

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

GABRIEL SOUZA OLIVEIRA

Avaliação do potencial probiótico de bactérias lácticas provenientes do cacau
(*Theobroma cacao*) contra *Escherichia coli* K88⁺

ILHÉUS – 2019

GABRIEL SOUZA OLIVEIRA

Avaliação do potencial probiótico de bactérias lácticas provenientes do cacau
(*Theobroma cacao*) contra *Escherichia coli* K88⁺

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Produção e Comportamento Animal
Orientador: Prof. DSc. Leandro Batista Costa; Co-orientador (a): Prof. DSc Camila Meneghetti.

ILHÉUS-BAHIA

2019

GABRIEL SOUZA OLIVEIRA

Avaliação do potencial probiótico de bactérias lácticas provenientes do cacau
(*Theobroma cacao*) contra *Escherichia coli* K88⁺

Ilhéus – Bahia, __/__/__

Leandro Batista Costa - DSc
PUC-PR/PPGCA
(Orientador)

Camila Meneghetti - Dsc
UESC
(Co-orientadora)

Wallace Felipe Blohen Pessoa – Dsc
UFPB

Rachel Passos Rezende – Dsc
UESC

Ilhéus-Bahia

2019

DEDICATÓRIA

A todos aqueles que sonharam e acreditaram comigo desde o início que esse dia iria chegar, dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e mais importante, agradeço a mim mesmo. Por nunca ter desistido nem nunca ter descreditado do que eu posso fazer e onde posso chegar.

Aos meus pais, Paulo e Jacira, por todo amor e atenção, por acreditarem em mim desde o início e sonharem junto comigo.

Ao meu irmão Ciro, pelo útero partilhado, pelo suporte e alicerce, por dividir minhas angústias diárias, por ouvir meus problemas e por ser meu melhor amigo acima de qualquer coisa.

Ao meu irmão Mateus, pela preocupação de sempre, mesmo distante. Pelas palavras de incentivo e pelas resenhas no grupo 'Zed'.

À minha namorada Laura, por ter aceitado esse desafio de estar ao meu lado nos prováveis meses mais conturbados da minha vida, obrigado por todo amor, dedicação, palavras de conforto e por você ser cores na minha tela em preto e branco.

Ao professor e orientador Leandro Batista Costa, agradeço pela orientação durante seu período como professor da instituição e pelos meus dois anos de mestrado.

À professora Camila Meneghetti, pelas palavras sábias nos momentos difíceis, pela cumplicidade, pelos ensinamentos e por se colocar e entender o que se passa do outro lado.

À professora Carla Romano, por ter aberto as portas do laboratório da imunologia no CBG, ter me mostrado um mundo novo, novas descobertas, novos gostos, nova vida.

À professora Rachel Rezende, pela disponibilidade dos lactobacilos e do laboratório.

Ao jovem Herbert por toda ajuda no laboratório, todas as análises, todas as dúvidas, as incertezas, as brincadeiras e apelidos. Entrei na imuno com um parceiro "chato" de laboratório e saio dela com um grande amigo.

Aos meus amigos do clã, em especial a Danilo, Danailo, Nerigudo e Yas, pela parceria de tantos anos, pelas risadas, brincadeiras, jogatinas e nubadas.

À Cláudia, agradeço por todos os momentos vividos, por todo carinho e apoio que me deu durante minha graduação e no início do mestrado.

Aos amigos do CBG, por todo apoio durante todo meu experimento e me ajudarem sempre que foi preciso.

À Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal por todas as oportunidades que me foram cedidas, nenhuma desperdiçada.

À FAPESB, pela concessão da bolsa.

A todos os amigos e familiares, que de alguma forma me apoiaram ao longo desses dois anos.

“O passado é história, o futuro é mistério, e o hoje é uma dádiva. Por isso é chamado de presente.”

(Provérbio chinês)

Avaliação do potencial probiótico de bactérias lácticas provenientes do cacau contra *Escherichia coli* K88⁺

