



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PROBIÓTICOS COMERCIAIS FRENTE
À ENTEROBACTÉRIAS**

LARISSA DA CONCEIÇÃO SANTOS

Serra Talhada – PE
2018

LARISSA DA CONCEIÇÃO SANTOS

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PROBIÓTICOS FRENTE À
ENTEROBACTÉRIAS PREJUDICIAIS AO HOMEM**

Monografia apresentada ao curso de Graduação de Bacharelado em Ciências Biológicas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Serra Talhada como requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Cynthia Maria Carneiro Costa

Serra Talhada – PE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca da UAST, Serra Talhada - PE, Brasil.

S237a Santos, Larissa da Conceição

Atividade antimicrobiana de probióticos comerciais frente à enterobactérias / Larissa da Conceição Santos. – Serra Talhada, 2018.

61 f.: il.

Orientadora: Cynthia Maria Carneiro Costa

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Unidade Acadêmica de Serra Talhada, 2018.

Inclui referências e apêndice.

1. Enterobactérias. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Probióticos. I. Costa, Cynthia Maria Carneiro, orient. II. Título.

CDD 574

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PROBIÓTICOS COMERCIAIS FRENTE À ENTEROBACTÉRIAS

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como requisito obrigatório para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cynthia Maria Carneiro Costa (ORIENTADORA)

UFRPE/UASt

Profa. Dra. Virginia Medeiros de Siqueira (2º TITULAR)

UFRPE/UASt

Profa. Ma. Ana Luiza da Silva (3º TITULAR)

UFRPE/UASt

SERRA TALHADA-PE

2018

Dedico essa monografia a Deus, meus pais
e a professora Cynthia Maria Carneiro
Costa.

Agradecimentos

À Deus pelo amor, força, coragem e ânimo, que me deste para passar por todos os momentos durante todo o percurso.

Aos meus pais Márcio e Nanci, aos meus irmãos, por todo apoio suporte e incentivo aos estudos. Tudo que hoje sou devo a vocês. Obrigada por tudo, vocês são meus pilares.

Em especial a minha irmã gêmea, Raissa Santos, que foi e sempre será um presente de Deus na minha vida, obrigada por toda ajuda, incentivo e cumplicidade.

Ao meu namorado Luan Souza pelo companheirismo, dedicação, amor e incentivo que foram essenciais para a conclusão desse trabalho. Amo você!

A minha professora Orientadora, Cynthia Costa por todo ensinamento, conselhos, esforço, paciência e dedicação.

A minha professora/supervisora Virgínia Medeiros, pela colaboração com meu trabalho, pelos conselhos e pelas dúvidas esclarecidas.

Aos professores, Plínio Pereira, Leandro dos Santos, pela amizade e por toda ajuda/suporte em outros trabalhos de pesquisa durante a graduação. Foi uma experiência gratificante trabalhar com vocês.

Aos meus amigos e companheiros de sala, Airton Gomes, Amanda Vieira, Patryck Monteiro, Vitória Lima, Jucicléia Medeiros, Antonielson Bezerra, Yara Araújo, André Marco, Elenice Santos, Larissa Medeiros, por todo suporte e trabalho em equipe. Foi ótimo passar todo esse tempo com vocês.

Em especial meu amigo Patryck pela grande amizade, risadas e por sempre ter me ajudado nas minhas dificuldades durante a graduação.

As meninas do laboratório, pelas risadas e distrações que foram de muita importância principalmente nos momentos de tensão.

Ao pessoal da monitoria, Ruth, Júlio e Joana, pela amizade, ajuda, união e pelo bom trabalho em equipe que tivemos. Foi ótimo trabalhar com vocês. Em especial a monitora Ruth que me ensinou a realizar todas as atividades destinadas a monitoria bem como as atividades da minha pesquisa. Destaco também o monitor Júlio que esteve comigo no último semestre da monitoria, agradeço pela ajuda e também pelos momentos de risadas e distrações. Obrigada por tudo!

Ao Instituto Oceanário Pernambuco – Base Itamaracá e, em muito especial, ao Professor Ricardo Gama Soares, por toda ajuda durante a minha graduação.

A todos os amigos estagiários que fiz na Base de Itamaracá, Luan Souza, Dênis Alves, Cláudio Cruz, Adão Medeiros, Amanda Bezerra, Andrey Giordane, Thiago Andrade, Felipe Santos, Werverson Ailton, Ádamo Gabriel, Viviana Rivieri, Thamires Magalhães, vocês são demais.

Em especial a Danielle Viana e Hidelânia Érica, pela amizade, carinho e amor durante esses anos, vocês são minhas preciosidades.

Aos meus amigos Rondinelly e Júlio César por toda amizade e apoio durante todo o percurso.

Ao meu amigo/irmão Alex que sempre esteve por perto para dar uma palavra amiga e de ânimo.

A meu amigo Nen pelos ensinamentos sobre a área de mergulho, por meio de você aprendi me encantar pela área de mergulho.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco/Unidade Acadêmica de Serra Talhada, pelo ensino gratuito e suporte para que eu pudesse concluir o curso.

A todos os funcionários da UAST.

A todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão do meu curso.

Muito Obrigada !!!

E ainda que tivesse o dom da profecia e conhecesse todos os mistérios e toda ciência e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria. (1CO 13:2).

RESUMO

Os probióticos são suplementos de microrganismos vivos que conferem benefícios ao hospedeiro. Em decorrência de alguma alteração na microbiota intestinal, os probióticos são receitados na tentativa de reverter desequilíbrios provocados por possíveis bactérias patógenas oportunistas. Dessa forma, a fim de conhecer o potencial dos probióticos comercializados em farmácia, a saber: *Saccharomyces cerevisiae* (Floratil®) *Saccharomyces boulardii* (Florax®) *Bacillus cereus* (Biovicerin®) e *Bacillus clausii* (Enterogermina®) objetivou-se quantificá-los em meio sólido e comparar com o fabricante, testar a atividade antimicrobiana dos probióticos individualmente, bem como a associação destes com *Lactobacillus* sp. (Leite fermentado Isis®) em meio sólido e líquido frente às enterobactérias. A contagem de Unidades Formadoras de colônias (UFC/mL) foi realizada pela técnica de diluição seriada e semeio em placas de Petri com Ágar Nutriente (para bactérias) e Ágar Sabouraud (para leveduras). As placas de Petri foram incubadas a 30 °C por 24 e 48 horas para o crescimento das bactérias e leveduras e posteriormente a quantificação das placas que apresentaram entre 20 e 200 UFC/mL. A atividade antimicrobiana foi avaliada a partir do crescimento dos probióticos individualmente e da associação destes com *Lactobacillus* sp. em meio sólido pela técnica de difusão em ágar, que consistiu em inocular discos de 15 mm na superfície do ágar Mueller Hinton onde se encontravam previamente semeadas, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. *Klebsiella* sp. e *Citrobacter freundii*. Também foi realizada a atividade antimicrobiana do crescimento dos probióticos individualmente em meio líquido, com extrato de cada probiótico em ágar Mueller Hinton com as bactérias testes previamente semeadas, além disso, a atividade dos probióticos também foi realizada pelo crescimento da associação desses com *Lactobacillus* sp. em meio líquido, em que a partir do crescimento deles, cada associado foi submetido a duas condições de tratamento colocando 5 mL do probiótico em dois tubos de Falcon (15 mL) onde um recebeu etanol (solvente polar) e o outro 5 mL de acetato de etila (solvente

apolar) submetidos a três horas sob agitação, em seguida, de todos os tubos foram pipetados 20 µl do sobrenadante e inoculados nos discos os quais estavam sobre a superfície do ágar Mueller Hinton com as bactérias testes previamente semeadas. Todos os testes foram realizados em triplicatas, incubados a 37°C, com resultados obtidos após 24 horas pela formação ou não do halo de inibição. Não houve atividade antimicrobiana frente às enterobactérias testadas. Diversos fatores devem ser levados em consideração quando se trata da ação metabólica de microrganismos, nas condições, *in vitro*, testadas neste trabalho.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus clausii*, microbiota intestinal.

ABSTRACT

Probiotics are supplements of living microorganisms that confer benefits to the host. As a result of some change in the intestinal microbiota, probiotics are prescribed in an attempt to reverse imbalances caused by possible opportunistic pathogenic bacteria. Thus, in order to know the potential of probiotics marketed in pharmacy, *Saccharomyces cerevisiae* (Floratil®) *Saccharomyces boulardii* (Florax®) *Bacillus cereus* (Biovicerin®) and *Bacillus clausii* (Enterogermina®) was quantified in solid medium and compare with the manufacturer, to test the antimicrobial activity of probiotics individually, as well as the association of these with *Lactobacillus* sp. (Isis ® fermented milk) in solid and liquid media against enterobacteria. The colony forming units count (UFC / mL) was performed by serial dilution and sowing in Petri dishes with Nutrient Agar (for bacteria) and Sabouraud Agar (for yeasts). The Petri dishes were incubated at 30 ° C for 24 and 48 hours for the growth of bacteria and yeasts and then quantification of the plaques that presented between 20 and 200 CFU / mL. The antimicrobial activity was evaluated from the growth of probiotics individually and their association with *Lactobacillus* sp. in solid medium by the agar diffusion technique, which consisted in inoculating 15 mm discs on the surface of the previously seeded Mueller Hinton agar, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. *Klebsiella* sp. and *Citrobacter freundii*. Antimicrobial activity of probiotic growth in liquid medium was also performed, with each probiotic extract in Mueller Hinton agar with the previously seeded bacteria. In addition, probiotic activity was also increased by the association of these with *Lactobacillus* sp. in liquid medium, in which, after their growth, each partner underwent two treatment conditions by placing 5 mL of the probiotic in two tubes of Falcon (15 mL) where one received ethanol (polar solvent) and the other 5 mL of acetate (apolar solvent) submitted to three hours under stirring, then 20 µl of the supernatant were pipetted from the tubes and inoculated onto the discs which were on the surface of the Mueller Hinton agar with the previously seeded test bacteria. All tests were performed in

triplicates, incubated at 37°C, with results obtained after 24 hours by the formation or not of the inhibition halo. There was no antimicrobial activity against the enterobacteria tested. Several factors should be taken into account when dealing with the metabolic action of microorganisms, under the conditions, in vitro, tested in this work.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus clausii*, intestinal microbiota.

.

LISTA DE QUADRO

Quadro 1: Características exigidas para a comprovação de um probiótico.....	25
--	----

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Diluições dos probióticos utilizadas para contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)	38
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplos de ações dos probióticos	21
Figura 2. (A) Tubos de Falcon contendo Caldo Sabouraud com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> + <i>Lactobacillus</i> sp. e <i>Saccharomyces boulardii</i> + <i>Lactobacillus</i> sp. em acetato e etanol. (B) Caldo nutriente com <i>Bacillus cereus</i> + <i>Lactobacillus</i> sp. e <i>Bacillus clausii</i> + <i>Lactobacillus</i> sp. em acetato e etanol.....	37
Figura 3: Placas de Petri com crescimento dos probióticos em diferentes diluições. (A) Floratil® – 10^{-6} , (B) Florax® – 10^{-2} , meio ágar Sabouraud; (C) Biovicerin® – 10^{-4} (D) Enterogermina® – 10^{-6} , meio ágar nutriente.	39
Figura 4: Microscopia dos probióticos em coloração de Gram. (A) Floratil® células de <i>Saccharomyces boulardii</i> ; (B) Florax® células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; (C) Biovicerin® células de <i>Bacillus cereus</i> ; (D) Enterogermina® células de <i>Bacillus clausii</i> ; (E) células de <i>Lactobacillus</i> sp. (x100, em óleo de imersão).....	40
Figura 5: Teste de atividade antimicrobiana, em Mueller Hinton, com probióticos crescidos em meio sólido frente à enterobactérias (A) <i>E. coli</i> , (B) <i>Salmonella</i> sp. (C) <i>Klebsiella</i> sp. (D) <i>Citrobacter freundii</i> . 1, 2, 3, 4 = Floratil® (<i>Saccharomyces boulardii</i>), Florax® (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>), Biovicerin® (<i>Bacillus cereus</i>) e Enterogermina® (<i>Bacillus clausii</i>) respectivamente.	41
Figura 6: Teste de atividade antimicrobiana, em Mueller Hinton, com os probióticos crescidos em meio líquido, frente à enterobactérias (A) <i>E. coli</i> (B) <i>Salmonella</i> sp. (C) <i>Klebsiella</i> sp. (D) . <i>Citrobacter freundii</i> . 1 e 2= Floratil® (<i>Saccharomyces boulardii</i>) e Florax® (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) respectivamente.....	42
Figura 7: Teste de atividade antimicrobiana dos probióticos em Mueller Hinton com probióticos crescidos em meio líquido frente à enterobactérias. (A) <i>Escherichia coli</i> ; (B) <i>Salmonella</i> sp. (C) <i>Klebsiella</i> sp.; (D) . <i>Citrobacter freundii</i> . 3 e 4= Biovicerin® (<i>Bacillus cereus</i>) e Enterogermina® (<i>Bacillus clausii</i>) respectivamente.	42

Sumário

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	X
LISTA DE QUADRO	XII
LISTA DE TABELA	XIII
LISTA DE FIGURAS	XIV
1.INTRODUÇÃO	16
2. REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	18
2.1. PROBIÓTICOS.....	19
2.2 MICRORGANISMOS GRAS.....	24
2.3 MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA.....	25
2.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	29
2.5. ENTEROBACTÉRIAS	30
2.5.1 <i>Escherichia coli</i>	30
2.5.2 <i>Salmonella</i>	31
2.5.3 <i>Klebsiella</i>	32
2.5.4 <i>Citrobacter</i>	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1 LOCAL DE EXECUÇÃO E PROBIÓTICOS	34
3.2 ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS E LEVEDURAS DOS PROBIÓTICOS..	34
3.3. ISOLAMENTO DE <i>LACTOBACILLUS</i> SP.	35
3.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	35
3.4.1 Teste de difusão em ágar	35
3.4.2 Teste de difusão em disco	35
3.4.3. Associação dos probióticos com os <i>Lactobacillus</i> sp.	36
3.4.3.1. Teste de difusão em ágar	36
3.4.3.2. Teste de difusão em disco	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 ISOLAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DOS PROBIÓTICOS	37
4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS PROBIÓTICOS	41
5. CONCLUSÕES	49
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
7.REFERÊNCIAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

A microbiota intestinal humana consiste em milhares de microrganismos presentes no intestino cooperando para o melhor funcionamento das respostas fisiológicas, imunes, homeostase, regulação hormonal, bom funcionamento do sistema nervoso, dentre outras ações benéficas (MOHAJERI et al., 2018).

Várias pesquisas têm sido feitas com intuito de conhecer o potencial de bactérias e fungos na população da microbiota intestinal, demonstrando que esses microrganismos habitantes do intestino, não são apenas habitantes passivos, mas também desempenham interações com seu hospedeiro de forma complexa. Além dessas interações, os microrganismos possuem um alto potencial de seletividade, por isso estes, tornaram-se indispensáveis na produção de fármacos e outras substâncias, uma vez que alguns medicamentos utilizados atualmente não são tão eficazes no tratamento de superbactérias por causa do uso indiscriminado e repetitivo de antibióticos (BINNS, 2014).

