

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
MESTRADO ACADÊMICO**

CLAUDIA CARNEIRO BRANDALIZE

**Potencial probiótico de *Enterococcus faecium* isolados
de queijo.**

CAMPO MOURÃO

2013

CLAUDIA CARNEIRO BRANDALIZE

**Potencial probiótico de *Enterococcus faecium* isolados de
queijo.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Professora Dra Luciana Furlaneto Maia.

CAMPO MOURÃO

2013

AGRADECIMENTO

A Deus por guiar meus passos e meu caminho ao propósito da realização desse trabalho.

A professora Dra. Luciana Furlaneto Maia, por toda sua dedicação e paciência no decorrer deste trabalho.

Ao prof. Dr. Luciano, da UFPR de Palotina, e a professora Dra. Márcia, da UEL, por terem gentilmente cedido seus laboratórios para realização de parte das análises.

Aos professores, alunos e funcionários da UTFPR que estão envolvidos no programa de pós graduação em tecnologia de alimentos, pela valiosa contribuição.

As alunas Kátia e Márcia, que ajudaram condução da utilização do laboratório da UEL.

A Cvale – Cooperativa Agroindustrial, por ter liberado todas as vezes que foram necessário eu me ausentar da empresa para cumprir com atividades do mestrado.

A minha mãe e irmã, Lenira e Ana Paula, por apoiar e incentivar nas horas de decisão.

RESUMO

Tendo em vista fazer uma verificação de algumas das características de micro-organismos com potencial probiótico, esse trabalho tem por objetivo identificar, avaliar e comparar o potencial probiótico de *Enterococcus faecium* isolados de queijo artesanal da cidade de Londrina. Primeiramente foram identificadas por técnica molecular as cepas já isoladas de *Enterococcus*. O restante dos testes foram feitos somente com os isolados de *Enterococcus faecium*. Fez-se então, um antibiograma frente à eritromicina 15 µg, tetraciclina 30 µg e vancomicina 30 µg, verificando-se a resistência ou sensibilidade de cada isolado frente a estes antibióticos. Em seguida foram realizados testes de simulação *in vitro* do trato gastro-intestinal e comparados com a cepa comercial de *Lactobacillus acidophilus*. Para simular as condições na boca foi realizado o teste de resistência à lisozima, verificando assim a sua viabilidade. Já para simular as condições no estômago realizou-se o teste de tolerância em meio ácido, em cultivo. Foram avaliadas as condições de sobrevivência simulando o intestino delgado, determinando-se a viabilidade destes micro-organismos frente à pancreatina em pH 8,0. No estudo de auto-agregação, cada isolado de *E. faecium* e a cepa comercial de *L. acidophilus*, foram colocados separadamente e verificados em densidade óptica de 540 nm. Os resultados demonstraram que dos 98 isolados de *Enterococcus*, 54,0 % eram *E. faecium*, 39,8% eram *E. faecalis* e 6,2% eram *Enterococcus* spp. Em relação à susceptibilidade à antimicrobianos foram pouco resistentes aos antibióticos testados, sendo que 24,5% apresentaram resistência à eritromicina e 1,9% apresentaram resistência à tetraciclina e vancomicina. Já no teste de resistência à lisozima após 120 min obteve-se 15 isolados que não apresentaram diferença significativa ao nível de 5% quando comparados ao *L. acidophilus* e 7 isolados que foram mais resistentes que o mesmo. No resultado frente ao estresse ácido após 3 h, 3 isolados não apresentaram diferença significativa ao nível de 5 % quando comparados com *L. acidophilus* e 2 isolados apresentaram maior resistência que o *Lactobacillus*. Em relação ao teste sobrevivência ao intestino delgado, em comparação a cepa comercial de *L. acidophilus*, apresentaram-se com taxas de sobrevivência sem diferença significativa, 21 isolados de *E. faecium*, e ainda pode-se destacar 7 isolados, onde encontrou-se uma taxa de sobrevivência maior que o controle. Dos 53 isolados analisados 60 % apresentaram capacidade de auto-agregação.

Palavras-chave: potencial probiótico, *Enterococcus faecium*

ABSTRACT

The purpose of this work was to identify, assess and compare some *Enterococcus faecium* potential probiotic micro-organisms isolated from artisanal cheese in Londrina. First, identified by molecular techniques already isolated strains of *Enterococcus*. The rest of the tests were made only with isolates of *Enterococcus faecium*. There was then a antibiogram forward to erythromycin 15 mg, 30 mg tetracycline and vancomycin 30 mg, checking the resistance or sensitivity of each isolate against these antibiotics. It was then performed simulation tests in vitro gastro-intestinal tract and compared with the commercial *Lactobacillus acidophilus* strain. To simulate the conditions in the mouth was performed to test for resistance to lysozyme, thus verifying its viability. Have to simulate conditions in the stomach was performed tolerance test in acid medium in cultivation. We evaluated the survival conditions simulating the small intestine, determining the viability of these micro-organisms against the pancreatin at pH 8.0. In the study of auto-aggregation, either isolated from *E. faecium* and a strain of commercial *L.acidophilus* were separately placed and the optical density verified of 540 nm. The results showed that the 98 Enterococcus, isolated from cheese, was 54.0% *E. faecium*, 39.8% *E. faecalis* and 6.2% *Enterococcus spp.* Regarding antimicrobial susceptibility were slightly resistant to the antibiotics tested, and 24.5% were resistant to erythromycin and 1.9% to tetracycline and vancomycin. Already in lysozyme resistance test after 120 min showed 15 isolates that had no significant difference at 5% when compared to *L. acidophilus* and 7 isolates were more resistant than the same. In result against acid stress after 3 h, 3 isolates showed no significant difference at 5% when compared with *L. acidophilus* and 2 isolates had greater resistance than *Lactobacillus*. Regarding testing survival to the small intestine, compared to commercial strain of *L. acidophilus*, presented with survival rates without significant difference, 21 isolates of *E. faecium*, and still can highlight the isolates 7 isolates, which found a higher survival rate than the control. 32 of the 53 isolates tested showed the ability to auto-aggregation, or 60%.

Keywords: potential probiotic, *Enterococcus faecium*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. OBJETIVOS GERAIS.....	10
2.1 Objetivos específicos.....	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 Bactérias probióticas.....	11
3.1.1 <i>Enterococcus</i> sp	15
3.1.1.1 Cepas probióticas de <i>Enterococcus faecium</i>	17
3.2 Critérios para seleção e utilização de bactérias probióticas.....	21
3.3 Características probióticas e o stress intestinal.....	23
3.3.1 Adesão e auto-agregação.....	23
3.3.2 Produção de substâncias antagônicas.....	25
4. METODOLOGIA.....	30
4.1 Material biológico.....	30
4.2 Reativação dos isolados.....	30
4.3 Preparo de inóculo.....	30
4.4 Extração de DNA e identificação da espécie.....	31
4.5 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão em disco.....	32
4.6 Resistência à Lisozima.....	32
4.7 Determinação da tolerância ao meio ácido.....	33
4.8 Determinação da tolerância ao trânsito intestinal.....	33
4.9 Teste de auto-agregação.....	34
4.10 Análise estatística dos resultados.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
5.1 Identificação genotípica das amostras de alimentos.....	35
5.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão em disco.....	36
5.3 Simulação <i>in vitro</i> do <i>stress</i> gastro-intestinal.....	38
5.4 Auto-agregação.....	54
6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicação de bacteriocinas na bioconservação de alimentos.....	29
Tabela 2 – Resultado do teste de sensibilidade a antimicrobianos dos isolados de <i>E. faecium</i>	37
Tabela 3 - Taxa de sobrevivência referente à resistência dos isolados em presença de lizosima ao longo do tempo.....	39
Tabela 4 - Taxa de sobrevivência referente a resistência dos isolados em presença de meio ácido, pH 3,0, ao longo do tempo.....	44
Tabela 5 - Taxa de sobrevivência referente a resistência dos isolados em presença de pancreatina em pH 8,0, ao longo do tempo.....	49
Tabela 6 – Avaliação dos isolados de <i>E. faecium</i> em relação ao controle <i>L. acidophilus</i>	50
Tabela 7 - Porcentagem de auto-agregação dos isolados ao longo do tempo.	54

LISTA DE FIGURAS ILUSTRATIVAS

Figura 1 - Etapas envolvidas para avaliação de um micro-organismo probiótico para uso em alimentos.....	13
Figura 2 - Mecanismo de ação de bacteriocinas das classes I (nisina) e IIa (pediocina)	28
Figura 3 – Figura de gel de agarose com produtos da PCR para a identificação de <i>E. faecium</i> e <i>E. faecalis</i>	35
Figura 4 – Contagem de cada isolado frente à lisozima ao longo do tempo.....	42
Figura 5 – Contagem de cada isolado frente ao meio ácido ao longo do tempo.....	46
Figura 6 – Contagem de cada isolado frente à pancreatina em pH 8,0 ao longo do tempo.....	48
Figura 7 – Gráfico dos <i>scores</i> para componente principal 1 versus componente principal 2.....	52
Figura 8 – Gráfico de <i>loadings</i> (variáveis) para a componente principal 1 versus componente principal 2.....	53

1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos probióticos são considerados aqueles que chegam ao trato gastro-intestinal com células viáveis suficientes para que tragam algum tipo de benefício para o organismo ao serem ingeridos em doses diárias adequadas. Dentre os estudos encontrados na literatura, relata-se benefícios como controle de infecção gastro-intestinal, ações benéficas frente ao câncer de cólon e até mesmo redução da hipercolesterolemia, entre outros. Algumas vezes, os benefícios desses probióticos estão relacionados à produção de bacteriocinas e à competição desses micro-organismos no trato gastro-intestinal.

No entanto, a seleção de micro-organismos probióticos deve passar por uma avaliação que leva em consideração a questão funcional, de segurança e tecnológica. Levando em consideração que, as células dos probióticos necessitam estar viáveis no trato gastro-intestinal, faz-se necessário a priori testes *in vitro* para a triagem das bactérias com potencial probiótico. Apesar de não serem conclusivos esses testes *in vitro*, os mesmos são importantes para obter uma compreensão científica sobre as características dos micro-organismos com potencial característica probiótica.

Entre as bactérias ácido lácticas (BAL) existem vários micro-organismos probióticos, tais como: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus*. O *Enterococcus* sp tem como habitat natural o trato gastro-intestinal de humanos e vários animais, além de estar presente em vários alimentos, como produtos lácteos. Dentre os *Enterococcus* já estudados e empregados como probióticos, há registros de cepas que estão no mercado com eficiência comprovada e sem riscos à segurança alimentar, a exemplo da cepa *E. faecium* SF68.

Neste contexto, embora já existam vários probióticos bem descritos e estudados em uso comercial, trabalhos visando isolar e caracterizar novos probióticos são desejáveis, tendo em vista que cada cepa probiótica tem uma alta especificidade em relação ao seu benefício à saúde. Esses novos estudos podem ajudar a encontrar outros probióticos com benefícios à saúde e aplicação industrial.

2. OBJETIVOS GERAIS

O principal objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade probiótica de *Enterococcus faecium*, provenientes de queijo.

2.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- identificar por técnicas moleculares as espécies de *Enterococcus* sp provenientes de queijo artesanal;
- determinar a sensibilidade dos isolados potencialmente probióticos frente aos antimicrobianos de uso clínico;
- verificar a sobrevivência de *E. faecium* pela simulação das condições do trato digestório;
- comparar a capacidade probiótica de *E. faecium* com cepas comerciais de *L. acidophilus*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Bactérias probióticas

Devido ao aumento da expectativa de vida da população e o crescimento exponencial dos custos médico hospitalar, a sociedade necessita vencer novos desafios, através do desenvolvimento de novos conhecimentos científicos e tecnologias que resultem em modificações importantes no estilo de vida das pessoas. Com isso, os alimentos funcionais e especialmente os pro e prebióticos são conceitos estimulantes para assegurar tanto o bem-estar quanto a saúde, como também o risco mínimo de desenvolvimento de doenças ao longo da vida (ROBERFROID, 2002).

Os probióticos foram classicamente definidos como suplementos alimentares à base de micro-organismos vivos, que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o balanço de sua microbiota intestinal (FULLER, 1989). Contudo, diversas definições de probióticos foram publicadas (SANDERS, 2003), e a definição atualmente aceita internacionalmente é que são micro-organismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2001; SANDERS, 2003).

A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos. Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIÄ *et al*, 2002).

Têm-se encontrado muitos estudos na literatura científica a respeito dos probióticos, principalmente sobre as bactérias ácido lácticas (BAL), na maioria das vezes em alimentos fermentados (MOMBELLI e GISMONDO, 2000).

Originalmente o grupo de bactérias lácticas incluía quatro gêneros de grande importância: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*. Após revisões taxonômicas desses gêneros e a descrição de novos, atualmente, as bactérias lácticas são divididas nos seguintes gêneros:

Aerococcus, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (AXELSSON, 2004). De todos esses gêneros, cinco são comumente encontrados em queijos: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* e *Streptococcus* (BERESFORD *et al*, 2001).

As BALs apresentam a forma de cocos, coco-bacilos ou bastonetes com as seguintes características: baixo conteúdo de G + C (< 55 mol%); ácido tolerantes; não esporuladas; nutricionalmente fastidiosas; aerotolerantes mas não aeróbias; incapazes de sintetizar porfirinas; catalase negativa; motilidade negativa, que estão funcionalmente relacionadas devido a sua capacidade comum de produzir parcialmente ácido láctico a partir de hexoses (LIN *et al*, 2006; MAKAROVA e KOONIN, 2007; BROADBENT, 2001).

A vasta diversidade das BALs permite sua presença em uma variedade de nichos ecológicos, desde matrizes alimentares, como produtos lácteos, carnes, vegetais, pães de massa azeda e vinho, até superfícies de mucosas humanas, como cavidade oral, vagina e trato gastrointestinal. Essa capacidade de sobreviver em vários ambientes é devido a sua habilidade em transportar e utilizar diferentes substratos (SCHROETER e KLAENHAMMER, 2009).

Uma das características necessárias para as bactérias lácticas serem consideradas probióticas é a capacidade de sobreviver durante o trânsito intestinal e colonizar, transitoriamente, o intestino (MOMBELLI e GISMONDO, 2000).

De acordo com a lista de alegações de propriedade funcional aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2008, os micro-organismos liberados para uso como probiótico em alimentos são: *Lactobacillus acidophilus*; *Lactobacillus casei shirota*; *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*; *Lactobacillus casei* variedade *defensis*; *Lactobacillus paracasei*; *Lactococcus lactis*; *Bifidobacterium bifidum*; *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*); *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium*. Os micro-organismos *Lactobacillus delbrueckii* (subespécie *bulgaricus*) e *Streptococcus salivarius* (subespécie *thermophilus*) foram retirados da lista tendo em vista que além de serem espécies necessárias para produção de iogurte, não possuem efeito probiótico cientificamente comprovado.

Bactérias isoladas de todas as porções do trato digestório do ser humano, como as pertencentes as espécies *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus faecium*, são mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos. O íleo terminal e o cólon parecem ser, respectivamente, o local de preferência para colonização intestinal dos lactobacilos e bifidobactérias (CHARTERIS *et al*, 1998; BIELECKA *et al*, 2002).

Cepas probióticas são selecionadas de acordo com as propriedades funcionais e fisiológicas as quais podem ser determinadas *in vitro* (HOLZAPFEL *et al.*, 2001). Diversos estudos devem ser realizados para confirmar a característica probiótica de uma cepa bacteriana (Figura 1).

