

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO

Propriedades Probióticas de *Lactobacillus* spp. de
Origem Humana e Interação com Leveduras
Potencialmente Patogênicas do Gênero *Candida*

Victor Hugo do Nascimento Cypriano

2013



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DO JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**PROPRIEDADES PROBIÓTICAS DE *Lactobacillus* spp. DE ORIGEM
HUMANA E INTERAÇÃO COM LEVEDURAS POTENCIALMENTE
PATOGENICAS DO GÊNERO *Candida***

VICTOR HUGO DO NASCIMENTO CYPRIANO

Sob a Orientação da Professora
Rosa Helena Luchese

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos

Seropédica, RJ
Julho de 2013

613.2

C996p

T

Cypriano, Victor Hugo do Nascimento, 1988-
Propriedades probióticas de
Lactobacillus spp. de origem humana e
interação com leveduras potencialmente
patogênicas do gênero *Candida* / Victor
Hugo do Nascimento Cypriano - 2013.
38 f.: il.

Orientador: Rosa Helena Luchese.
Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos.

Bibliografia: f. 26-29.

1. Alimentos funcionais - Teses. 2.
Prebióticos - Teses. 3. Probióticos -
Teses. 4. Lactobacilo - Teses. 5. *Candida*
albicans - Teses. I. Luchese, Rosa Helena,
1957-. II. Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos. III.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

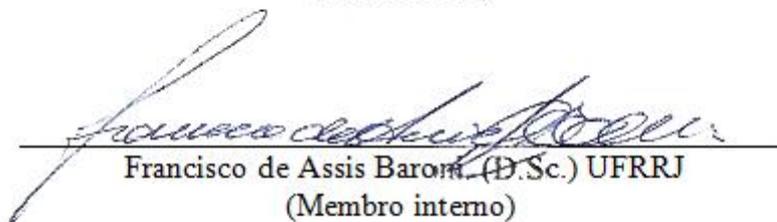
VICTOR HUGO DO NASCIMENTO CYPRIANO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos.

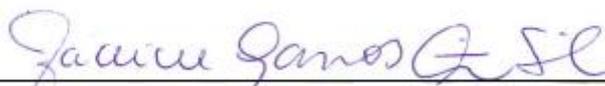
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 30 DE JULHO DE 2013



Rosa Helena Luchese. (Ph.D.) UFRRJ
(Orientadora)



Francisco de Assis Baroni. (D.Sc.) UFRRJ
(Membro interno)



Janine Passos Lima da Silva. (D.Sc.) EMBRAPA/CTAA
(Membro externo)

Dedico este trabalho à minha mãe, Maria, e à minha irmã, Gabriela, de quem eu sempre recebi muita dedicação, muito carinho e muito incentivo nos estudos e no caráter, para que eu me tornasse o homem que eu sou hoje.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu eterno Mestre, que sempre me concede forças para superar meus obstáculos e vencer todos os meus desafios.

À minha família, meu porto seguro, pelo incentivo dado a mim para que continuasse estudando e pelo conforto nas horas em que eu me cansava.

Aos meus amigos, de perto e de longe, pela compreensão nos momentos de ausência devidos à pesquisa e pela descontração quando eu já não podia pensar direito.

À minha orientadora, Professora Ph.D. Rosa Helena Luchese, pela confiança depositada em mim para a realização deste trabalho e pelo apoio em todos os momentos.

Aos membros da banca examinadora do projeto e da dissertação, pelas contribuições feitas ao trabalho e por aceitar o convite de fazer a avaliação.

Aos amigos da minha turma de mestrado, pela companhia, pela convivência, pelas risadas, pelos ensinamentos diversos e pelo laço de afeto que jamais se dissolverá.

Aos técnicos, professores e alunos dos Laboratórios de Microbiologia e Fermentações, pelo auxílio prestado, pelos bons diálogos e conhecimentos comigo divididos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida para financiar meus estudos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelo suporte acadêmico, pedagógico e pessoal recebido.

Por fim, a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pela oportunidade de estudar e fazer ciência em um lugar aconchegante bem perto de casa.

*“Não são as respostas que movem o mundo,
são as perguntas.”*

(Albert Einstein)

RESUMO

CYPRIANO, Victor Hugo do Nascimento. **Propriedades probióticas de *Lactobacillus* spp. de origem humana e interação com leveduras potencialmente patogênicas do gênero *Candida***. 2013. 37f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

A disbiose ou desequilíbrio da microbiota intestinal torna-se um problema cada vez mais frequente na atualidade, tendo como consequência várias doenças relacionadas. O consumo de alimentos enriquecidos com prebióticos e probióticos pode promover o bom funcionamento do aparelho gastrointestinal, especialmente no que se refere à exclusão competitiva de patógenos e estimulação do sistema imune. A capacidade de autoagregação tem sido correlacionada com a adesão, um pré-requisito para colonização e infecção do trato gastrointestinal por patógenos. A capacidade de coagregação de microrganismos probióticos e consequentemente a exclusão competitiva de patógenos são requisitos importantes na modulação da microbiota intestinal para a manutenção da saúde. Esta pesquisa teve por objetivo estudar mecanismos pelos quais *Lactobacillus* spp. se estabelecem no intestino e interagem com linhagens de *Candida albicans* potencialmente patogênicas. Foram realizados testes a fim de verificar se os lactobacilos possuem a capacidade de agregar suas próprias células e as células das leveduras. Posteriormente, avaliou-se a afinidade a hidrocarbonetos e a capacidade de inibição contra as leveduras. Dentre os isolados bacterianos estudados, Lac 2 e Lac 4 – ambas identificadas como *L. paracasei* spp. paracasei – e a cultura comercial *L. acidophilus* LA-5 apresentaram taxas mais elevadas de autoagregação e coagregação ($p < 0,05$) quando comparados às demais culturas (Lac 1, Lac 3 – identificados com *L. rhamnosus* – e a cultura comercial *L. casei*-01), indicando que existe correlação entre estas duas variáveis. Com o teste de hidrofobicidade não foi possível observar a mesma correlação, visto que apenas Lac 2 e LA-5 apresentaram valores consideráveis de hidrofobicidade. Foi observada inibição do crescimento de *Candida albicans* através da cocultura em meio líquido com médias de redução em torno de 2 log, atribuindo-se aos isolados Lac 1 e Lac 3 as maiores reduções. Finalmente, não foi observada inibição de leveduras por difusão em placa pelo filtrado livre de células de lactobacilos com nenhuma das culturas; da mesma forma, no teste da autoagregação utilizando estes mesmos filtrados não foi observado efeito significativo ($p < 0,05$). Conclui-se que as características analisadas se devem a diferentes fatores, além de serem específicos para cada cepa de uma mesma espécie. Para as bactérias estudadas, os mecanismos de adesão provavelmente estão relacionados a moléculas presente na superfície celular, não havendo produção importante de substâncias extracelulares. Estudos mais profundos são necessários para elucidar os mecanismos da exclusão competitiva de patógenos.

Palavras-chave: perfil bioquímico, mucosa intestinal, agregação.

ABSTRACT

CYPRIANO, Victor Hugo do Nascimento. **Probiotics properties of human-origin *Lactobacillus* spp. and interaction with potentially pathogenic yeasts of the genus *Candida***. 2013. 37f. Dissertation (Master Science in Food Science and Technology). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

The dysbiosis, imbalance of the intestinal microbiota, becomes an increasingly common problem nowadays, resulting in various diseases. Consumption of foods enriched with prebiotics and probiotics can promote the proper functioning of the gastrointestinal tract, particularly regarding to competitive exclusion of pathogens and immune system stimulation. Auto-aggregation has been correlated with adherence, a precondition for colonization and infection of the intestinal tract. The probiotics' ability of coaggregation and therefore the competitive exclusion of pathogen are important in modulating the gut microbiota for maintaining health. The aim of this research was study mechanisms which *Lactobacillus* spp uses to colonize the intestine and interact with potentially pathogenic yeasts of the genus *Candida*. Tests were conducted to verify if lactobacilli have the ability to aggregate their own cells and yeast cells. Subsequently, we evaluated the affinity to hydrocarbons and inhibition capacity against yeast. The isolates Lac 2 and Lac 4 - both identified as *L. paracasei* spp. *paracasei* - and the standard culture *L. acidophilus* LA-5 showed high rates of auto-aggregation and coaggregation ($p < 0.05$) when compared to other cultures (Lac 1, Lac 3 - both identified as *L. rhamnosus* - and commercial culture *L. casei*-01), indicating the existence of correlation between these two variables. Hydrophobicity's test did not show the same correlation, because only Lac 2 and LA-5 results were considerably high. Growth inhibition of *Candida albicans* by co-cultivation in liquid medium was got with a mean reduction of about 2 log: Lac 1 and Lac 3 showed the best results. Finally, plate inhibition of yeast using cell-free filtrates of lactobacilli was not obtained by any of the cultures; likewise, in auto-aggregation test using filtrates was not observed any significant effect ($p < 0,05$). It is concluded that the characteristics analyzed are due to different factors and they are species-specific or restricted to lower taxonomic levels. For our cultures, the adhesion mechanisms are probably related to molecules present on the cell surface, with no important production of extracellular substances. More detailed studies are needed to elucidate the mechanisms involved in competitive exclusion of pathogens. Beneficial bacteria isolated from human origin have great potential for use as probiotics.

Keywords: biochemical profile, intestinal mucous, aggregation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma dos testes de interação entre <i>Lactobacillus</i> spp. e <i>Candida albicans</i> .	10
Figura 2. Cultivos dos isolados de <i>Lactobacillus</i> spp. em caldo MRS.	16
Figura 3. Autoagregação dos isolados de <i>Lactobacillus</i> . (A) após contato por uma hora; (B) após contato por 24 horas.	17
Figura 4. Coagregação de células lactobacilos com <i>Candida albicans</i> – Lev I.	18
Figura 5. Coagregação de células lactobacilos com <i>Candida albicans</i> – Lev II.	19
Figura 6. Coagregação de células lactobacilos com <i>Candida albicans</i> – Lev III.	19
Figura 7. Observação microscópica de coagregação entre células de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (Lac 1) e <i>Candida albicans</i> (Lev I).	20
Figura 8. Percentual de adesão de lactobacilos a hidrocarbonetos.	21
Figura 9. Crescimento de <i>Candida albicans</i> cocultivadas com <i>Lactobacillus</i> spp.	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	2
2.1 Geral	2
2.2 Específicos	2
3 REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1 Prebióticos	3
3.2 Probióticos	3
3.3 Simbióticos	4
3.4 Interação entre probióticos e patógenos intestinais	4
3.4.1 <i>Lactobacillus</i> spp.	4
3.4.2 Disbiose intestinal	5
3.4.3 Leveduras do gênero <i>Candida</i> como causadores de disbiose intestinal	5
3.5 Exclusão competitiva	6
3.5.1 Exclusão por mecanismos de adesão e agregação	6
3.5.2 Lectinas e o sistema complemento	7
3.5.3 Produção de substâncias antimicrobianas e competição por nutrientes	8
4 MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1 Culturas de lactobacilos e leveduras do gênero <i>Candida</i>	9
4.2 Padronização do inóculo	9
4.3 Identificação dos microrganismos	9
4.3.1 Leveduras	9
4.3.2 Lactobacilos	10
4.4 Interação entre lactobacilos e leveduras	10
4.4.1 Autoagregação em presença dos filtrados de cultura de lactobacilos	10
4.4.2 Autoagregação e coagregação	11
4.4.2.1 Autoagregação entre células de lactobacilos	11
4.4.2.2 Coagregação entre células de lactobacilos e leveduras	11
4.4.3 Hidrofobicidade	12
4.4.4 Inibição do crescimento de leveduras por lactobacilos	12
4.4.4.1 Método em meio líquido utilizando células viáveis de lactobacilos	12
4.4.4.2 Método da difusão em ágar para teste dos filtrados de lactobacilos	12
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5.1 Identificação dos microrganismos	14
5.1.1 Leveduras	14
5.1.2 Lactobacilos	14
5.1.2.1 Identificação preliminar	14
5.1.2.2 Identificação bioquímica	14
5.2 Autoagregação utilizando o filtrado de cultura de lactobacilos	15
5.3 Autoagregação entre células de lactobacilos	16
5.4 Coagregação entre células de lactobacilos e leveduras	18
5.5 Hidrofobicidade	21
5.6 Inibição do crescimento de leveduras em meio líquido	22
5.7 Inibição do crescimento de leveduras por difusão do filtrado em ágar.	24
6 CONCLUSÃO	25
7 REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

A disbiose intestinal tem se tornado um problema cada vez mais frequente na atualidade, referida em grande parte dos diagnósticos. Causada por diversos fatores, ela constitui a perda do equilíbrio na microbiota intestinal e pode ter consequências que vão desde diarreias e dores abdominais até inflamações e câncer. O melhor caminho para se prevenir e tratar tal enfermidade é através de uma alimentação balanceada e dietas. Uma nova abordagem que está surgindo recentemente relaciona o consumo de alimentos enriquecidos com substâncias não digeríveis (prebióticos) e microrganismos vivos (probióticos) que juntos possam atuar na modulação da atividade do sistema gastrointestinal e no controle da população microbiana local – estes alimentos recebem a denominação de simbióticos.

