

FUNDAÇÃO OSWALDO ARANHA  
CENTRO UNIVERSITÁRIO DE VOLTA REDONDA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BACHARELADO  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**BRUNA BELLÓ T. DELGADO**

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS  
PRODUZIDAS POR *Lactobacillus spp.* FRENTE AS CEPAS DE  
*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae***

**VOLTA REDONDA  
2018**

FUNDAÇÃO OSWALDO ARANHA  
CENTRO UNIVERSITÁRIO DE VOLTA REDONDA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – BACHARELADO  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS  
PRODUZIDAS POR *Lactobacillus spp.* FRENTE AS CEPAS DE  
*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae***

Artigo apresentado ao curso de Ciências  
Biológicas do UniFOA como requisito à  
obtenção do título de bacharel em ciências  
biológicas

Aluno:  
Bruna Belló T. Delgado

Orientador:  
Prof. Dr. Renato da Silva Teixeira

**VOLTA REDONDA  
2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Bibliotecária: Alice Tação Wagner - CRB 7/RJ 4316

D352a Delgado, Bruna Belló Teixeira.

Avaliação da ação das substâncias antimicrobianas produzidas por *Lactobacillus spp.* frente as cepas de *Escherichia Coli* e *Klebsiella Pneumoniae*. / Bruna Belló Teixeira Delgado. – Volta Redonda: UniFOA, 2018.  
27 p. II.

Orientador (a): Prof. Dr. Renato da Silva Teixeira

Monografia (TCC) – UniFOA / Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado, 2018.

1. Ciências Biológicas - TCC. 2. Probióticos. 3. Lactobacillus. 4. Enterobactérias. I. Teixeira, Renato da Silva. II. Centro Universitário de Volta Redonda. III. Título.

CDD 570



Fundação Oswaldo Aranha



### FOLHA DE APROVAÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: Análise *in vitro* de substâncias antimicrobianas produzidas por micro-organismos probióticos contra enterobactérias.

Elaborado por Bruna Belló Teixeira Delgado apresentado publicamente perante a Banca Avaliadora, como parte dos requisitos para conclusão do Curso de Ciências Biológicas, modalidade Bacharelado.

Aprovada em 31 de outubro de 2018

Banca Avaliadora:

Professor Orientador

Renato da Silva Teixeira, Dr. Centro Universitário de Volta Redonda – UniFOA.

Professor Avaliador

Rodrigo Rocha Barbosa, Dr. Centro Universitário de Volta Redonda – UniFOA.

Professor Avaliador

Carlos Alberto Sanches Pereira, Dr. Centro Universitário de Volta Redonda – UniFOA.

## DEDICATÓRIA

Acima de tudo quero agradecer a Deus por guiar meus passos, iluminar meu caminho e me dar forças, em segundo lugar meu orientador que me apoiou até o final e minha família os quais amo muito.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, primeiramente por tanta benção, amparo e proteção, além de me manter no caminho no qual me sinto tão realizada.

Aos meus pais e familiares, por todo incentivo e apoio em todos os meus sonhos e decisões. Por terem me ensinado a ser honesta e viver a vida com mais dignidade.

Aos meus mestres, principalmente o professor Carlos Alberto Sanches e o professor André Barbosa por toda dedicação e por todo conhecimento compartilhado. Agradeço também pela confiança e dedicação.

Ao meu orientador, professor Renato Teixeira pelo seu grande exemplo de profissionalismo, por todo auxílio, companheirismo e parceria, e por acreditar em mim desde o primeiro dia.

Ao técnico de laboratório de biotecnologia Alexandre Oliveira, o qual me ajudou em todo processo prático do trabalho, me apoiando, incentivando e auxiliando.

Aos meus amigos por sempre estarem ao meu lado, tanto nos momentos bons quanto nos ruins. Por me apoiarem e estarem sempre presentes acompanhando toda a minha trajetória.

Á minha colega de turma, Beatriz Tjäder, pela companhia e por compartilhar nossas ansiedades e sonhos. Obrigada pela amizade, atenção e carinho.

Aos profissionais do estágio, pela receptividade e pela troca de ensinamentos. Por terem contribuído valiosamente com o meu conhecimento.

Ao meu namorado, por me compreender e estar sempre ao meu lado pro que vier. Seu carinho, atenção e amor foram essenciais para a conclusão dessa etapa.

A todos que passaram por mim, durante a graduação, direta ou indiretamente, contribuindo, para meu crescimento pessoal e profissional. Muito obrigada!

Seja o que você deseja ser. Não dê importância ao que os outros dizem. Você é filho de Deus, e como tal tem o direito à sua liberdade. Não desanime diante dos impedimentos e das dores. Fique certo de que você, unicamente você, terá de dar contas de seus atos... Portanto, busque dentro de si mesmo a luz divina, e seja exatamente o que você deseja ser: subindo sempre.