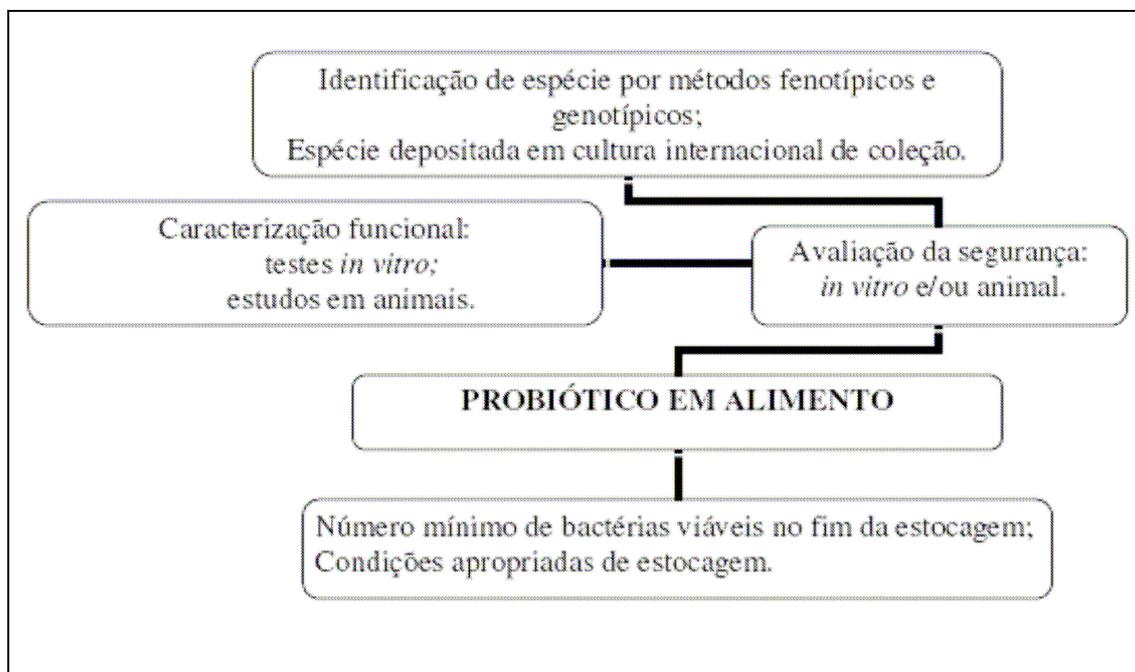


Figura 1 – Etapas envolvidas para avaliação de um micro-organismo probiótico para uso em alimentos.

Fonte: FAO/WHO (2001)

Os probióticos têm benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à sua ingestão, entre eles os que mais se destacam, segundo SHAH e LANKAPUTHRA (1997), KLAENHAMMER (2001), KAUR *et al* (2002), TOUHY *et al* (2003) são:

- controle da microbiota intestinal;
- estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos;
- promoção da resistência gastrintestinal à colonização por patógenos;

- diminuição da população de patógenos através da produção de ácidos acético e láctico, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos;
- promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose;
- estimulação do sistema imune;
- alívio da constipação;
- aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas.

Segundo o Guia Prático de probiótico e prebiótico da Organização Mundial de Gastroenterologia (OMGE, 2013), cepas específicas de probióticos demonstraram ser eficazes em ensaios clínicos bem desenhados e com doses estabelecidas para os seguintes transtornos: diarreia aguda em adultos e crianças, aliviar sintomas da síndrome do intestino irritado, manutenção da remissão de colite ulcerativa, prevenção de enterocolite, prevenção e manutenção da remissão de pouchite.

Contudo, é necessário que haja consumo regular para que se mantenha o efeito desses micro-organismos sobre a composição da microbiota intestinal, já que a colonização não é permanente, e sim transiente (GOMES e MALCATA, 1999).

Já existem no mercado, produtos probióticos comerciais disponíveis para aves, suínos, bovinos, ovinos, equinos, cães e gatos. A forma mais tradicional de aplicação dos micro-organismos probióticos na criação de suínos é por meio de alimentos funcionais. A administração destes produtos geralmente acontece logo após o nascimento, pois nas primeiras horas de vida o trato gastrointestinal do leitão é estéril, havendo pouca secreção de ácido clorídrico, o que permite a proliferação de bactérias patogênicas como *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Salmonella* e *Clostridium*, principais causadores de morte nos suínos (SANTOS *et al*, 2003; MENIN *et al*, 2008; VANNUCCI e GUEDES, 2009).

Contudo o mercado dos probióticos no Brasil é incipiente, sendo comercializados alguns produtos alimentícios, como leite fermentado e iogurte, além de alguns produtos probióticos considerados como farmacêuticos na forma de suplemento alimentar, suspensão oral e comprimidos (OLIVEIRA *et al*, 2002).

O relatório da Global Industry Analysis, feito pelo Transparency Market Research, apontou que as principais áreas de interesse para probióticos são os

lácteos, os cereais, os produtos fermentados de carnes e os alimentos desidratados entre outros. E ainda destacou que, a procura de probióticos para produtos lácteos deverá alcançar 32,2 bilhões de dólares em 2018, com uma taxa composta de crescimento anual de 6,8%, no período de 2013 à 2018.

3.1.1 *Enterococcus* sp.

SCHLEIFER e KILPPER-BALZ (1984) descreveram pela primeira vez o gênero *Enterococcus*, correspondendo à descrição de *E. faecium* e *E. faecalis*. Até então as espécies *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium* eram atribuídas ao gênero *Streptococcus*. SHERMAN (1937) dividiu estreptococos em quatro grupos, conhecidos como: *Enterococcus* ou *Estreptococcus* fecais, os *Estreptococcus* laticos, o grupo *viridans* e o grupo dos *Estreptococcus pyogenes*. Mais tarde o termo *viridans* foi atribuído a *Streptococcus* orais e *Enterococcus* a *Streptococcus* fecais. Apoiados em dados moleculares SCHLEIFER e KILPPER-BALZ (1984) dividiram o gênero *Streptococcus* em três gêneros distintos: *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Lactococcus*. A partir de então foram descritas várias espécies de *Enterococcus*, sendo que atualmente são consideradas 40 espécies (EUZÉBY, 2011).

As características do gênero compreendem: forma de cocos isolados, em pares, ou em cadeias curtas; não esporulados; reação de oxidase negativo e aeróbio facultativas (HARDIE e WHILEY, 1997). *Enterococcus* crescem em uma temperatura ótima de 35 °C, embora a maioria das espécies do gênero cresça em temperaturas que variam de 10 a 45 °C. A maioria apresenta crescimento em altas concentrações de NaCl (até 6,5 %), em pH em torno de 9,6 e ainda pode sobreviver a 60 °C durante 30 minutos, portanto, termodurico. Grande parte desses micro-organismos conseguem hidrolisar a esculina na presença de 40 % de sais biliares (FACKLAM *et al*, 1995; GIRAFFA, 1997; 2003; FACKLAM *et al*, 2002; FOLQUIE-MORENO, 2006).

O gênero *Enterococcus* representa um grupo de bactérias complexo, bastante heterogêneo e de elevada importância ao nível da sua interação com os humanos (VALENZUELA *et al*, 2009). São frequentes no trato intestinal de animais de sangue quente, *E. faecalis* e *E. faecium* são membros naturais da

microbiota digestiva em humanos, variando em abundância (10^2 a 10^8 / g de conteúdo digestivo) de indivíduo para indivíduo e ao longo do trato gastrointestinal (OGIER e SERROR, 2008).

Uma característica de diferentes espécies de enterococos é conseguir produzir uma grande variedade de bacteriocinas, designadas como enterocinas, que consistem em pequenos peptídeos secretados por estes microorganismos e que possuem a capacidade de inibir um amplo espectro de patógenos de origem alimentar e clínica (MORENO *et al*, 2003).

GHRAIRI *et al* (2008), avaliaram a atividade de enterocinas produzidas por *E. faecium* MMT21 e obtiveram resultados satisfatórios de inibição frente à *Listeria monocytogenes* e *Clostridium* spp. Os autores citam o uso dessas enterocinas como bons métodos de preservação frente à patógenos emergentes. Essa bacteriocina foi considerada termoestável, o que possibilita a utilização em processos industriais que envolvam tratamentos térmicos.

Outro exemplo de enterocina é a CRL35 da estirpe *E. faecium*, que foi capaz de inibir a multiplicação *in vitro* de células do vírus causador da herpes (WACHSMAN *et al*, 1999).

Anteriormente, a presença de *Enterococcus* em produtos lácteos era considerada como indicador de condições sanitárias inadequadas durante a produção e o processamento do leite (GIRRAFA, 2002; SARANTINOPOULOS *et al*, 2001), porém nas últimas décadas tem-se assistido a um aumento no interesse em enterococos que se deve em grande parte à sua utilização como probióticos efetivos e como culturas *starter* em vários produtos alimentares fermentados (PANGALLO *et al*, 2008), desde leite, queijos, carne e vegetais (VALENZUELA *et al*, 2009) que se deve em grande medida ao fato de não possuírem cadeia respiratória nem Ciclo de Krebs, o que os torna fortes fermentadores comumente usados na indústria alimentar (KLEIN, 2003).

A importância da ação do *Enterococcus* já foi relatada para o desenvolvimento de características sensoriais de queijos europeus como Mussarela, Feta e Cebreiro (SARANTINOPOULOS *et al*, 2001), Roncal e Idiazabel (ARIZCUM *et al*, 1997) e Rigouta (GHRAIRI *et al*, 2008). Tolerância à sal e ácido são algumas propriedades bioquímicas desejáveis no processamento de alguns queijos (ANDRIGUETTO *et al*, 2001; GIRAFFA,

2002). Também, pode ser uma cultura *starter* natural proveniente da própria matéria prima, o leite cru ou pasteurizado (GIRRAFA, 2002).

O gênero *Enterococcus* caracteriza-se por ser constituído de micro-organismos colonizadores transitórios do trato gastrointestinal, indispensáveis no tratamento das diarréias, principalmente na invasão do rotavírus. É capaz de reduzir o colesterol LDL (lipoproteína de baixa densidade) pela ativação do sistema enzimático hepático. A espécie *E. faecium* destaca-se dentre as demais por exercerem tais funções de maneira mais acentuada (FISIOQUANTIC, 2011).

3.1.1.1 Cepas probióticas de *Enterococcus faecium*

E. faecium foi, por muito tempo, confundido com *E. faecalis*, uma espécie que pode ser patogênica, razão pela qual seus estudos foram prejudicados, tendo seu início tardio em relação as demais bactérias benéficas ao organismo humano (ECOLOGY HEALTH CENTER, 2011).

E. faecium é uma bactéria com tempo de geração de 19 minutos, diferente do *Lactobacillus* e o *Bifidobacterium* que é de aproximadamente 60 minutos. Com reprodução três vezes mais rápida, seu efeito na remoção de floras patogênicas nos intestinos, é mais efetivo. É mais resistente ao ácido do estômago, sendo menos inibido quando veiculado por suplemento oral, com conseqüente colonização mais rápida nas paredes intestinais (VAHJEN *et al*, 2005; POLLMAN *et al*, 2005)

Entre os enterococos considerados probióticos, podemos citar: *E. faecium* SF68® (produzido por Cerbios-Pharma AS, Barbengo, Suíça) e *E. faecalis* Symbioflor 1 (produzido por SynbioPharm, Herbolm, Alemanha). Ambas são produzidas na forma de preparação farmacêutica (FRANZ *et al*, 2011).

A estirpe SF68 de *E. faecium* é uma das mais estudadas quanto à sua atividade probiótica, na medida que tem sido usada para o tratamento da diarréia em crianças e adultos e é considerada como uma alternativa ao tratamento com antibióticos (FRANZ *et al*, 1999). Essa estirpe apresenta efeito positivo na resposta imune, equilíbrio da microbiota intestinal, antagonismo à

patógenos veiculados por alimentos contaminados e redução do colesterol sérico (FRANZ *et al*, 1999; ANDRIGHETTO *et al*, 2001).

Na Dinamarca é comercializado um leite fermentado (Gaio) contendo uma estirpe específica de *E. faecium* e que é usado como probiótico. A cultura Causido® que consiste em duas cepas de *S. thermophilus* e uma de *E. faecium* constitui outro uso probiótico de *Enterococcus* sendo que já fora comprovado o seu efeito na redução a curto prazo dos níveis de colesterol HDL (SESSIONS *et al*, 1997).

Em estudos com *E. faecium* na flora intestinal, observou-se que os efeitos são frequentemente visíveis nos primeiros dias após sua ingestão, o que não é observado com outros produtos contendo *Lactobacillus* sp (MARCÍÑAKOVÁ *et al*, 2004; VAHJEN *et al*, 2005; POLLMAN *et al*, 2005).

KINOUCHI (2006) demonstrou uma atividade anticarcinogênica em fêmeas de camundongos Balb/c com câncer de mama biologicamente induzido ao receber uma dieta contendo um produto à base de soja fermentado com *E. faecium* CRL 183 e *L. helveticus* spp *jugurti* 416. Os animais que consumiram este produto apresentaram um volume menor do tumor comparado aos demais grupos. Ainda com relação à atividade anticarcinogênica do *E. faecium*, SIVIERI *et al* (2007) observaram uma redução de 40 % na incidência de tumores de cólon em ratos quimicamente induzidos e que ingeriram uma suspensão oral desse micro-organismo em uma concentração diária de 10⁸ UFC / mL.

Estudo realizado *in vitro* por ROSSI *et al* (1994) com um “iogurte” de soja fermentado por *E. faecium* CLR 183 e *Lactobacillus helveticus* spp *jugurti* 416, demonstrou a capacidade de redução do colesterol total e de aumento no HDL (lipoproteína de alta densidade) colesterol em coelhos hipercolesterolêmicos.

ROSSI *et al* (2000) também observaram efeitos semelhantes em ratos hipercolesterolêmicos e em humanos normocolesterolêmicos e concluíram que os efeitos observados são, em grande parte, decorrentes da presença dos micro-organismos viáveis no intestino. Observou-se ainda, um menor percentual de liberação de histamina e de granulação de mastócitos em ratos que consumiram um produto à base de soja fermentado com *E. faecium* CRL 183 e *L. helveticus* spp *jugurti* 416 em relação ao grupo placebo, demonstrando

os benefícios desses micro-organismos na redução do potencial alergênico da proteína da soja.

Em estudos com *E. faecium* KH 24, BHARDWAJ (2010), observou que esse micro-organismo não demonstrou quaisquer propriedades patogênicas e possuía produção potencial de bacteriocina, que pode ajudar a controlar a microflora autóctone e que a produção de bacteriocina precisa ser vantajosa para a cepa conseguir se estabelecer frente à concorrência gastrointestinal. Além disso, sua funcionalidade foi reforçada por suas resistências às condições gastrointestinais, e a ausência da resistência aos antibióticos. Nesse estudo foi relatada a redução na contagem de coliformes e inibição significativa de uma cepa patogênica de *Salmonella*, que pode fornecer alternativas valiosas para os antibióticos para o tratamento de infecções em animais ou humanos.

Enterococcus de diferentes origens podem ser de diversas linhagens genéticas, o que eles têm em comum é a capacidade de rapidamente adquirir elementos genéticos móveis, podendo resultar em uma estirpe problemática, que possuem resistência a antibióticos e / ou genes de virulência. Assim, virulência dos enterococos não pode ser reduzida para investigações da presença de genes de virulência em cepas que são atualmente reconhecidos e que ocorrem em alimentos, comensal, bem como de amostras clínicas (FRANZ *et al*, 2011)

Resistência a antibiótico em *Enterococcus* pode ser transferida por ferormônios mediados por plasmídios conjugativos ou transposons. A resistência pode ser passada não somente para os enterococos suscetíveis, mas também para outros patógenos (FISHER e PHILIPS, 2009).

Tanto *E. faecalis* quanto *E. faecium* podem apresentar resistência a vancomicina. Em 1996 foi encontrado o primeiro enterococos resistente à vancomicina (ERV) no Brasil identificado como *E. faecium* (DALLA COSTA *et al*, 1998). Há seis fenótipos de resistência aos glicopeptídeos conhecidos em enterococos: VanA, B, C, D, E e G que são expressos pela transcrição dos *operons van* localizados tanto em plasmídeos como no cromossomo bacteriano. (KAYSER, 2003; FISHER e PHILIPS, 2009). Enterococos que apresenta resistência à vancomicina frequentemente expressa resistência

adicional a múltiplos antibióticos, incluindo ampicilina, aminoglicosídeos, gentamicina e estreptomicina (SCHOUTEN *et al*, 2000).

