos a CACO-2 obtiveram resultados inferiores estando entre 2,01 e 17,86% da contagem inicial inoculada.

Esse resultado é esperado ao considerar o fenótipo de cada linhagem, pois a HT-29 apresenta uma proporção de células caliciformes capazes de secretar glicoproteínas precursoras de muco. Sendo, portanto, a camada de muco responsável por numerosas vantagens ecológicas aos microrganismos residentes [50] o que inclui um melhor ambiente de fixação por meio de proteínas de ancoragem. As células CACO-2 “*in vitro*” se diferenciam em monocamada homologa aos enterócitos do epitélio intestinal os quais apresentam características absorptivas e não muco-secretoras [50].

As estirpes *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1774), *Lactobacillus brevis* (CCMA 1762) e *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1768) apresentaram melhor capacidade adesiva para HT-29 sendo que o resultado para a bactéria (CCMA 1762) não se diferenciou estatisticamente ( $p < 0,05$ ) em relação à capacidade de adesão encontrada para as bactérias *L. paracasei* (CCMA 1774) e *L. pentosus* (CCMA 1768).

Para as estirpes testadas em CACO-2 as que se destacaram quanto ao percentual de adesão foram, coincidentemente, as estirpes *Lactobacillus paracasei* (CCMA 1774) e *Lactobacillus brevis* (CCMA 1762) com diferença estatística entre ambas ( $p < 0,05$ ).

Para Zivkovic et. al. [51] o resultado observado é corroborado quando afirma que *L. paracasei subsp. paracasei* possui o gene BGSJ2-8 responsável por sintetizar AggLb, proteína de agregação e, portanto, é capaz de sobreviver em condições intestinais simuladas.

A característica de síntese é reforçada por Bengoa et. al. [52] quando afirma que estirpes paracasei são produtoras de polissacarídeo, por conseguinte, é possível pensar a intervenção destes nas propriedades de adesão.

Com relação à cepa de *Lactobacillus brevis* Hynonen et. al. [53] afirma que são importantes colonizadores de mucosas, principalmente, entre seres humanos, apoiando sua afirmação na presença da camada S, a qual contém uma classe de adesinas com afinidade por diversos alvos teciduais.

Por fim a cepa de bactéria probiótica comercial (controle positivo) apresenta resultados de 6% para HT-29 e 0,03% para CACO-2 indicando menor capacidade adesiva quando comparada às estirpes testadas.