Devido à importância cada vez maior que os consumidores dão à alimentação como fator preponderante na manutenção de sua saúde e bem-estar, com atenção especial aos alimentos funcionais, torna-se oportuno explorar esse universo para pesquisar e produzir produtos que venham trazer benefícios na prevenção e até mesmo no tratamento de diversas patologias. Visto que a alimentação é um meio relativamente fácil de atingir a população, torna-se vantajoso produzir alimentos com propriedades preventivas e curativas, tendo como resultado o aumento da qualidade de vida das pessoas. Além disso, os alimentos funcionais vêm com a proposta de não ter efeitos colaterais, o que pode favorecer e muito a aceitação da população com relação ao seu consumo e disseminação.

Sem dúvida o principal benefício atribuído aos probióticos é a exclusão competitiva de patógenos, através de diferentes mecanismos entre os quais: a) competição por um sítio de ação no epitélio intestinal como ocorre com lactobacilos que inibem diretamente a ligação de *Salmonella*, *Escherichia coli* e outros patógenos de origem alimentar; b) secreção de fatores inibidores da aderência e internalização de patógenos, além de aumento da secreção de muco como ocorre com lactobacilos que estimulam a secreção de mucinas que inibem a aderência de *E. coli* enteropatogênica; c) estímulo ao efeito de barreira na mucosa, como no caso dos lactobacilos e bifidobactérias que auxiliam na barreira epitelial e previnem que patógenos induzam um aumento na permeabilidade intestinal (MORO e ARSLANOGLU, 2005).

Dentre as bactérias com conhecido poder probiótico, destacam-se as do gênero *Lactobacillus*, capazes de produzir compostos antimicrobianos e competir por sítios de adesão, além de interagir diretamente com os microrganismos patogênicos, evitando sua multiplicação descontrolada, que poderia ocasionar desequilíbrio da função normal intestinal.

A exclusão competitiva de patógenos é o principal requisito de um microrganismo probiótico e a agregação de células probióticas é uma propriedade desejável para isso. Microrganismos com capacidade de coagregar outras células, como um patógeno, por exemplo, podem apresentar vantagem competitiva sobre aqueles que não têm essa propriedade e são mais facilmente removidos do ambiente intestinal. A adesão de bactérias ao epitélio intestinal é um processo complexo que envolve mecanismos não específicos (hidrofobicidade) e ligação a receptores específicos. Muitos autores consideram que o poder de coagregação de espécies de *Lactobacillus* possa permitir que formem uma barreira que previna a colonização por bactérias patogênicas (BORIS, SUAREZ E BARBÉS, 1997).

Considerando que a capacidade de agregar e coagregar são propriedades desejáveis de um probiótico, esta pesquisa teve por objetivo avaliar as propriedades de autoagregação, de adesão a hidrocarbonetos e de coagregação com leveduras do gênero *Candida*, além da capacidade de inibir seu crescimento celular, como forma de realizar uma seleção preliminar de isolados de *Lactobacillus* de origem humana.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar aspectos da exclusão competitiva de leveduras potencialmente patogênicas do gênero *Candida*, por espécies de *Lactobacillus*.

2.2 Específicos

- Identificar fenotipicamente culturas de lactobacilos isolados da microbiota intestinal de lactentes;
- Determinar a capacidade de autoagregação de linhagens de *Lactobacillus* spp.;
- Determinar a capacidade de coagregação entre células de *Lactobacillus* spp. e de *Candida* spp.;
- Avaliar a hidrofobicidade celular de *Lactobacillus* através do teste de adesão a hidrocarbonetos;
- Determinar a capacidade inibitória de filtrados livres de células de lactobacilos contra leveduras em meio sólido;
- Determinar a capacidade inibitória de células de lactobacilos contra leveduras em meio líquido;
- Averiguar a existência de correlação entre as propriedades relacionadas à exclusão competitiva.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Prebióticos

Os prebióticos são definidos como componentes alimentares, não digeríveis pelas enzimas do nosso organismo, capazes de estimular seletivamente o crescimento e a atividade de populações da microbiota intestinal que venham a trazer benefício à saúde humana, além de estimular a motilidade intestinal e regular a absorção de nutrientes. Seu efeito de modulação da microbiota está relacionado ao fato de que, de acordo com as propriedades da substância ingerida, serão metabolizadas por um número limitado e específico de bactérias benéficas presentes no intestino, que aumentarão sua população e inibirão o crescimento de outras que possam causar doenças; os prebióticos não podem servir de fonte de alimento para estas últimas (STEFE, ALVES e RIBEIRO, 2008).

Tratando-se, em sua maioria, de carboidratos não digeríveis, os prebióticos já são amplamente comercializados na Europa e no Japão na forma de adoçantes funcionais e como ingredientes de bebidas lácteas, balas, doces, chocolate, biscoitos, geleias, pudins e gomas de mascar. Entre as substâncias classificadas como prebióticos, podemos citar: lactulose, lactitol, xilitol, inulina, fruto-oligossacarídeos e galacto-oligossacarídeos. Sua utilização por bactérias gera metabólitos que podem possuir a propriedade de modulação da microbiota, pois podem alterar fatores com pH, acidez e mediar interações entre os microrganismos, bem como exercerem ação inibitória contra microrganismos indesejáveis (SAAD, 2006).

3.2 Probióticos

Os probióticos já tiveram diversas definições ao longo dos anos. Todavia, a mais aceita atualmente é a de que são microrganismos cuja administração em quantidades adequadas promove benefícios à saúde e ao bom funcionamento do organismo do hospedeiro. Eles possuem a propriedade de controlar a população microbiana intestinal através da promoção de efeitos antagônicos e competição contra bactérias patogênicas e estimulação do sistema imunológico. Outros benefícios obtidos pela sua ingestão envolvem a redução do colesterol, prevenção de doenças inflamatórias, diarreias e neoplasias, síntese de vitaminas e efeitos que se estendem para além do sistema gastrointestinal (SAAD, 2006).

Para que determinado microrganismo seja considerado probiótico, foram escolhidos diversos critérios para sua seleção, dentre os quais podemos destacar: origem humana, resistência à bile, ácidos e sucos digestivos, adesão e segurança. No entanto, é praticamente impossível que uma única linhagem consiga agrupar todos os requisitos, portanto, a estratégia adequada é encontrar indivíduos que possuam um conjunto de características direcionadas para determinado tratamento. Os probióticos mais estudados e aceitos ultimamente pertencem a dois gêneros – *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sendo que outras bactérias e algumas leveduras também desempenham esse papel. A seguir, na Tabela 1, são apresentados critérios utilizados para a seleção de probióticos e sua relação com a prevenção da diarreia e o restabelecimento do equilíbrio da microbiota intestinal.

Tabela 1. Critérios utilizados para seleção de cepas probióticas e correspondência ao efeito alegado (adaptado de Garcia, 1999).

Critério de seleção	Prevenção da diarreia	Restauração do balanço microbiano
Origem humana	S	+
Resistência à bile	+	+
Resistência ao pH ácido	+	+
Colonização	+	+
Adesão	+	+
β -galactosidase	+	+
Assimilação de colesterol	S	S
Redução na produção de compostos carcinogênicos	S	+
Redução na produção de aminas	S	+
Estimulação imune	#	-
Antimutagenicidade	S	+
Produção de bacteriocina	-	#
Resistência a antibióticos	+	#
Tolerância ao oxigênio	+	S
Segurança	+	+

(+) critério com correspondência positiva ao efeito atribuído

(-) critério com correspondência negativa ao efeito atribuído

(#) critério com pontos favoráveis e desfavoráveis

(S) critério sem influência no efeito alegado

3.3 Simbióticos

Visando a introdução de microrganismos benéficos no trato intestinal e o fornecimento de condições favoráveis ao seu crescimento e desenvolvimento, surgiram os simbióticos, que seriam alimentos preparados pela associação de prebióticos e probióticos. Esta combinação visa possibilitar a sobrevivência das culturas nos alimentos e mesmo sua passagem pelo ambiente gástrico, permitindo que cheguem até o intestino. O ideal é que o componente prebiótico seja metabolizável pelo probiótico utilizado na formulação (STEFE, ALVES e RIBEIRO, 2008).

3.4 Interação entre probióticos e patógenos intestinais

3.4.1 *Lactobacillus* spp.

O gênero *Lactobacillus* é constituído por bactérias Gram positivas, não esporuladas, sem flagelos e produtoras de catalase; estão amplamente distribuídos pela natureza, mas podem também ser encontrados sobre a superfície de plantas e em tecidos animais, inclusive

do homem. Podem ser anaeróbios ou facultativos e, quanto ao metabolismo, existem representantes tanto homofermentativos quanto heterofermentativos. Os lactobacilos são os bacilos de Döderlein da microbiota vaginal e estão entre as bactérias encontradas no trato intestinal de boa parte da população saudável (BORIS, SUAREZ E BARBÉS, 1997).

Segundo Pereira e Gómez (2007), os lactobacilos estão inseridos dentro do grupo das bactérias lácticas, e muitas espécies são utilizadas na indústria alimentícia – como culturas iniciadoras em fermentados e outros produtos – podendo-se citar, como exemplos, *L. casei* e *L. acidophilus*. Além disso, eles são responsáveis pelo aumento da vida de prateleira destes produtos, graças à produção de substâncias antimicrobianas e ao seu efeito competitivo, evitando que microrganismos deteriorantes ou patogênicos consigam crescer e se estabelecer nos alimentos.

Lactobacilos apresentam algumas propriedades interessantes: adesão às células epiteliais da mucosa intestinal de forma semelhante como ocorre no epitélio vaginal, interação com células de patógenos, produção de substâncias antimicrobianas como peróxido de hidrogênio, ácido láctico e bacteriocinas, e competição por sítios de ligação às células intestinais (PEREIRA e GÓMEZ, 2007).

Todas estas características, somadas à capacidade de algumas espécies resistirem às condições adversas do trato gastrointestinal (acidez, bile, enzimas digestivas) até chegarem ao local de colonização fazem dos lactobacilos fortes candidatos a serem utilizados em formulações probióticas e simbióticas, visando a prevenir o desequilíbrio da microbiota autóctone e a colonização intestinal por patógenos oportunistas. Uma última característica essencial dessas bactérias é o fato de elas serem reconhecidamente seguras (GRAS – “generally recognized as safe”), isto é, não apresentarem efeitos adversos à saúde do hospedeiro como ocorre com uso de antibióticos (PAN et al, 2009).