(C. Torres Pastorin)

## RESUMO

Os probióticos são suplementos alimentares constituídos por micro-organismos vivos, principalmente por bactérias ácido-lácticas como as do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. São classificados como alimentos funcionais, pois produzem efeitos positivos para a saúde do hospedeiro, destacando-se pela capacidade de aumentar, equilibrar e restaurar a microbiota intestinal, promovendo proteção contra possíveis patógenos. Através da atividade fermentativa os *Lactobacillus* são capazes de produzir substâncias antimicrobianas com diferentes mecanismos de ação frente a bactérias patogênicas. A microbiota residente permite um controle do funcionamento normal das funções fisiológicas do hospedeiro, entretanto, sua alteração pode ocasionar na proliferação de patógenos e consequentemente infecções por Enterobactérias. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ação das substâncias antimicrobianas produzidas por *Lactobacillus spp.* frente cepas de *K. pneumoniae* e *E. coli*. Para tanto, foram avaliadas 4 cepas de *Lactobacillus* frente a *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, através da técnica *Spot on the Lawn*, onde os probióticos foram inoculados em forma de pontos em ágar MRS e após 24 h de cultivo, 10 mL de meio BHI semi-sólido contendo 100 µL das bactérias patogênicas foram vertidos sobre as placas de ágar MRS contendo as amostras de *Lactobacillus* e cultivadas por mais 24 h. Após este período, mediu-se o tamanho dos halos de inibição. Pode-se observar neste experimento que as quatro espécies de *Lactobacillus spp.* apresentaram capacidade de inibição frente às cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae*, porém a maior inibição ocorreu contra *E. coli*, principalmente pelo *L. plantarum*, cujo halo total de inibição apresentou em média 19,9 mm de diâmetro e a menor inibição com 6,5 mm de diâmetro pelos *L. acidophilus*. O estudo reafirma a importância de se isolar e caracterizar estes micro-organismos visto que a capacidade de produzir compostos antimicrobianos e a capacidade de promover a atividade antagonista contra patógenos otimizando a caracterização destes como linhagens probióticas.

**Palavras-chave:** Probióticos. *Lactobacillus*. Enterobactérias. Substâncias antimicrobianas.

## ABSTRACT

Probiotics are food supplements made up of living microorganisms, mainly lactic acid bacteria such as those of the genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. They are classified as functional foods, since they produce positive effects for the health of the host, being distinguished by the capacity to increase, balance and restore the intestinal microbiota, promoting protection against possible pathogens. Through the fermentative activity *Lactobacillus* are able to produce antimicrobial substances with different mechanisms of action against pathogenic bacteria. The resident microbiota allows a control of the normal functioning of the physiological functions of the host, however, its alteration can cause in the proliferation of pathogens and consequently infections by Enterobacteria. Thus, the present study aimed to evaluate the action of the antimicrobial substances produced by *Lactobacillus spp.* against strains of *K. pneumoniae* and *E. coli*. For this, 4 strains of *Lactobacillus* were evaluated against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, using the Spot on the Lawn technique, where probiotics were inoculated as MRS agar points and after 24 h of culture, 10 mL of semi-BHI medium solid containing 100 µL of the pathogenic bacteria were poured onto the MRS agar plates containing the *Lactobacillus* samples and cultured for a further 24 h. After this time, the size of the inhibition halos was measured. It can be observed in this experiment that the four species of *Lactobacillus spp.* showed inhibition capacity against strains of *E. coli* and *K. pneumoniae*, but the highest inhibition occurred against *E. coli* mainly by *L. plantarum*, whose total inhibition halo presented on average 19.9 mm in diameter and the lowest inhibition with 6.5 mm diameter by *L. acidophilus*. The study reaffirms the importance of isolating and characterizing these microorganisms since the ability to produce antimicrobial compounds and the ability to promote antagonistic activity against pathogens optimizing the characterization of these as probiotic strains.

**Keywords:** Probiotics. *Lactobacillus*. Enterobacteria. Antimicrobial substances.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Atividade antimicrobiana de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados de probióticos manipulados de farmácia, demonstrada pelos halos de inibição (mm) por meio da técnica spot-on-the-lawn .....	18
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média dos diâmetros (em mm) dos halos de inibição produzidos por bactérias ácido láctico (BAL) no ensaio spot-on-the-lawn para verificação de atividade antimicrobiana, frente às cepas <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Escherichia coli</i> .....	19
Tabela 2 - Porcentagem de inibição entre os diferentes lactobacilos utilizados. .....	20

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	16
2.1 MICRO-ORGANISMOS.....	16
2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	17
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	18
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	22
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	23

## 1 INTRODUÇÃO

O termo “probiótico” tem origem grega que significa “para a vida”. Várias definições conceituais de probiótico foram publicadas desde sua descoberta em 1908 por Metchnikoff (PEHRSON, 2013). No entanto, com a necessidade de uma definição amplamente aceita, especialistas da FAO/WHO (Food and Agriculture Organization / World Health Organization) implementaram uma denominação que é aceita internacionalmente, onde os “probióticos são micro-organismos vivos , que quando administrados em quantidade adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002, RAIZEL et al., 2011).