RESUMO

Nos sistemas de produção de suínos tem-se como período mais crítico o desmame, devido a adaptação dos leitões à ração sólida, separação da mãe, perda da integridade intestinal e queda da imunidade dos animais. Estes fatores podem refletir em aumento da quantidade de bactérias enteropatogênicas, dentre elas a *Escherichia Coli* K88⁺. Os probióticos são bactérias que, em quantidades satisfatórias, desempenham funções benéficas ao hospedeiro, sendo então uma possível alternativa para os sistemas de produção. Diante disso, pretendeu-se avaliar a atividade antimicrobiana das bactérias lácticas derivadas da fermentação da amêndoa do cacau (*Theobroma cacao*), contra a *E. coli* K88⁺. Foram avaliados os parâmetros referentes à capacidade probiótica e citotoxicidade dos lactobacilos frente às células de linhagem intestinal HT-29, autoagregação entre lactobacilos e coagregação destes com *E. coli* K88⁺ e o papel dos sobrenadantes destes lactobacilos sobre a viabilidade da *E. coli* K88⁺ e sobre a formação de biofilme. O experimento foi realizado após a avaliação de citotoxicidade das cepas de *Lactobacillus* spp., obtidos da fermentação do cacau, e em associação a esta etapa, foi feito o cultivo dos lactobacilos e da *E. coli* K88⁺, assim como produção do sobrenadante para a realização dos testes definidos no experimento. O teste de viabilidade foi realizado para se obter uma concentração ideal de lactobacilos que não causasse danos às células HT-29. A avaliação da autoagregação e da coagregação foi realizada com 24h de interação entre os lactobacilos e a *E. coli* K88⁺ e posterior mensuração, assim como para a formação do biofilme, com posterior leitura em espectrofotômetro. Para a avaliação da atividade antimicrobiana, foi realizado o plaqueamento em meio ágar Mueller Hinton. O ensaio de co-cultura foi realizado para verificar se houve interferência ou não sobre o crescimento da *E. coli* K88⁺ pelos lactobacilos. Os sobrenadantes de *Lactobacillus fermentum* 5.2, *Lactobacillus plantarum* 6.2 e 7.1 não foram capazes de exercer atividade lítica sobre a bactéria estudada, uma vez que não demonstraram efeito sobre a viabilidade da bactéria. Entretanto, o teste com os sobrenadantes demonstrou efeito, diminuindo a formação de biofilme em *E. coli* K88⁺, sendo que os lactobacilos foram hábeis em coagregar com a cepa de *Escherichia coli* K88⁺ *in vitro*. Esses dados identificam propriedades probióticas desejáveis das cepas de lactobacilos, através da coagregação com *E. coli* K88⁺, além de identificar propriedade antibiofilme desta bactéria no sobrenadante dos *L. plantarum* e *L. fermentum*. Tais resultados mostram a possibilidade de uso destas bactérias em produtos para limpeza e higienização de instalações de suínos.

Palavras-chave: Bactérias enteropatogênicas, lactobacilos, microbiologia, suinocultura.

Evaluation of the probiotic potential of lactic acid bacteria against *Escherichia coli* K88⁺

ABSTRACT

In pig production systems, the most critical period is weaning, due to the adaptation of the piglets to the solid feed, separation of the mother, loss of intestinal integrity and immunity of the animals. These factors may reflect an increase in the amount of enteropathogenic bacteria, among them *Escherichia coli* K88⁺. Probiotics are bacteria that, in satisfactory quantities, perform beneficial functions to the host, being then a possible alternative to the production systems. Therefore, it was intended to evaluate the antimicrobial activity of lactic bacteria derived from the fermentation of the cocoa bean (*Theobroma cacao*) against *E. coli* K88⁺. The parameters related to the probiotic capacity and cytotoxicity of *lactobacilli* against HT-29 intestinal lineage, autoaggregation between *lactobacilli* and their coaggregation with *E. coli* K88⁺ and the role of *lactobacilli* supernatants on the viability of *E. coli* K88⁺ and on biofilm formation. The experiment was carried out after the evaluation of the cytotoxicity of the strains of *Lactobacillus* spp., obtained from the cocoa fermentation, and in association with this stage the *lactobacilli* and the *E. coli* K88⁺ were cultured, as well as the production of the supernatant for the accomplishment of the tests defined in the experiment. The viability test was performed to obtain an ideal concentration of *lactobacilli* that did not cause damage to HT-29 cells. The evaluation of self-aggregation and coaggregation was performed with 24h interaction between *lactobacilli* and *E. coli* K88⁺ and subsequent measurement, as well as biofilm formation, with subsequent spectrophotometer reading. For the evaluation of antimicrobial activity, plating was performed in Mueller Hinton agar medium. The co-culture assay was performed to verify whether or not there was interference on the growth of *E. coli* K88⁺ by *lactobacilli*. The supernatants of *Lactobacillus fermentum* 5.2, *Lactobacillus plantarum* 6.2 and 7.1 were not able to exert lytic activity on the bacteria studied, since they did not show any effect on the viability of the bacteria. However, the test with the supernatants showed an effect, decreasing the biofilm formation in *E. coli* K88⁺, and the *lactobacilli* were able to coaggregate with the *Escherichia coli* K88⁺ strain in vitro. These data identify

desirable probiotic properties of *lactobacilli* strains through coaggregation with *E. coli* K88⁺, in addition to identifying the antibiofilm property of this bacterium in the supernatant of *L. plantarum* and *L. fermentum*. These results show the possibility of using these bacteria in products for cleaning and sanitizing of pig installations.