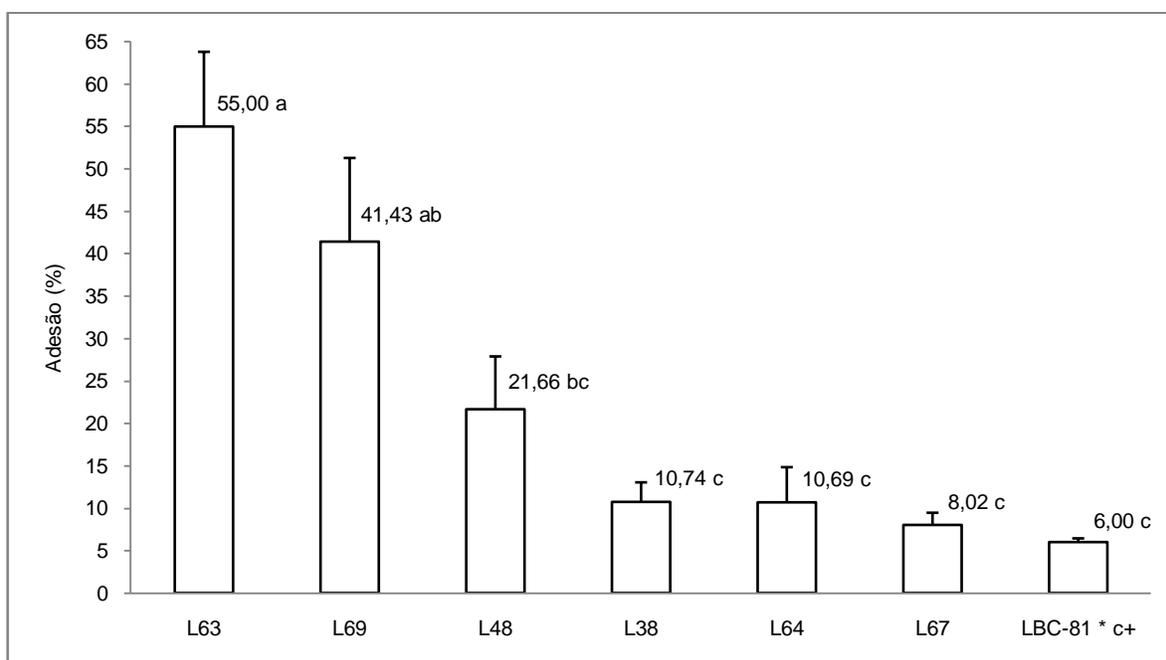


Fig. 7 - Teste de adesão "in vitro" de estirpes potencialmente probióticas em células humanas HT-29. Valores apresentados foram determinados em triplicata; barras indicam desvio padrão da média. Valores médios seguidos de letras diferentes diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. Estirpes – CCMA 1768: *Lactobacillus pentosus*; CCMA 1768: *Lactobacillus paracasei*; CCMA 1774: *Lactobacillus paracasei*; CCMA 1770: *Lactobacillus paracasei*; CCMA 1766: *Lactobacillus brevis*; CCMA 1762: *Lactobacillus brevis*; LBC-81: *Lactobacillus paracasei*. \*: cepa comercial (controle +).