Estes são classificados como alimentos funcionais, pois ao serem consumidos em quantidades adequadas diariamente, produzem efeitos metabólicos e fisiológicos positivos para a saúde do hospedeiro, tendo como principal objetivo aumentar, equilibrar e reestruturar a microbiota intestinal conferindo diversos benefícios como: resistência gastrintestinal e urogenital contra patógenos, ativação do sistema imunológico, tratamento de diarreias, absorção de vitaminas e minerais e modulação da microbiota normal após o uso de antibióticos (FULLER, 1989; RAIZEL et al., 2011; SANTOS; VARALLO, 2011).

Os principais micro-organismos utilizados para a produção desse tipo de produto são bactérias lactocídofilas (BAL) do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* que podem ser comercializadas como produtos lácteos fermentados ou como suplementos na forma liofilizada. Contudo, há também outras espécies que são consideradas probióticas por fornecerem benefícios à saúde do homem como: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium*, *Saccharomyces*, *Escherichia* e alguns micro-organismos eucarióticos como leveduras (PEREIRA; GÓMEZ, 2007).

Dentre os micro-organismos citados a cima, os *Lactobacillus* se destacam pela sua ampla utilização como suplementos alimentares e pelo crescente interesse terapêutico (NOGUEIRA; GONÇALVES, 2011). De acordo com BADARÓ et al. (2008) o gênero *Lactobacillus* é formado por bactérias gram-positivas em formato de bacilos e incapazes de formar esporos. São anaeróbias, anaeróbias facultativas ou microaerófilas, contudo crescem melhor em meio com pouca concentração de oxigênio, além disso, possuem como principal característica a formação de ácido láctico como produto do metabolismo primário.

Dentre as diversas espécies do gênero caracterizadas com propriedades probióticas, destacam-se: *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. casei* – *subsp. paracasei* e *subsp. tolerans*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *L. lactis*, *L. brevis*, *L. bulgaricus*, *L. johnsonii*, *L. gasseri* (LEUCAS, 2012).

Os estudos sobre os probióticos relatam três possíveis mecanismos de atuação, sendo o primeiro a supressão do número de células viáveis por meio da produção de compostos antimicrobianos, a competição por nutriente e a competição por sítios de adesão. O segundo mecanismo seria a alteração do metabolismo conforme o aumento ou diminuição da atividade enzimática e o terceiro seria o estímulo da imunidade do hospedeiro (FULLER, 1989).

A fermentação realizada pelos lactobacilos resulta na formação de compostos antimicrobianos, como os ácidos lácticos, acético, propiônico, peróxido de hidrogênio, diacetil, reuterina e bacteriocinas que irão acidificar o meio e inibir a atividade microbiana de possíveis micro-organismos patogênicos (NOGUEIRA; GANÇALVES, 2011; PEHRSON, 2013).

De acordo com Sumita (2007) os ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico tem a propriedade de aumentar a permeabilidade da membrana externa de bactérias gram-negativas, assim o ácido penetra no citoplasma e diminui o pH intracelular, inibindo as atividades microbianas, dentre elas o micro-organismo se torna incapaz de absorver nutrientes, como íons, fosfato e aminoácidos.

O peróxido de hidrogênio tem a capacidade de oxidar componentes celulares (DNA, lipídios e proteínas) e formar radicais ( $\text{OH}^\cdot$ ). Possui propriedades autolimitantes em relação ao crescimento microbiano, podendo até mesmo provocar um decréscimo na própria viabilidade dos micro-organismos probióticos. Esta característica deixa de ser uma vantagem e torna-se normalmente um obstáculo técnico para a conservação da viabilidade celular de espécies probióticas em certos alimentos. Regiões pobres em oxigênio como o intestino e a cavidade vaginal ainda necessitam de estudos para a avaliação dos mecanismos de ação desse composto.

O diacetil tem ação bacteriostática, sugerem que o seu mecanismo de ação está relacionado ao bloqueio da utilização da arginina. Sua produção é desencadeada em resposta a diminuição do pH causada pelos produtos da

fermentação e atuam com mais frequência em micro-organismos gram-negativos (PEHRSON, 2013).

As bacteriocinas são proteínas metabolicamente ativas com ação semelhante aos antibióticos, são capazes de destruir células alvo pela formação de poros e/ ou inibição da síntese da parede celular, auxiliando na inibição do crescimento de patógenos e protegem o epitélio intestinal contra futuros danos (NOGUEIRA; GANÇALVES, 2011). Além disso, podem contribuir com o sistema imunológico, pois induzem a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como o interferon-gama, fator de necrose tumoral-alfa e interleucinas (KARKOW, 2007; BERMUDEZ-BRITO, 2012).

Alguns *Lactobacillus* têm a capacidade secretar mucina com a propriedade de espessar a barreira intestinal local. Contribuem para uma diminuição de processos alérgicos e cancerígenos e também contra infecção (NOGUEIRA; GANÇALVES, 2011).