3.4.2 Disbiose intestinal

O acúmulo de maus tratos com a função intestinal pode desequilibrar a microbiota do local, promovendo o aumento do número de microrganismos patogênicos em detrimento daqueles que são benéficos ao organismo. Estes, por sua vez, podem trazer consequências sérias à saúde do hospedeiro, afetando a digestão e absorção de nutrientes no intestino delgado, produzindo toxinas, causando mal estar, diarreia e inflamação, e produzindo substâncias peptídicas mutagênicas e carcinogênicas através da combinação de toxinas e proteínas oriundas da alimentação. Todo esse processo é denominado disbiose intestinal e constitui um problema cada vez mais frequente em todo o mundo. A antibioticoterapia pode ser um fator desencadeante dessa patologia, pela possibilidade de conferir resistência aos patógenos intestinais e também pela eliminação das bactérias benéficas ao local. Outros fatores que podem ser considerados são a má alimentação, consumo excessivo de alimentos processados, estresse, entre outros. O uso de prebióticos, probióticos e simbióticos está entre as possíveis abordagens que visam o tratamento e a prevenção desse distúrbio, assim como a adoção de dietas balanceadas (ALMEIDA et al., 2009).

3.4.3 Leveduras do gênero *Candida* como causadores de disbiose intestinal

Entre os agentes importantes no desenvolvimento da disbiose intestinal está *Candida albicans*, levedura que pode estar presente na microbiota do intestino de animais como comensal, tornando-se patogênica em condições específicas. Ela possui metabolismo aeróbico, mas consegue se desenvolver em anaerobiose, como se observa no cólon humano. É

capaz de fermentar carboidratos e produzir substâncias potencialmente prejudiciais, transgredindo o funcionamento harmônico do sistema gastrointestinal, comprometendo a saúde do indivíduo. *C. albicans* produz também gliotoxinas, compostos com vários efeitos biológicos, dentre os quais atividades antibacterianas, antivirais e imunossupressoras, esta última pela fragmentação do DNA de glóbulos brancos do sangue (SHAH et al, 1998).

Outro fator de virulência de *Candida* spp. é a produção de adesinas que mediam sua fixação a células da mucosa ou do endotélio hospedeiro e a proteínas da matriz extracelular. Com isso, há a formação dos biofilmes, estruturas que atuam na comunicação entre os microrganismos presentes (*quorum* sensing) e os protegem contra a resposta imunológica. E dependendo da situação, as leveduras podem produzir proteínas inativadoras de anticorpos e fatores do complemento. Ainda para escapar do ataque imunológico, estas leveduras são capazes executar um mecanismo de mudança da estrutura de sua parede celular, dificultando o reconhecimento delas pelas células apresentadoras de antígenos (SCHULZE e SONNENBORN, 2009).

3.5 Exclusão competitiva

Os probióticos agem principalmente por exclusão competitiva. Segundo Nurmi (1973), pintainhos recém-nascidos aos quais foi administrada alimentação contendo fezes de adultos adquiriram resistência à infecção por *Salmonella infantis*, indicando que nos organismos dos adultos já havia uma microbiota benéfica bem desenvolvida. Sua atuação parece estar relacionada com adesão a sítios específicos no epitélio intestinal, reduzindo assim a colonização por patógenos seja pelo impedimento da aderência ou pelo destacamento dos microrganismos. Alguns autores argumentam sobre a adesão à mucina e às células produtoras de muco (células de Goblet), bem como às células epiteliais (SAVAGE, 1992).

Lactobacillus spp. tem capacidade de controlar a população microbiana saprófita do intestino. Ao que parece, as estratégias relacionadas à função de controle da microbiota intestinal são a produção de substâncias com atividade antimicrobiana, a adesão ao epitélio intestinal e coagregação aos demais microrganismos (WYNNE et al, 2004).

3.5.1 Exclusão por mecanismos de adesão e agregação

Quando se fala em adesão, o mecanismo envolve ligação entre adesinas presentes na superfície celular do microrganismo e receptores celulares da mucosa intestinal. A capacidade de proteção exercida pelos comensais da microbiota contra a colonização do trato intestinal por microrganismos patogênicos é denominada exclusão competitiva (SANDERS, 1993). Essa interação despertou o interesse de estudos da administração de componentes naturais não digeríveis junto à alimentação com o objetivo de intervir ou suprimir a aderência de patógenos a superfície intestinal. Como existem carboidratos não digeríveis, metabolizáveis por bactérias específicas que podem fazer parte da microbiota ou serem introduzidas nela, tal como os lactobacilos, surgiu a ideia de associar os dois conhecimentos, levantando a possibilidade de administração de substâncias prebióticas que possam suprimir adesão de culturas patogênicas e ao mesmo tempo, estimular o crescimento e colonização dos *Lactobacillus* da microbiota ou probióticos. Essa nova abordagem define a ecoimunonutrição (GIBSON et al., 1995; NOUSIAINEN e SETÄLÄ, 1998).

Um número de proteínas de reconhecimento/contacto de bactérias probióticas incluem lectinas, enzimas e outros fatores envolvidos no metabolismo de carboidratos, na interação microrganismo-microrganismo e microrganismo-hospedeiro. Lactobacilos sintetizam lectinas.

Entretanto, as proteínas de *Lactobacillus* são pouco estudadas e suas funções permanecem obscuras. O potencial de reconhecimento de *L. acidophilus* e outros lactobacilos incluem interações do tipo mucina-mucina e manana-manana, glicoproteínas dentro do intervalo de 49-71 kDa (UCHIDA et al., 2006).

Em relação à coagregação – processo pelo qual bactérias geneticamente distintas se aderem umas as outras via moléculas específicas – três mecanismos têm sido relacionados. O primeiro diz respeito à interação entre componentes da superfície celular, em que as proteínas de aderência (adesinas) são lectinas – proteínas de origem não imunológica que realizam aglutinação celular graças a sua propriedade de se ligar de forma reversível a carboidratos. Este mecanismo parece ser o observado na aglutinação de células de leveduras por espécies de *Lactobacillus* através de ligação a manose presente na parede celular de leveduras (ADLERBERTH et al., 1996). Nos dois mecanismos restantes, as adesinas não são lectinas. Eles se baseiam, respectivamente, na secreção de uma proteína específica que media agregação e altera a frequência de conjugação, e secreção de ferormônios sexuais, também capazes de alterar a frequência da conjugação (MORI, SAKAGAMI e NARITA, 1984; RENIERO et al., 1992).

A parede celular de leveduras consiste de polissacarídeos contendo manose (manana). *Escherichia coli* e outras enterobactérias portadoras de receptores contendo adesinas manose-específicas aglutinam células de leveduras. Desta forma, a capacidade de ligar-se às células de leveduras pode ser uma indicação de atividade específica a manose. Portanto, a lectina ligadora de manose (MBL) tem papel fundamental na defesa contra *Candida albicans*. A adesão de *Lactobacillus plantarum* às células do cólon humano (HT-29) é devido a um mecanismo sensível a manose. (ADLERBERTH et al, 1996).

3.5.2 Lectinas e o sistema complemento

Outro mecanismo de exclusão competitiva envolve a ativação do sistema do complemento por moléculas como o ácido teicoico (parede celular) e fragmentos de peptidoglicano. Probióticos são conhecidos também por secretar substâncias que inibem a internalização e a adesão de patógenos, assim como aumento na secreção de muco, como ocorre com lactobacilos que estimulam a secreção de mucina, inibindo a aderência de *E. coli* enteropatogênica. O estímulo à barreira da mucosa por lactobacilos e bifidobactérias que ajudam a prevenir que patógenos induzam um aumento da permeabilidade do intestino também tem sido relatado como uma ação observada na exclusão competitiva.

Sabe-se que no sistema de defesa do organismo contra patógenos muitas vezes a interação dos anticorpos com antígenos é eficiente por si só. Entretanto em outras ocasiões a ligação de anticorpos a antígenos não produz função útil a menos que ela possa ativar um mecanismo efetivo, seja ele celular ou humoral. O sistema complemento participa nestas funções efetoras, sendo composto por proteínas de superfície e séricas, participando das defesas inatas (natural) e adquiridas (memória). Inúmeras proteínas do complemento são proteases que se autoativam por clivagem proteolítica e essa cascata de ativação. A via das lectinas utiliza uma proteína para ativar a cascata do complemento, a lectina ligadora de manose (MBL). A MBL se liga a resíduos de manose e outros carboidratos, organizados em um padrão, que recobrem superficialmente muitos patógenos. As pessoas deficientes em MBL têm maior suscetibilidade a infecções na infância, o que mostra a importância da via da lectina na defesa do hospedeiro (JANEWAY et al., 2007).

3.5.3 Produção de substâncias antimicrobianas e competição por nutrientes

Existe uma série de outros produtos, especialmente sintetizados por lactobacilos, capazes de apresentar atividade contra microrganismos indesejáveis, entre os quais ácido láctico causando redução do pH intestinal, assim como de ácidos graxos voláteis como acetato, propionato e butirato, peróxido de hidrogênio, proteínas e/ou peptídeos (bacteriocinas) com ação inibitória contra grupos selecionados de bactérias. Relatos de alguns trabalhos sugerem também que os probióticos fazem uma rápida metabolização de substratos, tornando-os indisponíveis aos patógenos e eliminando-os por competição de nutrientes (MORO e ARSLANOGLU, 2005; REID, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Culturas de lactobacilos e leveduras do gênero *Candida*

As culturas de lactobacilos e leveduras fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFRRJ, sendo isolados intestinais de lactentes provenientes do trabalho de doutoramento de Oliveira (2011). Também foram utilizadas como padrão de referência duas culturas comerciais: *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Lactobacillus casei*-01, doadas pela Christian Hansen.

Para estoque, as leveduras foram mantidas a 5°C em tubos contendo ágar batata dextrose (ABD) inclinado, enquanto os lactobacilos foram mantidos congelados a -20°C. O procedimento de congelamento da massa celular das culturas de lactobacilos consistiu na distribuição do terceiro cultivo consecutivo em caldo MRS (De Man, Rogosa e Sharpe, 1960) em volumes de 1.5 mL em tubos Eppendorf, seguida de centrifugação (10.000 x g, 10 °C, 10 minutos). O sobrenadante foi desprezado e a massa celular reconstituída com 1,0 mL de caldo MRS adicionado de 15% de glicerol como crioprotetor. As culturas de trabalho foram preparadas por três transferências sucessivas em caldo MRS ou caldo extrato de malte/extrato de levedura peptonada respectivamente para lactobacilos e leveduras.

4.2 Padronização do inóculo

Visando obter um parâmetro para se conhecer a concentração correta do inóculo de cada linhagem de *Lactobacillus* sp. e *Candida* sp., foi realizado um procedimento de calibração, relacionando o valor de absorbância das suspensões diluídas preparadas a partir do crescimento em caldo com a contagem de unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) em placa, mediante incubação a condições adequadas. A suspensão de células obtida da terceira transferência em caldo MRS foi centrifugada e lavada duas vezes com 2 mL de tampão fosfato pH 7,0-7,5. Diluições de 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100 foram preparadas em tampão fosfato pH 7,2 e o valor da absorbância de cada diluição determinado em espectrofotômetro (1105, BEL PHOTONICS SP, USA) a 600 nm. Ao mesmo tempo foi realizada a contagem de células por inoculação de diluições seriadas em Agar MRS e incubadas a 36 °C. A curva foi linearizada de forma a obter uma equação do 1º grau.