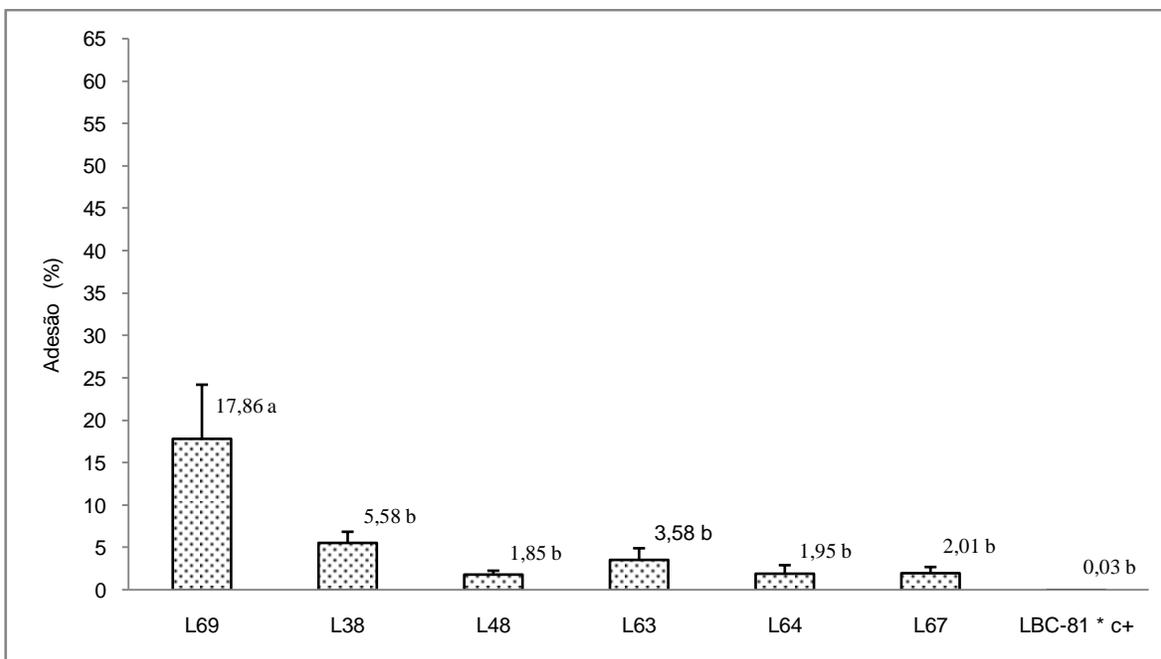


Figura 8- Teste de adesão “in vitro” de estirpes potencialmente probióticas em células humanas CACO-2. Valores apresentados foram determinados em triplicata; barras indicam desvio padrão da média. Valores médios seguidos de letras diferentes diferem significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. Estirpes – CCMA 1768: *Lactobacillus pentosus*; CCMA 1768: *Lactobacillus paracasei*; CCMA 1774: *Lactobacillus paracasei*; CCMA 1770: *Lactobacillus paracasei*; CCMA 1766: *Lactobacillus brevis*; CCMA 1762: *Lactobacillus brevis*; LBC-81: *Lactobacillus paracasei*. \*: cepa comercial (controle +).

#### 6.4 Teste de exclusão *in vitro* das estirpes potencialmente probióticas

Os resultados da capacidade de inibição da agregação de patógenos estão apresentados na Figura 12.

Verifica-se que os resultados observados variaram de acordo com a linhagem celular, bem como entre as estirpes utilizadas. Os tratamentos submetidos à linhagem HT-29 apresentaram diferença estatística tendo redução logarítmica para todas as cepas potencialmente probióticas em relação ao controle positivo. A cepa comercial probiótica expressou baixa habilidade para exclusão do patógeno reduzindo apenas 0,04 (Log. UFC/mL) sendo estatisticamente ( $p < 0,05$ ) similar ao controle positivo.

Dentre as cepas testadas em relação ao potencial probiótico as que demonstraram maior capacidade de exclusão foram: *L. paracasei* (CCMA 1770) apresentando redução logarítmica de 3,62 (Log. UFC/ml), *L. paracasei* (CCMA 1771) apresentando redução logarítmica de 3,51 (Log. UFC/ml) e *L. brevis* (CCMA 1762) apresentando redução logarítmica de 2,96 (Log. UFC/ml) quando comparadas aos controles e a cepa comercial.

Para as cepas submetidas à linhagem CACO-2 os resultados demonstraram-se menos expressivos, pois a redução logarítmica foi discreta considerando o controle positivo: mínima de 0,3 (Log. UFC/mL) e máxima de 0,96 (Log. UFC/mL). Contudo, ao confrontar os resultados obtidos entre as cepas potencialmente probióticas e a comercial pode-se perceber similaridade estatísticas ( $p < 0,05$ ) na eficiência de exclusão para todos os isolados microbianos.

Jankowska et. al. [54] em seus estudos observou reduções mais acentuadas para a contagem de bactérias patogênicas junto ao teste de exclusão para linhagens celulares CACO-2. Contudo, deve-se considerar que a cepa patogênica utilizada pertence à subespécie *entérica*. Para execução deste trabalho utilizou-se a subespécie *enteritidis*, portanto, parte da diferença nos resultados pode ser atribuída ao patógeno utilizado.

Os resultados observados para a cepa *L. paracasei* (CCMA 1771) pode ser justificada considerando a proposição de Jankowska et. al. [54] quando afirma que tal bactéria utiliza o mesmo mecanismo e receptores que a patogênica. Tal característica parece criar condições para uma inibição com maior intensidade.

A cepa *L. brevis* (CCMA 1762) teve contagem de 9,48 (Log. UFC/ml) sendo, portanto, superior ao resultado encontrado para o controle positivo *Salmonella enteritidis* s64 (inoculado isoladamente) que obteve uma contagem de 8,78 (Log. UFC/ml). Tal desfecho pode indicar conforme Collado et. al. [55] que a presença prévia da bactéria potencialmente probiótica *Lactobacillus brevis* (CCMA 1762) não só falhou quanto à capacidade de exclusão como ocasionou maior adesão do M.O. patogênico.