A exclusão competitiva está entre os mecanismos de ação dos probióticos, pois, estes são capazes de competir por sítios de ligação na mucosa intestinal, formando uma barreira física contra bactérias patogênicas e também são capazes de competir por nutrientes eliminando os micro-organismos menos favoráveis (CARVALHO; SOARES; SOARES, 2012; OKADA; SILVA, 2015).

Além disso, possui atividades imunomoduladoras, principalmente por modificarem a resposta a antígenos. Conforme várias evidências de estudos *in vitro* e utilizando modelos animais e humanos indicam que os probióticos podem estimular tanto a resposta imune não específica quanto a específica. Pois foi possível detectar a ativação de macrófagos pelo aumento dos níveis de citocinas e o aumento da atividade das células destruidoras naturais e dos níveis de imunoglobulinas (BADARÓ et al, 2008).

O equilíbrio e a estabilidade da microbiota intestinal é um processo mantido através das inter-relações das bactérias entre si e entre estas e o hospedeiro (SANTOS; VARALLO, 2011). Uma microbiota normal é dividida em dois grupos: residente e transitória, na primeira os micro-organismos são relativamente permanentes e quando alterados são reestabelecidos, em contrapartida, os micro-organismos transitórios não são fixos, permanecem temporariamente. Segundo Lima; Pereira; Nowak (2015) a microbiota residente permite um controle do

funcionamento normal das funções fisiológicas do hospedeiro, entretanto, existem diversos fatores que podem alterar a composição normal microbiana intestinal como: estilo de vida, envelhecimento, desordens peristálticas, câncer, cirurgias, doenças hepáticas ou renais, anemia perniciosa, estresse emocional, desordens do sistema imunológico, uso de anticoncepcionais, anti-inflamatórios, realização de radioterapia e o uso de antibióticos, os quais podem ocasionar na proliferação de patógenos e consequentemente infecções por Enterobactérias.

As Enterobactérias são bactérias gram negativa em formato de bacilos, são aeróbias ou anaeróbias facultativas, fermentadora de glicose e se desenvolvem em meios sólidos. Algumas são patogênicas oportunistas uma vez que algumas espécies são residentes da microbiota normal do corpo humano. Dentre esse grupo, destacam-se as bactérias dos gêneros *Escherichia* e *Klebsiella* (PINHEIRO, 2017).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004), as principais doenças causadas por estes micro-organismos são: infecções do trato urinário (cistite, uretrite, Pielonefrite, Prostatite, vaginite), infecções genitais (vaginose bacteriana), doenças gastrointestinais (diarreias), infecção do sistema nervoso central (meningite aguda, meningite crônica, encefalite, mielite, neurite, abscesso cerebral), infecções abdominais entre outras.

Esses micro-organismos nos últimos anos têm recebido muita atenção no âmbito farmacêutico devido ao insucesso no tratamento de infecções bacterianas multirresistentes a antibióticos. Esse cenário preocupante está relacionado ao uso indiscriminado de antibióticos, o qual têm sido responsável pelo crescente número de infecções cujo tratamento inclui drogas mais caras e com maior toxicidade, hospitalização prolongada, alta incidência de mortalidade e elevado custo hospitalar (OLIVEIRA, 2015). Após o tratamento com antibióticos o organismo humano permanece com efeitos da droga por longos períodos, gerando uma pressão seletiva sobre a microbiota presente (principalmente sobre as bactérias sensíveis) gerando consequências devastadoras para o equilíbrio da microbiota e não se deve desconsiderar a seleção de linhagens patogênicas de maior resistência e virulência (PAIXÃO; CASTRO, 2016).

Portanto, visto que os probióticos influenciam diretamente na microbiota intestinal, local no qual regula diversas atividades metabólicas e fisiológicas do hospedeiro e conforme o surgimento de linhagens patogênicas de maiores virulências e resistência devido ao uso indiscriminado de antibióticos surgiram o

interesse em avaliar a ação das substâncias antimicrobianas que os *Lactobacillus spp.* produzem frente as cepas *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, com o intuito de ampliar os estudos no desenvolvimento de terapias alternativas contra Enterobactérias.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nas instalações do Laboratório de Biotecnologia do Centro Universitário de Volta Redonda (UniFOA).

### 2.1 MICRO-ORGANISMOS

No presente trabalho foram avaliadas 4 cepas de *Lactobacillus*, sendo elas *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei* e *L. plantarum*, adquiridos em uma farmácia de manipulação na forma liofilizada.

Para ativação das células as respectivas cepas foram repicadas individualmente, por três vezes consecutivas a 37°C por 24 h., em caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS), composto por glicose (20 g/L), peptona (10 g/L), extrato de carne (8 g/L), extrato de levedura (4 g/L), acetato de sódio trihidratado (3 g/L), citrato triamoniaco (3 g/L), fosfato dipotássio (2 g/L), sulfato de magnésio heptahidratado (0,2 g/L), sulfato de manganês (0,05 g/L) e Tween 80 (1mL/L), contendo 20% glicerol, esterilizado a 121 °C/15 min (TEIXEIRA, 2017).