4.3 Identificação dos microrganismos

4.3.1 Leveduras

A identificação das leveduras quanto à espécie foi realizada utilizando-se as provas de produção de tubo germinativo em soro sanguíneo (2 a 3 horas de incubação) para identificação de *Candida albicans* ou *C. dubliniensis* e de formação de clamidoconídios em meio Ágar Rice (Difco Laboratories®), para diferenciação de *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*. Além dos testes morfológicos, os isolados foram submetidos a testes bioquímicos de identificação automatizada através de aparelho VITEK® (Biomérieux, França) e também em meio cromogênico específico para *Candida* spp. (Chromagar®, BD-BBL).

4.3.2 Lactobacilos

Os isolados de lactobacilos foram previamente identificados através da realização de coloração de Gram, seguida dos testes da catalase e oxidase, do crescimento a 15 °C e a 45 °C e da digestão do soro de Loeffler. Finalmente, foi feita a identificação bioquímica das culturas pelo estudo do perfil de fermentação de carboidratos, utilizando a bateria de testes API 50 CHL, para lactobacilos (Biomérieux[®], França). Os perfis de fermentação dos carboidratos no API 50 CHL foram processados com o auxílio do software apiweb[™] (Biomérieux), disponível no endereço eletrônico: <https://apiweb.biomerieux.com/index.jps>.

4.4 Interação entre lactobacilos e leveduras

Para compreender a interação que ocorre entre lactobacilos e leveduras, primeiramente foram realizados testes com o objetivo de verificar se os lactobacilos possuem a capacidade de agregar suas próprias células e as células das leveduras, além de testar a afinidade de sua superfície a hidrocarbonetos. Por último, verificou-se a existência de efeito inibitório exercido pelos isolados de *Lactobacillus* sobre as leveduras. Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos – DTA-IT/UFRRJ. Os testes realizados estão esquematizados na Figura 1 abaixo.



Figura 1. Fluxograma dos testes de interação entre *Lactobacillus* spp. e *Candida albicans*.

4.4.1 Autoagregação em presença dos filtrados de cultura de lactobacilos

Inicialmente, obtiveram-se os filtrados da seguinte maneira: após crescimento a 37 °C por 24 horas, as culturas foram centrifugadas (10.000 x g, 20 °C, 2 minutos) e os sobrenadantes foram recolhidos e esterilizados por filtração em membrana de 0,22 µm, sendo depois mantidos em refrigeração.

Para o teste, culturas de lactobacilos em caldo MRS incubadas a 37 °C por uma noite foram centrifugadas (3300 x g, 20 °C, 2 minutos) e lavadas três vezes com solução tampão fosfato. A seguir, os pellets lavados foram ressuspensos em tubos Eppendorf contendo os sobrenadantes filtrados e esterilizados previamente reservados. Após incubação à temperatura ambiente, os tubos foram observados após 30, 60 e 90 minutos. O fenômeno de agregação foi

considerado positivo quando houvesse precipitação de partículas visíveis pelas paredes e no fundo dos tubos Eppendorf, de acordo com Boris, Suarez e Barbés (1997).

4.4.2 Autoagregação e coagregação

Para investigar a agregação entre células de lactobacilos e agregação destas com leveduras potencialmente patogênicas foi utilizada uma modificação das metodologias descritas por Botes, Loos e Reenem (2008) e Collado, Meriluoto e Salminen (2008).

4.4.2.1 Autoagregação entre células de lactobacilos

Culturas de 18h de lactobacilos em caldo MRS foram centrifugadas (3300 x g, 18°C, 10 minutos) e lavadas com 2 ml de solução salina (0,75% p/v de NaCl). Foram preparadas suspensões em solução salina, ajustadas em espectrofotômetro para a densidade ótica (600nm) de 0,3 e as suspensões foram centrifugadas (1470 x g, 20 °C, 2 minutos) em tubos Eppendorf. A seguir, um mililitro dos sobrenadantes de cada suspensão foi transferido para cubetas de plástico e sua densidade ótica foi mensurada imediatamente (momento inicial – OD₀) e após 1 (OD_I) e 24 horas (OD_{II}) de repouso. O resultado da autoagregação foi expresso em porcentagem e determinado de acordo com Malik et al (2003) pelas seguintes fórmulas:

$$Aa_I(\%) = \frac{(OD_0 - OD_I)}{OD_0} \times 100 \quad Aa_{II}(\%) = \frac{(OD_0 - OD_{II})}{OD_0} \times 100$$

onde OD₀, OD_I e OD_{II} significam as respectivas densidades óticas nos tempos supracitados.

4.4.2.2 Coagregação entre células de lactobacilos e leveduras

As suspensões das culturas de lactobacilos e leveduras foram preparadas de acordo com o descrito para o teste da autoagregação, tendo sido ajustadas para a densidade ótica de 0,25 e tendo sido as leveduras cultivadas em caldo extrato de levedura peptona. Volumes iguais (500 µL) das suspensões de lactobacilos e leveduras foram misturados e incubados a temperatura ambiente sem agitação. As absorbâncias das misturas e das culturas separadas – controles foram mensuradas imediatamente (momento inicial – OD₀) após 1, 2, 3 e 24 horas (OD_I, OD_{II}, OD_{III} e OD_{IV}, respectivamente). O resultado da coagregação foi expresso em porcentagem, de acordo o protocolo de Malik et al (2003).

$$Coag_{1h}(\%) = \frac{(OD_0 - OD_I)}{OD_0} \times 100 \quad Coag_{2h}(\%) = \frac{(OD_0 - OD_{II})}{OD_0} \times 100$$

$$Coag_{3h}(\%) = \frac{(OD_0 - OD_{III})}{OD_0} \times 100 \quad Coag_{24h}(\%) = \frac{(OD_0 - OD_{IV})}{OD_0} \times 100$$

onde OD₀, OD_I, OD_{II}, OD_{III} e OD_{IV} significam densidades óticas no momento inicial e nos tempos de 1 até 24 horas, respectivamente.

4.4.3 Hidrofobicidade

O teste de hidrofobicidade baseado na adesão a hidrocarbonetos foi realizado seguindo metodologia descrita por Collado, Meriluoto e Salminen (2008). Culturas de 24h de lactobacilos em caldo MRS foram centrifugadas (3300 x g, 18°C, 10 minutos) e lavadas com 2mL de solução tampão fosfato. Foram preparadas suspensões em tampão, ajustadas em espectrofotômetro para a densidade ótica (600nm) de $0,5 \pm 0,01$ (OD_0). Adicionou-se 1mL de xileno a 3mL das suspensões bacterianas, seguindo-se a subsequente pré-incubação por 10 minutos. Depois, as duas fases foram agitadas em vórtex por 2 minutos, e após 20 minutos de incubação, a fase aquosa (3mL) foi removida com auxílio de pipeta Pasteur e transferida para cubetas de vidro, nas quais a densidade ótica foi determinada (OD_1). Os resultados foram expressos em porcentagem, de acordo com o cálculo:

$$SHb(\%) = \frac{(OD_0 - OD_1)}{OD_0} \times 100$$

onde OD_0 e OD_1 significam densidade ótica antes e depois da extração com solvente orgânico respectivamente.

4.4.4 Inibição do crescimento de leveduras por lactobacilos

Os testes para verificar a capacidade de células de lactobacilos e de seus filtrados livres de células em inibir o crescimento de leveduras do gênero *Candida* foi realizado empregando-se metodologia descrita por Drago et al. (1997) com modificações.

4.4.4.1 Método em meio líquido utilizando células viáveis de lactobacilos

Foram utilizados tubos de ensaio contendo, ao mesmo tempo, 2,5 mL de caldo MRS e 2,5 mL de caldo extrato de levedura triptona, previamente autoclavados. Os tubos foram incubados concomitantemente com uma suspensão de 10^7 células de *Lactobacillus* e outra de 10^5 células de levedura, a 30°C. Após um período de 18 horas os meios foram substituídos por meio fresco visando minimizar o efeito do pH e depleção de nutrientes; para isto, as culturas foram centrifugadas (3300 x g, 20 °C, 15 minutos) e os pellets ressuspensos nos novos meios. As culturas foram então reincubadas por um período de 24 horas, ao término do qual os tubos foram agitados em vórtex para proceder às diluições sucessivas (10^{-1} até 10^{-6}) de cada suspensão e, em seguida, à semeadura em placas contendo ágar Sabouraud, para verificar o crescimento das leveduras através da contagem de unidades formadoras de colônia em placa. Foram preparados controles sem a inoculação de lactobacilos, utilizados como parâmetro para avaliar a capacidade de inibição.

4.4.4.2 Método da difusão em ágar para teste dos filtrados de lactobacilos

As culturas de leveduras foram semeadas na superfície de placas de ABD, onde foram feitos cinco poços com furador de 6,8mm. Os poços foram preenchidos com 50 μ L do filtrado livre de células de lactobacilos previamente neutralizados ou não e as placas mantidas a 5°C por 24 horas, visando à absorção do filtrado pelo meio de cultura, seguida de incubação a

30°C por 48 horas. Após a incubação, a zona de inibição do crescimento de leveduras foi determinada pela medida da distância entre a borda dos poços e a borda do crescimento das leveduras.

Os filtrados livres de células foram preparados com culturas de lactobacilos crescidas a 37 °C por 24 horas em caldo MRS que, após centrifugação (10.000 x g, 20 °C, 2 minutos) foram filtradas em membrana esterilizante (filtro de policarbonato com 0,22 µm de porosidade) e neutralizadas ou não com NaOH (1M).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação dos microrganismos

5.1.1 Leveduras

Das cinco amostras isoladas de fonte intestinal, somente três (designadas como Lev I, Lev II e Lev III) foram identificadas como sendo pertencentes à espécie *Candida albicans*, uma delas foi identificada como *Malassezia furfur* e a última não teve uma identificação conclusiva. Para o estudo em progresso, optou-se por trabalhar apenas com as culturas de *C. albicans*, por se tratarem de fungos frequentemente presentes no trato intestinal de animais e seres humanos, além de estarem relacionados a doenças decorrentes do desequilíbrio da microbiota intestinal.

5.1.2 Lactobacilos

5.1.2.1 Identificação preliminar

Quatro amostras isoladas e designadas com Lac 1, Lac 2, Lac 3 e Lac 4 se apresentaram como bacilos Gram positivos, não produtores de catalase ou oxidase e que não digerem o soro do Loeffler. Apenas Lac 2 cresceu somente à temperatura de 15 °C; os demais exibiram um ótimo crescimento a 42 °C, e um crescimento discreto a 15 °C. Estes testes foram realizados com o intuito de confirmar que as culturas em questão pertenciam ao gênero *Lactobacillus*. Na etapa seguinte, utilizando o kit de identificação comercial, foram testadas as quatro culturas descritas acima, e a cultura comercial *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (Christian Hansen), foi empregada como controle de qualidade do teste.

5.1.2.2 Identificação bioquímica

Duas culturas, Lac 1 e Lac 3, foram identificadas como sendo pertencentes à espécie *L. rhamnosus*, com mais de 99% de porcentagem de identificação. A cultura Lac 2 foi identificada como sendo *L. paracasei* subespécie *paracasei* 1, com 99,9% certeza; a cultura Lac 4 também foi identificada como *L. paracasei* subespécie *paracasei*, porém seu perfil de fermentação não foi totalmente conclusivo, deixando-a entre dois subtipos possíveis; ainda assim, a porcentagem de identificação ultrapassou 95%. Finalmente, a cultura comercial confirmou a confiabilidade do teste, pois foi identificada como *L. acidophilus* 1, com 98% de confiança. Os perfis bioquímicos dos cinco isolados estão expostos no Quadro 1.

Quadro 1. Perfil fenotípico dos isolados de *Lactobacillus* spp.