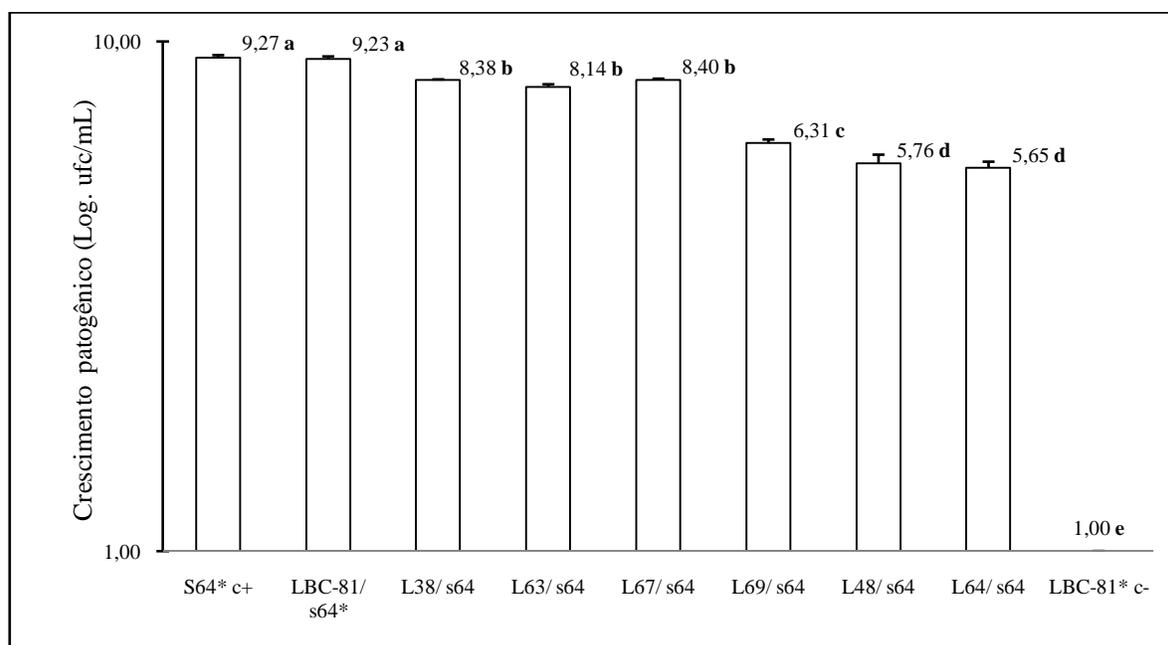


Fig.9 - Teste de exclusão *in vitro* de estirpes potencialmente probióticas com células humanas (HI-29). Siglas separadas por barra indicam quais cepas foram incubadas no mesmo poço. Resultados apresentados com letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA, Tukey) ( $p < 0,05$ ). Estirpes – CCMA 1768: *Lactobacillus pentosus*; CCMA 1771: *Lactobacillus paracasei*; CCMA 1774: *Lactobacillus paracasei*; CCMA 1770: *Lactobacillus paracasei*; CCMA 1766: *Lactobacillus brevis*; CCMA 1762: *Lactobacillus brevis*; LBC-81: *Lactobacillus paracasei*; S64: *Salmonella enteritidis*. \*\*patógeno (controle +),\*\*cepa comercial probiótica (controle -).