NOGUCHI, *et al* (2011), avaliando a resistência à antibióticos de seis cepas comerciais de enterococos: BIOTHREE[®] (Toa Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan), LEBENIN[®]-S POWDER (Wakamoto Co., Ltd.,Tokyo, Japan), Bioflorin[®] (Sanova Pharm GesmbH, Wien, Áustria), Medilac[®]-D.S (Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd., Kyonggi-do, Korea, BIOFERMIN[®]-R POWDER (Biofermin Pharmaceutical Co., Ltd., Kobe, Japan) e Enteronon[®]-R (Ajinomoto Pharmaceuticals Co., Ltd., Tokyo, Japan), observaram que todos esses probióticos continham *E. faecium* e que não apresentaram resistência à vancomicina.

No entanto, apenas algumas cepas probióticas são bem investigadas quanto as suas propriedades funcionais e de segurança. Duas das cepas melhores caracterizadas quanto a questão da segurança são novamente *E. faecium* SF68 e *E. faecalis* Symbioflor 1. Estas têm uma longa história (ambas a mais de 20 anos) de uso seguro, sem relatos de efeitos prejudiciais (FRANZ *et al*, 2011). KAYSER (2003) relata sobre a segurança do *E. faecium* SF68 e investiga a ausência de determinantes de virulência. *E. faecium* SF68 não contém um plasmídeo sexo feromônio ágil e também não contém o gene para a substância de agregação. De acordo com estes resultados, a estirpe não foi capaz de aderir ao epitélio vascular celular (CHISARI *et al*, 1992; KAYSER, 2003).

E. faecalis cepa Symbioflor 1 é uma estirpe de CC25 (SOLHEIM *et al*, 2011) que teve seu genoma completamente sequenciado e comparado com o patogênico *E. faecalis* V583. Embora houvesse uma boa conservação geral e sintonia entre as seqüências das duas linhagens, após detalhadas análises mostraram uma ausência de uma grande região genômica no cromossoma da cepa probiótica que apontava para a perda de gene. Genes que não estão presentes em *E. faecalis* Symbioflor 1 são os genes para a citolisina, gelatinase, a hialuronidase, e o antibiótico peptídico AS-48 (DOMANN *et al*, 2007).

Além disso, outros fatores determinantes, como a produção de substâncias de aglutinação, proteínas de colageno aderente, bem como da resistência em relação ânions reativos de oxigênio e a formação da cápsula

pode ser detectado. Todas estas últimas características, entretanto, foram considerados fatores de colonização (DOMANN *et al*, 2007), que conferem uma vantagem competitiva da cepa probiótica e, assim, apoiar o seu caráter probiótico e atividade. Até agora, apesar da utilização generalizada destes probióticos em altas dosagens, não houve um único relatório de infecção com estes dois enterococos probiótico, isso é um bom indicativo da segurança dessas cepas (FRANZ *et al*, 2011).

3.2 Critérios para seleção e utilização de bactérias probióticas

A seleção de bactérias probióticas tem como base alguns critérios, como: o gênero ao qual pertence a bactéria deve ser de origem humana; estabilidade celular frente a ácido e a bile; capacidade de adesão e colonização à mucosa intestinal; capacidade de produzir compostos antimicrobianos; e ser metabolicamente ativo no intestino. Outros critérios fundamentais incluem a segurança para uso humano, ou seja, não apresentar fatores de patogenicidade, além da ausência de genes determinantes da resistência aos antibióticos (COLLINS *et al*, 1998; LEE *et al*, 1999; SAARELA *et al*, 2000; STANTON *et al*, 2003).

Adicionalmente, a tolerância ao fenol é desejável, já que este composto pode ser formado no intestino pela desaminação de aminoácidos aromáticos provenientes da dieta ou de proteínas endógenas (PINTO *et al*, 2006). Estas propriedades podem ser determinadas por avaliações *in vitro*, as quais são geralmente empregadas na seleção de potenciais bactérias probióticas (SCHILLINGER *et al*, 2005).

Entretanto, deve ser levado em consideração que os probióticos devem, necessariamente, resultar em efeitos benéficos mensuráveis sobre a saúde, substanciados por estudos conduzidos no hospedeiro ao qual ele se destina. Em outras palavras, probióticos destinados para o uso em humanos requerem comprovação da eficácia através de ensaios em humanos (FAO 2001; SANDERS, 2003).

Um critério definitivo para a seleção de cepas probióticas irá depender da indicação clínica, além de considerações de segurança ou biológicas, como

a capacidade de sobreviver ao trânsito gastrointestinal e a tolerância à acidez e à bile. Adicionalmente, não se pode aceitar o fato de que uma determinada cepa probiótica será efetiva para todos os indivíduos ou mesmo para um mesmo indivíduo em diferentes fases de uma doença (SHANAHAN, 2002).

O potencial probiótico pode diferir até mesmo para diferentes cepas de uma mesma espécie, tendo em vista que são incomparáveis e podem possuir áreas de aderência distintas, efeitos imunológicos específicos e seus mecanismos de ação sobre a mucosa saudável e a inflamada podem ser distintos (ISOLAURI *et al*, 2004).

Para a utilização de culturas probióticas na tecnologia de fabricação de produtos alimentícios, além da seleção de cepas probióticas para uso em humanos, as culturas devem ser empregadas com base no seu desempenho tecnológico. Culturas probióticas com boas propriedades tecnológicas devem apresentar boa multiplicação no substrato, sobrevivência no alimento durante a fabricação do produto e prazo de validade, além de propiciar propriedades sensoriais adequadas no produto e ser estáveis e viáveis durante armazenamento. Desta forma, podem ser manipuladas e incorporadas em produtos alimentícios sem perder a viabilidade e a funcionalidade, resultando em produtos com textura e aroma adequados (OLIVEIRA *et al*, 2002; ZAGO *et al*, 2011).

Além disso, com relação às perspectivas de processamento de alimentos, é desejável que essas cepas sejam apropriadas para a produção industrial em larga escala, resistindo a condições de processamento como a liofilização ou secagem por “spray drying” (STANTON *et al*, 2003).

O consumo de quantidades adequadas dos micro-organismos probióticos desejados nos bioprodutos são suficientes para a manutenção das concentrações ativas fisiologicamente *in vivo* (CHARTERIS *et al*, 1998).

Esses alimentos devem permanecer com algumas características inalteradas após a adição do micro-organismo para serem considerados probióticos como, por exemplo, conter pelo menos 10^7 UFC / g de bactérias probióticas viáveis no momento da compra do produto. Esta é uma concentração recomendada por alguns autores (RYBKA e FLEET, 1997; VINDEROLA e REINHEIMER, 2000). Entretanto, vários autores propõem que a dose mínima diária da cultura probiótica considerada terapêutica seja de 10^8 e

10^9 UFC / g ou mL, o que corresponde ao consumo de 100 g de produto contendo 10^6 a 10^7 UFC / g (LEE e SALMINEN, 1995; HOIER *et al*, 1999).

No Brasil, segundo legislação vigente, a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC / g ou mL na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante, com a quantidade mínima viável do micro-organismo até o final do prazo de validade. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia (ANVISA, 2008).

Inúmeros produtos lácteos probióticos estão disponíveis comercialmente e a variedade desses produtos continua em expansão (STANTON *et al*, 2003). Muitas pesquisas em termos de probióticos encontram-se voltada para produtos como leites fermentados e iogurtes, sendo estes os principais produtos comercializados no mundo, contendo culturas probióticas. Outros produtos comerciais contendo essas culturas incluem sobremesas à base de leite, leite em pó destinado a recém-nascidos, sorvetes, sorvetes de iogurte e diversos tipos de queijo, além de produtos na forma de cápsulas ou produtos em pó para serem dissolvidos em bebidas frias, alimentos de origem vegetal fermentados e maionese (OLIVEIRA *et al*, 2002; STANTON *et al*, 2003).

Entretanto, é importante salientar que um produto probiótico deve conter uma ou mais cepas bem definidas, uma vez que os efeitos probióticos são específicos para determinadas cepas em especial. Assim sendo, a validação da função probiótica ou o monitoramento do impacto probiótico de uma preparação de micro-organismos com uma composição desconhecida é cientificamente inaceitável (SANDERS, 2003).

3.3 Características probióticas e o *stress* intestinal

3.3.1 Aderência e auto-agregação

A microbiota intestinal contribui na proteção do hospedeiro contra patógenos, prevenindo o estabelecimento desses micro-organismos no trato gastrointestinal. A aderência dos micro-organismos patogênicos ocorre na

superfície das células epiteliais do intestino, ou seja, na superfície destinada à absorção de nutrientes. Após a colonização, estas se utilizam de um sistema especializado de injeção a fim de enviar algumas de suas próprias proteínas ao interior da célula hospedeira, com a finalidade de se reproduzirem (OLIVEIRA, 2007).

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

As ligações específicas entre o epitélio intestinal humano e *Enterococcus* são vinculadas à substância de agregação (Agg). Essa substância é uma proteína de superfície codificada e expressa em resposta a indução por ferormônios. A Agg converte a superfície celular bacteriana em uma superfície aderente para as células doadoras, causando agregação ou aglutinação, facilitando a adesão na matriz das células eucarióticas (JETT *et al*, 1994; MUNDY *et al*, 2000, KOCH *et al*, 2004).

A principal dificuldade encontrada nos estudos envolvendo a adesão *in vivo* dos probióticos é conhecer o mecanismo desse processo (MAYRAMAKINEN *et al*, 1983). Inicialmente a adesão foi considerada uma técnica que envolve interações físicas não específicas entre a célula do micro-organismo e epitélio intestinal, mas com os estudos de CONWAY e KJELLBERG (1989) e KIMOTO *et al* (1999) foram descobertas inúmeras interações envolvendo relações específicas entre os receptores celulares.

Os mecanismos de ação dos probióticos estão relacionados à competição por sítios de ligação ou à exclusão competitiva, ou seja, as bactérias probióticas ocupam o sítio de ligação na mucosa intestinal formando, uma barreira física às bactérias patogênicas. Assim, as bactérias seriam excluídas por competição de espaço, sendo, as fímbrias os elementos de aderência bacteriana mais conhecidos e estudados. São estruturas compostas

por fosfoglicoproteínas que se projetam do corpo bacteriano, e seus receptores são específicos e se diferem entre as porções anatômicas, ao longo do trato intestinal (KIMOTO *et al*, 1999).

Já, a auto-agregação pode ser definida como a aderência de bactérias que pertencem a mesma estirpe e co-agregação ocorrem quando duas ou mais bactérias, de espécies diferentes, interagem formando um agregado composto estável e este último é altamente específico e pode ser considerado um fator de virulência (KHEMALLELAKUN *et al*, 2006).

A auto-agregação e a co-agregação dos probióticos são mecanismos que envolvem um ou mais micro-organismos, representando um processo necessário para ocorrer a adesão ao epitélio intestinal. Trata-se de um mecanismo importante, uma vez que pode formar barreiras que previnem a colonização por micro-organismos patogênicos (REID *et al*, 1988; BORIS *et al*, 1997; DEL RE *et al*, 2000). Entretanto, vale ressaltar que algumas características físico-químicas celulares podem impedir a adesão, como a hidrofobicidade (WADSTROM *et al*, 1987; PÉRES *et al*, 1998; DEL RE *et al*, 2000) e a presença de determinadas proteínas de menor peso molecular em alguns *Lactobacillus* (SCHNEITZ *et al*, 1993; MUKAI e ARIHARA, 1994).

3.3.2 Produção de substâncias antagônicas

Substâncias antagônicas são metabólitos liberados por bactérias lácticas, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, radicais livres, diacetileno, acetaldeído, isômeros D de aminoácidos e bacteriocinas, todos capazes de inibir a proliferação de outras bactérias (PIARD e DESMAZEUD, 1992). Entre tais substâncias, as bacteriocinas são as mais estudadas devido ao seu efeito protetor no organismo (MONTVILLE *et al*, 1995).

As bacteriocinas podem ser definidas como pequenos peptídeos ou proteínas, termoestáveis, sintetizados pelos ribossomos e biologicamente ativos, com ação inibitória contra outros tipos de bactérias, sendo que a bactéria produtora possui um mecanismo específico que lhe confere imunidade a estas substâncias (COTTER *et al*, 2005). As bacteriocinas variam em relação

ao aspecto de atividade, modo de ação, massa molecular, origem genética e propriedades bioquímicas (GÁLVEZ *et al*, 2008).

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

As bacteriocinas são produzidas por bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, patogênicas ou não, e que têm atividade letal contra outras bactérias. Normalmente as células bacterianas que produzem bacteriocinas são imunes à sua ação antagônica e propiciam à bactéria secretora uma vantagem competitiva sobre outras bactérias no mesmo ambiente ecológico. A secreção de bacteriocinas é encontrada amplamente no reino *Eubacteria* e têm ampla diversidade quanto as suas propriedades físicas e químicas (TODOROV *et al*, 2005).

As propriedades bioquímicas, peso molecular, espectro de atividade, mecanismo de ação, sistema de produção e secreção, bem como a organização genética que codificam estas proteínas, definem diferentes classes de bacteriocinas produzidas pelas bactérias lácticas (KLAENHAMMER, 1993), sendo:

- bacteriocinas da classe I: também chamadas de lantibióticos, são pequenos peptídeos (<5kDa); pertencem a esse grupo os aminoácidos como lantionina, metillantionina, dehidroalanina e dehidrobutirina (SAHL; BIERBAUM,1998; GUDER *et al*, 2000). Com base nas características estruturais e modo de ação, os lantibióticos são subdivididos em dois subgrupos: A e B. Os lantibióticos tipo A inibem as células sensíveis por despolarização da membrana plasmática, são maiores que os lantibióticos tipo B, com tamanho variado entre 21 e 38 aminoácidos, sendo, a nisina a bacteriocina mais representativa e melhor estudada desse grupo (GROSS e MORELL, 1971). Os lantibióticos do tipo B têm uma estrutura secundária globular e sua composição não excede a 19 aminoácidos, têm seu modo de ação através da inibição enzimática da célula alvo, um exemplo dessa

subclasse é a mersacidina, que interfere na biossíntese da parede celular (BROTZ *et al*, 1995).

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

- bacteriocinas da classe III: é constituída por grandes proteínas termolábeis (>30kDa), também denominadas bacteriolisinas, pois contém em sua estrutura molecular regiões específicas com diferentes funções para translocação, receptores de ligação e atividade letal, como as helveticinas J e V acidofilina e lactacinas A e B (JEEVARATNAM *et al*, 2005).

- bacteriocinas da classe IV: conhecida também como bacteriocinas complexas, caracteriza-se por incorporar carboidratos e lipídeos na sua molécula protéica para ter atividade, porém, essa classe é pouco conhecida em relação à estrutura e à função, sendo a leuconocina S e a lactocina 27 as mais representativas dessa classe.

A maioria das bacteriocinas produzidas por bactérias associadas com alimentos pertence às classes I e II (MELO, 2003).

As bacteriocinas cujo modo de ação foram mais estudados, até então, são a nisina (classe I) e a pediocina (classe II) que inclusive compartilham algumas características em comum. Geralmente, atuam destruindo a integridade da membrana citoplasmática pela formação de poros, o que provoca a saída de pequenos compostos ou a alteração de força protomotriz

necessária para a produção de energia e para a síntese de proteínas ou ácidos nucleicos. A nisina é uma bacteriocina peptídica hidrofóbica sintetizada pelo *Lactococcus lactis* que atua contra bactérias Gram-positivas. Os organismos Gram-negativos, por possuírem membranas externas que representam uma barreira à permeabilidade, geralmente são resistentes a moléculas hidrofóbicas como a nisina (MONTVILLE; CHEIN, 1998; ELLIASON; TATINI, 1999; SABLON *et al.*, 2000).