Os probióticos são suplementos de microrganismos vivos que produzem benefícios ao hospedeiro, quando administrados em quantidades apropriadas, desempenhando funções essenciais ao hospedeiro e promovendo a restauração da microbiota intestinal saudável (RAIZEL et al., 2011). Dentre os gêneros mais utilizados na produção dos probióticos destacam-se os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Esses gêneros de bactérias são Gram-positivas, ácido-láticas e crescem em microaerofilia, além desses existem os *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *SporoLactobacillus*, bem como as espécies não ácido-láticas; *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Propionibacterium freudenreichii* e as leveduras *Saccharomyces boulardii* e *S. cerevisiae* que também podem ser encontradas em probióticos (STURMER et al. 2012).

Quando a microbiota é alterada, o hospedeiro pode apresentar inflamação na mucosa, diarreia, desordem de permeabilidade, entre outros (SANTOS, 2011), essas alterações podem ser causadas por infecções gastrointestinais ocasionadas por bactérias patogênicas oportunistas, ou por uso de antibióticos no tratamento de doenças, (BINNS, 2014). Para reverter esses quadros, alguns probióticos são utilizados na recuperação da microbiota, reestruturando-a, estimulando o sistema

imunológico, produzindo vitaminas, tratando alguns tipos de diarreia, e melhorando os níveis de colesterol no organismo (SANTOS, 2011).

Atualmente muitas pesquisas são realizadas no intuito de investigar se realmente os probióticos podem acelerar ou melhorar a correção da microbiota em decorrência de uma infecção (SAAD, 2006). Alguns probióticos são temporários, já outros conseguem se replicar e persistir no intestino, pelo menos até antes de um distúrbio provocado pela ingestão excessiva de antibióticos, por exemplo. Embora pesquisas apontem a composição da microbiota intestinal, ainda há muito a ser descoberto quanto à composição microbiana normal (eubiose) do trato gastrointestinal, para isso é necessário entender a distinção entre “normal” e “saudável”. A noção do efeito benéfico dos probióticos deve-se ao conhecimento de que a microbiota intestinal protege os indivíduos contra infecções (BINNS, 2014).

Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a microbiota intestinal forma uma barreira ativa em oposição aos microrganismos patógenos e oportunistas, quando há algum distúrbio os probióticos são administrados em maior quantidade e conseqüentemente, promovem condições favoráveis para a recuperação da microbiota normal (KARKOW et al. 2007). Embora, vários estudos relacionados aos benefícios dos probióticos tenham sido publicados, na cura de alguns distúrbios gastrointestinais, é importante a realização de mais discussão e pesquisas sobre o tema, ressaltando a importância da associação desses probióticos com outras terapias (THEOPHILO e GUIMARÃES 2008).

Como os probióticos conseguem agir significativamente na modulação intestinal do organismo animal, alguns estudos apontam a relevância de trabalhar com esses frente à enterobactérias potencialmente patógenas (KURITZA et al., 2014). Diante disso, o presente estudo objetivou-se, isolar e quantificar os diferentes probióticos em meio sólido e comparar com a indicação dos fabricantes, caracterizar microscopicamente os microrganismos isolados dos probiótico e avaliar a atividade antimicrobiana dos probióticos *Saccharomyces cerevisiae* (Floratil®) *Saccharomyces boulardii* (Florax®) *Bacillus cereus* (Biovicerin®) e *Bacillus clausii* (Enterogermina®) isoladamente e da associação destes com *Lactobacillus* sp., em meio sólido e líquido, frente à enterobactérias.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

A Microbiologia é a ciência que estuda os microrganismos, amplo grupo de seres vivos conhecidos como bactérias, fungos, protozoários e as microalgas, além desses os vírus também são estudados neste grupo, embora não serem considerados vivos. Estes organismos são responsáveis por diversas atividades relevantes para o Homem e o meio ambiente, os mesmos são encontrados em diferentes lugares como solo, água o ar inclusive em ambientes extremos como desertos, leito de oceanos e áreas vulcânicas (BINNS, 2014).

Os microrganismos apresentam grande diversidade e se adaptam a variados ambientes devido à grande variação genética que possuem (NICOLAU, 2016). Com relação ao Homem, as bactérias e os fungos se destacam por serem em sua grande maioria benéficos, e por serem considerados decompositores por excelência. Além disso, participam de vários processos na indústria alimentícia (produção de pão, cerveja, vinho, queijo, leite fermentado, molhos), farmacêutica (antibióticos, vitaminas, ácidos orgânicos), na medicina (tratamento de doenças), agronomia (solubilizadores de nutrientes, bioinseticidas, biofungicidas). Por outro lado, alguns microrganismos são responsáveis por causarem desequilíbrios tanto no homem como ao meio ambiente (ROMANO et al, 2016). Essas alterações, embora sejam representadas por uma pequena porcentagem do universo microbiano, causam doenças com ampla representatividade na saúde pública e no ambiente (TORTORA, et al. 2012).

Estes organismos também são encontrados como parte do microbioma humano e animal exercendo ações benéficas indispensáveis aos mesmos em diversas partes do corpo, como a pele, trato gastrointestinal, mucosa oral, entre outros (CARDOSO, 2015). A existência desses microrganismos nos seres vivos foi observada pela primeira vez pelo pesquisador holandês Antonie van Leeuwenhoek, por meio de amostra de fezes e salivas e devido serem microscópicos foram chamados pela primeira vez de “animálculos” (CHO e BLASER, 2012).

2.1. Probióticos

O nome "probiótico" foi dado em 1965 por Lilly e Stillwell como um produto microbiológico que influencia de forma positiva, no desenvolvimento de outros microrganismos a partir de substâncias que esses produzem. Para tal denominação, esses microrganismos deveriam ser viáveis para a manutenção do trato intestinal. A partir disso, outros pesquisadores iniciaram suas pesquisas sobre como esses pequenos organismos beneficiavam a saúde do indivíduo (GUARNER et al., 2011).

A curiosidade por buscar mais informações sobre os probióticos aumentou, pois, anos atrás, a terapia medicamentosa para pacientes era feita unicamente por meio de antibióticos. No entanto, a ingestão demasiada desses medicamentos não estava obtendo resultado esperado, devido às modificações que esses químicos causavam no trato gastrointestinal, deixando-o vulnerável ao aparecimento de outras doenças. Então, através de várias pesquisas, a ideia de introduzir cepas bacterianas benéficas ao trato intestinal com finalidade de restaurar a microbiota habitual e prevenir doenças, se tornou muito viável (GUPTA e GARG, 2009). Ainda segundo esses autores, os gêneros de bactérias mais utilizadas como probióticos são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus*, *Bacillus* e *Streptococcus*. Além de representantes fúngicos do gênero *Saccharomyces*, que são bastante utilizadas.

O professor pesquisador Russo, Elie Metchnikoff, em 1905, foi o responsável por descrever as primeiras bactérias ácido-láticas como organismos que conferiam melhor resultados para a saúde, acrescentando mais tempo de vida ao indivíduo (WHO, 2011). A partir disso, foi proposto a utilização de leite fermentado na dieta do indivíduo, denominando o nome da bactéria *Bacilo bulgaro* (GUARNER et al., 2011). Ainda de acordo com esses autores, em 1917, o professor pesquisador, Alfred Nissle, utilizou cepas não patogênicas de *Escherichia coli*, isoladas de fezes de um soldado da primeira guerra mundial, como probióticos em distúrbios intestinais, foi o primeiro pesquisador a utilizar bactérias probióticas não ácido-láticas.

A palavra probiótico é de origem grega que significa "pro-vida" (COPPOLA e TURNES, 2004), e também benéfico à vida (BARBOSA, et al 2011). Esse preparado constituído a base de bactérias ou fungos é considerado alimento funcional, que dispõe de substâncias necessárias para a vida, como vitaminas e carboidratos, com

potencial de conferir melhor desenvolvimento da saúde humana (PHAM e MOHAJERI, 2018). Sobre alguns benefícios dos probióticos, a medicina atual destaca o tratamento de distúrbios do metabolismo gastrointestinal, inibição da carcinogênese e seu efeito como imunomoduladores (OLIVEIRA, et al., 2017).

Os probióticos possuem diferentes atividades importantes que caracterizam seu modo de ação, tais como, os efeitos antimicrobianos, nutricionais e fisiológicos (RAIZEL et al., 2011). O primeiro modo seria a capacidade desses probióticos de inibir alguns microrganismos patógenos, estas atividades são viabilizadas a partir da quantidade de células responsáveis por tal atividade, uma vez que, produzirão compostos específicos que inibirão a presença de microrganismos patógenos, essa atividade antimicrobiana pode ser visualizada macroscopicamente pelo halo de inibição. O segundo modo de ação seria através de mudanças aleatórias no metabolismo dos microrganismos, aumentando ou diminuindo o trabalho enzimático. Esses mesmos autores ainda dizem que o terceiro e último modo trata dos efeitos causados no hospedeiro com intuito de aumentar significativamente a imunidade do mesmo, mediado por anticorpos e possíveis macrófagos (OLIVEIRA, et al. 2002).

Os probióticos são comumente consumidos em alimentos, que ajudam na nutrição de adultos e crianças, cada um desses devem ser administrados em quantidades corretas, cujas favorecerão a multiplicação desses microrganismos ao colonizarem o intestino, uma vez que, quanto maior a população de microrganismos benéficos, melhor será as funções fisiológicas do indivíduo (HUNGRIA & LONGO, 2009).

Segundo Fonseca et al (2010), a ação dos probióticos consiste em eliminar a competição dos microrganismos patógenos por sítios de receptores presentes na mucosa bem como os nutrientes presentes (Figura 1). Ainda de acordo com esse autor, a diminuição desses agentes prejudiciais, podem ser feito pela redução do pH intestinal, compostos antimicrobianos como também peróxido de hidrogênio e bacteriocinas.

Uma revisão bibliográfica realizada por Lara et al. (2015) aborda que probióticos conseguem alterar de forma benéfica a microbiota intestinal conseguindo inibir o crescimento de bactérias patogênicas ajudando no estímulo da função imunológica do hospedeiro (Figura 1). Essa mesma autora relata que os probióticos foram utilizados para prevenir a dermatite atópica, apresentando bons resultados.

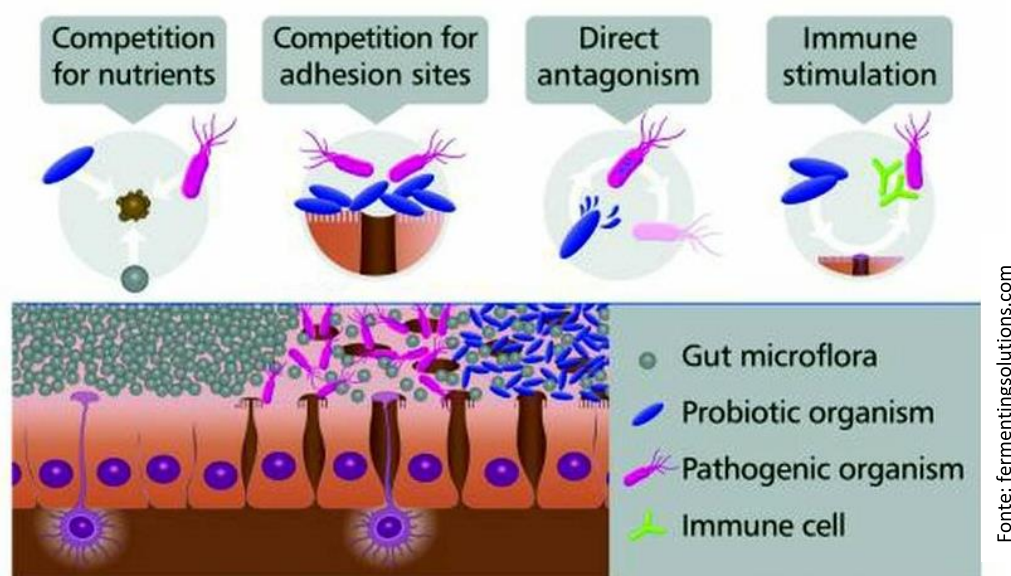


Figura 1: Exemplos de ações dos probióticos

Os probióticos, prebióticos e simbióticos são substâncias que tem sido recentemente discutidas e pesquisadas, pois, conseguem modular respostas inflamatórias e competir contra agentes invasores, modificando assim o pH do meio (MORAES e JACOB, 2006). Estes, também produzem diferentes metabólitos com caráter antimicrobiano e compete por sítios de ligação, impedindo dessa forma a ação patógena de microrganismos potencialmente prejudiciais ao animal incluindo o homem (KURITZA et al., 2014). Entretanto, pouco se sabe a forma de ação desses processos, se eles impedem ou inibem o crescimento de patógenos (MORAES e JACOB, 2006).

Os prebióticos são carboidratos não digeridos pelo trato gastrointestinal (GUPTA e GARG, 2009), e se caracterizam como um alimento funcional que nutrem as bactérias probióticas. Constituídos basicamente de oligossacarídeos e polissacarídeos, podem ser encontrados em cereais, biscoitos e principalmente produtos lácteos, dentre os prebióticos mais conhecidos estão lactulose, oligofrutose, inulina, galactooligosacarídeos, fibras, entre outros. Cada substância é responsável por nutrir determinada classe de probióticos e esses prebióticos por sua vez, ajudam no modo de ação desses probióticos (GUARNER et al., 2011). Os probióticos e prebióticos são denominados simbióticos os quais ajudam as bactérias a se manterem vivas no trato intestinal (GUPTA e GARG, 2009).

Os simbióticos contribuem progressivamente na prevenção de doenças no intestino, já foi descrito que esses conseguem reduzir a incidência de diarreia infantil grave (MILLANI, et al., 2009). Ainda de acordo com esses autores, a digestão parcial

no intestino delgado contribui para fortalecimento do sistema imune, inibindo os microrganismos patógenos. Os simbióticos nada mais são do que a junção dos probióticos com os prebióticos, sua ação promove maior eficiência nos processos fisiológicos (KERRY et al., 2018). A ação dos simbióticos se torna bem maior contra os patógenos e induz a reposta imunológica, pois os probióticos aumentam a produção de células de defesa no intestino, além de aumentar o processo de absorção de cálcio por meio da fermentação dos prebióticos no cólon (FLESCHE et al., 2014).

As espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* são leveduras não patogênicas com elevado potencial probiótico que tem sido estudada a mais de 30 anos principalmente no tratamento de diarreia. *S. boulardii* foi isolada pela primeira vez de frutas tropicais pelo pesquisador Henri Boulard em 1923 e a partir disso, novas pesquisas foram realizadas com intuito de descobrir a importância dessas leveduras (APPEL-DA-SILVA et al., 2017).

Estas leveduras têm sido muito utilizadas no tratamento de várias doenças gastrointestinais (APPEL-DA-SILVA et al., 2017), seja por meio de infecções virais ou bacterianas (ARNOLDO et al., 2003). *S. cerevisiae* e *S. boulardii* são utilizadas como probióticos em animais e humanos, apesar das duas espécies serem do mesmo gênero, existem diferenças genéticas entre elas, além do mais *S. boulardii* é mais adequada para tratamentos em humanos, pois consegue se desenvolver a temperaturas maiores que 30°C enquanto que *S. cerevisiae* preferem temperaturas menores que isto (PALMA et al., 2015).