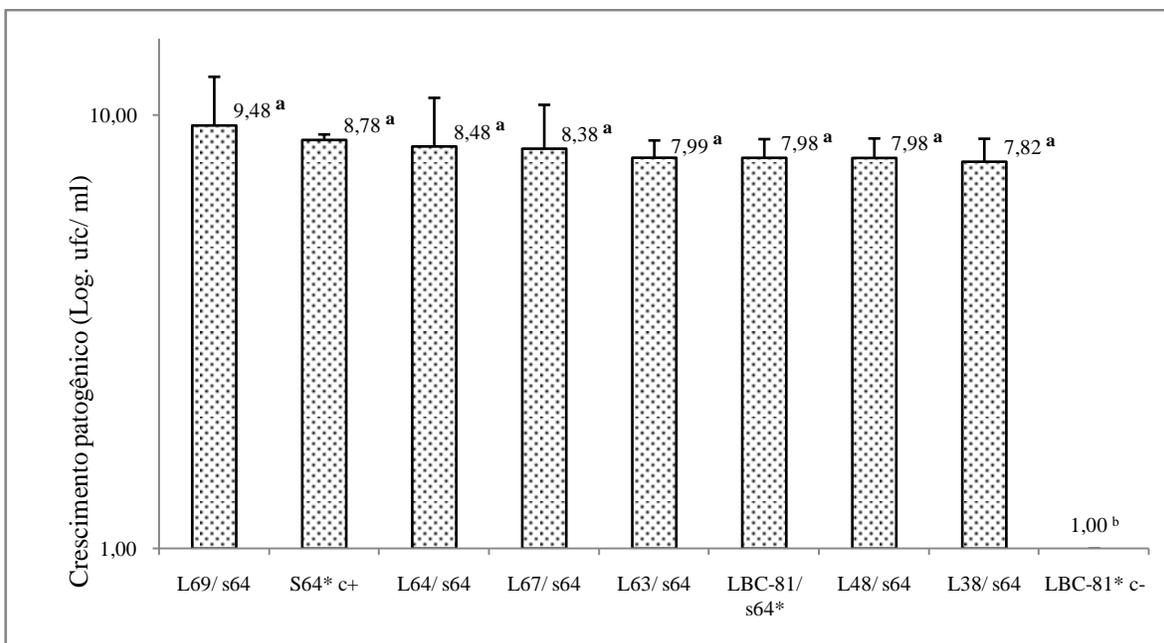


Fig.10 - Teste de exclusão *in vitro* de estirpes potencialmente probióticas com células humanas (CACO-2). Siglas separadas por barra indicam quais cepas foram incubadas no mesmo poço. Resultados apresentados com letras distintas são significativamente diferentes (ANOVA, Tukey) ( $p < 0,05$ ). Estirpes – CCMA 1768: *Lactobacillus pentosus*; CCMA 1771: *Lactobacillus paracasei*; L63: *Lactobacillus paracasei*; CCMA 1770: *Lactobacillus paracasei*; CCMA 1766: *Lactobacillus brevis*; CCMA 1762: *Lactobacillus brevis*; LBC-81: *Lactobacillus paracasei*; s64: *Salmonella enteritidis*. \*patógeno (controle +), \*\*cepa comercial probiótica (controle -).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O intestino é o principal alvo de constantes infecções exógenas (doenças gastroentéricas). Nesse sentido, as cepas potencialmente probióticas podem contribuir para inibição e ou redução do tempo desses quadros infecciosos. A relação direta entre a diversidade microbiológica das cepas e o estado de saúde de seu hospedeiro se torna cada vez mais nítida.

Nesse sentido, o interesse pela temática tem direcionado o foco das grandes corporações do ramo alimentício para pesquisas capazes de identificar e associar características em cepas potencialmente probióticas.

Atualmente, as principais matrizes de obtenção desses M.O.s são produtos lácteos que, por sua vez, tem origem animal. Contudo, a crescente demanda do mercado vegetariano/ vegano exige incessante busca por fontes vegetais.

Os resultados obtidos nesse trabalho fomentam a possibilidade da utilização de cepas potencialmente probióticas obtidas do fruto de *Olea europaea* (oliveira) in natura e naturalmente fermentadas servindo como reservatórios.

Por certo, algumas das questões cruciais para classificação de cepas como probióticas se dá através da análise de resistência às intempéries impostas pelo TGI (mudanças no pH, resistência a substâncias bacteriostáticas, capacidade adesiva entre outras).

Os resultados observados neste estudo indicam que os isolados testados demonstram resistência às intempéries simuladas, bem como desenvolveram alta capacidade de adesão às células miméticas aos enterócitos. Para, além disso, as cepas foram eficientes na exclusão do patógeno utilizado.