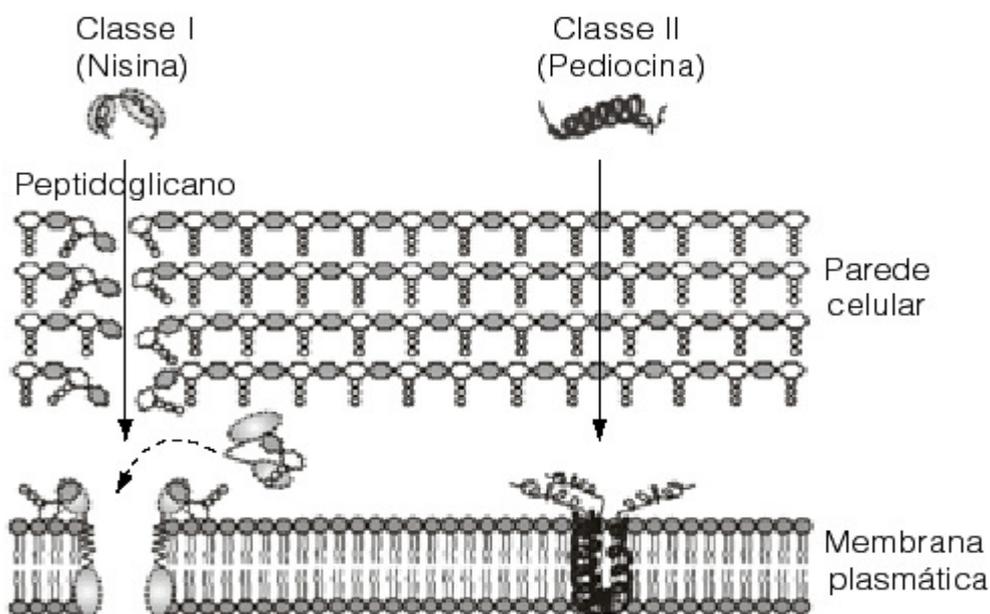


Figura 2 – Mecanismo de ação de bacteriocinas das classes I (nisina) e IIa (pediocina).
Fonte: NASCIMENTO, *et al* (2008).

Alguns membros da classe I das bacteriocinas (ou lantibióticos) parecem ter um modo duplo de ação, podendo ligar-se ao lipídeo II, o principal transportador das subunidades do peptidoglicano do citoplasma para parede celular, impedindo assim a síntese da parede celular, ou, ainda, usando o lipídeo II como uma molécula “âncora” para facilitar a sua inserção na membrana celular, o que levaria a formação de poros e, conseqüentemente, à morte da célula. Já as bacteriolisinas atuam diretamente na parede de Gram-positivas provocando a lise e a morte da célula-alvo (COTTER *et al*, 2005).

Quando se analisa o uso das bacteriocinas em alimentos, observa-se que podem ser introduzidas nos alimentos por pelo menos três diferentes maneiras: em alimentos fermentados podem ser produzidas *in situ* pela adição de culturas lácticas bacteriocinogênicas no lugar das tradicionais culturas

iniciadoras; pela adição destas culturas como adjuntas; ou pela adição direta de bacteriocinas purificadas (NASCIMENTO *et al*, 2008). Na tabela 1 tem-se estudos que comprovam a aplicação das bacteriocinas.

Bacteriocina	Cultura		Micro-organismo alvo	Redução (log UFC/g)
	Produtora	Alimento		
Nisina	<i>Lc. lactis lactis</i>	Carne suína	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	3,5
Nisina	<i>Lc. lactis lactis</i>	Leite fermentado	<i>Listeria monocytogenes</i>	6,0
Pediocina Ach	<i>Lb. Plantarum</i>	Queijo	<i>Listeria monocytogenes</i>	1,0 a 2,0
Enterocina	<i>E. faecium</i>	Leite	<i>Listeria monocytogenes</i>	2,0
Nisina Z	<i>Lc. lactis lactis</i>	Queijo <i>Afuega'l Pitu</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	2,0
Enterocina	<i>E. faecalis</i>	Salsicha Stap	<i>Staphylococcus aureus</i>	5,3

Tabela 1 - Aplicação de bacteriocinas na bioconservação de alimentos.

Fonte: NASCIMENTO *et al*, 2008 - Adaptado

4. METODOLOGIA

4.1 Material biológico

Neste estudo foram utilizados isolados de *Enterococcus* sp provenientes de queijo produzidos artesanalmente, comercializados na cidade de Londrina-PR. Os isolados foram identificados fenotipicamente ao nível de gênero e conservados em glicerol em freezer -80 °C. Estes isolados pertencem a bacterioteca particular da profa. Dra. Luciana Furlaneto Maia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus* Londrina.

A cepa comercial de *Lactobacillus acidophilus* foi gentilmente doada pelo Dr. Lucio A. F. Antunes, gerente da Divisão de Laticínios da Chr Hansen Ind e Com Ltda.

4.2 Reativação dos isolados

Para este estudo, foram reativados 98 isolados de *Enterococcus* sp. Para tanto, retirou-se uma alíquota de 20 µL de cada isolado e inoculou-se em caldo Brain Heart Infusion (BHI) e manteve-se por 24 horas a 37 °C. Após a turvação do meio, realizou-se um inóculo em ágar BHI, e este foi utilizado para a realização dos testes.

O isolado de *L. acidophilus* encontrava-se liofilizado. Para a reativação celular, depositou-se um grama da cultura em 10 mL de caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) e incubou-se por 24 horas a 37 °C.

4.3 Preparo de inóculo

Para preparar o inóculo para as análises, cada isolado foi cultivado em caldo MRS, à 37 °C por 16 horas. Transcorrido esse tempo, as células foram obtidas por centrifugação durante 5 minutos a uma rotação de 10.000 rpm e lavadas por três vezes em solução salina tamponada de fosfato pH 7,0. Em

seguida, as células foram ressuspensas em água destilada estéril até obter uma turvação de 0,5 na escala de McFarland, que corresponde à 10^8 células por mL.

4.4 Extração de DNA e identificação da espécie

A extração de DNA genômico ocorreu pelo método de fervura (MARQUES; SUZART, 2004). Para tanto, os isolados foram cultivados em meio Luria-Bertani (LB), e incubados a 37 °C sob agitação constante (180 rpm) por 18 horas. Após este período, centrifugou-se por 10 min a 10.000 rpm, e o *pellet* foi ressuspensado em 500 µL água ultrapura estéril. Esta suspensão foi submetida ao aquecimento, até temperatura de fervura por 30 minutos. Em seguida fez-se novamente a centrifugação, nas mesmas condições mencionadas acima, e por fim retirou-se 150 µL do sobrenadante contendo DNA e armazenou-se em freezer a -20 °C.

Os isolados de *Enterococcus* sp foram identificados ao nível de espécie *E. faecium*, pela reação de PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores *ddl_{E.faecium}F* (5' TAGAGACATTGAATATGCC 3') e *ddl_{E.faecium}R* (5' TCGAATGTGCTACAATC 3'), gerando um amplicon de 550 pb, conforme descritos por DUTKA-MALEN *et al* (1995).

As reações foram realizadas em termociclador Techne-Tc3000, em um volume final de 20 µL, contendo 10 µL DNA, 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 20 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (*forward* e o *reverse*) e 2,5 U Taq DNA polimerase.

O programa do termociclador teve desnaturação inicial de 94 °C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 °C à 1 minuto, anelamento a 56 °C por 1 minuto, extensão a 72 °C por 1 minuto, e extensão final a 72 °C por 10 minutos. O controle negativo continha todos os reagentes, porém sem adição da amostra de DNA. Os produtos resultantes da amplificação foram separados em gel de agarose a 1,0 %, corado com brometo de etídio, e visualizado sob luz ultravioleta. O amplicon foi fotografado com sistema de foto documentação computadorizado de análise de gel.

As espécies confirmadas de *E. faecium* foram utilizadas nos testes de resistência à lisozima, determinação da tolerância ao meio ácido, determinação de tolerância ao trato intestinal e teste de susceptibilidade a antimicrobiano. Para cada experimento descrito para *E. faecium*, o mesmo foi realizado utilizando a cepa probiótica de *L. acidophilus* como controle.

4.5 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão em disco

Os isolados foram testados quanto à susceptibilidade para três antimicrobianos (eritromicina 15 µg, tetraciclina 30 µg e vancomicina 30 µg) pelo método Kirby-Bauer (disco difusão em ágar).

O teste de difusão em disco seguiu a metodologia preconizada pela Clinical Laboratory Standard (CLSI, 2007). Incubou-se uma alíquota de 20 µL de cada isolado, em meio Mueller Hinton ágar (MHA) à 37°C / 16 horas. Após esse período suspendeu-se as colônias em tubos de solução salina (NaCl 0,85 %) até atingirem turbidez de 0,5 da escala de McFarland. Essa suspensão foi semeada na superfície de MHA, em três direções. Depositou-se então os discos de antibiótico sobre o meio inoculado. As placas foram incubadas a 37°C / 16-24 horas e observou-se os diâmetros de inibição. Os diâmetros de inibição foram mensurados e interpretados em tabela de acordo com os critérios de interpretação preconizados pelo CLSI.

4.6 Resistência à Lisozima

O teste de resistência à lisozima seguiu metodologia descrita por VIZOSO-PINTO *et al* (2006). Preparou-se o inóculo conforme item 4.3. Para simular a saliva *in vivo*, incubou-se 200 µL da solução com micro-organismo em 200 µL de solução eletrolítica estéril (0,22 g / L CaCl₂, 6,2 g / L NaCl, 2,2 g / L KCl, 1,2 g / L NaHCO₃) na presença de 100 mg / L de lisozima. Obtendo uma concentração final de 50 mg / L de lisozima.

Os tubos foram incubados à 37 °C, então fez-se a contagem em ágar MRS após 0, 30 e 120 minutos de incubação. As contagens de colônias foram realizadas após 48 horas de incubação, sendo os resultados expressos em UFC / mL. A sobrevivência foi calculada pela porcentagem de UFC / mL após cada tempo em comparação com a contagem no tempo zero.

4.7 Determinação da tolerância ao meio ácido

Para simular as condições do estômago, determinou-se a viabilidade dos micro-organismos em pH 3,0 de acordo com a metodologia descrita por RAZI *et al.* (2007).

Para tanto, seguiu-se o protocolo de obtenção de células como descrito no item 4.3. Uma alíquota de 300 µL de cada isolado foi suspenso em 2,7 mL de caldo MRS pH 3,0, ajustado com HCl 0,1 N.

Os tubos foram incubados à 37 °C, e procedeu-se a contagem de colônias em ágar MRS após 0, 1, 2, 3 e 4 horas de incubação. Após 48 horas de incubação, foram realizadas as contagens das colônias, sendo os resultados expressos em UFC / mL. A sobrevivência foi calculada pela porcentagem de UFC / mL após este tempo em comparação com a contagem no tempo zero.

O mesmo experimento foi realizado utilizando a cepa de *L. acidophilus*.

4.8 Determinação da tolerância ao trânsito intestinal

Para simular as condições intestinais, foi verificada a viabilidade dos isolados em presença de solução de pancreatina pH 8,0, conforme metodologia descrita por CHARTERIS *et al* (1998). Para tanto, utilizou-se solução salina a 0,5 % contendo 1 mg / mL de pancreatina. O pH foi ajustado para 8,0 com NaOH 0,1 N. Em seguida, a solução foi esterilizada por meio de filtração em membrana de 0,2 µm. Transferiu-se 10 mL da solução para tubos estéreis contendo 3 mL de solução salina estéril adicionados de 2 mL de suspensão celular de *Enterococcus* sp, conforme padronização descrito no

item 4.3. Fez-se então a homogeneização e os tubos foram incubados a 37 °C. Nos tempos 0 e 240 minutos, foi feita diluição seriada e semeado em agar MRS. Após 48 horas de incubação, fez-se a contagens das colônias e calculou-se a taxa de sobrevivência.

4.9 Teste de auto-agregação

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

Os isolados de *E. faecium* foram cultivados e obtidos por centrifugação conforme descrito no item 4.3. As células foram ressuspensas em solução salina estéril pH 7,2 até obter uma turvação de 0,5 na escala de McFarland, seguida de homogeneização em vortex por 10 segundos e incubação a 37°C. Nos tempos 0, 1, 2, 3, 4 e 5 horas de incubação, alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para tubos contendo 3,9 mL de tampão PBS pH 7,2 e feita a leitura em absorvâncias a 540 nm.

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

4.10 Análise estatística dos resultados

Os valores médios obtidos em cada experimento foram submetidos ao teste T de Student, por meio do *software* Estatística. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5 % de significância. Análise de componentes principais (PCA) para as análises de simulação *in vitro* frente ao *stress* gastro-intestinal, utilizou-se o *software* MATLAB 6.5.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação genotípica dos isolados de *Enterococcus* provenientes das amostras de alimentos

Neste estudo foram avaliados 98 isolados de enterococos pertencentes à bacterioteca da UTFPR-Londrina e provenientes de amostra de queijo tipo minas frescal. Cem por cento dos isolados que já tinham sido previamente identificados como pertencente ao gênero *Enterococcus* sp foram identificados como as espécies *E. faecium*, *E. faecalis*, para os que não pertenciam as duas espécies citadas manteve-se como *Enterococcus* sp (figura 3). A distribuição dos isolados foram: 53 *E. faecium* (54,0 %), 39 *E. faecalis* (39,8 %) e 6 isolados *Enterococcus* sp (6,2 %).

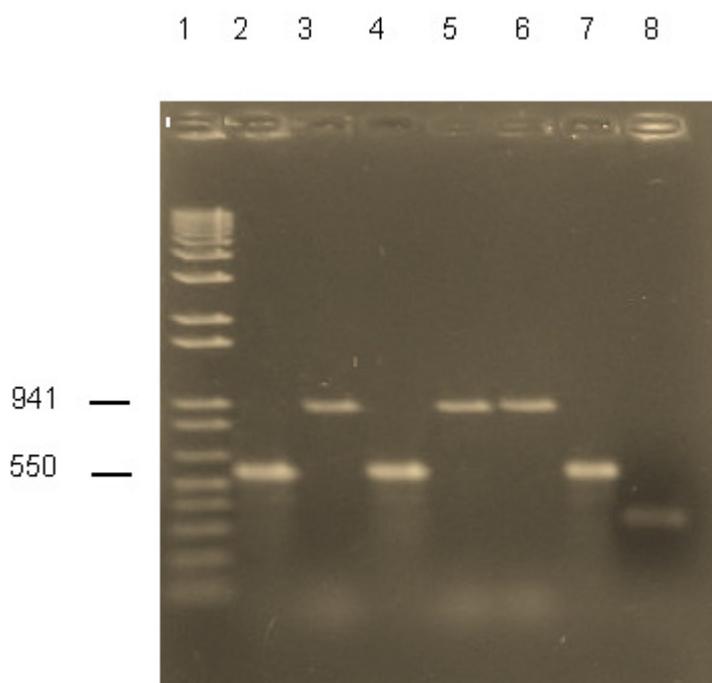


Figura 3 – Figura de gel de agarose com produtos da PCR para a identificação de *E. faecium* e *E. faecalis*. 1 = marcador; 550 pb = *E. faecium*; 941 pb = *E. faecalis*

Em estudos realizados por nosso grupo observaram que *E. faecium* não apresentou determinantes de virulência, sendo portanto esta espécie a escolhida para os testes de seleção como potencial probiótico, e também por

ser predominante em nossos isolamentos. Dados semelhantes foram obtidos por GOMES *et al* (2008) e (FRANZ, 1999).

SERHAN *et al* (2009), ao estudarem a diversidade bacteriana presente em um queijo artesanal libanês produzido com leite cru de cabra, afirmaram que, entre as bactérias ácido-láticas, os gêneros mais encontrados foram *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*, e que queijos produzidos com leite cru e seguindo processos tradicionais de fabricação apresentam diversidade microbiológica, que precisa ser conhecida para que haja a manutenção de produtos artesanais típicos com tradição cultural. FUKA *et al* (2010) também encontraram os enterococos participando ativamente da microbiota do queijo Istriano e reconheceram a importância desse gênero como responsável pelo sabor e aroma típicos desse produto.