A levedura *S. boulardii* pode ser utilizado como suplementação para adultos e crianças, além disso, está associado a diversos tipos de tratamentos principalmente àqueles relacionados a desequilíbrios intestinais como a diarreia do viajante, pelo uso abusivo de antibióticos ou de origem viral ou bacteriana (ŁUKASZEWICZ, 2012). Várias pesquisas mostram que o tratamento com *S. boulardii* pode mudar o quadro de diversos pacientes que são submetidos à administração de antibióticos, melhorando assim a sanidade do paciente e consequentemente diminuindo seu tempo em clínicas hospitalares (ARNOLDO et al., 2003). O uso desse probiótico consegue evitar a infecção por *Clostridium difficile* impedindo a inflamação do intestino, entre outras infecções (APPEL-DA-SILVA et al., 2017; HEIKE e BISCHOFF, 2016), embora seu uso seja bastante explorado,

ainda há muito a ser descoberto sobre seus mecanismos de ação (ŁUKASZEWICZ, 2012).

O gênero *Bacillus* é caracterizado por ser Gram-positivo, produtor de endósporos, essas bactérias possuem formato bacilar, embora não faça parte da microbiota gastrointestinal indígena algumas espécies são utilizadas como probiótico (COELHO, 2013). As espécies desse gênero têm sido estudadas há 50 anos a partir de um produto italiano chamado Enterogermina, que em 1958 foi utilizado como um suplemento medicinal (CUTTING, 2011), nesse sentido, apesar de alguns estudos realizados, o interesse pelas cepas de *Bacillus* foi mais intenso nos últimos 15 anos.

Das espécies empregadas como probióticos, *Bacillus cereus* e *Bacillus clausii*, são muito utilizadas na nutrição animal e em formulas farmacêuticas para uso humano. As cepas de *B. clausii* são utilizadas no produto Enterogermina considerado um suplemento medicinal, na prevenção de diarreia infantil (URDACI et al., 2004). Esses autores ainda observaram a atividade antimicrobiana de cepas probióticas de *B. clausii* contra *Stafilococcus aureus* e *Salmonella*, e concluíram que o probiótico conseguiu inibir apenas a presença de *Staphylococcus*.

Apesar de *B. cereus* ser muito conhecida como agente causador de intoxicação alimentar, nem todas as cepas possuem os genes de toxicidade, sendo algumas caracterizadas como probióticas (CUTTING, 2011). Essas espécies são utilizadas como suplemento alimentar para garantir o bem-estar do indivíduo, restaurar a microbiota, algumas dessas, tem participado como suplemento alimentar ou no tratamento de pacientes com infecções intestinais (COELHO, 2013). Um teste realizado com *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* em animais mostrou que a cepa de *B. cereus* teve melhor atividade na suplementação dietética ao contrário das demais (REDA, 2018). Outros trabalhos com cepas probióticas de *Bacillus* têm sido realizados para melhor entender seu funcionamento (COELHO, 2013).

Outros estudos realizados com os probióticos também abordam o caráter probiótico dos *Lactobacillus* que são bactérias Gram-positivas com formato de bastonetes e são assim chamados por produzirem ácido lático como produto final da fermentação, eles participam desse grupo juntamente com as *Bifidobacterium*, *enterococcus*, *Lactococcus*, entre outros (BRUNO, 2011).

O ácido-lático é uma substância antimicrobiana produzida por essas bactérias e por isso são muito utilizadas na prevenção e tratamentos de distúrbios

gastrointestinais (GOLDSTEIN et al., 2015). Testes realizados *in vitro* mostram que bactérias ácido lácticas conseguem induzir as células de defesas a produzir substâncias inibidoras contra agentes patógenos, bem como ajudam em processos inflamatórios ocorrentes no trato gastrointestinal e na indução de células de defesa do sistema imunológico, entre outros benefícios (SICHETTI et al., 2018).

Diferentes cepas de *Lactobacillus* têm sido utilizadas em leites fermentados, na fabricação de queijos como alimento funcional por conseguirem garantir o desenvolvimento da microbiota saudável inibindo o crescimento de patógenos oportunistas (FLESCHE et al., 2014). Várias pesquisas com cepas de *Lactobacillus* já foram desenvolvidas, inclusive como suplementação na modulação do trato intestinal, bem como na estimulação do sistema imunológicos em humanos (VANDENPLAS, et al., 2015; VEMURI, et al., 2018).

2.2 Microrganismos GRAS

Conceitualmente Generally Recognized as Safe (GRAS) significa “geralmente conhecido como seguro”, este termo está relacionado a cosméticos, medicamentos e alimentos que são geralmente comercializados com intuito do benefício à população. Destacando-se os alimentos ou substâncias contidas no mesmo, antes deles irem às prateleiras e tornar-se algo consumível, primeiramente é necessário o seu reconhecimento como um produto seguro (GRAS), ou seja, um processo de aprovação segundo a Lei Federal dos alimentos afirmando que estes estão aptos para o consumo humano (SEWALT et al., 2016).

Se tratando dos probióticos para a sua aprovação é imprescindível à realização de testes de repetições sobre a segurança do produto antes de serem comercializados. Os probióticos são muito utilizados como alimento funcional em produtos como leites fermentados, iogurtes, kefir, entre outros. Para participarem desses alimentos os probióticos devem passar primeiramente por uma seleção, a qual deve avaliar aspectos taxonômicos, funcionais, tecnológicos, fenotípicos, genéticos, segurança e resistência principalmente a antibióticos (OMURA, 2014). Além disso, também é importante a produção do probiótico em larga escala e que estejam viáveis e ativos no local disponibilizado, terem resistência ao ambiente ácido estomacal, ter capacidade de adesão às células intestinais e antagonismos a patógenos (MARTINEZ et al., 2014).

Atualmente se sabe que boa parte dos probióticos é reconhecida como seguros, principalmente os que contêm os gêneros, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces*, são bem conhecidos por sua eficácia no tratamento de diversos distúrbios gastrointestinais e por entrarem em todos os requisitos que caracterizam um probiótico (Quadro 1) (CASSANEGO et al., 2015). Os efeitos benéficos proporcionados juntamente com outros probióticos contribuem para o melhor funcionamento das funções do corpo humano e de outros animais (OMURA, 2014).

Quadro 1: Características exigidas para a comprovação de um probiótico

Caracterização de um probiótico
Tolerar o ácido biliar
Possuir adesão às células epiteliais
Competição por nutrientes
Possuir antagonismo a patógenos
Considerados seguros
Serem ativos e viáveis
Recuperar a microbiota intestinal
Colonização do intestino

(SORNPLANG E PIYADEATSOONTORN, 2016)

2.3 Microbiota Intestinal Humana

A microbiota intestinal se refere ao agrupamento de microrganismos presente no intestino humano (GONÇALVES, 2014). Segundo Isolauri, et al (2004) a microbiota normal intestinal é caracterizada pelo bem-estar físico em que o indivíduo se encontra, sem a presença de doenças. Esses microrganismos habitantes do trato gastrointestinal, quando ingeridos não apresentam efeitos secundários, pelo contrário, ajudam nos processos fisiológicos, permeabilidade intestinal, imunidade da mucosa, entre outros (MARTINS et al., 2005).

Por meio de pesquisas realizadas sobre o microbioma humano, sabe-se atualmente que o número de microrganismo é milhões de vezes maiores que o quantitativo de células do corpo humano (MIMICA, 2017). A simbiose entre a microbiota e o seu hospedeiro contribui para o aumento de chances de uma boa qualidade de vida, visto que, os microrganismos presentes no corpo do hospedeiro

trabalham em harmonia para o melhor desenvolvimento dos processos fisiológicos (MOHAJERI, et al., 2018).

A microbiota encontra-se em diferentes partes do corpo, por exemplo, ao sistema respiratório, digestivo, genital e a pele, contudo sabe-se que a maior biota se encontra no intestino principalmente, o grosso (MIMICA, 2017). Ainda de acordo com este autor, a microbiota compreende maior concentração de células bacterianas, mas também existem fungos e vírus, porém em menor quantidade. Os microrganismos beneficiam e são beneficiados com nutrientes e vitaminas, para que se mantenham ativos e funcionais, e o ambiente em que se encontram deve está com temperatura, pH e umidade adequada (UZCÁTEGUI, 2016).

Os estudos realizados sobre a microbiota humana caracterizam-na como tão importante e imprescindível que esta pode ser utilizada para diversos fins. O transplante de microbiota fecal seria um deles, recentemente essa técnica voltou-se a ser utilizada no tratamento de infecções oriundas de bactéria patógenas. Essa forma de tratamento não é tão recente, pois já foi utilizada por chineses num tratamento de colite pseudomembranosa em 1958, entretanto, devido aos seus bons resultados foi novamente incorporada nos últimos dez anos. Neste trabalho, os autores destacam o transplante de microbiota fecal de um indivíduo com microbiota saudável para outro indivíduo portador de uma infecção bacteriana (MESSIAS et al., 2018).

Geralmente o indivíduo doador é parente consanguíneo do receptor, entretanto, é também requerido alguns exames e critérios, como por exemplo, não ter feito uso de antibióticos em pelo menos seis meses, não ter nenhuma doença inflamatória, não ser imunocomprometido, dentre outras questões (GANC et al., 2015). Este tipo de técnica, também pode ser realizada para tratar outras doenças provocadas por outros microrganismos, isto dependerá da situação clínica do paciente (FRANCINO, 2014). A maioria das infecções graves existentes ocorre pela resistência bacteriana por algumas classes de antibióticos, uma vez ganhando oportunidade certas bactérias causam infecções gravíssimas no seu hospedeiro principalmente as bactérias do gênero *Clostridium* (PATHAK et al., 2014).

Devido aos agravos causados especificamente por isolados resistentes de *Clostridium difficile*, pesquisas demonstram que a população idosa é beneficiada com essa técnica de transplante da microbiota fecal. Geralmente, esses idosos se

encontram em ambientes hospitalares sendo tratados com antibióticos convencionais e quando a bactéria ganha resistência provoca algumas doenças como, diarreia e insuficiência renal, entre outras complicações (GANC et al., 2015). A realização desse transplante, também foi descrita em crianças acometidas com colite ulcerativa, as quais obtiveram bons resultados após o tratamento (NUSBAUM et al., 2018).

O conhecimento da microbiota intestinal se tornou muito importante para o tratamento de algumas patologias que acometem o homem (PAIXÃO E CASTRO, 2016). A relação mutualística entre esses microrganismos com seu hospedeiro contribui muito para seu melhor desenvolvimento fisiológico (GONÇALVES, 2014).

Estratégias alimentares foram estudadas para estimular a proliferação contínua da microbiota benéfica, por meio de probióticos adicionados na alimentação, ou através dos prebióticos, conhecidos como suplemento alimentar que ajudam os probióticos a dominarem outras bactérias do trato gastrointestinal (PHAM e MOHAJERI, 2018).

De acordo com Waitzberg (2009) a microbiota intestinal é dividida em três partes, a microbiota dominante (*Bifidobactérias*) subdominante (*Lactobacillus*) e residual (*Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Clostridium*). A relação mutualística entre os microrganismos com seu hospedeiro contribui muito para seu melhor desenvolvimento fisiológico (GONÇALVES, 2014).

O epitélio intestinal é envolvido por uma camada de muco que impede a entrada de invasores patógenos, nas células desse epitélio também existe uma barreira de gel mucoso, impedindo a invasão de microrganismos patógenos, os quais, geralmente, conseguem invadir a célula utilizando os fatores de virulência que os ajudam na penetração celular. Os microrganismos benéficos estão presentes na porção externa do muco, neste local conseguem sobreviver a partir de nutrientes como, vitaminas, carboidratos, peptídeos e minerais (TADDEI e FEFERBAUM, 2017).

O estômago e o intestino delgado são ambientes com baixa proliferação microbiológica devido à presença atuante do suco gástrico, secreção pancreática e o próprio peristaltismos do intestino (ANDRADE, 2010). Com esses fatores o estômago consegue comportar apenas os gêneros de *Lactobacillus*, *Streptococcus* (BESERRA, 2014) e *Helicobacter pylori* (YOUSSEF et al., 2018). No intestino

delgado existe uma pequena população de bactérias de *Escherichia coli* e outros anaeróbios facultativos, como também os *Lactobacillus* e *Peptostreptococcus* (BREDA, et al., 2010). O intestino grosso é o local onde se tem maior variedade complexa de microrganismos, principalmente anaeróbios (GONÇALVES, 2014), composta pelos gêneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides* (90-95%), *Escherichia*, *Enterococcus* e *Clostridium* (SERDOURA, 2017).

De acordo com as pesquisas feitas, o intestino da criança ganha sua microbiota através da mãe, após o parto (PAIXÃO E CASTRO, 2016) que são muito importantes na homeostase do corpo (AGGARWAL et al., 2016). Geralmente as primeiras bactérias a colonizarem o bebê são *Escherichia coli*, *E. faecalis* e *E. faecium*, devido à alta quantidade de oxigênio, dez dias após o parto, o meio fica apto para a colonização de outras bactérias anaeróbias como *Clostridium*, *Bacteroides* e *Bifidobacterium* (TADDEI e FEFERBAUM, 2017).

O leite materno é composto por diversas bactérias dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* e várias espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, esses dois últimos gêneros atuam rigorosamente contra a adesão de bactérias patogênicas na mucosa intestinal. Ainda segundo esses autores, a maioria dos bebês prematuros possui risco de serem acometidos com enterocolite necrosante, esse distúrbio acarreta na diminuição da variedade de microrganismos benéficos, predominando várias bactérias patogênicas como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Helicobacter*, entre outras (TADDEI e FEFERBAUM, 2017).

No decorrer do tempo o desenvolvimento microbiológico do indivíduo recém-nascido será formado a partir do contato com o meio externo onde ele estará inserido, incluindo a idade, alimentação, estilo de vida e entre outros (GONÇALVES, 2014). A microbiota intestinal desse indivíduo estará sujeita a disbiose, ou seja, um desequilíbrio nas funções normais do metabolismo intestinal, por vários fatores, que pode resultar em infecções e inflamações, a fim de reverter à disfunção fisiológica, os probióticos podem ser utilizados para eliminar a ação dos possíveis patógenos e controlar a população dos mesmos (NOGUEIRA, 2015).

O uso exacerbado de antibióticos também é outro fator agravante da disbiose, isso porque, esse químico elimina boa parte das bactérias sensíveis, ou

seja, bactérias benéficas, deixando as mais resistentes, contribuindo no aparecimento de doenças devido a maior presença de populações bacterianas oportunistas. Se há maior concentração de populações bacterianas resistentes, então há maior probabilidade do hospedeiro ser acometido por doenças causadas por essas bactérias, principalmente as do gênero *Clostridium* (ANDRADE, 2010).

2.4. Atividade Antimicrobiana

Essa ação consiste na inibição de qualquer microrganismo, seja patógeno ou não (GUEDES NETO et al, 2005). Pode ser dada a partir de qualquer substância produzida por determinado organismo, como por exemplo, metabólito primário ou secundário, probióticos, óleo essencial, extratos vegetais, entre outros. Essas substâncias podem inibir ou não o crescimento do agente patógeno, isso dependerá do fator de resistência do microrganismo (SIMONETTI, et al, 2016).

Alguns autores vêm discutindo, que os probióticos de bactérias ácido lácticas conseguem inibir a presença de certas bactérias patogênicas principalmente as dos gêneros *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Pseudomonas*, e bactérias do grupo coliforme (GUEDES NETO et al, 2005). A inibição ocorre por meio de algumas substâncias liberadas pela maioria das bactérias lácticas como, subprodutos de via metabólica, toxinas, bacteriocinas, enzimas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio (DE SOUZA MOTTA e GOMES, 2015).