A pesquisa da produção de substâncias antimicrobianas pelos referidos *Lactobacillus* foi realizada frente a diferentes cepas de *Escherichia coli* (54, 57, 59, 60, 61) e *Klebsiella pneumoniae* (56, 58, 64, 66, 75), todas pertencentes à coleção de cultura do UniFOA, de origem do trato urinário e intestinal que se encontravam mantidas congeladas a -20 °C. Para ativação as cepas foram descongeladas a temperatura ambiente e transferidas individualmente em câmara de fluxo laminar para tubos contendo 2mL de caldo BHI devidamente esterilizados e incubadas a 37 °C por 24 horas.

## 2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O teste de antagonismo "*in vitro*" foi realizado de acordo com a técnica *Spot on the Lawn* descrita em Altarugio (2016). Para isto, 5 µL dos cultivos de cada cepa de *Lactobacillus* foram inoculados em forma de pontos em placas de Petri contendo ágar MRS e após estarem completamente secas, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Em seguida, 100 µL dos cultivos de bactérias indicadoras foram transferidos para 10 mL de meio Brain Heart Infusion (BHI) semi-sólido em tubos de ensaio e vertidos, depois de agitação, sobre as placas de ágar MRS contendo as amostras de *Lactobacillus* (spot) já crescidas, e após completa solidificação as placas foram novamente incubadas a 37 °C, durante 24 h. Após este período, a medida dos halos de inibição a partir da borda da colônia dos *Lactobacillus* foi realizada com paquímetro.

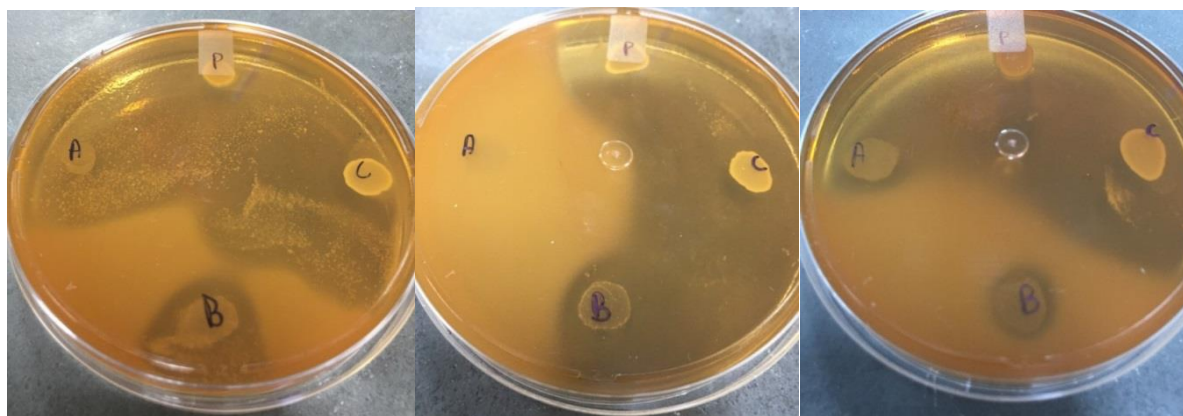
## 2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey para avaliar a diferença entre as médias dos halos de inibição produzidos por cada cepa de *Lactobacillus*. Foram consideradas estatisticamente significantes diferenças que apresentem valor descritivo (*p*) menor ou igual a 5%. Estes testes foram realizados utilizando os softwares Excel e BioEstat 5.0.

### 3 RESULTADO E DISCUSSÃO

No presente trabalho, a atividade inibidora de micro-organismos probióticos sobre o crescimento de diferentes cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, foi verificada através da realização do teste de “spot-on-the-lawn”, onde a presença de halos de inibição indicam resultados positivos.

Os halos de inibição formados pela ausência de crescimento do micro-organismo indicador ao redor das colônias de *Lactobacillus* podem ser visualizados na Figura 1.



a) Frente a *K.pneumoniae* (KP64) b) Frente a *E. coli* (EC60) c) Frente a *E. coli* (EC61)

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 1 - Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* spp. isolados de probióticos manipulados de farmácia, demonstrada pelos halos de inibição (mm) por meio da técnica spot-on-the-lawn.

As quatro espécies de *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei* e *L. plantarum*) apresentaram capacidade de inibição frente às cepas indicadoras, porém, com diferentes potenciais de sensibilidade. Os resultados mostram que a sensibilidade às substâncias produzidas variam de acordo com os patógenos e com os isolados probióticos utilizados.

Pode-se observar neste experimento que a bactéria indicadora *E. coli* foi a que teve maior inibição de seu crescimento, cuja média do halo de inibição foi de 22 mm de diâmetro, enquanto a *K. pneumoniae* apresentou 14 mm de diâmetro de halo de inibição (TABELA 1).