Em nosso estudo, as amostras de onde foram isolados os enterococos são de queijo do tipo frescal, e nesse tipo de processamento não há adição intencional de enterococos em seu processamento. *Enterococcus* podem contaminar o leite diretamente através de fezes humanas e de animais, assim como a contaminação pode ser proveniente da água, equipamentos, utensílios e tanque de estocagem. Como são micro-organismos resistentes às condições ambientais, podem crescer durante o período de refrigeração do leite e permanecer após a pasteurização (FRANZ *et al*, 1999; GIRAFFA, 2003; OGIER *et al*, 2008). O que pode explicar a presença de enterococos em nossas amostras.

5.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos pelo método de difusão em disco

Em relação à susceptibilidade aos antimicrobianos, 13 (24,5 %) dos isolados apresentaram resistência à eritromicina, 33 (62,2 %) intermediário e 7 (13,3 %) sensível a este antibiótico (tabela 2). Quando testados frente à tetraciclina, somente o isolado 54 apresentou resistência a este antibiótico, todos os demais apresentaram-se sensíveis. Já nos testes com vancomicina, observou-se o seguinte resultado: 1 isolado resistente, 9 intermediários e 43 sensíveis, o que representa, 1,9 %, 17,0 % e 81,1 %, respectivamente.

Os resultados apresentam 7 isolados com sensibilidade frente a todos os antibióticos testados, sendo eles: 34, 35, 52, 34A, 35A, 41A e 47A. Apenas o isolado 54 apresentou resistência aos três antibióticos.

Isolado	ERY	TET	VAN	Isolado	ERY	TET	VAN	Isolado	ERY	TET	VAN
19	R	S	S	62	R	S	S	19 A	I	S	S
20	I	S	S	65	I	S	S	20 A	I	S	S
23	R	S	S	67	I	S	S	26 A	R	S	I
24	R	S	S	68	I	S	S	30 A	I	S	I
25	R	S	S	69	I	S	S	34 A	S	S	S
26	R	S	S	70	I	S	S	35 A	S	S	S
32	I	S	I	71	I	S	S	39 A	I	S	S
34	S	S	S	72	I	S	S	40 A	I	S	S
35	S	S	S	08A	I	S	I	41 A	S	S	S
37	R	S	S	09A	I	S	S	43 A	I	S	S
38	R	S	S	10A	I	S	I	44 A	I	S	S
44	R	S	S	11A	I	S	S	45 A	I	S	S
50	R	S	S	12A	I	S	I	46 A	R	S	S
51	I	S	S	13 A	I	S	I	47 A	S	S	S
52	S	S	S	15 A	I	S	I	48 A	I	S	S
54	R	R	R	16 A	I	S	S	49 A	I	S	S
55	I	S	S	17 A	I	S	S	50 A	I	S	S
58	I	S	S	18 A	I	S	I				

Tabela 2 – Resultado do teste de sensibilidade a antimicrobianos dos isolados de *E. faecium*.
Nota: ERY= eritromicina / TET= tetraciclina / VAN= vancomicina; R= resistência / I= intermediário / S= sensibilidade

Um probiótico ideal não deve apresentar fatores de virulência e nem adquirir resistência à antibióticos (LUND *et al*, 2002). A incidência de resistência antibiótica de enterococos é bastante difundida nos alimentos. Eles foram isolados a partir de produtos de carne, produtos lácteos e pronto para o consumo, e até mesmo dentro de cepas de enterococos usados como probióticos (FRANZ *et al*, 2001; GIRAFFA, 2002). O papel dos enterococos resistentes à vancomicina tem sido enfatizada por GIRAFFA (2002), como possíveis reservatórios naturais do alimento na disseminação de antibiótico resistência no meio ambiente. Por razões de segurança, sensibilidade de cepas

comercialmente exploradas contra antibióticos é desejável, a fim de ser utilizado como co-cultura ou culturas iniciadoras (BHARDWAJ *et al*, 2010).

Neste contexto, os resultados apresentados indicam que somente o isolado 54, que apresentou resistência a todos os antibióticos testados não seria interessante para uso como potencial probiótico. O restante dos isolados poderiam ser considerados, pela avaliação dos resultados de resistência à antibióticos, como potenciais probióticos.

BHADWAJ *et al* (2010), avaliando a susceptibilidade aos antibióticos de *E. Faecium* KH24, a mesma mostrou-se sensível aos antibióticos eritromicina, tetraciclina e vancomicina. Assim como TRIVELDI *et al* (2011), não encontraram resistência à vancomicina e eritromicina em enterococos de produtos lácteos. FRACALANZZA *et al* (2007), encontraram 100 % de sensibilidade a vancomicina em *E. faecalis* e *E. faecium* isolados de carne de frango e leite.

No entanto, NIETO-ARRIBAS *et al* (2011), avaliando a susceptibilidade de enterococos isolados de queijo, encontraram uma taxa de resistência para tetraciclina, eritromicina e vancomicina de aproximadamente, 20 %, 20 % e 6 % respectivamente. Contudo, ainda é uma incidência baixa de resistência para isolados de alimentos.

Analisando o nível de resistência com o uso dos antimicrobianos, ZOU *et al* (2011) cita que o alto nível de resistência à Eritromicina provavelmente está relacionado com a ampla utilização dessa classe de antimicrobiano em criação de animais, principalmente o uso de Tilosina como promotor de crescimento e no tratamento de doenças. A resistência à Eritromicina e Tetraciclina induzida pela terapia em animais é difícil de avaliar pois tem sido utilizados na terapia humana e animal ao longo de décadas e isso reflete na elevada prevalência de resistência à Eritromicina e Tetraciclina na criação animal (BUSANI *et al*, 2004; KASZANYITZKY *et al*, 2007 e ZOU *et al*, 2011).

5.3 Simulação *in vitro* ao stress gastro-intestinal

Dentro da simulação *in vitro* ao *stress* gastro-intestinal foram realizados testes de resistência à lisozima, *stress* em meio ácido e tolerância à pancreatina.

A taxa de sobrevivência foi calculada pela porcentagem de sobrevivência no tempo inicial em relação ao tempo de incubação, calculados com os resultados da contagem feita em UFC / mL.

Observando-se os resultados da resistência à lisozima, os isolados que são mais interessantes são aqueles que não apresentam diferença significativa ao nível de 5 % de significância em relação à cepa controle, *L. acidophilus*, ou aqueles isolados que apresentam diferença em relação ao nosso controle que no entanto apresentam uma taxa de sobrevivência maior do que o mesmo.

Analisando os resultados após 30 minutos de incubação em presença de lisozima, 33 isolados não apresentaram diferença significativa, em relação ao controle, *L. acidophilus* (tabela 6). Dos isolados que apresentaram diferença significativa em relação ao controle, 10 isolados tiveram uma taxa de sobrevivência maior que o mesmo, ou seja, com resultados de sobrevivência melhores que o *L. acidophilus*, que são os isolados 23, 25, 37, 38, 51, 13A, 20A, 43A, 45A e 48A.

Na tabela 3, pode-se perceber que a taxa de sobrevivência variou de bastante de isolado para isolado, no entanto, destaca-se o isolado 43A que apresenta uma taxa de sobrevivência de 173 %, muito superior a cepa controle que foi de 97 %.

Os resultados apresentados para a taxa de sobrevivência em presença de lisozima após 120 minutos, variou entre 20 a 159 % (tabela 3). Sendo que 15 isolados comparados com o controle não apresentaram diferença significativa. Contudo, 7 isolados apresentaram diferença significativa em relação ao controle e uma taxa de sobrevivência maior do que o *L. acidophilus*, sendo estes isolados: 13A, 20A, 39A, 43A, 46A, 48A e 50A.

Código do Isolado	Taxa de sobrevivencia (%)		Código do Isolado	Taxa de sobrevivencia (%)	
	30 min	120 min		30 min	120 min
19	86	40	9A	101	104
20	88	20	10A	93	57
23	149	81	11A	98	101
24	103	35	12A	101	98

25	128	65	13A	116	114
26	74	36	15A	101	88
32	103	68	16A	96	90
34	38	20	17A	102	89
35	73	35	18A	92	88
37	112	77	19A	99	98
38	119	79	20A	132	111
44	105	79	26A	82	78
50	95	72	30A	104	98
51	139	35	34A	107	101
52	88	46	35A	97	97
54	101	72	39A	110	118
55	83	71	40A	102	105
58	71	76	41A	97	83
62	99	56	43A	173	159
65	75	50	44A	103	83
67	84	48	45A	129	108
68	95	60	46A	100	110
69	106	73	47A	81	103
70	70	32	48A	121	130
71	87	49	49A	83	71
72	96	68	50A	97	118
8A	80	66	LA	97	93

Tabela 3 – Taxa de sobrevivência referente à resistência dos isolados em presença de lisozima ao longo do tempo

Nota: LA=*Lactobacillus acidophilus*

Comparando com a cepa comercial de *L. acidophilus*, onde obteve-se uma resistência de 93 % após 120 minutos de exposição *in vitro*, obtivemos valores bem satisfatórios.

A Figura 4 apresenta a contagem de cada isolado nos tempos 0, 30 e 120 minutos, expresso em \log_{10} UFC / mL, onde percebe-se isolados mais resistentes, destacam-se os isolados 9A, 39A, 40A, 46A, 48A e 50A, que continuaram aumentando sua população ao longo do tempo, mesmo na presença de lisozima.

A lisozima é uma enzima presente na saliva, e sua presença faz com que faz com que o estresse do micro-organismo começa na boca (CORZO e GILLIAND, 1999). Cepas selecionadas mostraram uma alta resistência à 100

mg / L de lisozima dentro da simulação das condições *in vivo* de saliva. A mesma concentração de lisozima não afetou a sobrevivência de *L. plantarum* na simulação da passagem pelo estômago (VIZOSO-PINTO *et al*, 2006). Nos estudos de ZAGO *et al*, 2011, obteve-se resultados acima de 95 % de sobrevivência frente à presença de lisozima em 4 cepas analisadas de *L. plantarum*, e acima de 68 % de sobrevivência em 15 das 27 cepas analisadas.

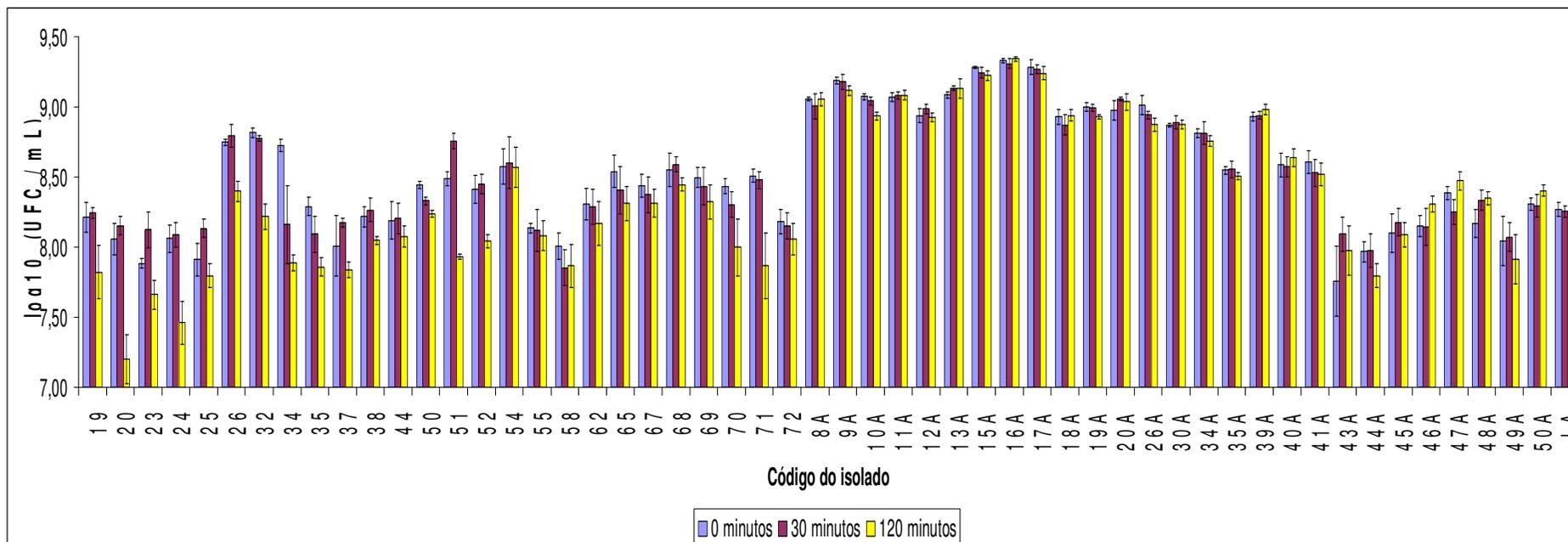


Figura 4 – Contagem de cada isolado e controle LA (*L. acidophilus*) frente à lisozima ao longo do tempo

Nos testes realizados de tolerância ao *stress* frente ao meio ácido, com os observa-se nos resultados (tabela 4) que, dentre os 53 isolados de *E. faecium*, o isolado 49A foi o que apresentou maior taxa de sobrevivência com 86,1 % após 4 horas de incubação em meio com pH 3,0. De todos os isolados testados apenas um isolado, o 58, não sobreviveu após 4h de incubação em meio ácido.

Após 3 horas de incubação em pH 3,0, as taxas de sobrevivência dos isolados variaram de 0,9 à 128,7 %. Obtivemos também 3 isolados sem diferença significativa em relação à cepa controle.

Pode-se observar ainda que os isolados 44A e 45A (tabela 6) apresentaram diferença significativa em relação ao controle, com uma taxa de sobrevivência maior que o mesmo. Sendo a taxa de sobrevivência do *L. acidophilus* de 91,4 % e dos isolados 44A e 45A, 107,4 % e 128,7 %, respectivamente.

Código do Isolado	Taxa de sobrevivência (%)			
	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas
19	7,3	5,9	8,5	8,2
20	39,0	15,4	17,9	15,1
23	18,5	8,4	8,8	4,0
24	84,2	33,3	18,4	57,0
25	47,3	19,2	16,4	22,6
26	6,8	15,3	10,3	9,8
32	18,2	11,6	25,6	23,2
34	48,5	12,4	9,6	9,3
35	47,3	10,9	11,2	10,2
37	50,9	32,7	32,2	16,9
38	43,5	47,0	6,1	1,3
44	35,6	35,6	18,9	15,2
50	89,6	67,7	64,2	23,6
51	66,7	47,6	55,1	27,4
52	64,8	55,3	58,1	15,5
54	82,1	89,3	60,3	54,8
55	108	44,2	35,2	18,3
58	142,9	107,1	92,9	0
62	16,5	33,1	29,9	18,0

65	27,8	25,7	14,1	13,5
67	96,7	63,9	75,4	45,9
68	93,0	70,0	49,5	5,5
69	101,5	91,5	55,9	48,2
70	111,0	95,0	72,0	7,5
71	95,6	90,8	70,3	25,3
72	83,5	71,9	64,0	46,4
8A	81,1	49,8	57,5	40,3
9A	85,4	93,6	57,6	10,5
10A	85,8	74,4	25,8	2,5
11A	93,7	84,1	42,6	3,3
12A	86,4	53,1	33,5	1,2
13A	87,9	46,0	35,9	0,9
15A	86,3	47,4	8,4	3,2
16A	81,5	65,4	34,1	0,7
17A	11,7	9,7	0,9	0,9
18A	86,5	86,0	79,5	19,1
19A	117,5	98,8	80,4	9,7
20A	7,3	5,9	1,5	4,4
26A	81,0	42,2	19,7	0,9
30A	84,9	65,0	34,8	2,0
34A	74,1	40,0	24,1	2,8
35A	96,4	82,4	63,0	17,0
39A	98,1	63,4	46,0	9,4
40A	57,1	41	41,8	9,6
41A	29,2	42,8	31,4	2,4
43A	57,8	54,8	43,7	9,6
44A	115,8	115,8	107,4	33,7
45A	138,3	164,9	128,7	37,2
46A	44,0	69,2	55,6	4,1
47A	239,0	99,3	65,2	17,7
48A	112,6	67,0	67,6	52,2
49A	123,4	79,6	74,5	86,1
50A	33,9	43,8	47,9	43,8
LA	94,4	77,8	91,7	97,2

Tabela 4 – Taxa de sobrevivência referente à resistência dos isolados em presença de meio ácido, pH 3,0, ao longo do tempo

Nota: LA=*Lactobacillus acidophilus*

A Figura 5 mostra a contagem de células viáveis de cada isolado em \log_{10} UFC / mL para cada tempo de incubação, 0, 1, 2, 3 e 4 horas. Percebe-se

que a grande maioria das cepas tiveram sua viabilidade diminuída com o passar do tempo, sendo que muitas apresentaram essa diminuição após 3 horas de incubação.