## 8 AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre comigo, abrindo portas e dando-me forças para prosseguir nesta caminhada.

À Universidade Federal de Lavras, a todos os técnicos do Laboratório de Microbiologia de Fermentações, em especial, ao Dirceu pela paciência e acolhimento.

Aos professores Disney Ribeiro e Sabrina Bastos pelos grandes ensinamentos, oportunidades e sincero acolhimento.

A minha co-orientadora, Luara por acompanhar minha caminhada e sempre estar disponível durante todo esse tempo.

Aos meus pais, pela confiança e apoio em minhas decisões. Principalmente a minha mãe por sempre estar ali quando a luz e fé se esmoreceram.

A meu grande amigo, Luiz Eduardo pelos ensinamentos de vida e acolhimento em momentos de fraqueza.

A meus amigos por estarem sempre presentes nos momentos mais difíceis, em especial, Allan, Felipe, Gabriel, Laudiceia, Liliana, Mario, Renan, Vladimir e William.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia, pelo companheirismo e momentos divididos por todo este tempo.

Obrigado!

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SOCCOL, C. R. et al. *The potential of probiotics: A review*. Curitiba, 2010.
- [2] SIMÕES, L. A. et al. *Isolamento de microrganismos de azeitonas 'in natura' e azeitonas fermentadas naturalmente e seleção de possíveis culturas starters probióticas*. Lavras, 2017.
- [3] NOVAK, F. R. et al. *Colostro humano : fonte natural de probióticos ?*. J. Pediatr. (Rio. J.), vol. 77, no. 4, pp. 265–270, 2001.
- [4] LUERCE, T. D. *Caracterização e Avaliação das Propriedades Probióticas de Lactococcus lactis NCDO2118*. Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.
- [5] SANTOS, F. M. dos et al. *Estudo do potencial probiótico de linhagens de Saccharomyces cerevisiae através de testes in vitro*. Rev. Biol. e Ciências da Terra, vol. 5, no. 2, p. 14, 2005.
- [6] GOLÇALVES, M. da C.; Nogueira, J. C. R. *Probióticos - Revisão da Literatura*. Revista Brasileira de Ciências da Saúde, vol. 15, no. 4, pp. 487–492, 2012.
- [7] M. G. Endo, Akihito. *Advances in Probiotic Technology*. Taylor & Francis Group, 2015.
- [8] MAHAN, L. K. et al. *Krause - Alimentos, Nutrição e Dietoterapia*. 2012.
- [9] SANTOS, L. A. *Uso de Probióticos na recuperação da flora intestinal, durante a antibioticoterapia*. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2010.
- [10] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Probióticos: construção da lista de linhagens probióticas*. ANVISA, pp. 1–14, 2017.
- [11] FOLIGNÉ, B. et. al. *Probiotics from research to market: The possibilities, risks and challenges*. Curr. Opin. Microbiol., vol. 16, no. 3, pp. 284–292, 2013.
- [12] AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Minuta de Guia para Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para Uso em Alimentos Sumário*. 2018.
- [13] YAKULT DO BRASIL. *Revista Super Saudável.*, pp. 1–3, 2016.
- [14] SANDERS, M. E. et al. *Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic*. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, Springer US, 2019.
- [15] BOUZAINÉ, T. et al. *Adherence and colonization properties of Lactobacillus rhamnosus TBI, a broiler chicken isolate*. Letters in Applied Microbiology, vol. 40, no. 5, pp. 391–396, 2005.
- [16] MACHADO, A. B. F. et al. *Microbiota Gastrintestinal: evidencias da sua influência na saúde e na doença*. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2015.
- [17] MANZANO, C. et al. *Efectos Clínicos de Los Probióticos: qué dice la evidencia*. Revista chilena de nutrición, vol. 39, no. 1, pp. 98–110, 2012.
- [18] GILL, H. S.; GUARNER, F. *Probiotics and human health: a clinical perspective*. Postgr. Med J, pp. 516–526, 2004.
- [19] FUSTER, G. O.; MOLERO, G. I. *Probióticos y prebióticos en la práctica clínica*. vol. 22, pp. 26–34, 2007.
- [20] MORAIS, Mauro. B. de; JACOB, Cristina M. A.. *The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice*. J. Pediatr. (Rio. J.), vol. 82, no. 8, pp. 189–197, 2006.