Tabela 1 - Média dos diâmetros (em mm) dos halos de inibição produzidos por bactérias ácido láctico (BAL) no ensaio spot-on-the-lawn para verificação de atividade antimicrobiana, frente às cepas *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*.

<i>Lactobacillus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>					<i>Escherichia coli</i>				
	56	58	64	66	75	54	57	59	60	61
<i>L. acidophilus</i>	-	-	13	-	7	-	-	30	-	15
<i>L. bulgaricus</i>	13	11,5	8,5	-	5	13	-	30	18,5	-
<i>L. casei</i>	14	22	18	16	15	13,5	19,5	30	27	21
<i>L. plantarum</i>	11	21	20	11	18	12	24	30	21	26

Fonte: elaborado pelo autor

Nota-se que as zonas de inibição obtidas, principalmente pelos *L. casei* e *L. plantarum*, são de diâmetro consideravelmente maiores que os outros lactobacilos, com uma média de inibição muito similar uma da outra de 19,9 mm e 19,4 mm de diâmetro respectivamente. Além disso, Apresentaram 100% de inibição frente às duas cepas indicadoras.

Os *L. bulgaricus* indicaram 80% de inibição frente às cepas *K. pneumoniae* enquanto que frente a bactéria indicadora *E. coli* foi de 60%. A média dos halos de inibição foi de 14,2 mm de diâmetro.

Os halos em relação à *L. acidophilus*, no entanto, foram de diâmetro menor com uma média total de 6,5 mm de diâmetro, apresentando uma porcentagem de 40% de inibição em cada patógeno indicador.

Ao realizar o teste ANOVA seguido do teste de Tukey, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre as médias dos halos de inibição produzidas pelos diferentes *Lactobacillus*. O valor do teste ANOVA foi  $F=6.6645$  com  $p<0,01$ . Ao comparar a média entre cada *Lactobacillus*, observa-se que *L. casei* e *L. plantarum* se mostrando os mais eficazes por apresentarem diferença significativa de suas médias quando comparado ao *L. acidophilus* ( $p<0,01$ ). A porcentagem da formação dos halos de inibição entre as bactérias probióticas é apresentada mostrada na Tabela 2.

Tabela 2 - Porcentagem de inibição entre os diferentes lactobacilos utilizados.

<i>Lactobacillus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. acidophilus</i>	40%	40%
<i>L. bulgaricus</i>	80%	60%
<i>L. casei</i>	100%	100%
<i>L. plantarum</i>	100%	100%

Tais resultados corroboram com o trabalho de Silva (2016), onde todas as amostras de *Lactobacillus* (*L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. paraplantarum* e *L. pentosus*) utilizadas, apresentaram halos de inibição contra a bactéria patogênica *Escherichia coli*. O autor relata que a atividade antagonista esta relacionado à produção de ácidos orgânicos, pois essas bactérias foram isoladas de queijos artesanais, nos quais participam do processo fermentativo com a degradação da glicose e consequente produção de ácidos orgânicos.

Por outro lado, Costa (2016) não observou a inibição de *E. coli* a partir de *L. plantarum* ambos isolados de queijo muçarela, visto que os micro-organismos gram-negativos são geralmente resistentes à substâncias inibidoras como as bacteriocinas, devido a presença de membrana protetora que forma uma barreira contra macromoléculas e solutos. Em contrapartida, frente a *Stapylococcus aureus* e *Listeria innocua* verificou-se o halo de inibição, desta forma, obteve-se apenas inibição frente aos micro-organismos gram-positivos utilizados.

Várias espécies de *Lactobacillus* são capazes de produzir uma variedade de compostos antimicrobianos, como ácidos orgânicos, dióxido de carbono, etanol, polissacarídeos e bacteriocinas. Essas substâncias são capazes de inibir o crescimento de outros micro-organismos, apresentando diferentes mecanismos de ação, como por exemplo, a desestabilização da membrana, lise celular, degradação de ácidos nucleicos e inibição da síntese de proteínas (DIAS; SILVA; TIMM, 2018).

Rivas; Riveiro (2009) relataram que o ácido láctico é o principal responsável por esse efeito, no entanto em um estudo da ação dos ácidos orgânicos, concluiu-se que apesar do ácido láctico ser importante para a inibição, a presença de ácido acético potencializa o efeito inibitório.

Pereira; Gómez (2007) observaram em seus estudos que ao neutralizar o pH do meio pode-se impedir o efeito inibitório de algumas cepas. Portanto, essa análise

pode demonstrar que a produção de ácidos orgânicos a partir da fermentação é um dos fatores chave no potencial antimicrobiano. Por outro lado, Domingos et al. (2018) verificaram que algumas cepas apresentaram inibição mesmo com o pH do meio alto, demonstrando que o efeito é proveniente não só pela ação dos ácidos orgânicos, mas também pela combinação de vários fatores e produtos gerados pelos *Lactobacillus*, como citados anteriormente. Costa et al. (2012) por exemplo, reporta que a ação das bacteriocinas podem ocorrer entre pH de 2 a 10, embora o efeito diminua conforme a alcalinização do meio.