Em testes *in vitro* frente ao *stress* ácido com pH 3,0, STROMPFOVÁ e LAUKOVÁ (2007) obtiveram uma redução de 1,4-1,7 log após 3 horas e uma quantidade de células viáveis acima de 10^7 UFC / mL, nos 5 isolados de *E. faecium* provenientes de frango.

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

Esses micro-organismos, para sobreviverem no intestino, devem ser primeiramente tolerantes ao baixo pH do estômago, que geralmente varia de 2,5 a 3,5, mas pode ser tão baixo quanto 1,5 durante o jejum ou tão alto quanto 4,5, após uma refeição. A natureza do alimento afeta o tempo de trânsito através do estômago, mas normalmente o alimento permanece por 2 a 4 h (HUANG e ADAMS, 2004).

Alguns testes *in vitro* podem ser usados para determinar a tolerância ao ácido estomacal, porém, é importante ressaltar que os níveis de tolerância a diversos pH variam consideravelmente entre as bactérias probióticas (KLAENHAMMER e KULLEN, 1999). Para que uma bactéria possa ser considerada probiótica, ela deve sobreviver entre os pH 2,0 e 3,0, durante 3 horas (GUPTA *et al*, 1996; GOMEZ-GIL *et al*, 1998; PARK *et al*, 2006).

O mecanismo de resistência à ácido tem sido notada em bactérias ácido lácticas. Os mecanismos incluem: homeostase do pH intracelular pelo próton pump F1F0-ATPase ou o sistema glutato descarboxilase; alcalinização do ambiente externo com urease ou argina deiminase; reparação do DNA e demanda de proteína em geral; e densidade celular e mudança na membrana celular (DE ANGELIS e GOBBETTI, 2004; CAGGIA *et al*, 2009).

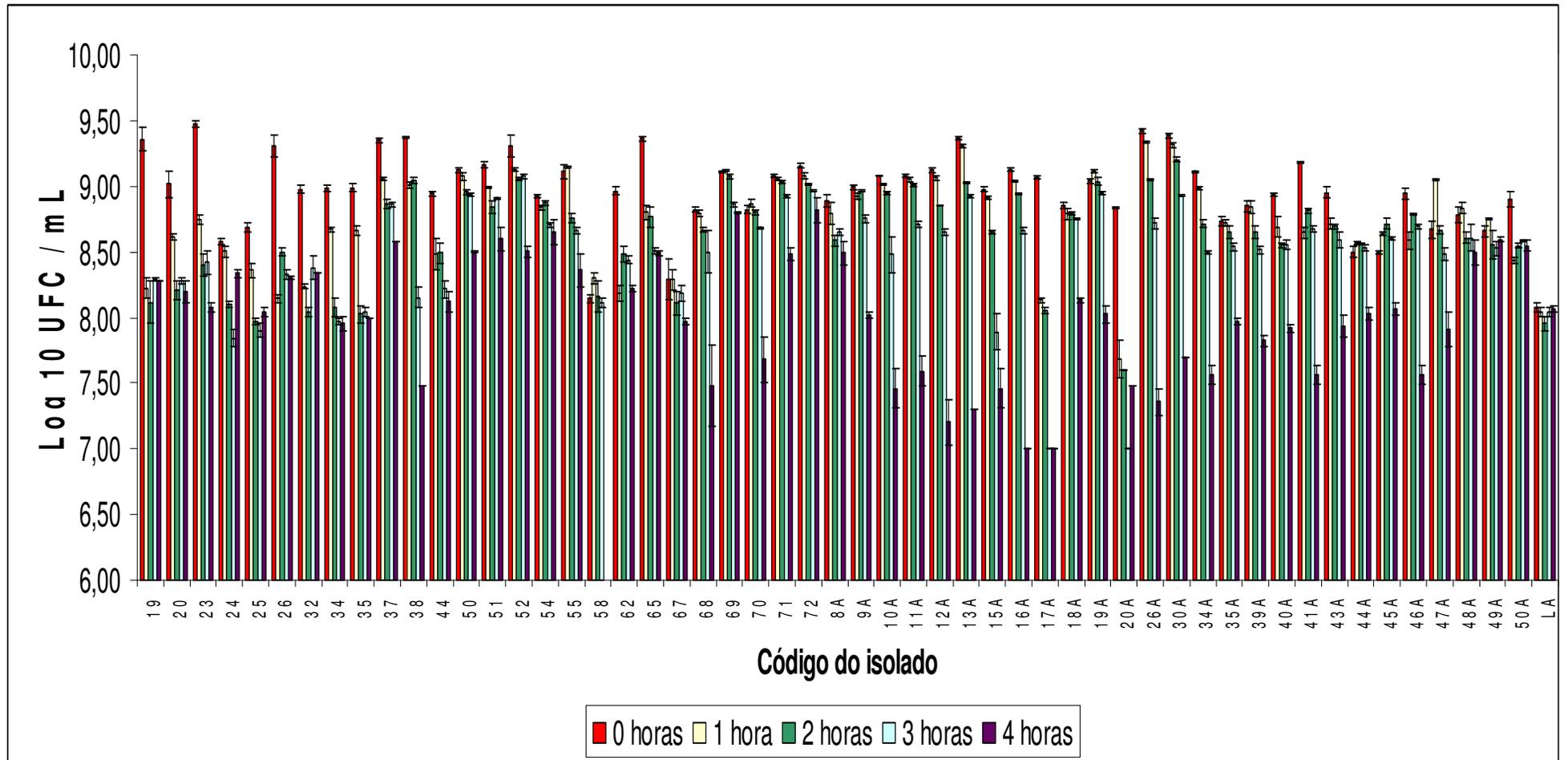


Figura 5 – Contagem de cada isolado frente ao meio ácido ao longo do tempo

Em relação ao micro-organismo *E. faecium*, encontra-se na literatura científica alguns estudos que buscam explicar a tolerância desta bactéria frente a diversos valores de pH. MORANDI *et al* (2005) testaram a resistência de 70 cepas do gênero *Enterococcus* sp. isoladas de queijo frente a diversas temperaturas e pH. Foi verificado entre elas, que a espécie *E. faecium* sobreviveu a todas as variações de temperaturas e pH, não reduzindo na escala logarítmica.

Os resultados obtidos no experimento da resistência dos isolados frente à pancreatina em pH 8,0, variaram de 4,2 à 108,2 % de sobrevivência após 4 horas de incubação (tabela 5). Em comparação a cepa comercial de *L. acidophilus*, cuja taxa de sobrevivência foi de 78,6%, apresentaram-se com taxas de sobrevivência sem diferença significativa, 21 isolados de *E. faecium*. Ainda pode-se destacar 7 isolados, 19, 26, 65, 67, 10A, 11A e 15A, que apesar de apresentarem diferença significativa, esta foi com uma taxa de sobrevivência maior que o controle.

Segundo CHARTERIS *et al* (1998) as metodologias *in vitro* representam uma importante forma de caracterização dessa capacidade, pois, além de garantir resultados confiáveis, são executadas com maior facilidade que os estudos *in vivo*.

A presença de sais biliares e pancreatina no intestino é uma barreira biológica à sobrevivência e colonização do probiótico. O tempo do alimento no trânsito intestinal é de 1 à 4 horas em pH por volta de 8,0 (HUANG e ADAMS, 2008).

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

Isolado	Taxa de sobrevivência (%)	Isolado	Taxa de sobrevivência (%)
	4 horas		4 horas
19	99,2	9A	57,1
20	39,2	10A	96,7
23	83,7	11A	108,2
24	54,8	12A	83,0
25	87,5	13A	85,7
26	95,6	15A	95,4
32	24,7	16A	83,3
34	66,7	17A	65,3
35	74,0	18A	45,7
37	45,7	19A	90,0
38	85,0	20A	67,6
44	40,7	26A	88,9
50	87,7	30A	65,7
51	79,2	34A	56,6
52	50,0	35A	10,3
54	36,0	39A	6,3
55	81,1	40A	9,1
58	87,4	41A	36,1
62	86,1	43A	9,7
65	95,1	44A	87,8
67	96,9	45A	72,0
68	52,9	46A	19,6
69	70,9	47A	4,2
70	66,1	48A	6,0
71	78,0	49A	8,0
72	83,4	50A	41,0
8A	80,6	LA	78,6

Tabela 5 – Taxa de sobrevivência referente a resistência dos isolados em presença de pancreatina em pH 8,0, ao longo do tempo

Nota: LA=*Lactobacillus acidophilus*

Na Figura 6 pode-se analisar a quantidade de cada isolado, expressas em \log_{10} UFC / mL, nos tempos inicial, 0 hora, e final, 4 horas, após a incubação à 37 °C, onde observa-se que somente o isolado 11A apresentou uma contagem maior de células viáveis após 4 horas de incubação, mostrando que não houve perda de viabilidade *in vitro* frente à essa barreira encontrada no trato intestinal.

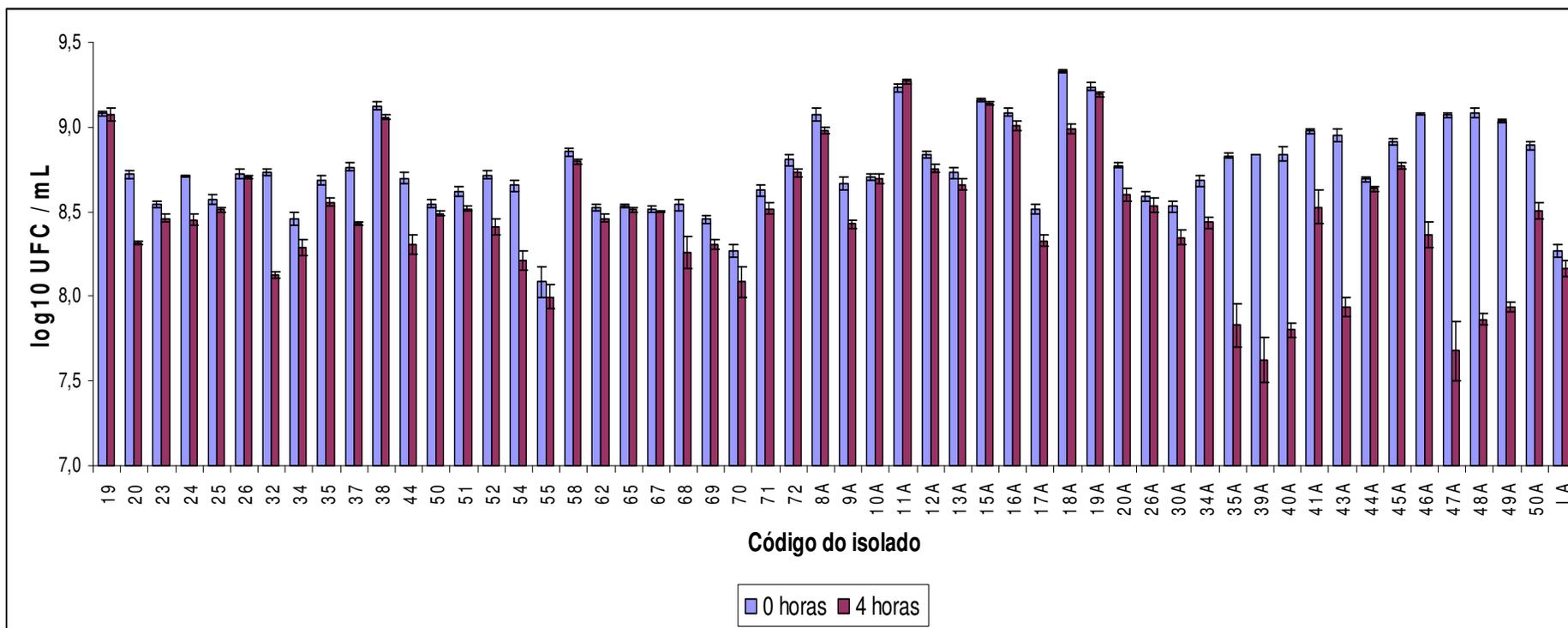


Figura 6 – Contagem de cada isolado frente à pancreatina em pH 8,0 ao longo do tempo

A tabela 6, mostra uma visão geral de todos os isolados frente à cada análise de *stress*, simulando o trato gastro-intestinal. Os isolados de interesse são aqueles que apresentam semelhança com o *L. acidophilus*, ou que apresentem uma capacidade de sobreviver maior que o mesmo, mesmo que apresente diferença significativa ao nível de 5 % de significância.

No aspecto global, avaliando o comportamento dos isolados em todas as análises, observa-se isolados com perfil diferenciado como é o caso dos isolados 45A e 19 A, que responderam de forma positiva à todas as análises de *stress* e ainda em algumas análises se destacaram apresentando um comportamento melhor do que a cepa controle.

Código do Isolado	Sobrevivência à lisozima (%)		Sobrevivência em presença de ácido (%)				Sobrevivência à pancreatina (%)
	30 min	120 min	60 min	120 min	180 min	240 min	240 min
19	+	-	-	-	-	-	++
20	+	-	-	-	-	-	-
23	++	-	-	-	-	-	+
24	+	-	+	-	-	-	-
25	++	-	-	-	-	-	+
26	-	-	-	-	-	-	++
32	+	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	-	-	+
37	++	-	-	-	-	-	-
38	++	-	-	-	-	-	+
44	+	-	-	-	-	-	-
50	+	-	+	+	-	-	+
51	++	-	-	-	-	-	+
52	+	-	-	-	-	-	-
54	+	-	+	-	-	-	-
55	+	-	++	-	-	-	+
58	-	-	++	-	+	-	+
62	+	-	-	-	-	-	+
65	-	-	-	-	-	-	++
67	+	-	+	-	-	-	++
68	+	-	+	+	-	-	-
69	+	-	+	++	-	-	+

70	-	-	++	++	-	-	-
71	+	-	+	++	-	-	+
72	+	-	+	+	-	-	+
8A	-	-	+	-	-	-	+
9A	+	+	+	++	-	-	-
10A	+	-	+	+	-	-	++
11A	+	+	+	+	-	-	++
12A	+	+	+	-	-	-	+
13A	++	++	+	-	-	-	+
15A	+	+	+	-	-	-	++
16A	+	+	+	+	-	-	+
17A	+	+	-	-	-	-	-
18A	+	+	+	+	+	-	-
19A	+	+	++	++	+	-	+
20A	++	++	-	-	-	-	+
26A	-	-	+	-	-	-	+
30A	+	+	+	+	-	-	-
34A	+	+	-	-	-	-	-
35A	+	+	+	+	-	-	-
39A	+	++	+	-	-	-	-
40A	+	+	-	-	-	-	-
41A	+	+	-	-	-	-	-
43A	++	++	-	-	-	-	-
44A	+	-	++	++	++	-	+
45A	++	+	++	++	++	-	+
46A	+	++	-	+	-	-	-
47A	-	+	++	++	-	-	-
48A	++	++	++	+	-	-	-
49A	-	-	++	+	-	+	-
50A	+	++	-	-	-	-	-

Tabela 6 – Avaliação dos isolados de *E. faecium* em relação ao controle *L. acidophilus*

Nota: ++ = taxa de sobrevivência com $p < 0,05$ em relação ao controle, e maior que o controle / + = taxa de sobrevivência com $p > 0,05$ em relação ao controle / - taxa de sobrevivência com $p < 0,05$ em relação ao controle, e menor que o controle

Para analisar a correlação entre as variáveis fez-se uma análise de componentes principais (PCA) para os resultados da taxa de sobrevivência tendo como variáveis: resistência à lisozima em 30 minutos, 120 minutos; tolerância à meio ácido nos tempos, 1 h, 2 h, 3 h e 4 h e tolerância à

pancreatina após 4h. Para essa análise, os dados foram auto-escalados visando não perder a relevância de cada variável.