Culturas	Perfil de fermentação de carboidratos (API 50 CHL)																								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
	/	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB
Lac 1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	?	+	+	-	-	+	+	+
Lac 2	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Lac 3	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Lac 4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+
LA-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
Culturas	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TER	INU	MLZ	RAF	AMD	GLYC	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG
Lac 1	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	?	-	-
Lac 2	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Lac 3	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
Lac 4	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
LA-5	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

0) controle; 1) glicerol; 2) eritritol; 3) D-arabinose; 4) L-arabinose; 5) ribose; 6) D-xilose; 7) L-xilose; 8) D-adonitol; 9) metil-β-D-xilopiranosídeo; 10) D-galactose; 11) D-glicose; 12) D-frutose; 13) D-manose; 14) L-sorbose; 15) L-ramnose; 16) dulcitol; 17) inositol; 18) D-manitol; 19) D-sorbitol; 20) metil-α-D-manopiranosídeo; 21) metil-α-D-glicopiranosídeo; 22) N-acetilglicosamina; 23) amígdalina; 24) arbutina; 25) esculina; 26) salicina; 27) D-celobiose; 28) D-maltose; 29) D-lactose; 30) D-melibiose; 31) D-sacarose; 32) D-trealose; 33) inulina; 34) D-melezitose; 35) D-rafinose; 36) amido; 37) glicogênio; 38) xilitol; 39) gentiobiose; 40) D-turanose; 41) D-xilose; 42) D-tagatose; 43) D-fucose; 44) L-fucose; 45) D-arabitol; 46) L-arabitol; 47) gluconato de potássio; 48) 2-cetogluconato de potássio; 49) 5-cetogluconato de potássio.

5.2 Autoagregação utilizando o filtrado de cultura de lactobacilos

A adição de células de lactobacilos ao seu próprio sobrenadante filtrado livre de células e frente aos filtrados de outros lactobacilos resultou na formação de agregados de células. A observação dos tubos de Eppendorf revelou a presença de grumos formando uma massa celular quase inteira. O fenômeno apresentou-se de forma semelhante nos tubos da maioria das culturas; o isolado Lac 2 foi aquele que mostrou o maior poder de autoagregação tanto em contato com seu próprio filtrado quanto com os filtrados dos demais isolados. Esta capacidade de autoagregar pode ser observada mesmo durante o cultivo em caldo MRS, onde formam agregados característicos, conforme exposto na Figura 2.

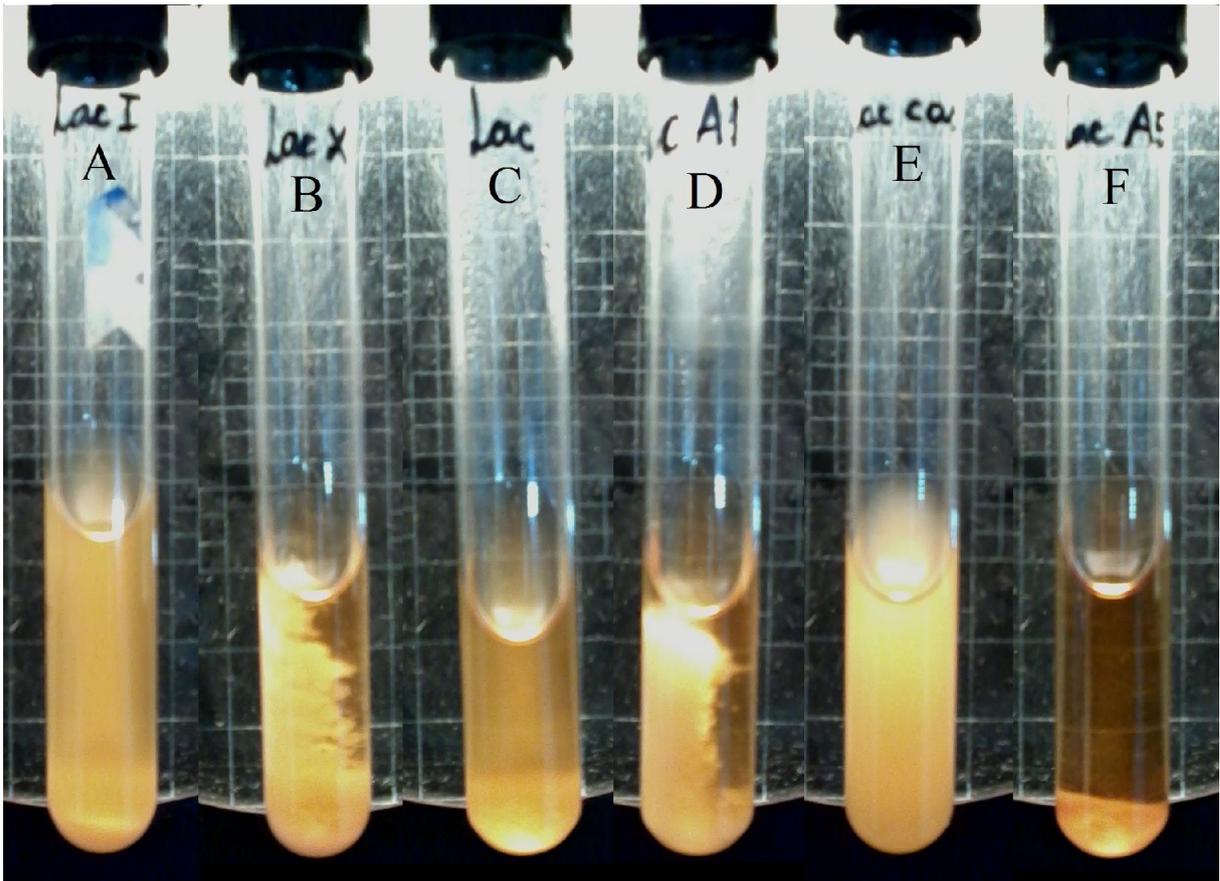


Figura 2. Cultivos dos isolados de *Lactobacillus* spp. em caldo MRS.

A) Lac 1 – *L. rhamnosus*; B) Lac 2 – *L. paracasei* spp. paracasei; C) Lac 3 – *L. rhamnosus*; D) Lac 4 – *L. paracasei* spp. paracasei; E) Lac C - *L. casei*-01; F) Lac A – *L. acidophilus* LA-5.

5.3 Autoagregação entre células de lactobacilos

Após uma hora de contato, não foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) na capacidade de autoagregar entre as culturas (Figura 3a). Pensando no efeito do tempo sobre as médias, optou-se por manter as cubetas contendo o sobrenadante dos seis cultivos em repouso por mais 24 horas a 37°C . Após incubação, Lac 4 passou a ser a cultura com o maior poder de autoagregação com média de 75,9%, seguida de Lac 2 e LA-5, com 66,28% e 63,41% respectivamente. Houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) de Lac 4 para os isolados Lac 1, Lac 3 e *L. casei*-01, e de Lac 2 e LA-5 para *L. casei*-01 conforme mostrado na Figura 3b.

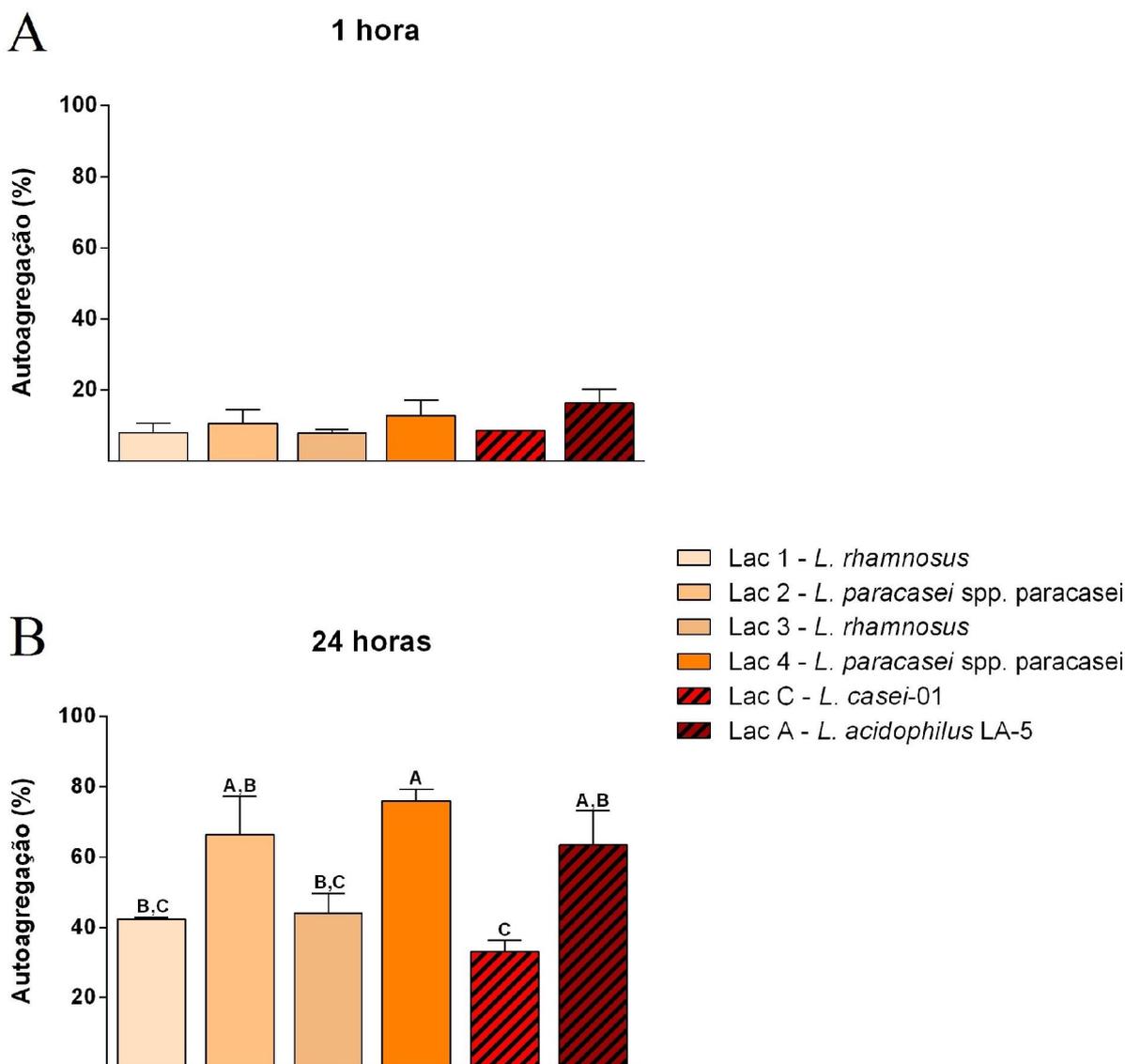


Figura 3. Autoagregação dos isolados de *Lactobacillus*. (A) após contato por uma hora; (B) após contato por 24 horas.

Resultados são médias de três repetições. Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

A autoagregação é uma das características investigadas na seleção de probióticos por estar relacionada à formação e manutenção de populações destas bactérias na microbiota e à adesão a mucosa intestinal. No presente estudo, cinco isolados apresentaram valores que os classificam com média capacidade de se autoagregar (20 - 70%), enquanto Lac 4 - *L. paracasei* spp paracasei classifica-se como possuidor de alta capacidade autoagregativa (> 70%), segundo Rhaman et al (2008). Resultados semelhantes foram obtidos por Botes et al (2008), com taxas de 48 a 64% entre probióticos e patógenos alimentares, porém em menor tempo de incubação. Collado, Meriluoto e Salminen (2007) também obtiveram resultados similares com 24 horas de incubação, chegando ainda à conclusão de que a temperatura é um fator capaz de modificar a capacidade de autoagregação dos microrganismos, sendo de 37 °C a ideal para culturas probióticas, justamente a temperatura corporal.