Estudos mostram que algumas bactérias do gênero *Bifidobacterium* podem produzir bacteriocinas (peptídeos antimicrobianos) (JUIZ, et al., 2017) sintetizadas nos ribossomos as quais diferem pelo modo de ação, biossíntese, transporte e a composição de aminoácidos em sua estrutura (OGAK e FURLANETO, 2015) essas bacteriocinas são capazes de agir contra bactérias Gram-negativas como também as Gram-positivas (JUIZ, et al., 2017). Outros estudos também explanam que os probióticos com *Lactobacillus mesenteroides* conseguem inibir o crescimento de agentes patogênicos carregados por alimentos como a *Listeria monocytogenes*, sendo um caso relevante para a diminuição das doenças transmitidas por alimentos (JERONYMO et al., 2013).

2.5 Enterobactérias

As enterobactérias são um grupo de bactérias pertencentes à família Enterobacteriaceae, são gram-negativas (PUERTA-GARCÍA E MATEOS-RODRÍGUEZ, 2010), se apresentam na forma de bacilos, podem ter motilidade ou não e conseguem fermentar a glicose, dependendo da espécie pode ser aeróbia ou anaeróbia facultativa (PATERSON, 2012). São assim denominadas, por se encontrarem no trato gastrointestinal de vertebrados (PUERTA-GARCÍA E MATEOS-RODRÍGUEZ, 2010).

São muito conhecidas por serem agentes patológicos responsáveis por sérias infecções no trato gastrintestinal, quando tem oportunidade e principalmente quando estão em grande população, ganham maior resistência (SEIBERT, et al., 2014). Atualmente essas bactérias são caracterizadas como um problema de saúde pública, por acometer grande parte da população (LAVAGNOLI, 2017), dentre as existentes se destacam os gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Salmonella*, *Shigela*, *Clostridium*, entre outros. Esses possuem grande importância por serem agentes etiológicos do trato gastrointestinal (OLIVEIRA, et al., 2015).

Além de causar doenças, um dos caracteres cruciais dessas bactérias, é a capacidade de resistir a alguns antibióticos, e por isso, muitos estudos foram realizados a fim de conhecer o grau de resistência e as quais substâncias elas conseguem ser sensíveis, esses estudos têm sido feitos, a partir de técnicas de antibiograma e moleculares. Ainda segundo esses autores, o grau de virulência desses microrganismos acarreta complicações trágicas dependendo da patologia, muitas dessas bactérias conseguem inibir a ação dos antibióticos por meio de genes específicos que sintetizam enzimas específicas, as quais impedem a ação de determinada classe de antibióticos, por exemplo, as bactérias que possuem o gene blaKpC conseguem sintetizar a carbapenemases (enzimas plasmídio-mediadas) que conferem resistência aos antibióticos betalactâmicos (ALVES E BEHAR, 2013).

2.5.1 *Escherichia coli*

Esta bactéria apresenta a forma de bastonete não esporulado, com movimento flagelar peritríquios e metabolismo anaeróbio facultativo (LEME, 2013).

Conhecida por apresentar sorotipos com alto grau de virulência está inserida no grupo dos coliformes e por isso é uma indicadora de contaminação fecal. É habitual do intestino humano e do meio ambiente, além de poder ser carregada por alimento, como por exemplo, as carnes, a presença dessa bactéria interfere na qualidade do alimento (SATO, et al., 2008). Fazem parte da microbiota intestinal inofensiva (*E. coli* Nissle, sorotipo O6: K5: H1), as estirpes benéficas são utilizadas como probióticos, em processos inflamatórios (CAÑAS et al., 2016), porém a *E. coli* também possui caráter patogênico responsável por diferentes tipos de diarreias no seu hospedeiro, além de doenças extra intestinais atingindo o sistema nervoso, respiratório e urinário (KHODAI et al., 2017).

Quando a *E. coli* assume sua forma enterotoxêmica, se torna responsável pela famosa “diarreia do viajante”, que acomete muitas pessoas que ingerem alimento contaminado. Esses autores ainda explanam que probióticos dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Saccharomyces* são muito utilizados no combate desse desequilíbrio fisiológico (KARKOW et al. 2007).

A *E. coli* também está relacionada com outros tipos de diarreias quando assume outras formas como enterotoxigênico, enteropatogênico, enteroagregativo, enterohemorrágica, e produtoras de toxina Shiga. Os *Lactobaccillus* são muito utilizados na inibição da *E. coli* enterotoxigênica, pois o mesmo impede a adesão dessa bactéria na mucosa intestinal por meio da liberação de peróxido de hidrogênio (KURITZA, et al., 2014).

A literatura explica que os probióticos, *Lactobacillus* e *Bifidobactéria* também conseguem inibir o crescimento de *E. coli* em condições de anaerobiose (COSTA, et al., 2012).

2.5.2 *Salmonella*

São bactérias Gram-negativas caracterizadas pela presença de fímbrias, flagelos peritríquios que conferem mobilidade, possuem formas de bastonetes curtos, são aeróbios facultativos, com pH neutro, temperatura ótima de 37°C, e não conseguem resistir a temperaturas de 60°C durante 15 minutos (MENDONÇA, 2016). A *Salmonella* é uma importante causadora de diarreia inflamatória, vive normalmente no intestino, conseguem prosperar nesse ambiente, pois se utilizam de fontes de carbono, são resistentes a proteínas antimicrobianas liberadas pelo

sistema imunológico e capturam o ferro do hospedeiro por meio de proteínas hospedeiras (DERIU et al., 2013).

Essa bactéria pode se isolar de alimentos de origem animal já que ela está presente no intestino de diversos animais de produção como: bovinos, suínos, aves, estando associada às doenças transmitidas por alimentos, além de estarem presentes também em animais domésticos. Por tal situação a frequência exacerbada de *Salmonella* é tratada como uma questão de saúde pública, devido às doenças que essa bactéria causa no homem quando encontra condições favoráveis (WHO, 2015). Uma dessas doenças é a salmonelose que pode ser transmitida por meio de animais domésticos que carregam essa bactéria em seu intestino de maneira assintomática (MENDONÇA, 2016).

O trabalho de Amadi et al. (2018), explicam sobre o isolamento de *Salmonella* nas fezes de cães não diarreicos. Os autores testaram a vulnerabilidade dessas bactérias a antibióticos e observaram que elas possuíam resistência a Neomicina e a Tetraciclina. Devido a isso, os probióticos podem ser a melhor fonte utilizada contra esses patógenos, condição que foi observada no trabalho de Huang e Huang (2016), os quais afirmam que *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* regulam respostas imunológicas como a Interleucina 8 (IL-8), e consequentemente reduzindo a ação da *Salmonella*.

Se a microbiota intestinal do indivíduo estiver em boas condições, ou seja, com maior presença microrganismos benéficos, dificilmente haverá distúrbios intestinais por *Salmonella*, *Clostridium* e *E. coli*, principalmente. A rápida colonização de *Salmonella* no intestino pode ser dada também pela ingestão variada de antibióticos como, metonidazol, vancomicina e estreptomicina, pois esses e demais antibióticos podem afetar direta ou indiretamente as vias metabólicas da microbiota (VOGT e FINLAY, 2017).

2.5.3 *Klebsiella*

Esse gênero compreende bactérias Gram-negativas encontradas geralmente na forma de bacilo, não móvel, encapsulada, é habitual do intestino humano e agrupa espécies patógeno-oportunista e multirresistentes com predisposição a formação de biofilmes (LAGRAFEUILLE et al., 2018). Além disso, este gênero é conhecido por causar infecções graves, como pneumonia, infecções urinárias,

inflamações, hemorragia dos tecidos pulmonares dentre outros exemplos (CUNHA, 2014).

A sua multirresistência parte do princípio delas portarem a enzima betalactamase em sua composição, a qual inativa os antimicrobianos, por isso a *Klebsiella* se encontra na classe das carbapenemase, com isso se faz importante tomar as devidas precauções quanto à alta população dessas bactérias no intestino humano, como também em pacientes, principalmente no âmbito hospitalar (SEIBERT et al., 2014).

Já foi relatado que os biofilmes de *Lactobacillus plantarum* dificultaram a formação de biofilmes de *K. pneumoniae*, impedindo a transcrição de genes relacionados com a produção desses biofilmes, *in vitro* (LAGRAFEUILLE et al., 2018).

2.5.4 *Citrobacter*

As bactérias desse gênero são Gram-negativas, possuem motilidade, são anaeróbias facultativas, seus flagelos estão geralmente situados em um único polo da célula conferindo motilidade, conhecida por ser um patógeno oportunista secundário, que reside normalmente na microbiota intestinal humana e pode estar presente também em alimentos, água e no solo (JONES E KNIGHT, 2012). Esses autores também relatam que a infecção por *Citrobacter* são múltiplas, mas está de acordo com o sorotipo, podendo causar meningite, com alto índice de abscesso cerebral, endocardite, diarreia, infecções do trato urinário e respiratório.

Segundo os estudos de LACH, et al., (2017), a utilização de probióticos frente à *Citrobacter* conseguiu eliminar os efeitos patológicos na microbiota intestinal de animais, bem como, melhorou os processos cognitivos em ratos diabéticos tratados com bactérias probióticas. Outro trabalho realizado por Kumar, et al., (2016), mostrou que a espécie *Lactobacillus acidophilus* conseguiu inibir a ação de *Citrobacter rodentium* em ratos, apresentando melhoras em quadros diarreicos e na microbiota dos animais avaliados

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Execução e probióticos

Os probióticos testados foram adquiridos em farmácia, com prazo de validade adequado, registrados sob o Lote (L.) 312 para Floratil® (*Saccharomyces boulardii*), L: 1703056 para Florax® (*Saccharomyces cerevisiae*) L: 17.009.103 para Biovicerin® (*Bacillus cereus*) e L: 2155 para Enterogermina® (*Bacillus clausii*) respectivamente. As pesquisas desenvolvidas foram realizadas no laboratório de Microscopia I na Unidade Acadêmica de Serra Talhada - Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE/UAST).

3.2 Isolamento e quantificação de bactérias e leveduras dos probióticos.

A diluição de cada probiótico foi realizada três vezes consecutivas e todas elas em triplicatas.

Para o isolamento e quantificação de bactérias e leveduras totais, realizou-se a técnica da diluição seriada (MONTASSIER, 2016), que consiste em adicionar 1 mL dos probióticos em quatro Erlenmeyers contendo 99 mL de água peptonada (1%), previamente autoclavada (diluição 10^{-2}) e homogeneização de 1 minuto por agitação. A partir dessa primeira diluição, transferiu-se 1 mL para outro Erlenmeyer contendo 99 mL de água peptonada 1%, e assim sucessivamente até a diluição 10^{-8} . Foram semeadas as quatro últimas diluições, cada uma com 0,1 mL em placas de Petri pelo método de espalhamento em superfície, em triplicatas, contendo os meios de cultura Agar Nutriente (AN) para bactérias e Agar Sabouraud (SAB) acrescido de cloranfenicol para as leveduras.

As placas de Petri foram incubadas a 30 °C por 24 horas para contagem de bactérias e por 48 horas para contagem de leveduras. As quantificações foram realizadas nas placas de Petri que apresentassem entre 20 e 200 Unidades Formadoras de Colônias (UFC), sendo os resultados expressos em UFC/mL.

A partir do isolamento dos probióticos, realizou-se também a coloração de Gram para observação microscópica das células bacterianas e fúngicas

3.3. Isolamento de *Lactobacillus* sp.

O isolamento de *Lactobacillus* sp. foi realizado a partir do leite fermentado comercial Isis®, do qual foi retirada uma alíquota de 100 µl, pipetado e semeado em meio ágar nutriente, pela técnica de semeio em tapete, utilizando alça de Drigalski. O crescimento bacteriano foi observado após 48 horas a 30°C.

3.4. Atividade Antimicrobiana

3.4.1 Teste de difusão em ágar

Os microrganismos foram submetidos ao teste de atividade antimicrobiana em meio sólido, pela técnica de difusão em Ágar, segundo metodologia de Ichikawa et al. (1971). Inicialmente os isolados (fungos e bactérias) selecionados foram cultivados em placas de Petri com meio Ágar Nutriente (bactérias) e Ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (fungos) a 30 °C. Após esse período, foram cortados discos de colônias (15 mm de diâmetro) e transferidos para a superfície do meio de cultura Agar Mueller Hinton (contendo g/L: Peptona 3,0; Peptona de caseína 17,5; Agar 15 Ca²⁺ 20-25; Mg²⁺ 10-12,5; pH 7,4) em placas de Petri previamente semeadas com as enterobactérias teste, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp. e *Citrobacter freundii* os quais foram incubados a 37°C. As bactérias testes foram previamente isoladas de moscas domésticas do trabalho de Barros, (2018) e foram mantidas em meio de crescimento Ágar nutriente. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada após 24 horas pela formação ou não de halos de inibição. Os testes foram realizados em triplicatas e as medidas expressas em milímetro pelas médias das triplicatas.

3.4.2 Teste de difusão em disco

Após o isolamento das leveduras e das bactérias probióticas, foi retirada uma pequena quantidade de cada isolado, com auxílio de uma alça de platina, e transferido para quatro diferentes Erlenmeyers, cada um contendo 200 mL de caldo Sabouraud para as leveduras e caldo Nutriente para bactérias, os quais estavam previamente autoclavados. Cada Erlenmeyer foi submetido à agitação em um agitador magnético por 48 horas para o crescimento dos microrganismos. Após esse

tempo, foi pipetado para cada disco, 20 µL do caldo e transferido para a superfície do meio de cultura Ágar Mueller Hinton em placas de Petri com as bactérias teste previamente semeada em tapete, e assim para os demais probióticos. O teste foi feito em triplicatas para cada bactéria, incubados a 37° C e o resultado foi analisado a partir da observação da formação ou não de halo de inibição após 24 horas.

3.4.3. Associação dos probióticos com os *Lactobacillus* sp.

3.4.3.1. Teste de difusão em ágar

Após o crescimento dos *Lactobacillus* sp., foi retirada uma pequena alíquota dessa cultura e colocada em tubo de ensaio com 10 mL de água destilada esterilizada, nesse momento, também foi adicionado uma alçada do inóculo de *S. cerevisiae* isolado do probiótico Florax®, e submetido à agitação por 1 minuto. Em seguida, foi realizado o semeio da associação desses microrganismos em ágar nutriente e submetidos ao crescimento por 48 horas a 30°C. Essa metodologia foi seguida para os demais probióticos. Após o crescimento dos probióticos, foram cortados discos (15 mm de diâmetro) de cada associação e inoculado em placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton, com as bactérias testes previamente semeadas, deixados a 37°C para a atividade antimicrobiana, a qual pôde ser observada pela formação ou não do halo de inibição após 24 horas.