- [21] BINNS, N. *Monografias concisas ilsi europe: Probióticos, Prebióticos e a Microbiota Intestinal*. ILSI Eur. Int. Life Sci. Inst., p. 36, 2014.
- [22] JENSEN, H. et al. *In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria*. Int. J. Food Microbiol., vol. 153, no. 1–2, pp. 216–222, 2012.
- [23] SOUZA, Marcio L. R. de. *Probióticos e a permeabilidade intestinal*. Pós em Rev., vol. 6, no. 2, pp. 299–306, 2012.
- [24] OGAKI, Mayara B.; FURLANETO, M. C.; MAIA, Luciana F. *Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas*. Brazilian J. Food Technol., vol. 18, no. 4, pp. 267–276, 2015.
- [25] OLIVEIRA, Maricê N. de et al. *Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos*. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol. 38, no. 1, pp. 1–21, 2002.
- [26] MORAES, Fernanda P.; COLLA, Luciane M. *Alimentos funcionais e nutracêuticos: Definições, Legislação e benefícios à Saúde*,” Revista Eletrônica de Farmácia, vol. 3, no. June, pp. 109–122, 2006.
- [27] ANDRADE, Dayana P. de et al. *Stability of microencapsulated lactic acid bacteria under acidic and bile juice conditions*. Int. J. Food Sci. Technol., vol. 54, no. 7, pp. 2355–2362, 2019.
- [28] ADLERBERTH, I. et al. *A mannose-specific adherence mechanism in Lactobacillus plantarum conferring binding to the human colonic cell line HT-29*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 62, no. 7, pp. 2244–2251, 1996.
- [29] SANTOS, Gisely L. P. *Mecanismos de adesão e invasão por microrganismos patogênicos*. no. 2009. pp. 11–50, 2011.
- [30] BUSSCHER, H. C.; VAN DER MEI H. J. *Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation*. Advances in Dental Research, pp. 24–32, 1997.
- [31] SERVIN, A. L.; COCONNIER, M. H. *Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens*. Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology, vol. 17, no. 5, pp. 741–754, 2003.
- [32] SALMINEN, S. J.; TUOMOLA, E. M. *Adhesion of some probiotic and dairy Lactobacillus strains to Caco-2 cell cultures*. Int. J. Food Microbiol., vol. 41, pp. 45–51, 1998.
- [33] ROCHA, Ticiania S. *Isolamento, identificação, avaliação da capacidade de adesão in vitro e in vivo e efeito imunomodulatório de lactobacillus isolados de aves*. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho,” 2011.
- [34] OUWEHAND, A. C. et al. *Adhesion of probiotic strains to human intestinal mucus*. Int. Dairy J., pp. 490s-490s, 1999.
- [35] WADSTROM, T. et al. *Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs*. J. Appl. Bacteriol., vol. 62, no. 6, pp. 513–520, 1987.
- [36] DUARTE, Priscila F. *Efeito de inibição de cepas de Lactobacillus, isolados de fezes humanas, frente a diferentes patógenos*. Universidade de São Paulo Escola de Lorena, 2007.
- [37] CHAMPAGNE, C. P; GARDNER, N. J.; ROY, D. *Challenges in the addition of probiotic cultures to foods*. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., vol. 45, no. 1, pp. 61–84, 2005.
- [38] RAMOS, Cíntia L. *Caracterização de Lactobacillus spp. e desenvolvimento de um sistema de*

*simulação de sobrevivência bacteriana no trato gastrointestinal*. Universidade Federal de Lavras, 2013.