As amostras foram codificadas de 1 a 54 conforme tabela 3, ressaltando que a amostra de número 54 é o controle, no caso *L. acidophilus*. Na figura 7, de *scores*, que representa os isolados, entre a componente principal 1 e componente principal 2, que correspondem a 65,78% da variância das amostras, não se evidencia separação de grupamentos entre os isolados, mesmo eles sendo de amostras de queijo diferentes. Nem mesmo com relação ao *L. acidophilus* não apresentou um grupamento separado.

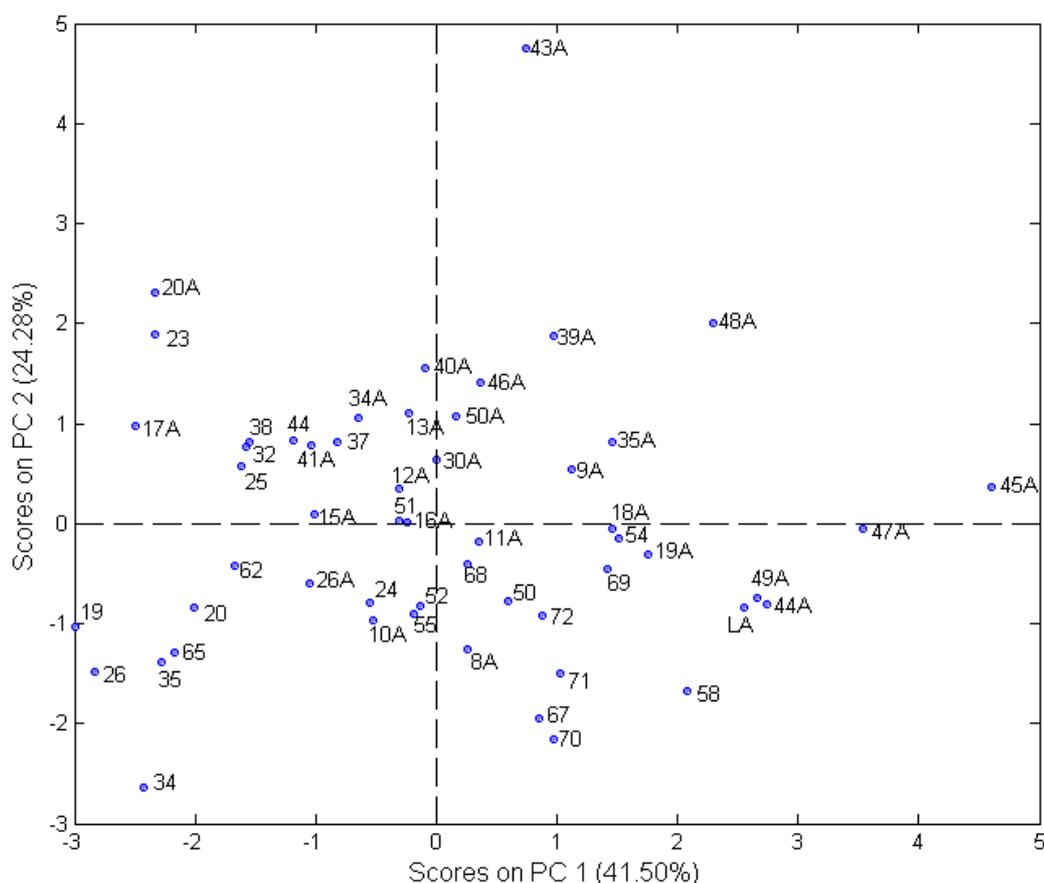


Figura 7 – Gráfico dos *scores* para componente principal 1 versus componente principal 2.

Segundo o gráfico de *scores*, os isolados mais próximos ao controle são os isolados 44A e 49A. O isolado 45A está isolado das outras amostras, o que era esperado já que seu resultado em grande parte das análises é diferente dos outros isolados, ressaltando assim sua característica diferenciada.

A análise de componentes principais é uma técnica de transformação de variáveis. Se cada medida pode ser considerada como um eixo de variabilidade, estando usualmente correlacionada com outras variáveis, esta

análise transforma os dados de tal modo a descrever a mesma variabilidade total existente (TINO, 2005).

Os valores de *scores* poderão ser dispostos num diagrama de dispersão, em que os eixos são as duas componentes mais importantes, e mostrar o relacionamento entre os casos condicionados pelas variáveis medidas (TINO, 2005).

O gráfico de *loadings* (figura 8) apresenta três grupos formados pelas variáveis analisadas, sendo o primeiro grupo referente às variáveis 1 e 2, que representam a resistência a lisozima após 30 mim e 120 min. Outro grupo formado, são referentes às variáveis 3, 4, 5 e 6 representam as análises de tolerância a meio ácido nos tempos 1h, 2h, 3h e 4h, respectivamente. E outro grupo tem a variável 7, que representa análise de tolerância à pancreatina.

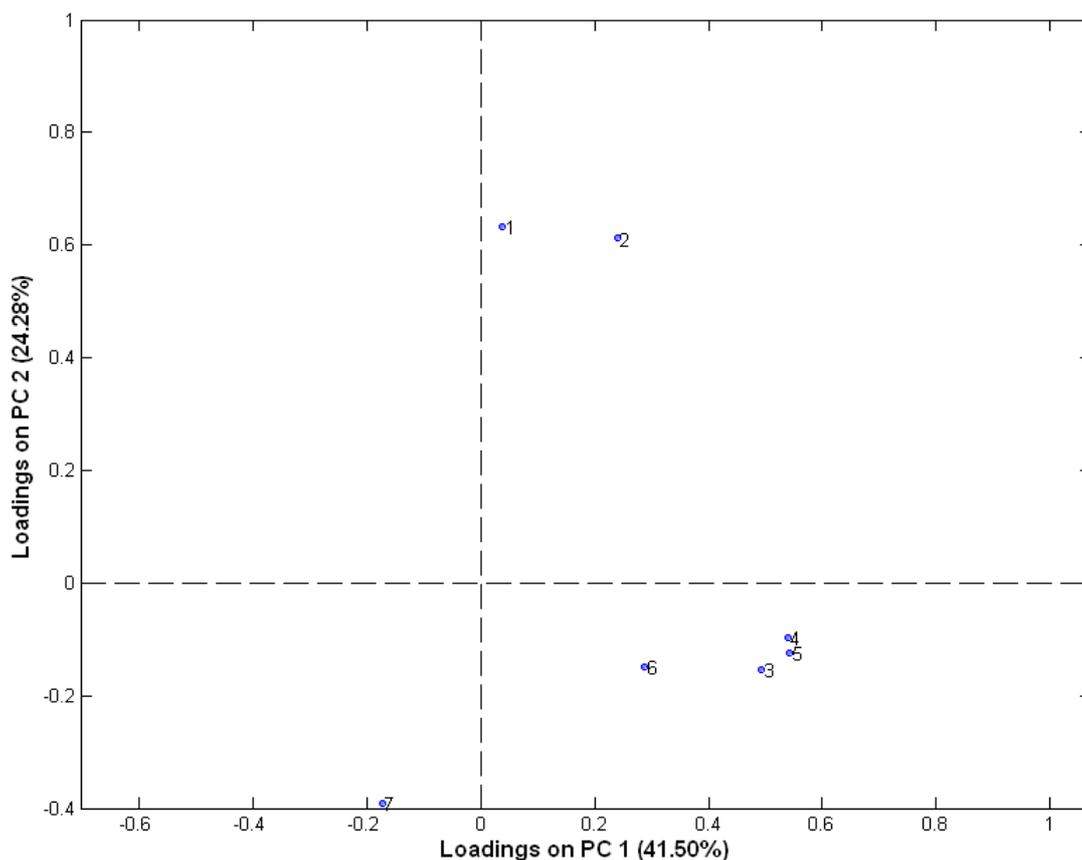


Figura 8 – Gráfico de *loadings* (variáveis) para a componente principal 1 versus componente principal 2

A divisão desses 3 grupos deixa claro que essas análises tem relação entre si, somente com relação aos tempos diferentes dentro das mesmas análises. E não tem relação um tipo de análise com a outra, ou seja, os

resultados esperados para cada micro-organismo em cada situação de *stress* é própria para aquela análise.

5.4 Auto-agregação

Os valores de auto-agregação ao longo do tempo estão representados na tabela 7. Dos isolados analisados 32 apresentaram capacidade de auto-agregação, representando 60 % dos *E faecium* analisados. No entanto, a cepa comercial utilizada como comparação da análise, não apresentou auto-agregação.

Código do Isolado	Auto-agregação (%)				
	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas	5 horas
19	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0
23	100	100	100	100	100
24	0	0	0	0	0
25	100	100	100	0	100
26	60	70	73	74	74
32	0	33	0	0	0
34	-50	0	0	-50	0
35	0	67	50	50	67
37	0	40	25	0	25
38	-33	33	20	0	33
44	-33	50	33	0	43
50	33	33	33	33	33
51	0	100	100	0	0
52	33	33	33	33	33
54	0	17	0	0	0
55	0	17	17	0	17
58	0	33	20	0	20
62	-50	25	0	0	25
65	-33	20	20	0	20
67	-100	33	33	0	50
68	-33	20	20	0	20
69	0	-100	0	-100	33
70	25	40	40	25	40
71	-25	0	0	-25	0
72	-33	0	0	-33	0

8A	0	200	200	200	200
9A	100	100	100	100	100
10A	100	100	100	100	100
11A	0	100	100	100	100
12A	75	80	80	75	80
13A	67	75	75	67	75
15A	0	100	100	100	100
16A	0	0	0	0	0
17A	90	92	92	91	92
18A	91	91	92	92	92
19A	90	92	92	92	92
20A	91	92	92	91	92
26A	90	92	92	91	92
30A	91	92	92	92	92
34A	91	92	92	92	92
35A	91	93	92	92	93
39A	0	0	0	0	0
40A	0	0	0	0	0
41A	0	0	0	0	0
43A	-200	-200	-200	-200	-200
44A	-100	-100	-100	-100	-100
45A	-200	-200	-200	-200	-50
46A	-100	0	0	0	0
47A	-300	-100	-100	-300	-100
48A	-200	-50	-50	-200	-50
49A	0	-50	-50	-200	-50
50A	-100	-100	-100	-100	-100
LA	-100	-100	-100	-100	-100

Tabela 7 – Porcentagem de auto-agregação dos isolados ao longo do tempo
Nota: LA=*Lactobacillus acidophilus*

No estudo de ESPECHE *et al* (2012), das 43 bactérias ácido lácticas isoladas de leite cru, a porcentagem de auto-agregação dos isolados variou de 0 a 14,0 %. Sendo que o único isolado de *E. faecium*, o *Enterococcus faecium* CRL1839, apresentou uma auto-agregação de 10,96 %.

A auto-agregação de micro-organismos está relacionada com a capacidade de adesão ao epitélio intestinal, sendo então, um importante requisito para que os mesmos possam fazer parte da flora intestinal (WADSTRON *et al*, 1987). Sendo assim, a capacidade de auto-agregação

pode ser usada para selecionar uma bactéria com potencial probiótico (COLLADO *et al*, 2008; DEL RE *et al*, 2000; XU *et al*, 2009).

6. CONCLUSÕES

Este estudo mostrou a presença de *E. faecium*, *E. faecalis* e *Enterococcus* sp nas amostras de queijo artesanal. Bem como a sua susceptibilidade a alguns antibióticos, testes *in vitro* de condições gastro-intestinais e auto-agregação, em comparação a uma cepa comercial de *L. acidophilus*.

Dentro da identificação destes isolados provenientes de queijo a sua grande maioria estava entre as espécies *E. faecium* e *E. faecalis*, como esperado.

Ao serem testados em condições de *stress* obteve-se resultados interessantes para resistência à lisozima, onde a maioria dos isolados se comportou de forma positiva, em alguns casos até superando a taxa de sobrevivência da cepa controle.

Quando submetidas a stress ácido, pH 3,0, obtivemos isolados resistentes em exposição por 3 horas, mostrando a capacidade de sobreviverem às condições encontradas no estômago. Ao serem expostos a uma outra enzima que atua durante a digestão, a pancreatina, também obtivemos isolados resistentes à 4 horas de exposição. De uma forma geral, alguns isolados destacaram, como 45A e 19A, que chegaram a ter taxas de sobrevivência maior que o controle em condições de *stress*.

Pela análise de componentes principais destacam-se os isolados 44A e 49A, sendo os micro-organismos mais próximos ao *L. acidophilus* nas condições de *stress* testadas.

Esses resultados indicam alguns isolados como potenciais probióticos, no entanto outros testes *in vitro*, como resistência à pepsina e principalmente aos sais biliares são necessários serem feitos para que a triagem dos mesmos seja mais assertiva.

Testes como co-agregação e hidrofobicidade são complementares ao teste de auto-agregação para indicar a possibilidade desde probiótico potencial aderir à mucosa do intestino, assim como testes posteriores *in vivo* poderão ser feitos.

7. REFERÊNCIAS

ANDRIGHETTO, C., KNIJFF, E., LOMBARDI, A., TORRIANI, S., VANCANNEYT, M., KERSTER, K., SWINGS, J., DELLAGLIO, F. Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. **J. Dairy Res**, v.68, p.303-316, 2001.

ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. IX - Lista de Alegações de Propriedade Funcional Aprovadas. Diário Oficial da União, Brasília, julho de 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 11/10/12.

ARIZCUM, C.; BARCINA, Y.; TORRE, P. Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* ssp isolated from milk and Roncal and Idiazabal cheese. **International Journal Food Microbiology**, v.38, p.17-24, 1997.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMINEN, S.; Von WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects**. 3rd ed. New York, Marcel Decker, chap.1, p.1-63, 2004.

BERESFORD, T.P.; FITZSIMONS, N.A.; BRENNAN, N.L.; COGAN, T.M. Recent advances in cheese microbiology. **Internacional Dairy Journal**. Alberta, v.11, p.259-274, 2001.

BRASIL. Resolução RDC n.º 2, de 7 de janeiro de 2002. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2002.

BHARDWAJ, A.; GUPTA, H.; KAUR, G.; VIJ, S.; MALIK, R.K. Safety assessment and evaluation of probiotic potential of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* KH 24 strain under in vitro and in vivo conditions. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v 141, p. 156-164, 2010.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002.

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

BROADBENT, J.R. Genetics of Lactic Acid Bacteria. In: MARTH, E.H.; STEELE, J.L. **Applied Dairy Microbiology**, 2ed, p.243-299, New York: Marcel Decker, 2001.

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

BUSANI, L. et al. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and resistant enterococci isolated in Italy from raw meat products, farm animals and human infections. **International Journal of Food Microbiology**, v.97, p.17-22, 2004.

CAGGIA, C., SCIFO, G.O., RESTUCCIA, C., RANDAZZO, C.L. Growth of acid-adapted *Listeria monocytogenes* in orange juice and in minimally processed orange slices. **Food Control**, v.20, p.59–66, 2009.

CHISARI, G.; Lo BUE, A.M.; DRAGO, L.; ABBIATI, R.; GISMONDO, M.R. Adhesion capacity of *Enterococcus faecium* (SF 68) and *Enterococcus faecalis* to various substrates. **Giornale italiano di chemioterapia**, v.39, p.11-15, 1992.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. **Approved standard M7-A7**. Wayne, PA, 2007.

COLLADO, M.C.; MERILOUTO, J.; SALMINEN, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **European Food Research and Technology**, v.226, p.1065-1073, 2008.

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

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

COTTER, P.D.; HILL, C.; ROSS, P.R. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.777-788, 2005.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Ingredient election criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **Int. J. Dairy Technol.**, Long Hanborough, v.51, n.4, p.123-136, 1998.