3.4.3.2. Teste de difusão em discos

A partir do crescimento das culturas isoladas dos probióticos associados aos *Lactobacillus* sp., com auxílio de uma alça de platina, coletou-se uma pequena amostra das colônias contendo *S.cerevisiae*+*Lactobacillus* sp., *S.boulardii*+*Lactobacillus* sp. e inoculo-se em Caldo Sabouraud e *B. cereus*+*Lactobacillus* sp., *B. clausii*+*Lactobacillus* sp. inoculou-se em Caldo Nutriente. As amostras de cada associação foram adicionadas em diferentes Erlenmeyers contendo 200 mL do respectivo meio de crescimento. Em seguida, foram submetidos à agitação em um agitador magnético por 48 horas. Após isso, foi adicionado 5 mL do caldo contendo *S. cerevisiae*+*Lactobacillus* sp. em dois tubos de Falcon (15 mL) onde um recebeu 5mL de etanol (solvente polar) e o outro 5 mL de

acetato de etila (solvente apolar), com o intuito de maximizar a quantidade de metabólitos produzidos pelos probióticos bem como o aumento desses diferentes metabólitos por causa da polaridade de cada um dos solventes (Figura 1). Essas mesmas etapas foram seguidas para as demais associações de probióticos. Após três horas, sob agitação, os tubos ficaram em repouso por 30 minutos e em seguida, de cada tubo, foi pipetado 20 µL do sobrenadante nos discos de papel (6 mm), os quais foram transferidos para a superfície de ágar Mueller Hinton contendo as bactérias testes previamente semeadas. O teste foi feito em triplicatas para cada bactéria e o resultado foi analisado a partir da formação ou não do halo de inibição após 24 horas.

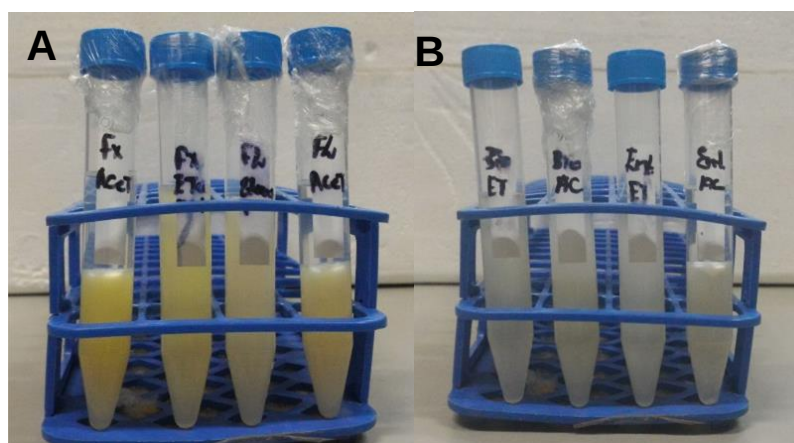


Figura 2. (A) Tubos de Falcon contendo Caldo Sabouraud com *Saccharomyces cerevisiae*+*Lactobacillus* sp. e *Saccharomyces boulardii*+*Lactobacillus* sp. em acetato e etanol. **(B)** Caldo nutriente com *Bacillus cereus*+*Lactobacillus* sp. e *Bacillus clausii*+*Lactobacillus* sp. em acetato e etanol.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e quantificação dos probióticos

Os probióticos *S. boulardii* (Floratil), *S. cerevisiae* (Florax), *Bacillus cereus* (Biovicerin) e *B. clausii* (Enterogermina), apresentaram ótimo crescimento em seus respectivos meios, ágar Sabouraud e ágar nutriente (Figura 2). No entanto, apenas *S. cerevisiae* (Florax), apresentou baixo crescimento nas diluições apresentando apenas na diluição 10^{-2} , quando comparado com os outros probióticos que apresentaram ótimo crescimento em todas as diluições.

As diluições utilizadas foram àquelas que apresentaram de 20-200 UFC (Tabela 1).

Tabela 1: Diluições dos probióticos utilizadas para contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)

Probióticos	Quantificação			Fabricante
	1	2	3	
<i>Saccharomyces boulardii</i> (Floratil®)	4,93x10 ¹⁰ UFC/mL	3,66x10 ⁸ UFC/mL	8,23x10 ⁸ UFC/mL	1x10 ⁹ UFC/g
<i>Bacillus clausii</i> (Enterogermina®)	1,17x10 ¹⁰ UFC/mL	6,00x10 ⁸ UFC/mL	3,90x10 ⁸ UFC/mL	4x10 ⁸ UFC/mL
<i>Bacillus cereus</i> (Biovicerin®)	7,46x10 ⁶ UFC/mL	6,73x10 ⁶ UFC/mL	8,46x10 ⁶ UFC/mL	1x10 ⁶ UFC/mL
<i>Saccaromyces cerevisiae</i> (Florax®)	3,66x10 ⁴ UFC/mL	1,83x10 ⁴ UFC/mL	2,93x10 ⁴ UFC/mL	5x10 ⁷ UFC/mL

1,2 e 3: Etapas em que realizou a quantificação dos probióticos.

Para os probióticos Floratil® e Enterogermina®, as diluições escolhidas para o trabalho, apresentaram número de células que variou entre 10¹⁰ /mL e 10⁸/mL. De acordo com o fabricante do Floratil®, 1g de pó contém 200 mg de células de *S. boulardii* que sugere 1x10⁹ UFC/g e do Enterogermina® 5 mL contém 2x10⁹ esporos de *B. clausii*. Entretanto, em 1 mL se tem 4x10⁸, resultados estes que foram coerentes com os observados nos testes realizados. O produto Biovicerin® apresentou um quantitativo de endósporos de *B. cereus* que se manteve constante apresentando a concentração de 10⁶, este número também está de acordo com o número de células informado pelo fabricante (10⁶/mL). Por outro lado, os resultados observados com o probiótico Florax® indicaram concentração de 10⁴ /mL que foram todas abaixo daquela informada pelo fabricante, o qual indica que existem 50 milhões de células de *S. cerevisiae* para cada mL do produto, ou seja, 5x10⁷ UFC para 1 mL (Tabela 1).

Em todas as três etapas nas quais as diluições foram repetidas o probiótico Florax® não apresentou crescimento nas diluições entre 10⁻⁴ e 10⁻⁸, mesmo tendo sido ultrapassado o tempo indicado para o crescimento dos microrganismos. Uma

possível explicação pode ter sido algum erro de fabricação levando ao aparecimento de UFC apenas na diluição de 10^{-2} (Figura 2 B).

Outra possibilidade para o baixo crescimento do Florax® pode está relacionada à viabilidade das células de *S. cerevisiae*, pois os probióticos possuem funções importantíssimas que são desempenhadas normalmente quando chegam ao seu local de ação, e, para sua eficácia é importante que eles estejam viáveis e para isto a quantidade mínima exigida é de 10^6 UFC/mL ou grama (KECHAGIA et al., 2013). As quantificações realizadas no trabalho de Bastos et al., (2015) a fim de confirmar se os probióticos estavam dentro dos requisitos esperados, mostraram que eles atendiam as exigências quanto à quantidade viável de microrganismos, no entanto estes autores cultivaram os probióticos em caldo YPG (1% Extrato de levedura - HIMEDIA, 2% Peptona - HIMEDIA, 2% Glicose, 2% Agar - HIMEDIA), a 28°C sob agitação. Segundo a ANVISA (2018) a quantidade mínima de células viáveis deve ser de 10^8 a 10^9 UFC, no entanto, valores abaixo destes podem ser aceitos desde que a empresa responsável comprove a eficácia dos probióticos.

A observação microscópica de cada probiótico pode ser observada na figura 3.

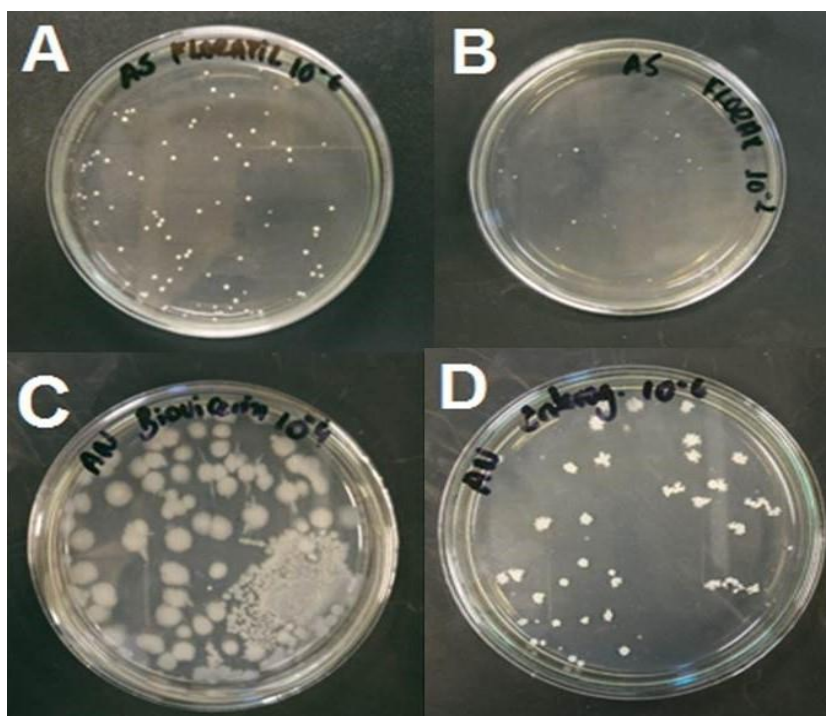


Figura 3: Placas de Petri com crescimento dos probióticos em diferentes diluições. (A) Floratil® – 10^{-6} , (B) Florax® – 10^{-2} , meio ágar Sabouraud; (C) Biovicerin® – 10^{-4} (D) Enterogermina® – 10^{-6} , meio ágar nutriente.

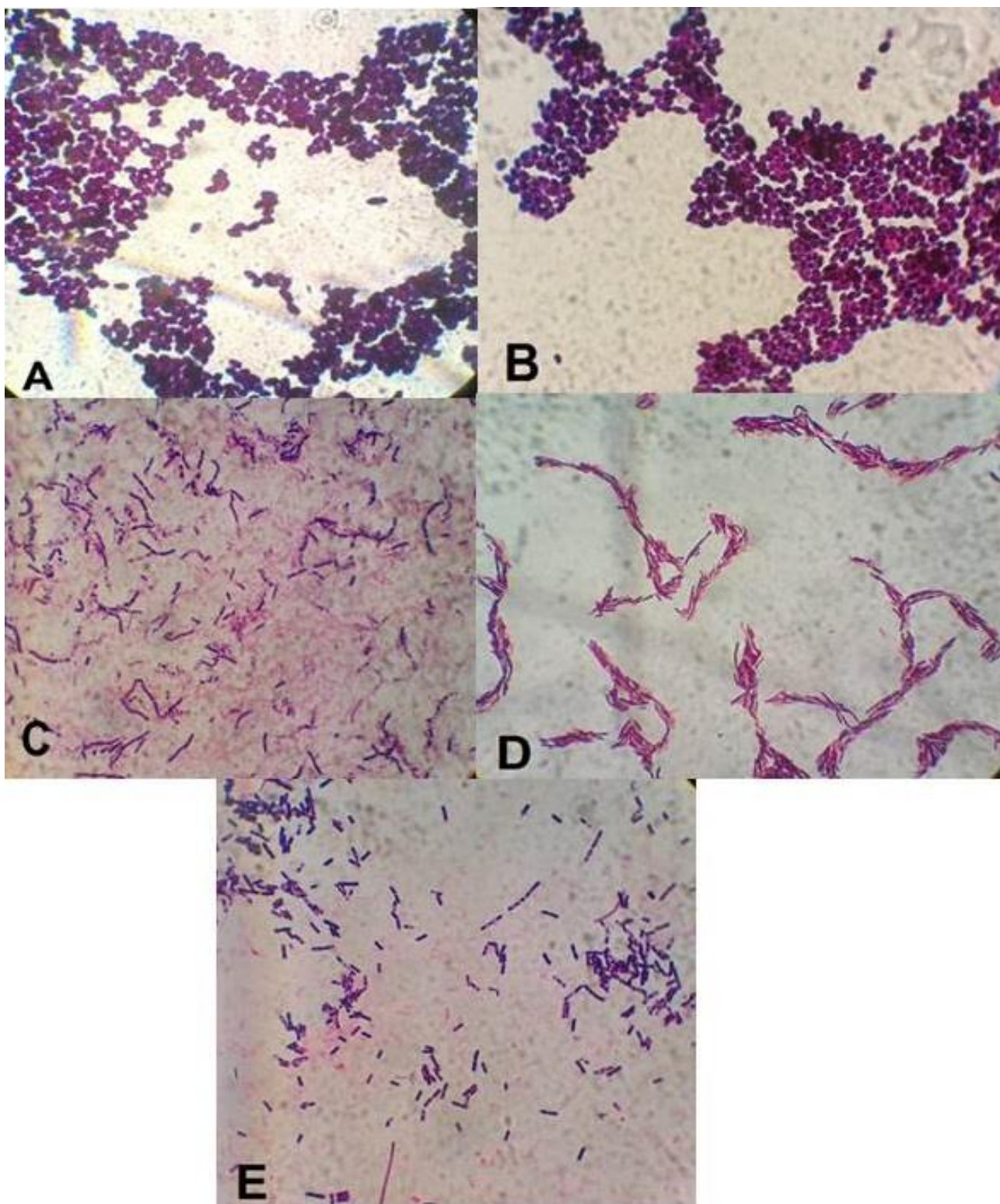


Figura 4: Microscopia dos probióticos em coloração de Gram. **(A)** Floratil® células de *Saccharomyces boulardii*; **(B)** Florax® células de *Saccharomyces cerevisiae*; **(C)** Biovicerin® células de *Bacillus cereus*; **(D)** Enterogermina® células de *Bacillus clausii*; **(E)** células de *Lactobacillus* sp. (x100, em óleo de imersão).

4.2 Atividade Antimicrobiana dos probióticos

Neste estudo, os probióticos Florax® e Floratil® (*S. cerevisiae* e *S. boulardii*), Biovicerin® e Enterogermina® (*B. cereus* e *B. clausii*) e *Lactobacillus* sp. (produto Isis®) não apresentaram atividade antimicrobiana nas duas condições de crescimento em meio sólido (Figura 4) e líquido (Figura 5 e 6) frente às enterobactérias testadas. Em meio sólido, os probióticos apresentaram ótimo crescimento tanto em ágar Sabouraud como em ágar nutriente, contudo, os mesmos não conseguiram propiciar a liberação de compostos antimicrobianos a ponto de haver a formação de halo de inibição. Nas condições de meio líquido os probióticos fúngicos apresentaram bastante emulsão, ao contrário daqueles formados por bactérias, entretanto, o extrato bruto de ambos, crescidos no caldo Sabouraud e caldo Nutriente também não levou a atividade antimicrobiana frente às enterobactérias (Figura 5 e 6).