- [39] REDONDO, Nadia C. *Avaliação in vitro de características probióticas do Enterococcus faecium CRL183 e do Lactobacillus helveticus ssp jugurti 416*. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho,” 2008.
- [40] SHORTT, C.; SALMINEN, S.; ROBERFROID, M., *Probiotics and Prebiotics in Health*. 2001.
- [41] SON, S. et al. *In vitro characterization of Lactobacillus brevis KU15006, an isolate from kimchi, reveals anti-adhesion activity against foodborne pathogens and antidiabetic properties*. *Microb. Pathog.*, 2017.
- [42] MATIJASIC, B. B. et al. *Ability of Lactobacillus gasseri K7 to inhibit Escherichia coli adhesion in vitro on Caco-2 cells and ex vivo on pigs' jejunal tissue*. *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 107, no. 1, pp. 92–96, 2006.
- [43] KOS, S. M. B. et al. *Adhesion and aggregation ability of probiotic strain Lactobacillus acidophilus M92*. *J. Appl. Microbiol.*, vol. 94, no. 6, pp. 981–987, 2003.
- [44] HANDLEY, P. S. *A Comparison of the Adhesion, Coaggregation and Cell-surface Hydrophobicity Properties of Fibrillar and Fimbriate Strains of Streptococcus salivarius*. *J. Gen. Microbiol.*, vol. 133, no. 11, pp. 3207–3217, 1987.
- [45] LEITE, Anely M. de O. *Análise da diversidade microbiana de grãos de kefir, caracterização da bebida fermentada e potencial probiótico das estirpes isoladas*. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.
- [46] GUEIMONDE, M. et al. *Effect of maternal consumption of Lactobacillus GG on transfer and establishment of fecal bifidobacterial microbiota in neonates*. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 42, no. 2, pp. 166–170, 2006.
- [47] YU, Q.; WANG, Z.; YANG, Q. *Ability of Lactobacillus to inhibit enteric pathogenic bacteria adhesion on Caco-2 cells*. *World J Microbiol Biotechnol*, pp. 881–886, 2011.
- [48] FLESCHE, A. G. T.; POZIOMYCK, A. K.; DAMIN, D. D. C. *O Uso Terapêuticos Dos Simbióticos*. *Arq. Bras. Cir. Dig.*, vol. 27, no. 3, pp. 206–209, 2014.
- [49] FLORES, Cristina. *Aspectos microbiológicos da bile de pacientes com suspeita de coledocolitíase e suas repercussões no tratamento das infecções biliares*. 2000.
- [50] GAGNON, M. et al. *Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate Salmonella adhesion and invasion*. *J. Microbiol. Methods*, vol. 94, no. 3, pp. 274–279, 2013.
- [51] ŽIVKOVIĆ, M. et al. *EPS-SJ exopolisaccharide produced by the strain Lactobacillus paracasei subsp. paracasei BGSJ2-8 is involved in adhesion to epithelial intestinal cells and decrease on E. coli association to Caco-2 cells*. *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. MAR, pp. 1–14, 2016.
- [52] BENGGA, A. A. et al. *Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of Lactobacillus paracasei strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin*. *Food Res. Int.*, vol. 103, pp. 462–467, 2018.
- [53] HYNÖNEN, U.; WESTERLUND-WIKSTRÖM, B.; PALVA, A.; KORHONEN, T. K. *Identification*

*by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin-binding function in the SIpA surface protein of Lactobacillus brevis.* J. Bacteriol., vol. 184, no. 12, pp. 3360–3367, 2002.

[54] JANKOWSKA, A.; LAUBITZ, D.; ANTUSHEVICH, H.; ZABIELSKI, R. *Competition of Lactobacillus paracasei with Salmonella enterica for Adhesion to Caco-2 Cells.* vol. 2008, 2008.

[55] COLLADO, M. C.; GUEIMONDE, M.; SANZ, Y.; SALMINEN, S. *Adhesion Properties and Competitive Pathogen Exclusion Ability of Bifidobacteria with Acquired Acid Resistance.* vol. 69, no. 7, pp. 1675–1679, 2006.