Resultados semelhantes ao presente trabalho foram descritos anteriormente por Soleimaniet al. (2010), onde *L. plantarum* obteve maior inibição dentre os lactobacilos utilizados (*L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei* e *L. reuteri*) frente a *S. aureus* ATCC 25923.

De acordo com NGUYEN et al. (2010); COSTA et al. (2012) este lactobacilo dispõem de propriedades importantes e uteis. Possuem potencial para biossíntese de vários aminoácidos, diacetil, acetoina e outros metabólicos, são capazes de tolerar concentrações elevadas de ácidos ou bacteriocinas, permitindo a inibição de outros micro-organismos e favorecendo a competição num dado ecossistêmico.

Os *L. acidophilus* tiveram o menor efeito inibitório, o que pode estar relacionado á produção insuficiente de ácidos orgânicos, tornando o meio pouco ácido para a inativação do crescimento das baterias indicadoras. (DIAS; SILVA; TIMM, 2018). Outros fatores podem estar relacionados a algumas bacteriocinas que possuem alvos muito específicos e às vezes não são devidamente ativadas conforme o método utilizado ou também a impropriedade das cepas indicadoras utilizadas podem afetar sua ativação. Aliado a estes fatores, alguns autores relatam também a necessidade de um período maior de incubação para as bactérias lácticas para poderem expressar suas atividades antimicrobianas, sendo necessária a incubação de pelo menos 48 horas e também as condições de aerobiose podem modificar a produção final dos principais compostos metabólitos produzidos durante seu crescimento (DEMIR; BASBÜLBÜL, 2017; NGUYEN. et al, 2010; PEREIRA; GÓMEZ, 2007).

## 4 CONCLUSÃO

Todos os lactobacilos probióticos utilizados apresentaram atividade antimicrobiana frente às cepas indicadoras *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Porém apenas *L.plantarum* e *L. casei* obtiveram 100% de potencial de inibição *in vitro* frente as duas Enterobactérias e os *L. acidophilus* tiveram o menor efeito inibitório dentre as amostras testadas com 40% de inibição para cada cepa utilizada.

A técnica (Spot-on-the-lawn) empregada para a detecção da atividade bacteriogênica, demonstrou ser viável e adequada para o estudo proposto, pois foi possível verificar a produção de substâncias antimicrobianas pelos lactobacilos.

Portanto o estudo reafirma a importância de se isolar e caracterizar estes micro-organismos, especialmente, em relação à saúde pública, visto que a capacidade de produzir compostos antimicrobianos e a capacidade de promover a atividade antagonista contra patógenos otimiza a caracterização destes como linhagens probióticas. Assim, novos estudos são recomendados, para que no futuro possa existir um produto natural que substitua os métodos terapêuticos de alto espectro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTARUGIO, R. **Seleção e caracterização probiótica *in vitro* de *Lactobacillus* spp. Com potencial de inibição de *Salmonella* heidelberg.** 2016. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2016.

ANTUNES, A. E. C. Probióticos: agentes promotores de saúde. **Nutrire: Rev. Soc. Bras**, São Paulo, SP, v. 32, n. 3, p. 103-122, dez. 2007.

ANVISA. **Principais Síndromes Infecciosas.** 2004. Agencia Nacional de vigilância sanitária..

BADARÓ, A. C. L. et al. LIMENTOS PROBIÓTICOS: APLICAÇÕES COMO PROMOTORES DA SAÚDE HUMANA: PARTE- 1. **Nutrir Gerais – Revista Digital de Nutrição**, Ipatinga, v. 2, n. 3, p.1-29, 2008.

BERMUDEZ-BRITO, M. et al. Probiotic Mechanisms of Action. **Nutrition e Metabolism**, Espanha, p.160-174, 2012.

CARVALHO, E. B; SOARES, A. G; SOARES, L. G. A INCORPORAÇÃO DOS PROBIÓTICOS NA ALIMENTAÇÃO HUMANA. **Nutrir Gerais**, Ipatinga, v. 6, n. 10, p.900-917, 2012.

CARVALHO, M. Colonização intestinal por enterobactérias multirresistentes: convivendo com o inimigo. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 75, p.73-74, 1999.

COSTA, A. C. C. C. **Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e avaliação de sua atividade frente a patógenos alimentares em sistema de bioconservação de produto láteo.** 2016. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

COSTA, G. N. et al. Atividade antimicrobiana de Lactobacillus e Bifidobacterium frente a micro-organismos patogênicos "in vitro". **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 5, p.1839-1846, 30 out. 2012. Universidade Estadual de Londrina.

DEMIR, E.; BASBÜLBÜL, G. Screening of Bacteriocin Production in Lactic Acid Bacteria Isolated From Fermented Dairy Products. **Biotechnology Journal International**, Turkey, p.2-9, 2017.