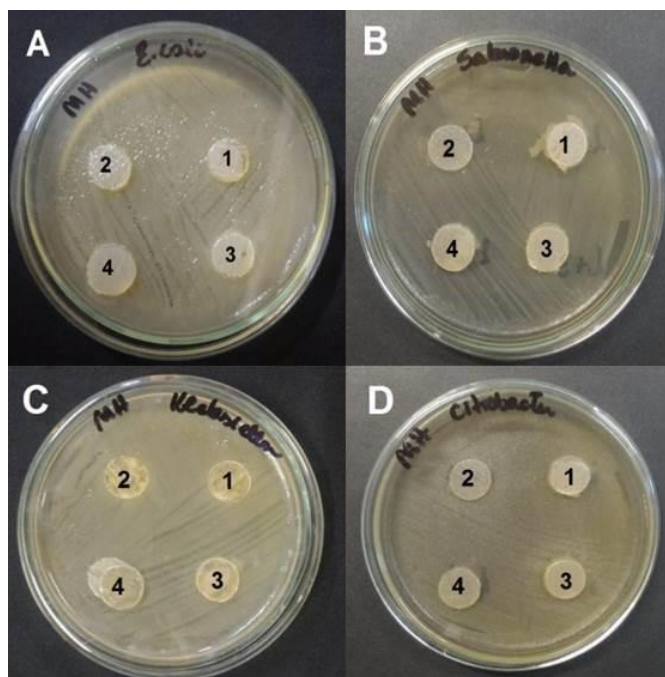


Figura 5: Teste de atividade antimicrobiana, em Mueller Hinton, com probióticos crescidos em meio sólido frente à enterobactérias **(A)** *E. coli*, **(B)** *Salmonella* sp. **(C)** *Klebsiella* sp. **(D)** *Citrobacter freundii*. 1, 2, 3, 4 = Floratil® (*Saccharomyces boulardii*), Florax® (*Saccharomyces cerevisiae*), Biovicerin® (*Bacillus cereus*) e Enterogermina® (*Bacillus clausii*) respectivamente.

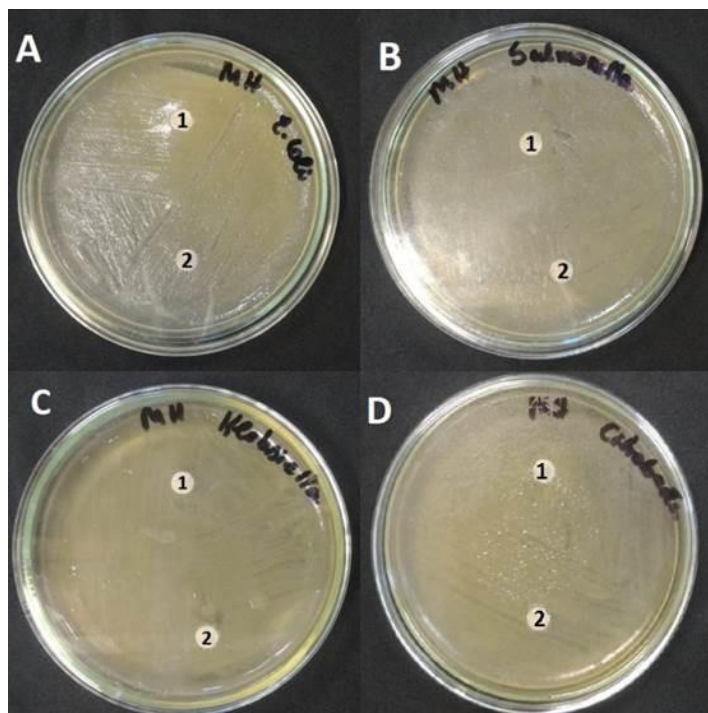


Figura 6: Teste de atividade antimicrobiana, em Mueller Hinton, com os probióticos crescidos em meio líquido, frente à enterobactérias **(A)** *E. coli* **(B)** *Salmonella* sp. **(C)** *Klebsiella* sp. **(D)**. *Citrobacter freundii*. 1 e 2= Floratil® (*Saccharomyces boulardii*) e Florax® (*Saccharomyces cerevisiae*) respectivamente.

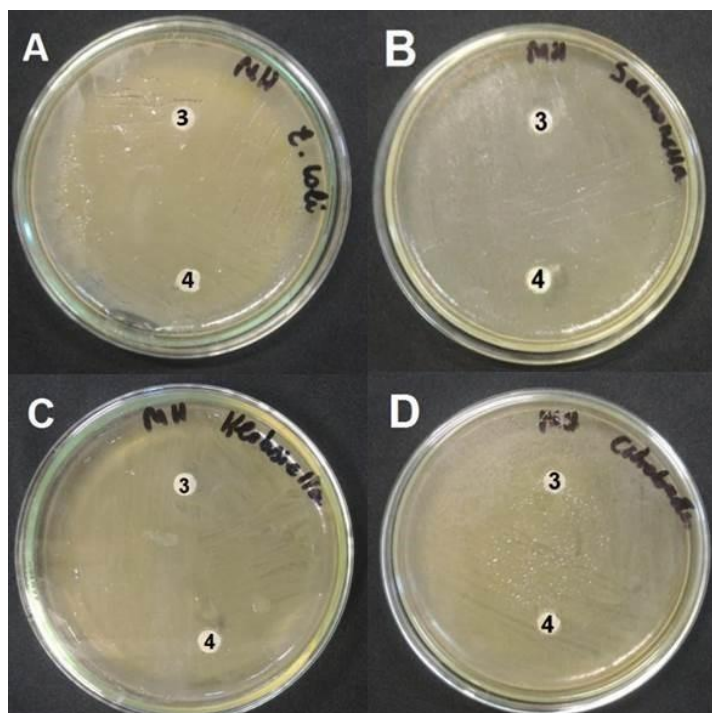


Figura 7: Teste de atividade antimicrobiana dos probióticos em Mueller Hinton com probióticos crescidos em meio líquido frente à enterobactérias. **(A)** *Escherichia coli*; **(B)** *Salmonella* sp. **(C)** *Klebsiella* sp.; **(D)**. *Citrobacter freundii*. 3 e 4= Biovicerin® (*Bacillus cereus*) e Enterogermina® (*Bacillus clausii*) respectivamente.

Como já se sabe, os probióticos são microrganismos vivos capazes de trazer benefícios ao corpo humano, especialmente no ambiente gastrointestinal, a partir da produção de compostos antimicrobianos metabolizados pelos mesmos ou induzindo células de defesa que agem inibindo agentes patógenos oportunistas que podem causar algum tipo de desequilíbrio naquele ambiente (KERRY et al., 2018). Ainda de acordo com esses autores, sabe-se também que os microrganismos probióticos atuam na modulação do sistema imune contribuindo para maior estímulo das células de defesa e na diminuição de diversas infecções. Eles também são muito utilizados como alimentos funcionais os quais conferem manutenção da microbiota intestinal bem como a prevenção de doenças, mantendo bom desenvolvimento dos processos fisiológicos (OLIVEIRA et al, 2017).

Apesar de todos os benefícios que são relatados em pesquisas com probióticos, algumas suposições foram levantadas com o intuito de entender os resultados obtidos neste trabalho. Por exemplo, na metodologia deste trabalho, o crescimento dos microrganismos foi baseado no cultivo em meios de cultura convencionais (Ágar ou caldo nutriente e Ágar ou caldo Sabouraud). As características nutricionais destes meios podem não ter favorecido a produção de metabólitos secundários dos probióticos (ROUSSEL et al. 2018). Além disso, em nenhuma das situações os probióticos foram submetidos a condições de anaerobiose, uma vez que algumas das substâncias produzidas pelos microrganismos probióticos ocorre a partir de processos fermentativos, ou seja, na ausência de oxigênio (HALDER et al., (2017).

O ambiente intestinal por sua vez se assemelha a essa situação por ter baixo teor de oxigênio dessa forma há maior possibilidade da produção de metabólitos com atividade antimicrobiana, condições totalmente diferentes das utilizadas neste trabalho. Por exemplo, Roussel et al., (2018), mostraram que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* teve atividade antimicrobiana frente a cepas de *Escherichia coli* patogênica, utilizando o meio de cultura Ágar Luria Bertani (LB) para o crescimento bacteriano, e Ágar Sabouraud para o crescimento da levedura, no entanto, antes de realizar a inoculação o autor suspendeu a mesma em solução salina e em seguida inoculou-a no meio sólido, a atividade foi observada a partir do co-cultivo da levedura e da bactéria em caldo LB a 37°C. Resultado semelhante também foi obtido por WU et al.(2014) que conseguiram atividade satisfatória de *S.*

cerevisiae e *S. boulardii*, quando inoculadas no meio YPD (Yeast Extract, Peptona, Dextrose) frente à *Salmonella enteritidis* inoculadas em Brain Heart Infusion (BHI), esse experimento ocorreu “*in vivo*” utilizando ratos com 21 dias de nascido. Já a pesquisa de Altarugio (2016) utilizou cepas de *Lactobacillus* sp. cultivados em caldo DeMan-Rugosa-Sharpe (MRS) e em seguida em Ágar MRS em condições de anaerobiose por 48 horas e dessa forma conseguiu a inibição significativa do crescimento da *Salmonella heidelberg*. Resultado similar foi obtido quando apresentou a atividade antibacteriana do probiótico *Lactobacillus* spp. provenientes de coalhadas comerciais quando cultivadas em Caldo de MRS e em Ágar MRS frente à *E. coli* e *Salmonella enterica* (HALDER et al., 2017).

Dessa forma, pode-se sugerir que os meios de crescimento utilizados no nosso trabalho não foram específicos o suficiente a ponto de proporcionar resultados positivos quando comparados aos trabalhos citados, uma vez que nestes foram usados meios de cultura mais específicos. Além desse fator, temos também a ausência das condições de disponibilidade de oxigênio, onde não foram utilizadas condições anaeróbias de crescimento. Esses dois fatores podem ter contribuído, levando a uma menor chance da expressão e produção de substâncias antimicrobianas metabolizadas pelos microrganismos presentes nos probióticos testados.

Outro fator que está ligado à disponibilidade de oxigênio, é o pH do meio, que pode não ter sido favorável para a liberação de antimicrobianos, uma vez que os testes não ocorreram em anaerobiose, o pH do meio pode ter ficado alcalino demais e em alguns casos para a inibição de algum patógeno é necessário a produção de algum ácido pelo probiótico no meio, onde a bactéria patogêna está inserida. O probiótico para ser caracterizado como tal, deve ser resistente a condições ácidas do meio (YERLIKAYA, 2014).

Quando os microrganismos se encontram em um ambiente com baixo teor de oxigênio a probabilidade do meio tornar-se ácido é muito maior, pois para garantir a sobrevivência, os mesmos realizam fermentação que pode ser de origem láctica, alcoólica, entre outras. Normalmente o tipo de fermentação depende muito do tipo de microrganismo e a liberação desses ácidos no meio, contribui para o não crescimento de microrganismos possivelmente patogênicos (WILLIS, 2017). Halder et al., (2017) em suas pesquisas, antes de realizar seus testes antimicrobianos

avaliaram o potencial dos probióticos em condições totalmente ácidas ou seja, sem a presença de oxigênio e devido a isso os autores conseguiram obter melhores resultados sob o caráter inibitório de *Lactobacillus* sp. frente a bactérias patogênicas incluindo *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* sorotipo Typhi. O trabalho que Wang et al., 2018, realizaram, também obteve seus melhores resultados cultivando *Lactobacillus plantarum* em condições de baixo oxigênio que ocasionou na produção de ácido láctico a partir da fermentação dos probióticos inibindo o crescimento de *E. coli* enteroxigênica. Diante disso, os testes realizados neste trabalho sob condições de aerobiose podem não ter possibilitado a produção de substâncias antimicrobianas dos probióticos frente às enterobactérias. Em contrapartida, as condições anaeróbia, ou seja pH ácido, facilitaria o processo de fermentação láctica pelos *Lactobacillus* sp. e fermentação alcoólica pelas leveduras obtendo resultados diferentes do que ocorreu neste trabalho.

Outra suposição para não observação da atividade antimicrobiana seria de que, no lugar de inibir, o probiótico poderia estar favorecendo o crescimento bacteriano, uma vez que as enterobactérias testadas foram isoladas de moscas domésticas, ou seja, não estavam causando doenças. Nos resultados constatados por Guardiola et al, (2017) pôde-se observar que o uso do probiótico *Lactobacillus* sp estimulou o crescimento de cepas bacterianas não patogênicas de *E. coli*, testadas por eles. Outros autores também discutem que os probióticos influenciam no crescimento de bactérias de caráter não patogênico. Teoricamente, se os probióticos não reconhecem um microrganismo como patogênico, ele não será induzido a liberar substâncias antimicrobianas, pelo contrário ele favorecerá o crescimento do microrganismo já que este não está causando doença (GAO et al., 2016).

Por outro lado, muitas referências apontam que pesquisadores ao realizarem testes antimicrobiano com probióticos, normalmente utilizam bactérias que apresentam caráter patogênico, as quais são isoladas de locais onde estariam causando doença ou infecção ou até mesmo selecionam tipos selvagens de bactérias para realizar seus testes. Por exemplo, Roussel et al., (2018) utilizaram cepas enteroxigênicas de *E. coli* isoladas de paciente portador de síndrome de cólera e ainda cepas selvagens dessas bactérias. Já, Helder et al., 2017 usaram em seus testes enterobactérias (*E. coli*, *Salmonella enteridis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus vulgaris*) causadoras de doenças em humanos. Entretanto, as

enterobactérias usadas no presente estudo não eram causadoras de doenças, dessa forma os probióticos não as reconheceram como agentes patógenos e devido a isso ter estimulado o crescimento bacteriano ao invés de inibi-las. O probiótico em sua função ajuda a controlar as populações bacterianas para que elas não fiquem em maior vantagem comparados a eles, para isso, os probióticos competem por sítios de ligação na mucosa intestinal, libera substâncias ácidas ou até mesmo estimula o sistema imunológico a liberar substâncias de defesa contra tal patógeno (KERRY et al., 2018).

A quarta suposição sugere o modo de ação dos probióticos, a qual propõe que para haver um efeito antibacteriano não precisa ser necessariamente por meio da produção de compostos específicos, mas, além disso, por meio da ação indireta, *in vivo* como, a competição por nutrientes e locais de adesão, acidificação do meio com a produção de ácido láctico, acético, graxo, entre outros, e pelo estímulo do sistema imunológico a liberar substâncias inibitórias contra o agente patógeno. O ambiente *in vitro* é completamente diferente de um ambiente *in vivo*, pois os processos ocorrentes no trato gastrointestinal são realizados por meio de conjunto de fatores que implicam na resposta imunológica ou de defesa contra os invasores. Simular essas condições em um sistema *in vitro* torna-se complicado e mesmo com tais simulações o resultado da ação probiótica não é totalmente igual ao que acontece no sistema *in vivo*.

O uso de probióticos tem aumentado na tentativa da redução o uso de antibióticos, pois os mesmos acabam comprometendo o trato gastrointestinal quando usados frequentemente, selecionando bactérias resistentes e tornando maior as chances de uma possível disbiose no ambiente intestinal, deixando-o vulnerável a possíveis doenças (SORNPLANG e PIYADEATSOONTORN, 2016). Tendo em vista que a ingestão de probióticos pode contribuir na exclusão de patógenos oportunistas, bem como modular o intestino e controlar a ação dos mesmos de diferentes modos e situações, os probióticos têm sido utilizados como uma melhor alternativa no controle de distúrbios intestinais (ARQUÉS et al., 2015).