Os resultados obtidos nesse experimento levam a crer que a capacidade de autoagregar dos isolados está relacionada a componentes na superfície celular das bactérias, pois a

agregação das células ocorreu mesmo após terem sido lavadas e ressuspensas com solução tampão, como também observaram Kos et al (2003). Não parece, no entanto, haver produção, por parte das culturas, de moléculas solúveis envolvidas no mecanismo, pois o teste no qual se adicionou o sobrenadante filtrado de crescimentos de 24 horas às culturas não influenciou de forma considerável no processo de agregação das mesmas. Boris, Suarez e Barbes (1997) foram bem sucedidos em comprovar a existência de um fator produzido e secretado pela cepa *L. gasseri* 2459 no meio de cultivo que restaurava ou conferia esta habilidade a outras culturas, indicando que o fenômeno de autoagregação se devia a presença de componentes de superfície celular ou de substâncias produzidos e secretados no ambiente, passíveis de se ligar a receptores celulares de outras bactérias.

5.4 Coagregação entre células de lactobacilos e leveduras

Os resultados são mostrados nas Figuras 4, 5 e 6. Lac 2 foi o isolado que apresentou maior capacidade de se agregar às células de levedura em todos os momentos de mensuração da densidade ótica, frente às três leveduras, com médias que foram de 22,33% a 92,67% entre 1 e 24 horas de incubação. No momento final, suas médias estabeleceram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) das médias dos isolados Lac 1, Lac 3 e *L. casei*-01, sendo que durante o período de incubação suas médias apresentaram-se diferentes da maioria dos outros isolados.

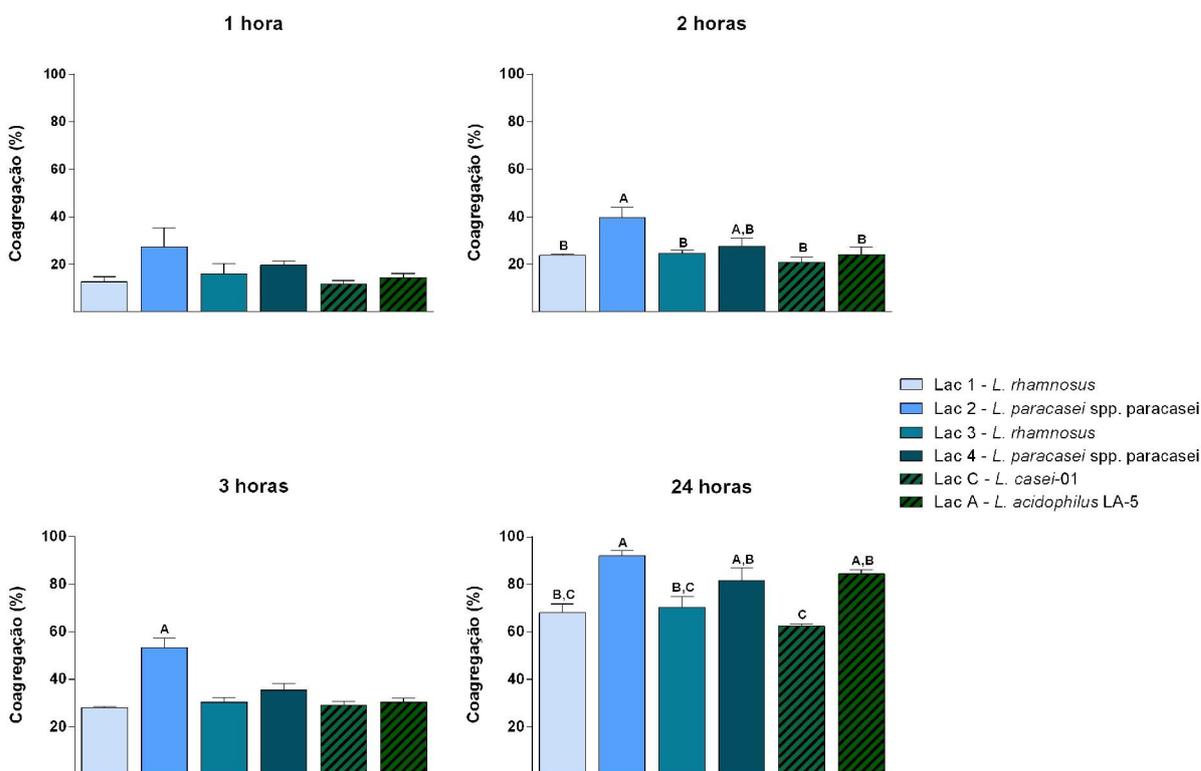


Figura 4. Coagregação de células lactobacilos com *Candida albicans* – Lev I. Resultados são médias de três repetições. Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

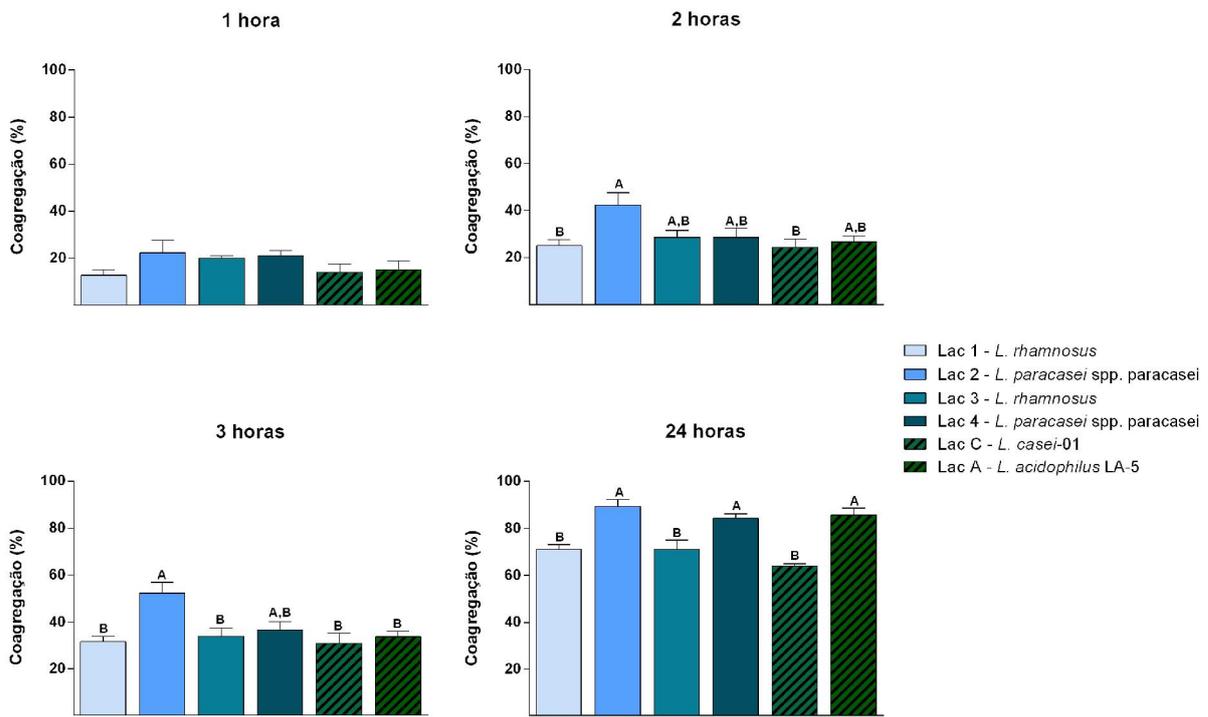


Figura 5. Coagregação de células lactobacilos com *Candida albicans* – Lev II. Resultados são médias de três repetições. Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

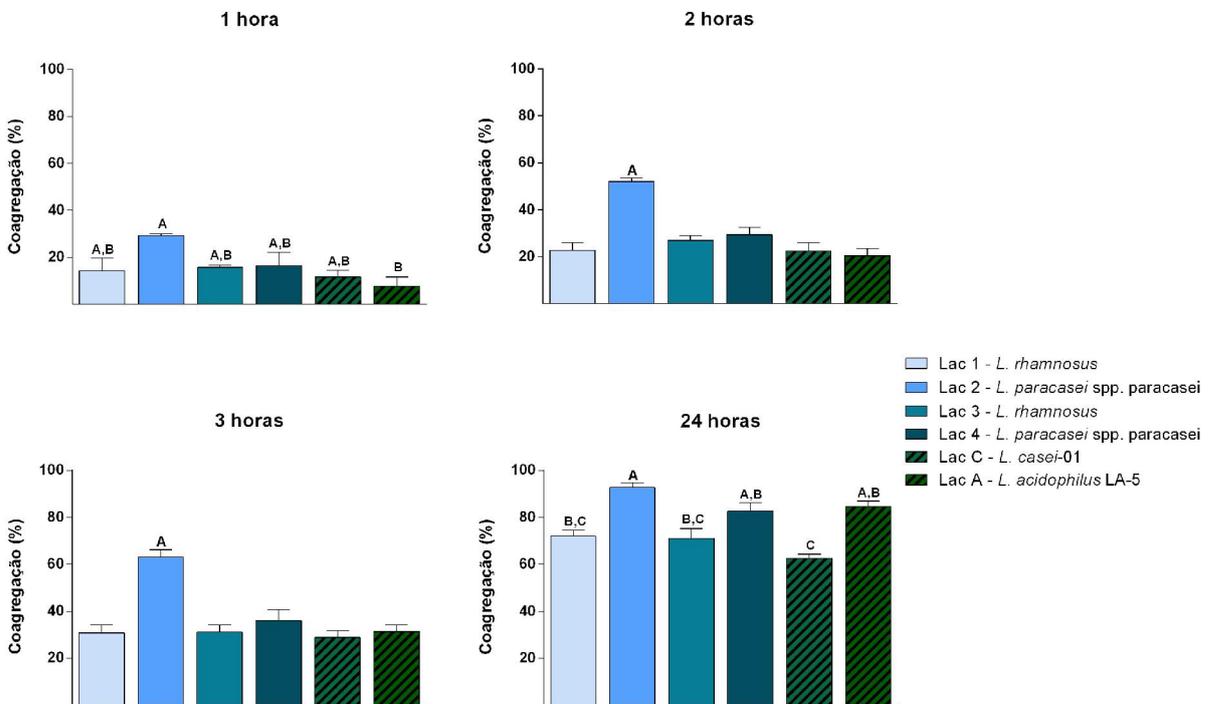


Figura 6. Coagregação de células lactobacilos com *Candida albicans* – Lev III. Resultados são médias de três repetições. Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

Em relação às demais culturas, Lac 4 foi aquela que apresentou o segundo maior valor de coagregação entre 1 e 3 horas, e LA-5 obteve o segundo maior valor de coagregação (85,67%) no tempo de 24 horas. Vale ressaltar que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre estas três culturas (Lac 2, Lac 4 e LA-5) no decorrer do período de incubação, tornando-se insignificante no final. A análise de variância revelou que o tempo de incubação afetou os resultados de forma significativa. Foi feita coloração de Gram a partir das suspensões de 24 horas dos testes de coagregação, onde é possível observar interação entre células de lactobacilos e leveduras. (Figura 7).