DIAS, P. A; SILVA, D. T; TIMM, C. D. Atividade antimicrobiana de micro-organismos isolados de grãos de kefir. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, p.1-8, 17 maio 2018.

DOMINGOS, I. et al. Measurement of in vitro Inhibition by Lactobacillus spp. Against Salmonella Heidelberg. **International Journal Of Poultry Science**, Paquistão, p.183-188, 2018.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization / World Health Organization. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario, Canada. p.10-11, 30 April e 1 Maio, 2002.

FULLER, R. Probiotics in human medicine. **Gut, London**, v. 32, n. 4, p. 439-442, 1991.

KARKOW, F. J. A. et al. Probióticos: perspectivas médicas. **Revista da Amrigs**, Porto Alegre, p.38-48, 12 jun. 2007.

LEUCAS, H. L. B. **Efeitos benéficos de micro-organismos envolvidos na produção de leite fermentado**. 2012. 51 f. Monografia (Especialização) - Curso de Microbiologia Aplicada às Ciências Ambientais e Industriais, Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

LIMA, E. T. et al. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by Lactobacillus spp. isolated from chickens. **The Canadian Journal Of Veterinary Research**, Botucatu, p.103-107, 2007.

LIMA, M. G.; PEREIRA, C. A. S; NOWAK, L. D. Espécies de *Lactobacillus* e seu papel na vaginose bacteriana. **Cadernos UniFOA**, Volta Redonda, n. 28, p. 83-90, ago. 2015

NGUYEN, H. et al. Isolation and characterisation of selected lactic acid bacteria for improved processing of Nemchua, a traditional fermented meat from Vietnam. **Beneficial Microbes**, v. 1, n. 1, p.67-74, mar. 2010.

NOGUEIRA, J. C. R.; GONÇALVES, M. C. R. Probióticos: revisão da literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, Paraíba, v. 15, n. 4, p.487-492, 2011.

OKADA, B. T. T.; SILVA, J. F. S. G. **EFEITOS TERAPÊUTICOS DOS PROBIÓTICOS PARA O CONTROLE DE DOENÇAS DO TRATO GASTROINTESTINAL**: revisão da literatura. 2015. 23 f. Monografia (Especialização) - Curso de Farmácia, Faculdade de Pindamonhangaba, Pindamonhangaba, 2015.

OLIVEIRA, M. A. et al. *Enterobacteriaceae*: bactérias intestinais de organismos aquáticos, um risco à saúde pública – Revisão de literatura . **Revista Científica de Medicina Veterinária**, Jaboticaba, v. , n. 25, p.0-20, 2015.

PAIXÃO, L. A; CASTRO, F. F. S. A colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. **Universitas: Ciências da Saúde**, Brasília , v. 14, n. 1, p.85-69, 13 jul. 2016

PEHRSON, M. E. S. F. **Avaliação da atividade antimicrobiana de substâncias sintetizadas por cepas de *Lactobacillus* sp. que apresentam propriedades probióticas**. 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia Industrial, Microbiologia Aplicada, Escola de Engenharia de Lorena, São Paulo, 2013.

PEREIRA, V. G.; GOMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra micro-organismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p.229-240, 2007.

PEREIRA, V. G.; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra micro-organismos patogênicos veiculados por alimentos. **Ciências dos Alimentos**, Londrina, v.28, n. 2, p.229-240, 2007.

PINHEIRO, L. G. **Diversidade de Enterobacteriaceae e de doenças de veiculação hídrica: percepção ambiental e ações de divulgação científica em região semiárida do RN**. 2017. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

RAIZEL, R. et al. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v. 4, n. 2, p.66-74, 2011.

RIVAS, C. C. A.; RIVEIRO, C. G. D. Efecto antagónico de *Lactobacillus plantarum* em pastizal de finca lechera. **Respyn Revista de Salud Pública y Nutrición**, v.10, n. 1, 2009.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. A importância de probióticos para o controle e/ou reestruturação da biota intestinal. **Revista Científica do Itpac**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 1, p.40-49, 2011.

SILVA, J. G. S. **Identificação molecular de bactérias ácido lácticas e propriedades probióticas in vitro de *Lactobacillus* spp. Isolados de queijo minas artesanal de Araxá, Minas Gerais**. 2016. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência Animal, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Goiânia, 2016.

SOLEIMANI, N. A. et al. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **African Journal Of Microbiology Research**, Iran, p.2170-2173, 18 out. 2010.

STÜRMER, E. S. et al. A importância dos probióticos na microbiota intestinal humana. **Revista Brasileira de Nutrição**, Canoas, p.264-272, 2012.

SUMITA, T. C. **Caracterização de cepas de Lactobacillus isolados de fezes humanas quanto às propriedades probióticas.** 2007. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Industrial, Biotecnologia Aplicada, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

TEIXEIRA, R. S. **Avaliação do efeito imunomodulador e carrapaticida de micro-organismos probióticos em bovinos da raça Girolando.** 2017. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Departamento de Biotecnologia. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 2017.