A ação antagônica dos probióticos ocorre em diferentes situações, por meio da competição por sítios de adesão e fator nutricional na formação de barreira intestinal contra patógenos, secreção de substâncias antimicrobianas e imunomodulação (WAN et al., 2018). Uma das características cruciais dos

probióticos é deixar o ambiente intestinal bacteriostático, ou seja, equilibrar a quantidade de bactérias não as deixando sobressair a eles (BUJALANCE et al, 2014). De acordo com Dimidi et al. (2017) o sistema imune mantém sua boa regulação com ajuda do efeito benéfico produzido pelos probióticos, devido aos mesmos propiciar estímulos de reações de defesa fortalecendo o próprio sistema contra invasores. Outras pesquisas também afirmam que por causa das doenças gastrointestinais provocadas pela desregulação do sistema imune, predisposição genética, disbiose, desempenho das funções, disfunção da barreira intestinal ou até mesmo doenças como a de Cronh, quando são realizados tratamentos associados com os probióticos se observa melhor desempenho das funções intestinais, sabendo que em doenças mais graves os probióticos apenas ajudam a controlar a fim de evitar o agravamento da mesma (THOMAS, et al., 2015). O trabalho de Bratz et al., (2015) demonstra a ação antimicrobiana de *Lactobacillus* sp., por meio da produção de ácidos orgânicos interferindo no pH do meio deixando-o mais ácido e inibindo o crescimento das bactérias patogênicas testadas. No mesmo sentido, SAKARYA e GUNAY (2014) mostraram que probióticos associados no tratamento de úlceras estomacais provocadas por *Helicobacter pylori* competem por sítios de ligação em células epiteliais específicos limitando a adesão de *H. pylori*. Como citado anteriormente, os probióticos conseguem agir de diferentes maneiras dependendo da situação onde esteja.

Por fim, a última suposição para a não ocorrência da atividade antimicrobiana nos testes realizados, seria a resistência das enterobactérias aos probióticos. Mesmo que esses produtos estivessem produzindo algum composto antimicrobiano provavelmente eles não estariam conseguindo combater o crescimento destas bactérias devido a tal resistência, pois as enterobactérias apresentaram um ótimo crescimento durante os testes, além disso, *E. coli*, *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp e *Citrobacter freundii* apresentaram resistência a antibióticos convencionais testadas no trabalho de Barros, (2018). Acredita-se que a resistência bacteriana tem se tornado uma das grandes preocupações em todo o mundo, tendo sido vista como uma das grandes ameaças à existência humana por causa das altas taxas de mortalidade principalmente em ambiente hospitalar (CARVALHÃES, 2016).

Partindo disso, algumas enterobactérias (Enterobacteriaceae) muito conhecidas por apresentarem um alto grau de virulência e/ou patogenicidade tornando-as bactérias extremamente resistentes a antimicrobianos especialmente a certas classes de antibióticos, por terem a capacidade de produzir diferentes tipos de toxinas e enzimas responsáveis pela sua resistência, além disso, outras características que também as ajudam no seu fator de resistência é a presença de cápsulas e/ou flagelos (SOARES, et al., 2016). Uma das principais razões dessa resistência se deve ao uso frequente, precoce e excessivo de antibióticos há muito tempo atrás (LOUREIRO et al., 2016). Ainda de acordo com esses autores, em suas pesquisas, pôde-se observar que *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* apresentam menor grau de suscetibilidade a compostos antimicrobianos.

Estudos realizados por Silva (2016) mostrou a resistência bacteriana de *E. coli* frente a antibióticos convencionais neomicina, ampicilina, gentamicina, penicilina, cefalexina e tetraciclina. Já no trabalho de Soares et al., (2016) as enterobactérias apresentaram multirresistência a antibióticos em especial a *E. coli*. A pesquisa de Flores et al., (2016) ressalta que as enzimas beta-lactamases produzidas pelo gênero *Klebsiella* é o seu principal mecanismo de resistência contra a classe de antibióticos betalactâmicos como cefalosporinas, penicilinas, carbapenemes e cefamicinas, além deste as estipes de *K. pneumoniae* mais conhecidas como KPC, possuem genes que conseguem produzir a enzima carbapenemase conseguindo ser resistente também a outra classe de antibióticos, os carbapenêmicos, considerados de última geração.

Outras bactérias como *E. coli*, *Citrobacter* sp. e *Salmonella* sp., dentre outras bactérias, também são produtoras desta enzima. A enzima Cefotaximases tem sido muito encontrada em cepas de *Salmonella enterica* como também em *E. coli*, ou seja, mais um fator que contribui para a resistência dessas enterobactérias contra antimicrobianos (MAMZA, et al., 2016). Além disso, também já pode ser visto a resistência das enterobactérias fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e as polimixinas pertencentes a um grupo mais recente de antimicrobianos (CARVALHÃES, 2016).

Devido à capacidade dessas bactérias de produzir diferentes enzimas, o combate a elas se torna uma tarefa bem difícil e por isso a importância de buscar novas opções de combater a atividade destas bactérias principalmente com o uso de probióticos que nos tem sido uma arma fundamental na prevenção de desordens

intestinais na restauração da mesma, causado por essas bactérias, além de também atuar na medicina contra diversas patologias como alguns tipos de câncer e doenças autoimune (OLIVEIRA, et al. 2017).

Por isso alguns trabalhos como de Liu et al, (2016) comprovou que a ingestão de probióticos provenientes da engenharia genética no combate da diabetes mellitus tipo 1 conferiu melhores resultados na prevenção da hiperglicemia, aumento das reações imunes e melhorar a tolerância a glicose em animais. O trabalho de Yu e Li et al, (2016) também explana que a aplicação clínica de probióticos que conseguiriam diminuir a inflamação após a operação de pacientes com câncer, além disso, eles também apresentam propriedades antiproliferativas em células cancerígenas.

Com isso, nota-se que o papel exercido pela microbiota em animais e humanos é de fundamental importância para a melhor qualidade de vida do hospedeiro, conferindo efeitos protetores contra problemas cardíacos, carcinogênicos, reações anti-inflamatórias, alérgicas bem como outros benefícios (GAO et al., 2016).

5. CONCLUSÕES

Nas condições em que o trabalho foi desenvolvido, conclui-se que:

- Os probióticos semeados em ágar Sabouraud e ágar nutriente apresentaram crescimento para contagem de Unidades Formadoras de Colônia;
- Floratil®, Biovicerin® e Enterogermina® tinham quantitativo de células indicadas pelo fabricante;
- Florax® apresentou contagem de células inferior à estabelecida pelo fabricante;
- Todos os probióticos tinham células de bactérias e fungos de acordo com o produto;
- Os probióticos não apresentaram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp. e *Citrobacter freundii*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A Ciência está em constante mudança e a microbiologia é uma área que apresenta grande complexidade em relação à interação dos microrganismos entre si e com o ambiente em que se encontram. O estudo com probióticos, para diversos fins, é um ramo que vem sendo bastante explorado e apresentando resultados promissores em diversas áreas. Diante desse cenário, é indispensável à prospecção desse tipo de produto no que se refere à inovação, comprovação e continuação progressiva do uso de probióticos tanto na saúde humana como na animal.

7. REFERÊNCIAS

- AGGARWAL, A., SARANGI, A. N. GAUR, P., SHUKLA, A., AGGARWAL. R. Gut microbiome in children with enthesitis-related arthritis in a developing country and the effect of probiotic administration. **British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology**, 187: 480–489, 2016.
- ALTARUGIO, R. Seleção e caracterização probiótica *in vitro* de *Lactobacillus* spp. com potencial de inibição de *Salmonella heidelberg*. Botucatu-SP, setembro de 2016.
- ALVES, A. P., BEHAR, P. R. P. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de Kpc em um hospital terciário do sul do Brasil. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, 57 (3): 213-218, jul.-set. 2013.
- AMADI, V. A., HARIHARAN, H., ARYA, G., MATTHEW-BELMAR, V., NICHOLAS-THOMAS, R., PINCKNEY, R. JOHNSON, R. Serovars and antimicrobial resistance of non-typhoidal *Salmonella* isolated from non-diarrhoeic dogs in Granada, West Indies. **Veterinary Medicine and Science**, 4(1) 26-34, 2018.
- ANDRADE, A. M. D. S. A. Microflora intestinal: uma barreira imunológica desconhecida. ARTIGO REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. Centro Hospitalar do Porto, Portugal, 2010. Disponível em: <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/52784/2/Microflora%20intestinal%20%20uma%20barreira%20imunologica%20deconhecida.pdf>. Acesso em: 06 jun.2018.
- APPEL-DA-SILVA, M. C. et al. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* fungemia following probiotic treatment. **Medical Mycology Case Reports**. 18; 15–17, 2017.
- ARNOLDO, J., et al. *Saccharomyces cerevisiae* Fungemia After *Saccharomyces boulardii* Treatment in Immunocompromised Patients. **J Clin Gastroenterol**, Vol 36, No. 1, 2003.
- ARQUÉS, J. L. et al. “Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria in Dairy Products and Gut: Effect on Pathogens.” **BioMed Research International**, 584183, 2015.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada- RDC nº 241, de 26 de JULHO de 2018.
- BARBOSA, F. H. F., et al. Probióticos – microrganismos a favor da vida. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. Volume 11 - Número 1 - 1º Semestre, 2011.
- BARROS, A. V. Bactérias potencialmente patogênicas associadas à *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) capturadas em área urbana do município de Serra Talhada- PE. 2018, 71f. Trabalho de Conclusão de Curso- Universidade Federal Rural de Pernambuco/ Unidade acadêmica de Serra Talhada (UFRPE/UAST), Serra Talhada, 2018.
- BASTOS, G. A. et al. Estabilidade de micro-organismos potencialmente probióticos em barra de cereais - efeito da técnica de incorporação. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** 36(2): 311-317; 2015.

- BESERRA, B. T. S. Avaliação da microbiota intestinal e sua relação com parâmetros metabólicos em mulheres com obesidade mórbida. Dissertação, Florianópolis - SC., 2014.
- BINNS, N. Probióticos, prebióticos e a microbiota intestinal. Ilse Europa, 2014. Disponível em: <http://ilsa.org/europe/wpcontent/uploads/sites/3/2016/05/Probi%C3%B3ticos.pdf>, acesso: 14 mar 2017.
- BRATZ, K. et al. Analysis of *in vitro* and *in vivo* effects of probiotics against *Campylobacter* spp. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr.** Mar-Apr;128(3-4):155-62, 2015.
- BREDA, A.L. et al. Manipulação de microrganismos intestinais em monogástricos: Revisão de literatura. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 1, Ed. 106, Art. 714, 2010.
- BRUNO, L. M. Manual de curadores de germoplasma-Microrganismos: Bactérias Acido-Láticas. EMBRAPA- Recursos genéticos e biotecnologia- Brasília-DF, 2011. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/941829/1/DOC12003.pdf>. Acesso em 20 jul. 2018.
- BUJALANCE, C. et al. Lack of correlation between *in vitro* antibiosis and *in vivo* protection against enteropathogenic bacteria by probiotic *Lactobacillus*. **Res Microbiol.** Jan;165(1):14-20, 2014.
- CAÑAS, M. A. et al. Outer Membrane Vesicles from the Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and the Commensal ECOR12 Enter Intestinal Epithelial Cells via Clathrin-Dependent Endocytosis and Elicit Differential Effects on DNA Damage. **PLOS ONE**, August 3, 2016.
- CARVALHÃES, C. G. Bacterial resistance in enterobacteria. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** vol.52 no. 5, Rio de Janeiro Sept./Oct. 2016.
- CARDOSO, N. M. O Microbioma Humano. Universidade Fernando Pessoa - Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2015. Disponível em: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/5545/1/PPG_21839.pdf. Acesso em: 31 jul. 2018
- CASSANEGO, D. B. et al. Leveduras: diversidade em kefir, potencial probiótico e possível aplicação em sorvete. **Ciência e Natura.** v.37, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, p. 175–186, 2015.
- COELHO, J. G. Potencial probiótico de bactérias do gênero *Bacillus*. Monografia; Porto Alegre, 2013. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/87564/000910303.pdf?sequence=1>. Acesso em 05 jul. 2018.
- CHO I, BLASER M. J. The Human Microbiome: at the interface of health and disease. **Nature reviews Genetics.**13(4):260-270, 2012.
- COPPOLA, M. M., TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1297-1303, jul-ago, 2004.

- COSTA, G. N., et al. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* frente a microrganismos patogênicos “in vitro”. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 5, p. 1839-1846, set./out. 2012.
- CUNHA, V. O. BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase –ENZIMA KPC nas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS). BELO HORIZONTE-MG, 2014. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUOS-AEDQRM/attim9su.pdf?sequence=1>. Acesso em: 22 mai 2018.
- CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**. 28; 214-220, 2011.
- DE SOUZA MOTTA, A.; GOMES, M. S. M. Propriedades tecnológicas e funcionais de bactérias lácticas: a importância destes micro-organismos para alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 3, p. 172-184, 2015.
- DERIU, E., et al. Probiotic Bacteria Reduce *Salmonella typhimurium* Intestinal Colonization by Competing for Iron. **Cell Host & Microbe**, 14(1), 26–37, 2013.
- DIMIDI, E. et al. Mechanisms of Action of Probiotics and the Gastrointestinal Microbiota on Gut Motility and Constipation. **American Society for Nutrition**. Adv Nutr.;8:484–94; 2017.
- FLESCHE, A. G. T., et al. O USO TERAPÊUTICO DOS SIMBIÓTICOS. **ABCD Arq Bras Cir Dig**; 27(3):206-209, 2014.
- FLORES, C. et al. Detection of antimicrobial resistance genes in betalactamase- and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* by patient surveillance cultures at an intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. **J Bras Patol Med Lab**, v. 52, n. 5, p. 284-292, October 2016.
- FONSECA, B. B. et al. Microbiota of the cecum, ileum morphometry, pH of the crop and performance of broiler chickens supplemented with probiotics. **Revista Brasileira de zootecnia**, v. 39, n. 8, p. 1756-1760, 2010.
- FRANCINO, M. P. Early development of the gut microbiota and immune health. **Pathogens**, Basel, v. 3, n. 3, p. 769- 790, set. 2014.
- GANC, A. J. et al. Transplante de microbiota fecal por enteroscopia alta para o tratamento da diarreia causada por *Clostridium difficile*. **Einstein**. 13(2):338-9; 2015.
- GAO, J., et al. Importance of gut microbiota in health and diseases of new born infants. **Experimental and Therapeutic Medicine**. 12(1), 28–32; 2016.
- GONÇALVES, M. A. P. Microbiota – implicações na imunidade e no metabolismo. Dissertação, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014. Disponível em: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4516/1/PPG_21951.pdf. Acesso em 07 jun. 2018.
- GOLDSTEIN, E. J. C., et al. *Lactobacillus* Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. **Clinical Infectious Diseases**, Volume 60, Issue suppl_2, 15, Pages S98–S107, May 2015.