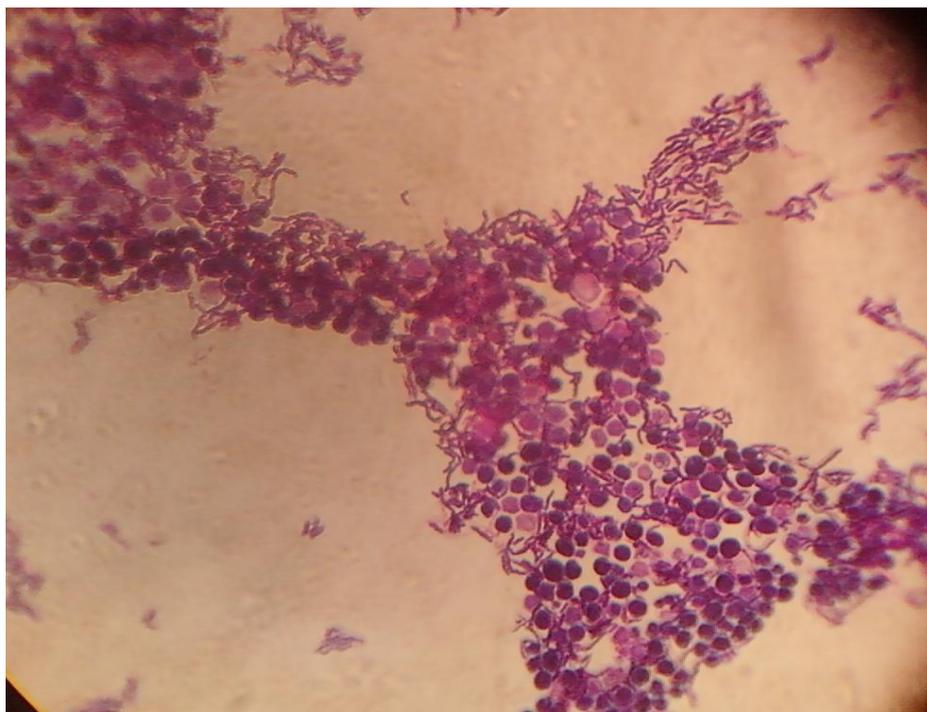


Figura 7. Observação microscópica de coagregação entre células de *Lactobacillus rhamnosus* (Lac 1) e *Candida albicans* (Lev I).

A capacidade de coagregação entre bactérias intestinais constitui importante mecanismo na exclusão competitiva de patógenos. *L. paracasei* spp *paracasei* (Lac 2) foi a cultura com maiores scores de coagregação às células de levedura, e foi também a que exibiu os maiores valores em menor tempo. Com 24 horas de incubação, as demais culturas exibiram valores que podem ser considerados médios a altos, embora sem a mesma eficiência.

Foi possível evidenciar correlação entre coagregação e autoagregação, pois os três isolados com melhores médias de coagregação também o foram para autoagregação, entretanto não na mesma ordem. Para as três culturas restantes também houve certa proporcionalidade. Tuo et al (2013) não observaram correlação existente entre estes dois parâmetros em 23 culturas testadas, concluindo que estas propriedades são específicas de cada cepa. Kos et al (2003) obtiveram valores mais discretos de coagregação de *L. acidophilus* M92 frente a dois probióticos e dois patógenos. Estes autores argumentaram que a coagregação entre espécies e gêneros diferentes de probióticos pode intensificar seus efeitos benéficos sobre a microbiota e que a coagregação à patógenos facilita a ação de substâncias antagonistas contra eles. Valores diferenciados foram encontrados também por Collado, Meriluoto e Salminen (2007), evidenciando o efeito do tempo sobre a interação.

5.5 Hidrofobicidade

Em relação ao grau de afinidade e adesão a hidrocarbonetos, *L. paracasei* spp paracasei (Lac 2), novamente, foi o cultivo que apresentou a maior média (93,9%), sendo seguido por LA-5 (88,1%) (Figura 8). Estes dois isolados apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) dos demais. Lac 4 também apresentou médias com diferença estatística significativa em relação a *L. casei*-01, Lac 1 e Lac 3, mas seu valor médio foi baixo, não chegando a 15%.

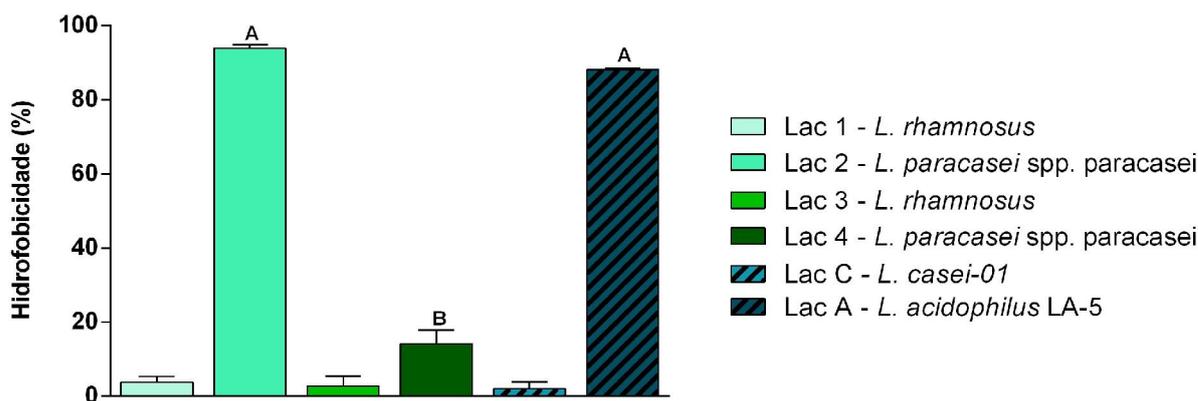


Figura 8. Percentual de adesão de lactobacilos a hidrocarbonetos.

Resultados são médias de três repetições. Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

A afinidade das culturas com hidrocarbonetos ocorreu de forma distinta entre os lactobacilos testados, demonstrando também se tratar de uma característica específica. Não foi possível estabelecer uma correlação clara entre hidrofobicidade e autoagregação/coagregação, pois o isolado *L. paracasei* spp paracasei (Lac 4) apresentou taxas elevadas de agregação entre suas próprias células e células de leveduras, no entanto sua média de adesão ao xileno foi baixa, inviabilizando a existência de uma correlação positiva. De forma semelhante, Tuo et al (2013) não observaram correlação positiva entre hidrofobicidade e autoagregação. Kos et al (2003) comprovaram a influência da alteração de pH e de tratamento com enzimas específicas sobre essa capacidade, e também atribuíram a hidrofobicidade das culturas à presença de componentes proteicos na parede celular das bactérias, conforme estudos prévios (apud GREEN e KLAENHAMMER 1994; ROJAS e CONWAY 1996; PELLETIER et al. 1997).

Adesão é um processo complexo que envolve ligações não específicas (hidrofobicidade), assim como ligações a receptores específicos. Aderência de células bacterianas está normalmente relacionada às características da superfície celular. Acredita-se que a afinidade aos hidrocarbonetos está fortemente ligada à adesão com células do epitélio intestinal. Portanto, outros estudos serão necessários para entender o papel dos hidrocarbonetos em relação à autoagregação e aos mecanismos de coagregação com patógenos.

5.6 Inibição do crescimento de leveduras em meio líquido

Em relação à inibição do crescimento de leveduras por meio de cocultura, os isolados Lac 3 e Lac 1 foram responsáveis por reduções de 2 ciclos log no crescimento de Lev I. Cinco isolados foram capazes de causar redução em mais de 2,0 log na população de Lev II: Lac 1 (2,5 log), Lac 3 (2,4 log), Lac 4 (2,1 log) Lac 2 e *L. casei*-01 (2 log). Já frente à cultura Lev III, somente Lac 2 foi capaz de causar redução do crescimento maior que 2 log. Nos três casos, a média de crescimento das leveduras cultivadas juntamente com a cultura comercial LA-5 não diferiu significativamente das médias obtidas para o crescimento dos controles, o que sugere que esta não possui capacidade de inibi-las. Apenas a cepa *L. acidophilus* LA-5 não apresentou capacidade significativa de inibir *C. albicans* (Figura 9).

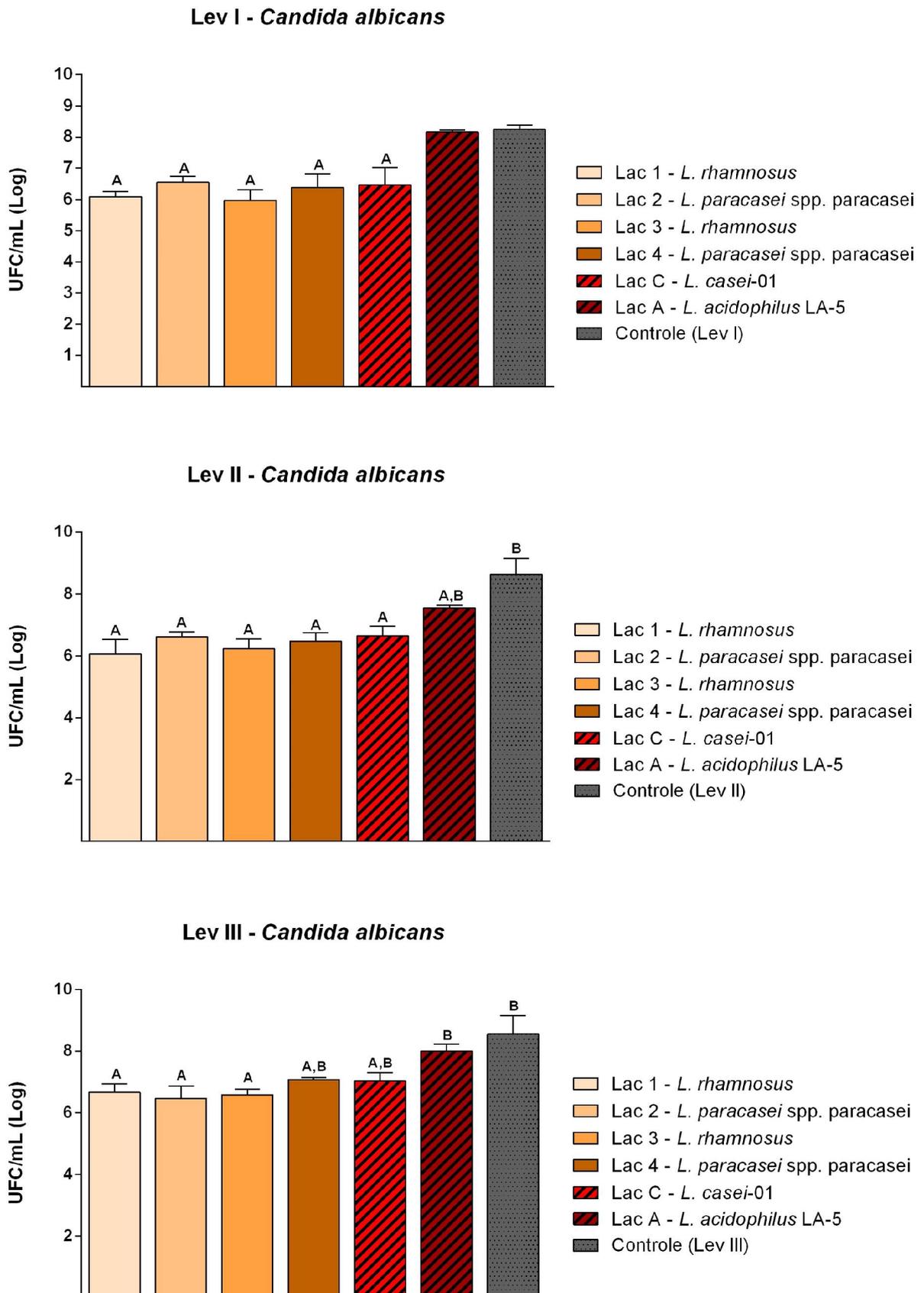


Figura 9. Crescimento de *Candida albicans* cocultivadas com *Lactobacillus* spp. Resultados são médias de três repetições. Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si.

5.7 Inibição do crescimento de leveduras por difusão do filtrado em ágar.

Não ocorreu inibição do crescimento em placa das culturas de leveduras por parte do filtrado de nenhum dos lactobacilos testados, tanto daqueles neutralizados quanto dos que não sofreram adição de hidróxido de sódio.