COLLINS, J.K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.8, p.487-490, 1998.

DALLA COSTA, L.M.; SOUZA, D.C.; MARTINS, L.T.F.; ZANELLA, R.C.; BRANDILEONE, M.C.; BOKERMAN, S.; SADER, H.S.; SOUZA, H.A.P.H.M. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brazil. **Brazil Journal Infectious Disease**, v.2, p.160-163, 1998.

DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: review. **Proteomics**, v.4, p.106-122, 2004.

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

DOMANN, E.; HAIN, T.; GHAI, R.; BILLION, A.; KUENNE, C.; ZIMMERMANN, K.; CHAKRABORTY, T. Comparative genomic analysis for the presence of potential enterococcal virulence factors in the probiotic *Enterococcus faecalis* strain Symbio.or 1. **International Journal of Medical Microbiology**, v.297, p.533-539, 2007.

DUTKA-MALEN, S., EVERS, S. AND COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. **J Clin Microbiol** v.33, p.24–27, 1995.

ECOLOGY HEALTH CENTER. Disponível em <<http://ecologyhealthcenter.net/node/27>>. Acesso em 21 out. 2011.

ELLIASON, D.J.; TATINI, S.R. Enhanced inactivation of *Salmonella typhimurium* and verotoxigenic *Escherichia coli* by nisin at 65°C. **Food Microbiology**, v.16, p.257-267, 1999.

ESPECHE, M.C.; PELLEGRINO, M.; FROLA, M.; LARRIESTRA, I.; BOGNI, C.; NADER-MACÍAS, M.E.F. Lactic acid bacteria from raw milk as potentially beneficial strains to prevent bovine mastitis. **Anaerobe**, v.30, p.1-7, 2012.

EUZÉBY, J.P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature – Genus *Enterococcus*. Disponível em <<http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>> Acesso em 21 out.2011.

FACKLAM, R.R.; CARVALHO, M.G.S.; TEIXEIRA, L. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In: GILMORE, M.S.; CLEWELL, D.B.; COURVALIN, P.; DUNNY, G.M.; MURRAY, B.E.; RICE, L.B. The enterococci: pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance. **AMS Press**. Washington, p.1-9, 2002.

FACKLAM, R.R.; SAHM, D.F. *Enterococcus*. In: MURRAY, B.E.; BACON, E.T.; PFALLER, M.A.; TENOVEN, F.C.; YOLKEN, R.H. Manual of clinical microbiology. **ASM Press**, Washington, p.308-314, 1995.

FISHER, K.; PHILIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology**, v.155, p.1749-1757, 2009.

FISIOQUANTIC. Disponível em: < <http://fisioquantic.com.br/site/> >. Acesso em: 21/10/2011.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional**

properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: < http://www.fao.org/es/esn/food/foodandfood_probio_en.stm Acesso em: 21 out. 2011.

FOULQUIE-MORENO, M.R., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, E., DE VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v.106, 1-24, 2006.

FRACALANZZA, S.A.; SCHEIDEGGER, E.M.; SANTOS, P.F.; LEITE, P.C.; TEIXEIRA, L.M. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, p.853–859, 2007.

FRANZ, C.M.A.P.; HOLZAPFEL, W.H.; STILES, M.E. Enterococci at the crossroads of food safety? **Int. J. Food Microbiol.** v.47, 1-24, 1999.

FRANZ, C.M.A.P.; HUCH, M.; ABRIOUEL, H.; HOLZAPFEL, W.; GÁLVEZ, A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v.151, p.125-140, 2011.

FRANZ, C.M.A.P., MUSCHOLL-SILBERHORN, A.B., YOUSIF, N.M.K., VANCANNEYT, M., SWINGS, J., HOLZAPFEL, W.H. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.4385-4389, 2001.

FUKA, M.M; ENGEL, M.; REDZEPOVIC, S.; SCHLOTTER, M. Bacterial communities associated with the production of artisanal Istrian cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.142, p.19-24, 2010.

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

GÁLVEZ, A.; LÓPEZ, R.L.; ABRIOUEL, H. Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, New York, v.28, p.125-152, 2008.

GHRAIRI, T.; FRERE, J.; BERJEAUD, J.M.; MANAI, M. Purification and characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. **Food Control**, v.19, p.162-169, 2008.

GIRAFFA, G., CARMINATI, D. and NEVIANI, E. Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use. **J. Food Prot.** v.60, p.732-738, 1997.

GIRAFFA, G. Enterococci from foods. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, p.163- 171, 2002.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* ssp and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutic properties

relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v.10, n.4-5, p.139-157, 1999.

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

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

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

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

HARDIE, J.M.; WHILEY, R.A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. **Society for Applied Bacteriology Symposium**. Series, v.26, p.1S-11S, 1997.

HOIER, E.; JANZEN, T.; HENRIKSEN, C.M.; RATTRAY, F.; BROCKMANN, E.; JOHANSEN, E. The production, application and action of lactic cheese starter cultures. In: LAW, B.A., ed. **Technology of cheesemaking**. Boca Raton: CRC Press, p.99-131, 1999.

HOLZAPFEL, W. H. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.73, n.2, p.365S-373S, 2001.

HUANG, Y.; ADAMS, M. C. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, p.253-260, 2004.

ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. Probiotics. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, London, v.18, n.2, p.299-313, 2004.

JEEVARATNAM, K.; JAMUNA, M.; BAWA, A.S. Biological preservation of foods – bacteriocins of lactic acid bacteria. **Indian Journal of Biotechnology**, New Delhi, p.446-454, 2005.

JETT, B.D.; HUYKE, M.M.; and GILMORE, M.S. Virulence of enterococci. **Clin. Microbiol. Rev.** v.7, p.462-478, 1994.

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

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

KASZANYITZKY E.J.; TENK, M.; GHIDAN, A.; FEHERVARI, G.Y.; PAPP, M. Antimicrobial susceptibility of enterococci strains isolated from slaughter animals on the data of Hungarian resistance monitoring system from 2001 to 2004. **International Journal of Food Microbiology**, v.115, p.119-123, 2007.

KAUR, I.P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **Eur. J. Pharm. Sci.**, Amsterdam, v.15, p.1-9, 2002.

KAYSER, F.H. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. **Int. J. Food Microbiol.** v. 88, p.255-262, 2003.

KHEMALLELAKUN, S.; BAUMGARTNER, J.C.; PRUKSAKOM, S. Autoaggregation and Coaggregation of bacteria associated with acute endodontic infections. **J. Endod.**, Baltimore, v.32, n.4, p.312-318, 2006.

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

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

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

KLAENHAMMER, T.R. Probiotics and prebiotics. In:DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. 2.ed. Washington: ASM, p.797-811, 2001.

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

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. **International Journal of Food Microbiology**, v.88, p.123-131, 2003.

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

KOCH, S.; HUFNAGEL, M.; THEILACKER, C.; HUEBNER, J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. **Vaccine**, v.22, p.822-830, 2004.

KOS, J.; S USJKOVIC´ , S.; VUKOVIC´ , M. ; j IMPRAGA, S ; FRECE, J.; MATOS;IC, S.. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **J. Appl. Microbiol.**, v. 94, p.981–987, 2003.

LEE, Y.K.; NOMOTO, K.;SALMINEN, S.; GORBACH,S.L. **Handbook of probiotics**. New York: Wiley, p.211, 1999.

LEE, Y.K.; SALMINEN, S. The coming age of probiotics. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.6, p.241-245, 1995.

LEVISON, M.E.; MALLELA, S. Increasing antimicrobial resistance: Therapeutic implications for enterococcal infections. **Current infectious disease reports**, v.2, p.417-423, 2000.

LIN, W.-H; HWANG, C.-F; CHEN, L.-W; TSEN, H.-Y. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiology**, v.23, n.1, p.74-81, 2006.

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

MAKAROVA, K.S.; KOONIN, E.V. Evolutionary genomics of lactic acids bacteria. **Journal Bacteriology**, v.189, p.1199-1208, 2007.

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

MARQUES, E.B.; SUZART, S.; Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina. **J.Med. Microbiol.** vol.53, p.1069-1073, 2004.

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

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

MELO, N.P. **Avaliação de embalagens ativada por incorporação de nisina na inibição de *Staphylococcus ssp***. Dissertação (Mestrado em ciência e tecnologia de alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p.88, 2003.

MENIN, A. *et al.* Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella spp*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.6, p.1687-1693, 2008.

MOMBELLI, B.; GISMONDO, M.R. The use of probiotics in medical practice. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.16, p.531-536, 2000.

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

MONTVILLE, T.J.; CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin; recent progress and unresolved questions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.50, p.511-519, 1998.

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

MUNDY, L.M., SAHM, D.F., GILMORE, M. Relationship between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. **Clin. Microbiol. Rev.** v.13, p.513-522, 2000.

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

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

NASCIMENTO, M.S.; MORENO, I.; KUAYE, A.Y. Bacteriocina em alimentos: uma revisão. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.11, p.120-127, 2008.

NIETO-ARRIBAS, P.; SESEÑA, S.; *et al.* *Enterococcus* populations in artisanal Manchego cheese: biodiversity, technological and safety aspects. **Food Microbiology**, v.28, p.891-899, 2011.

NOGUCHI, N.; NAKAMINAMI, H.; NAKASE, K.; SASATSU, M. Characterization of *Enterococcus* Strains Contained in Probiotic Products. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 34, p.1469-1473, 2011.

OGIER, J.-C. & SERROR, P. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p.291-301, 2008.

OMGE – Organização Mundial de Gastroenterologia. **Guias práticas: Probióticos e Prebióticos.** Disponível em < http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/pt/pdf/guidelines/19_probiotics_prebiotics_pt.pdf >. Acesso em: 15/05/2013.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v.38, n.1, p.1-21, 2002.

OLIVEIRA, M.N. Probióticos: seus benefícios a saúde humana. **Nutrição em Pauta**, v. 15, n.87, 2007.

PANGALLO *et al.* Assessment of environmental enterococci: bacterial antagonism, pathogenic capacity and antibiotic resistance. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.94, p.555- 562, 2008.

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

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

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

PINTO, M.G.V.; FRANZ, C.M.A.P.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.109, p.205-214, 2006.

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

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMANGALDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.13, p.3-11,2002.

RAZI, I.; GOLLOPA, N.; POLAK-CHARCON, S.; SCHWARTZ, B. Isolation and characterisation of new putative probiotic bacteria from human colonic flora. **British Journal of Nutrition**, v.97, p.725–734, 2009.

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

ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Dig. Liver Dis.**, Rome, v.34, suppl.2, p.S105-S110, 2002.

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

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

RYBKA, S.; FLEET, G.H. Populations of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species in Australian yoghurts. **Food Aust.**, Sydney, v.49, n.10, p.471-475, 1997.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **J. Biotech.**, Amsterdam, v.84, p.197-215, 2000.

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

SABLON, E.; CONTRERAS, B.; VANDAMME, E. Antimicrobial peptides of Lactic Acid Bacteria: Made of action, Genetic and Biosynthesis. **Advances in Biochemical Engineering /Biotechnology**, v.68, p.21-60, 2000.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutr. Rev.**, New York, v.61, n.3, p.91-99, 2003.

SANTOS, M. S. et al. Influência do fornecimento de probiótico à base de *Lactobacillus* sp. sobre a microbiota intestinal de leitões. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.27, n.6, p.1395-1400, 2003.

SARANTINOPOULOS, P., ANDRIGHETTO, C., GEORGALAKI, M.D., REA, M.C., LOMBARDI, A., COGAN, T.M., KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. **Int. Dairy J.** v.11, p.621-647, 2001.

SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; HOLZAPFEL, W.H. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. **Internacional Dairy Journal**, v.15, p.1289-1297, 2005.

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

SCHLEIFER, K.L.; KILPPER-BALZ, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to de genus *Enterococcus* nom.rev. *Enterococcus faecalis* comb.nov. and *Enterococcus faecium* comb.nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.34, p.31-34, 1984.

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

SCHROETER, J.; KLAENHAMMER, T. Genetics of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**. v.292, p.1-6, 2009.

SCHOUTEN, M.A.; HOOBKAMP-KORTANJE, J.A.A.; MEIS, J.F.G.; VOSS, A. The European VRE study group: prevalence of vancomycin-resistant Enterococci in Europe. **European Journal Clinical of Microbiology**, v.19, p.816-822, 2000.

SERHAN, M.; CAILLIEZ-GRIMAL, C.; BORGES, F. et al. Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. **Food Microbiology**, v.26, p.645-652, 2009.

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

SESSIONS, V.A.; LOVEGROVE, J.A.; TAYLOR, G.R.J.; DEAN, T.S., WILLIAMS, C.M.; SANDERS, T.A.B.; MacDONALD, I.A.; SALTER, A.M. The effect of a new fermented milk product on total plasma cholesterol, LDL-cholesterol, and apolipoprotein B concentrations in middle-aged men and women (abstract 285). In: Sadler, M.J., Saltmarch, M. (Eds.), 121 Functional Foods: the consumer, the product, and the evidence. **The Royal Society of Chemistry**, London, p.15-19, 1997.

SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V. Improving viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.7, p.349-356, 1997.

SHANAHAN, F. Probiotics and inflammatory bowel disease: from fads to fantasy to facts and future. **Br. J. Nutr.**, Wallingford, v.88, suppl.1, p.5-9, 2002.

SHERMAN, J.M. The Streptococci **Bacteriological Reviews**, v.1, p.3-97, 1937.

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

SOLHEIM, M.; BREKKE, M.C.; SNIPEN, L.G.; WILLEMS, R.J.; NES, I.F.; BREDE, D.A. Comparative genomic analysis reveals significant enrichment of mobile genetic elements and genes encoding surface-structure proteins in hospital-associated clonal-complex 2 *Enterococcus faecalis*. **BMC Microbiology**, v.11, p.3, 2011.

STANTON, C.; DESMOND, C.; COAKLEY, M.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In: FARNWORTH, E.R., ed. **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press. p.27-58, 2003.

STOMPFAVÁ, V.; LAUKOVÁ, A. In vitro study on bacteriocin production of Enterococci associated with chickens. **Anaerobe**, v.13, p.228-237, 2007.

TINO, V. F. **Utilização de análise de componentes principais na regulação de máquinas de injeção plástica**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. **Enzyme Microb. Technol.**, v.36, p.318-326, 2005.

TOUHY, K.M.; PROBERT, H.M.; SMEJKAL, C.W.; GIBSON, G.R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**, Haywards Heath, v.8, n.15, p.692-700, 2003.

TRIVELDI, K.; CUPAKOVA, C.; KARPISKOVA, R. Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. **Veterinari Medicina**, v.56, p.353-357, 2011.

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

VALENZUELA, A.S. *et al.* Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. **Food Control**, v.20, p.381-385, 2009.

VANNUCCI, F. A.; GUEDES, M. R. C. Fisiopatologia das diarreias em suínos, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.7, p.2233-2242, 2009.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.10, p.271-275, 2000.

VIZOSO-PINTO, M.G., FRANZ, C.M.A.P., SCHILLINGER, U., HOLZAPFEL, W. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. **Int. J. Food Microbiol.**, v.109, p.205-214, 2006.

XU *et al.* First report of class 2 integron in clinical *Enterococcus faecalis* and class 1 integron in *Enterococcus faecium* in South China. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.68, p.315-317, 2010.

ZAGO, M.; FORNASARI, M.E.; CARMINATI, D.; BURNS, P.; SUÀREZ, V. VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J.; GIRAFFA, G. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. **Food Microbiology**, v.28, p. 1033-1040, 2011.

ZOU, L.-K. *et al.* Erythromycin resistance and virulence genes in *Enterococcus faecalis* from swine in ;chine. **New Microbiologica**, v.34, p.73-80, 2011.

WACHSMAN, M.B.; FARIAS, M.E.; TAKEDA, E.; SESMA, F.; HOLGADO, A.P.R.; TORRES, R.A.; COTO, C.E. Antiviral activity of enterocin CLR35 against herpesviruses. **Internacional Journal of Antimicrobial Agents**, v.12, p.293-299, 1999.

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