- GUARDIOLA, F. A. et al. Effects of dietary supplementation with fenugreek seeds, alone or in combination with probiotics, on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) skin mucosal immunity. **Fish & Shellfish Immunology**, 65:169-178; 2017.
- GUARNER, F. et al. Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia, Probióticos e prebióticos. **World Gastroenterology Organisation**, 2011.
- GUEDES NETO, L. G. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, Suplemento 2, v. 57, p. 245-250, 2005.
- GUPTA, V. GARG, R. Probiotics. **Indian J Med Microbiol**, jul-sep; 27(3): 202-9, 2009.
- HALDER, Debashis et al. "Indigenous Probiotic *Lactobacillus* Isolates Presenting Antibiotic like Activity against Human Pathogenic Bacteria." **Biomedicines**, 5.2: 31, 2017.
- HEIKE, S. BISCHOFF, S. C. Influence of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 on the gut-associated immune system. **Clinical and Experimental Gastroenterology**. 9 269–279, 2016.
- HUANG.F.C,HUANG S.C. The different effects of probiotics treatment on *Salmonella* -induced interleukin-8 response in intestinal epithelia cells via PI3K/Akt and NOD2 expression. **Epub**; Nov 30;7(5):739-748, 2016.
- HUNGRIA T.D e LONGO P.L. Viabilidade de *Lactobacillus casei* em alimento probiótico infantil relacionada à vida-de-prateleira. **Revista Saúde**, 2009.
- ISOLAURI, E., et al. Probiotics. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, London, v.18, n.2, p.299-313, 2004.
- ICHIKAWA, T., et al. A. Improvement of Kasigamycin- producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiol** 16; 218, 1971.
- JERONYMO, A. B. O. Avaliação do potencial probiótico de bactérias acidoláticas produtoras de substância antimicrobiana isoladas de mussarela de búfala. 2013. 108 f. **Dissertação (Mestrado) - Curso de Biociências**, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2013.
- JONES, S. E., KNIGHT, K. L. *Bacillus subtilis*-mediated protection from *Citrobacter rodentium*-associated enteric disease requires espH and functional flagella. *Bacillus Subtilis*-Mediated Protection from *Citrobacter Rodentium*-Associated Enteric Disease Requires espH and Functional Flagella." Ed. A. J. Bäumler. **Infection and Immunity**. 80.2: 710–719, 2012.
- JUIZ, P. J. L., et al. O estado da arte sobre a atividade antimicrobiana e imunomoduladora de probióticos. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 8 n. 3, p. 141-155, jul./set. 2017.
- KARKOW, F. J. A. et al. Probióticos: perspectivas médicas. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, 51 (1): 38-48, jan-mar. 2007.

- KERRY, R. G. Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of Food and Drug Analysis**, 26: 927-939, 2018.
- KECHAGIA M, et al. Health benefits of probiotics: a review. **ISRN Nutrition**. 2013.
- KHODAIL, Z., et al. Probiotic Bacteria and their Supernatants Protect Enterocyte Cell Lines from Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) Invasion. **International Journal of Molecular and Cellular Medicine**. Original Article, Vol 6, No 3, 2017.
- KUMAR A., et al. *Lactobacillus acidophilus* counteracts inhibition of NHE3 and DRA expression and alleviates diarrheal phenotype in mice infected with *Citrobacter rodentium*. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**. 311(5): G817-G826, 2016.
- KURITZA, L. N., et al. Probióticos na avicultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.8, p.1457-1465, ago, 2014.
- LACH, G., et al. Envolvimento da flora intestinal na modulação de doenças psiquiátricas. **Vitalle – Revista de Ciências da Saúde**, 29 n.1; 64-82, 2017.
- LAGRAFEUILLE R., et al. Opposing effect of *Lactobacillus* on *in vitro* *Klebsiella pneumoniae* in biofilm and in an *in vivo* intestinal colonisation model. **Benef Microbes**. Jan 29;9(1):87-100, 2018.
- LARA, M. F., et al. Há lugar para o uso de probióticos na prevenção e no tratamento da dermatite atópica pediátrica? **Rev Med**. Minas Gerais; 25 (Supl 6): S52-S60, 2015.
- LAVAGNOLI, L. S., et al. Fatores associados à aquisição de Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**. 25: e2935; 2017.
- LEME, L. B. Características de adesão de cepas de *Escherichia coli* isoladas de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal. Monografia, Botucatu, 2013. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/124213/000829080.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 20 jul.2018.
- LIU, K. F., et al. Oral administration of *Lactococcus lactis*-expressing heat shock protein 65 and tandemly repeated IA2P2 prevents type 1 diabetes in NOD mice. **Immunology Letters**. 174, 28–36; 2016.
- LOUREIRO, R. J., et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Rev. Port. Saúde Pública**. 34(1):77–84; 2016.
- ŁUKASZEWICZ, M. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*–Probiotic Yeast. In: **Probiotics**. InTech, 2012.
- MAMZA, S. A. et al., Beta-lactamases and their Global Health Implications–One: Epidemiological Profile, Paradigm of Nigerian Chickens *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Isolates. **Journal of Etiology and Animal Health**. Volume 2, Sep 09, 2016.
- MARTINS, F. S. et al. Estudo do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes *in vitro*. **Revista de Biologia Ciências da Terra**. Volume 5- Número 2 - 2º Semestre, 2005.

- MARTINEZ, R. C. R. et al. Probióticos e Prebióticos. EDMART I.indd. January, 2014.
- MENDONÇA, E. P. Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil. Tese de doutorado, Uberlândia, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/17625/1/CaracteristicasVirulenciaResistencia.pdf>. Acesso em: 21 mai. 2018.
- MESSIAS, B. A. et al. Transplante de microbiota fecal no tratamento da infecção por *Clostridium difficile*: estado da arte e revisão de literatura. **Rev Col Bras Cir.** 45(2): 1609; 2018.
- MILLANI, E., et al. Efeitos da utilização de prebióticos (oligossacarídeos) na saúde da criança. **Rev Paul Pediatr.**, 27(4):436-46, 2009.
- MIMICA, M. J. Microbioma humano: conceito, principais características, e potenciais implicações patológicas e terapêuticas. **Arq Med Hosp Fac Cienc Med.** 62(1):42-5; 2017.
- MOHAJERI, M. H. et al. The role of the microbiome for human health: from basic Science to clinical applications. **European Journal of Nutrition.** 57 (Suppl1):S1–S14, 2018.
- MONTASSIER, H. J. Práticas laboratoriais em imunologia básica e aplicada. UNESP- Universidade Estadual Paulista; JABOTICABAL - SP - 2016. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/HELIOJOSEMONTASSIER/roteiro-aulas-praticas-biologia.pdf>. Acesso em 7 ago. 2018.
- MORAES, M. B., JACOB, C. M. A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Jornal de Pediatria** - Vol. 82, Nº5(Supl), 2006.
- NICOLAU, P. B. Microrganismo e ambiente: ar e água, solo e extremos. (2016). Disponível: https://repositorioaberto.uab.pt/bitstream/10400.2/6135/1/UT4_Microrganismos%20e%20Ambiente.pdf. Acesso em: 25 mai 2018.
- NOGUEIRA, B. L. Probióticos para o tratamento de doenças neurológicas: uma revisão. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA APLICADA, BELO HORIZONTE, 2015.
- NUSBAUM, D.J., et al. Gut microbial and metabolomic profiles after fecal microbiota transplantation in pediatric ulcerative colitis patients. **FEMS Microbiol Ecol.** Sep 1;94(9); 2018.
- OLIVEIRA, M.A. et al. Enterobacteriaceae: bactérias intestinais de organismos aquáticos, um risco à saúde pública – Revisão de literatura. **Revista científica de medicina veterinária** - ISSN:1679-7353 Ano XIII-Número 25 – Periódico Semestral - Julho de 2015.
- OLIVEIRA, M. N., et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.** Vol. 38, n. 1, jan./mar., 2002.

- OLIVEIRA, J. L. et al., A Importância do uso de probióticos na saúde humana. **Unesc & Ciência** - ACBS Joaçaba, v. 8, n. 1, p. 7-12, jan./jun. 2017.
- OMURA, M. H. Características probióticas e de segurança de bactérias do ácido láctico predominantes em leite humano. DISSERTAÇÃO- Viçosa- Minas Gerais – Brasil, 2014. Disponível em: <http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/6401/texto%20completo.pdf?sequence=1>Acesso em: 02 ago. 2018.
- OGAK, M. B. e FURLANETO, M. C. Revisão: Aspectos gerais das bacteriocinas. **Braz. J. Food Technol.** Campinas, v. 18, n. 4, p. 267-276, out./dez. 2015.
- PAIXÃO, L. A., CASTRO, F. F. S. A colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. *Universitas: Ciências da Saúde*, Brasília, v. 14, n. 1, p. 85-96, jan./jun. 2016.
- PATHAK R., et al. Treatment of relapsing *Clostridium difficile* infection using fecal microbiota transplantation. **Clinical and Experimental Gastroenterology**. 7:1-6; 2014.
- PALMA, M. L., et al. Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains as biotherapeutic tools: is there room for improvement? **Appl Microbiol Biotechnol**, Ago; 99 (16): 6563-70, 2015.
- PATERSON, D.L. Infections Due to Other Members of the Enterobacteriaceae, Including Management of Multidrug-Resistant Strains. **Goldman's Cecil Medicine**, 2: 1874–1877. 2012.
- PHAM, V.T., MOHAJERI, M.H. The application of *in vitro* human intestinal models on the screening and development of pre- and probiotics. *Benef Microbes*. Apr 26:1-18, 2018.
- PUERTA-GARCÍA, A., MATEOS-RODRÍGUEZ, F. Enterobactérias. **Medicine**. Albacete. España.10(51):3426-31, 2010.
- RAIZEL, R., et al. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v. 4, n. 2, p. 66-74, jul./dez. 2011.
- REDA, R. M. et al. Estudo comparativo de três linhagens predominantes de *Bacillus* intestinal e uma *B. amyloliquefaciens* comercial como probiótico no desempenho de *Clarias gariepinus*. **Peixe Marisco Immunol**. 18; 80:416-425, jun 2018.
- ROMANO, L.H., et al. Review: Aplicação de Microorganismos e Biologia Molecular na Produção de Bioenergia. **Saúde em Foco**, Edição nº: 08/Ano: 2016.
- ROUSSEL, C., et al. Anti-infectious properties of the probiotic *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I- 3856 on enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) strain H10407. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2018.
- SAAD, S. M. I. Probioticos e prebioticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 01-16, 2006.

- SANTOS, T. T. A importância de probióticos para o controle e/ou reestruturação da microbiota intestinal. **Revista Científica do ITPAC**, Volume 4. Número 1. Janeiro de 2011.
- SATO, M. I. Z. Monitoramento de *Escherichia coli* e coliformes termotolerantes em pontos da rede de avaliação da qualidade de águas interiores do Estado de São Paulo. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental- Relatório Técnico, São Paulo, 2008.
- SEIBERT, G., et al. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase em um hospital escola. **Einstein**, 12(3):282-6, 2014.
- SAKARYA, S. GUNAY, N. *Saccharomyces boulardii* expresses neuraminidase activity selective for α 2,3-linked sialic acid that decreases *Helicobacter pylori* adhesion to host cells. **APMIS**. Oct;122(10):941-50; 2014.
- SERDOURA, S. V. Microbiota intestinal e Obesidade. Revisão Temática, 1.º Ciclo em Ciências da Nutrição Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto, 2017.
- SEWALT, V. Review The Generally Recognized as Safe (GRAS) Process for Industrial Microbial Enzymes. **Industrial Biotechnolog**. vol. 12 no. 5 _ october 2016.
- SICHETTI, M., et al. Anti-inflammatory effect of multistrain probiotic formulation (*L. rhamnosus*, *B. lactis*, and *B. longum*). **Nutrition**. 53, 95–102; 2018.
- SILVA, Y. R. Isolamento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* resistentes a antimicrobianos em queijo do tipo fresco artesanal comercializado no distrito de Ouroana – Go. Monografia- UNIRV - Universidade de Rio Verde Faculdade de Biologia e Química, 2016.
- SIMONETTI, E., et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, p.9-18, 2016.
- SOARES, G. G. et al. Biofilm production and resistance profile of Enterobacter sp. strains isolated from pressure ulcers in Petrolina, Pernambuco, Brazil. **J Bras Patol Med Lab**, v. 52, n. 5, p. 293-298, October 2016.
- SORNPLANG, P., and PIYADEATSOONTORN, S. “Probiotic Isolates from Unconventional Sources: A Review.” **Journal of Animal Science and Technology** 58: 26, 2016.
- SHOBHARANI, P. Strain-Specific Quantification of Native Probiotic Bacillus spp. and Their Effect on Liver Function and Gut Microflora of Experimental Rats. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**. 06 March, 2018.
- STURMER, E. S., et al. A importância dos probióticos na microbiota intestinal humana. **Rev. Bras. Nutr. Clin**; 27 (4):264-72, 2012.
- TADDEI, C. R., FEFERBAUM, R. Microbioma intestinal no início da vida. São Paulo: ILSI **Brasil - International Life Sciences Institute do**

- Brasil**, (Série de publicações Ilsi Brasil: força tarefa de nutrição da criança; v. 3, 2017.
- THEOPHILO, I. P. P., GUIMARÃES, N. G. Tratamento com probióticos na síndrome do intestino irritável. **Com. Ciências Saúde**.;19(3): 271-281, 2008.
- THOMAS, L., et al. Probiotics: A proactive approach to health. A symposium report. **British Journal of Nutrition**, 114 (S1), S1-S15, 2015.
- TORTORA, G. J. et al. Microbiologia.10. ed., Porto Alegre: **Artmed**, 2012.
- URDACI, M. C. et al. *Bacillus clausii* Probiotic Strains Antimicrobial and Immunomodulatory Activities. **J Clin Gastroenterol** • Volume 38, Supp. 2, July 2004.
- VANDENPLAS, Y., et al. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria**. v. 91, n. 1, p. 6-21, 2015.
- UZCÁTEGUI, O. Expresidenta de la Sociedad de Obstetricia y Ginecología de Venezuela. **Rev Obstet Ginecol Venez**. 76(1):1-3; 2016.
- VOGT, S. L., & FINLAY, B. B. Gut microbiota mediated protection against diarrheal infections. *Journal of Travel Medicine*, 24(Suppl 1), S39-S43, 2017.
- VEMURI, R., et al. "A Human Origin Strain *Lactobacillus Acidophilus* DDS-1 Exhibits Superior *in Vitro* Probiotic Efficacy in Comparison to Plant or Dairy Origin Probiotics." **International Journal of Medical Sciences** 15.9, 840–848; 2018.
- WAITZBERG, D.L. Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica. 4.ed. São Paulo: **Atheneu**, v.2, 2009.
- WAN, M. L. et al. Probiotics interaction with foodborne pathogens: a potential alternative to antibiotics and future challenges. **Crit Rev Food Sci Nutr**. Jul 11:1-29; 2018.
- WANG, J. et al. "Swine-Derived Probiotic *Lactobacillus plantarum* Inhibits Growth and Adhesion of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Mediates Host Defense." **Frontiers in Microbiology**, 2018.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Salmonella*. 2015. Disponível em: Acesso em: 21 mai 2018.
- WHO, WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION. Diretrizes Mundiais da Organização. Mundial de Gastroenterologia - Probióticos e prebióticos, 29p, 2011.
- WILLIS, L. Probiotics—The quality challenge. **National Enzyme Company**, may 2017.
- WU, D. et al. *Saccharomyces boulardii* prevention of the hepatic injury induced by *Salmonella enteritidis* infection. **Canadian Journal of Microbiology**, Vol. 60, No. 10: pp. 681-686, 2014.
- YERLIKAYA, O. Starter cultures used in probiotic dairy product preparation and popular probiotic dairy drinks. **Food Sci. Technol**, Campinas, 34(2): 221-229, Apr.-June 2014.

- YOUSSEF, O., et al. Stool Microbiota Composition Difers in Patients with Stomach, Colon, and Rectal Neoplasms. **Digestive Diseases and Sciences**. 11 July 2018.
- YU, A. Q., LI, L. The Potential Role of Probiotics in Cancer Prevention and Treatment. **Nutrition and Cancer**., VOL. 0, NO. 0, 1–10; 2016.