A inibição do crescimento de patógenos intestinais é desejável como característica a ser investigada na seleção de candidatos a microrganismos probióticos. No presente estudo, os isolados de origem humana demonstraram um maior poder de inibição quando cocultivados com células de leveduras em meio líquido, mas nenhuma delas foi capaz de causar inibição em meio sólido. Em teste anterior (autoagregação), os filtrados também não exerceram influência significativa nos resultados, levando-nos a crer que as culturas utilizadas neste experimento não produzem fatores importantes na interação e inibição de leveduras. Vale ressaltar que não houve correlação entre a inibição e a coagregação com as leveduras. Assim as espécies de *L. rhamnosus* (Lac 1 e Lac 3) foram as que apresentaram maior potencial de inibição em meio líquido mas apresentaram baixa capacidade de coagregação.

Osset et al (2001) também observaram que as culturas de lactobacilos não inibiam as células de leveduras em meio sólido, mas o conseguiam em meio líquido. Nos trabalhos de Wynne et al (2004), foi verificada inibição de *Candida albicans* por parte de lactobacilos tanto em meio líquido quanto em meio sólido, porém os dados da inibição em placa não foram mostrados. Em meio líquido, a inibição foi extremamente eficiente, mantendo o cultivo de *Candida* sp. nos níveis de inoculação. Strus et al (2005) conseguiram demonstrar inibição de espécies de *Candida* por culturas de lactobacilos produtoras de peróxido de hidrogênio, mas atribuíram essa inibição a um conjunto de mecanismos.

O fato de lactobacilos serem capazes de produzir peróxido de hidrogênio, atributo importante no controle da candidíase vaginal é amplamente reconhecido (MIJAC et al, 2006; GIL et al, 2010). No entanto de acordo com Martín e Suárez (2010) a produção de peróxido de hidrogênio é iniciada em presença de O_2 e que ademais há necessidade de Fe^{3+} para posterior degradação do peróxido que poderia inibir o próprio lactobacilo produtor. Os autores concluem que a proteção devida ao peróxido de hidrogênio contra microrganismos indesejáveis, resulta do equilíbrio entre a geração e a destruição por espécies de lactobacilos de modo a evitar a toxicidade do O_2 e H_2O_2 em excesso. Estas condições ambientais são encontradas no canal vaginal cuja superfície contém elevada concentração de Fe^{3+} que é provido pela menstruação, mas não no intestino. Ademais os resultados *in vitro* nesta pesquisa sugerem que a produção de substâncias inibidoras não são as responsáveis pela inibição aqui observada, mas provavelmente por componentes de membrana em mecanismo de exclusão por adesão. Lakhtin et al. (2010) verificou que lectinas de lactobacilos e de bifidobacterias possuem atividade por mananas e outros polímeros do tipo mucina e que estas lectinas apresentaram atividade contra biofilmes de *C. albicans*.

6 CONCLUSÃO

Todos os lactobacilos analisados foram capazes de autoagregar, assim como coagregar com células de leveduras, sendo de, no mínimo, 60% com as três linhagens de *C. albicans* testadas após 24 horas. A adesão a hidrocarbonetos não correlacionou positivamente com a capacidade de coagregação, nem tão pouco com a capacidade de inibição de leveduras em meio líquido indicando a possibilidade de múltiplos mecanismos de exclusão competitiva. Os resultados deste trabalho indicam que propriedades como adesão, auto/coagregação e hidrofobicidade são específicas para cada linhagem e não espécie-específicas além de serem dependentes do tempo de incubação. Desta forma, a medida da capacidade de autoagregação, coagregação com espécies patogênicas, juntamente com a hidrofobicidade da superfície celular são ferramentas importantes para seleção preliminar de probióticos potenciais.

Todas essas observações corroboram a favor de que estudos mais detalhados sobre estes critérios (entre outros) de seleção para probióticos sejam realizados, além dos fatores ambientais que possam exercer influência sobre eles. Finalmente, estudos sobre seleção de bactérias como candidatas a probióticos devem ser feitos especialmente com isolados de origem humana, pois estas culturas possuem um grande potencial, por se tratar de microrganismos já bem estabelecidos nos microambientes onde habitam.

7 REFERÊNCIAS

- ADLERBERTH, I.; AHRNÉ, S.; JOHANSSON, M-L.; MOLIN, G. A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, n. 7, p. 2244-2251, jul. 1996.
- ALMEIDA, L. B.; MARINHO, C. B.; SOUZA, C. S.; CHEIB, V. B. P. Disbiose intestinal. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, Belo Horizonte, v. 24, n. 1, p. 58-65, dez. 2009.
- BORIS, S.; SUAREZ, J. E.; BARBÉS, C. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. **Journal of Applied Microbiology**. v. 83, n. 4, p. 413-420, out. 1997.
- BOTES, M.; LOOS, B.; REENEN, C. A. Adhesion of the probiotic strains *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. **Archives of Microbiology**, v. 190, n. 5, p. 573-584, nov. 2008.
- CARVALHO, G.; PERUCHA, V. P. Doença Inflamatória Intestinal. **Revista de Nutrição Saúde e Performance** – Anuário Nutrição Clínica Funcional da Teoria à Prática, Ano 7, 29ª ed., p. 9-16, 2006.
- COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEM, S. In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. **Food Research International**, v. 40, n. 5, p. 629-636, jun. 2007.
- COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEM, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **European Food Research and Technology**, v. 226, n. 5, p. 1065-1073, abr. 2008.
- DRAGO, L.; GISTMONDO, M. R.; LOMBARDI, A.; HAEN, C.; GOZZINI, L. Inhibition of *in vitro* growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. **Federation of European Microbiological Societies – Microbiology Letters**, v. 153, n. 2, p. 455-463, ago. 1997.
- GIBSON, G.R.; BEATTY, E.R.; WANG, X.; COMMINGS, J.H. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. **Gastroenterology**, v. 108, n. 4, p. 975-982, abr. 1995.
- GIL, N. F.; MARTINEZ, R. C. R.; GOMES, B. C.; NOMIZO, A.; MARTINIS, E. C. P. Vaginal lactobacilli as potential probiotics against *Candida* spp. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 6-14, jan.-mar. 2010.
- GREEN, J.D.; KLAENHAMMER, T.R. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4487-4494, dez. 1994.

HARTEMINK R.; DOMENECH V. R.; ROMBOUITS F. M. LAMVAB – a new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. **Journal of Microbiological Methods**, v. 29, n. 2, p. 77-84, mai. 1997.

KOS, B.; SUSKOVIC, J.; VULKOVIC, S.; SIMPRAGA, M.; FRECE, J.; MATOSIC, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 6, p. 981-987, fev. 2003.

LAKHTIN, M.; ALYOSHKIN, V.; LAKHTIN, V.; AFANASYEV, S.; POZHALOSTINA, L.; POSPELOVA, V. Probiotic *Lactobacillus* and bifidobacterial lectins against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* clinical strains: new class of the pathogen biofilm destructors. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 2, n. 3, p. 186-196, out. 2010.

MALIK, A.; SAKAMOTO, M.; HANAZAKI, S.; OSAWA, M.; SUZUKI, T.; TOCHIGI, M.; KAKII, K. Coaggregation among nonflocculating bacteria isolated from activated sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 6056-6063, nov. 2003.

MARTÍN, R.; SUÁREZ, J. E. Biosynthesis and degradation of H₂O₂ by vaginal lactobacilli. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 400-405, jan. 2010.

MIJAC, V. D.; DUKIĆ, S. V.; OPAVSKI, N. Z.; DUKIĆ, M. K.; RANIN, L. T. Hydrogen peroxide producing lactobacilli in women with vaginal infections. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 129, n. 1, p. 69-76, nov. 2006.

MORI, M.; SAKAGAMI, Y.; NARITA, M. Isolation and structure of the bacterial sex pheromone, cAD1, that induces plasmid transfer in *Streptococcus faecalis*. **Federation of European Microbiological Societies Letters**, v. 178, n. 1, p. 97-100, dez. 1984.

MORO, G. E.; ARSLANOGLU, S. Reproducing the bifidogenic effect of human milk in formula-fed infants: Why and how? **Acta Paediatrica**, v. 94, n. Supplement 449, p. 14-17, out. 2005.

NOUSIAINEN, J.; SETÄLÄ, J. "Lactic acid bacterial as animal probiotics." In **Lactic Acid Bacteria - Microbiology and Functional Aspects**, 3rd ed. Salminen S. e Wright A. von (eds), New York: Marcel Dekker, Inc., p. 437-473, 1998.

OLIVEIRA, G. S. **Potencial prebiótico do leite humano comparado ao leite em pó modificado na modulação da microbiota colônica e sanidade de lactentes**. 2011. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

OSSET, J.; GARCÍA, E.; BARTOLOMÉ, R. M.; ANDREU, A. Papel de *Lactobacillus* como factor protector de la candidiasis vaginal. **Medicina Clínica**, v. 117, n. 8, p. 285-288, 2001.

PAN, X.; CHEN, F.; WU, T.; TANG, H.; ZHAO, Z. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. **Food Control**, v. 20, n. 6, p. 598-602, jun. 2009.

- PELLETIER, C.; BOULEY, C.; CAYUELA, C.; BOUTTIER, S.; BOURLIOUX, P.; BELLON-FONTAINE, M. N. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1725-1731, mai. 1997.
- PEREIRA, V. G.; GÓMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 229-240, abr.-jun. 2007.
- RAHMAN, M.; KIM, W.; KUMURA, H.; SHIMAZAK, K. Autoaggregation and surface hydrophobicity of bifidobacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 1593-1598, jul. 2008.
- RENIERO, R.; COCCONCELLI, P.; BOTAZZI, V.; MORELLI, L. High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promoting factor. **Journal of General Microbiology**, v. 138, n. 4, p. 763-768, abr. 1992.
- ROJAS, M.; CONWAY, P.L. Colonization by lactobacilli of piglet small intestinal mucus. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, n. 5, p.474-480, nov. 1996.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 42, n. 1, jan.-mar. 2006.
- SANDERS, M. E. Effect of consumption of lactic cultures on human health. In: **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 37, p. 67-130, 1993.
- SCHULZE, J.; SONNENBORN, U. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 106, p. n. 51-52, 837-842, dez. 2009.
- SHAH, D. T.; JACKMAN, S.; ENGLE, J.; LARSEN, B. Effect of gliotoxin on human polymorphonuclear neutrophils. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 6, n. 4, p. 168-175, fev. 1998.
- STEFE, C. A.; ALVES, M. A. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, prebióticos e simbióticos – Artigo de revisão. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 3, n.1, p. 16-33, jan.-jun. 2008.
- STRUS, M.; KUCHARSKA, A.; KUKLA, G.; BRZYCHCZY-WŁOCH, M.; MARESZ, K.; HECZKO, P. B. The in vitro activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida*. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 13, n. 2, p. 69-75, jun. 2005.
- TUO, Y.; YU, H.; AI, L.; WU, Z.; CHEN, W.; GUO, B. Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 7, p. 4252-4257, jul. 2013.
- UCHIDA H, KINOSHITA H, KAWAI Y, KITAZAWA H, MIURA K, SHIIBA K. Lactobacilli binding human A-antigen expressed in intestinal mucosa. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 7, p. 659-665, set. 2006.

VANDEVOORDE, L.; CHRISTIAENS, H.; VERSTRAETE, W. Prevalence of coaggregation reactions among chicken lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72, n. 3, p. 214-219, mar. 1992.

WYNNE, A. G.; MCCARTNEYA, A. L.; BROSTOFF, J.; HUDSPITHB, B. N.; GIBSON, G. R. An in vitro assessment of the effects of broad-spectrum antibiotics on the human gut microflora and concomitant isolation of a *Lactobacillus plantarum* with anti-Candida activities. **Anaerobe**, v. 10, n. 3, p. 165-169, jun. 2004.