Key-words: Enteropathogenic bacteria, lactobacilli, microbiology, swine culture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Valores em porcentagem (%) de autoagregação dos *Lactobacillus* isolados _____ 24
- Figura 2: Percentual de autoagregação em função do tempo _____ 25
- Figura 3: Valores em porcentagem (%)coagregação dos dos *Lactobacillus* com a *Escherichia coli* K88⁺ _____ 26
- Figura 4: Atividade antimicrobiana dos sobrenadantes dos *Lactobacillus* em frente a *E. coli* K88⁺ por difusão em ágar _____ 27
- Figura 5: Formação do biofilme pela *E. coli* K88⁺, em incubação ou não com sobrenadante de *L. fermentum* 5.2, *L. plantarum* 6.2 e 7.1 _____ 29
- Figura 6: Ensaio de viabilidade celular após 24h de interação das células HT-29 com o meio de cultura de lactobacilos (MRS) e com os sobrenadantes das cepas de *Lactobacillus* spp. avaliadas _____ 30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 PROBIÓTICOS	14
2.2 PRINCIPAIS MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS E SUAS CARACTERÍSTICAS	16
2.3 A FERMENTAÇÃO DO CACAU COMO FONTE DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO	17
2.4 USO DE PROBIÓTICOS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL	18
2.5 CULTIVO CELULAR COMO ALTERNATIVA AO MODELO DE EXPERIMENTAÇÃO <i>IN VIVO</i>	19
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 CRESCIMENTO E MANUTENÇÃO DOS MICRO- ORGANISMOS	21
3.2 CULTIVO DE CÉLULAS HT-29	21
3.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DA METABOLIZAÇÃO DO BROMETO DE [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5- difênil tetrazolium] (MTT)	22
3.4 AUTOAGREGAÇÃO DE LACTOBACILOS E COAGREGAÇÃO ENTRE <i>LACTOBACILLUS</i> E <i>E. COLI</i> K88 ⁺	22
3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO SOBRENADANTE DE CULTURA FRENTE A <i>E. COLI</i> K88 ⁺	23
3.6 FORMAÇÃO DE BIOFILME POR <i>E. COLI</i> K88 NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS <i>LACTOBACILLUS</i> ISOLADOS DA FERMENTAÇÃO DO CACAU	23
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 AUTOAGREGAÇÃO E COAGREGAÇÃO	24
4.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	27
4.3 FORMAÇÃO DE BIOFILME	29
4.4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR DA LINHAGEM HT 29 NA PRESENÇA DE SOBRENADANTES DE LACTOBACILOS	31

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
6. REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

Em decorrência da legislação que tem limitado o uso de antibióticos nos sistemas de produção animal tem-se aumentado a busca por produtos alternativos que venham a desempenhar funções benéficas no organismo dos animais, melhorando os índices zootécnicos. Dentre essas alternativas, estão às bactérias probióticas.

As bactérias probióticas são micro-organismos presentes na microbiota comum intestinal ou advindas de fontes externas, que podem ser inseridas na dieta de humanos e animais promovendo, principalmente, melhora da saúde intestinal.

Diante da premissa de alimentos alternativos e com o crescimento do mercado para produtos naturais, há grande incentivo na busca por outras fontes de nutrientes, assim como outras fontes de micro-organismos, visto que, na sua grande maioria, as bactérias probióticas são obtidas de fontes animal ou humana. Dentre essas fontes naturais, estão os vegetais e produtos advindos da fermentação.

O processo de fermentação do cacau é feito por vários micro-organismos, sendo destacadas as bactérias ácido-láticas, sendo já identificadas algumas espécies de *Lactobacillus* responsáveis por esse processo fermentativo.

No presente trabalho serão estudados os efeitos de lactobacilos oriundos da fermentação do cacau contra a bactéria *Escherichia coli* K88⁺, comum ao trato gastrointestinal de suínos. Para tal, foi utilizado como modelo *in vitro* as células da linhagem intestinal humana HT-29, devido à proximidade genética entre suínos e os seres humanos. O cultivo celular é uma alternativa viável devido ao controle ambiental, homogeneidade amostral quando comparamos com animais de experimentação, e também pelo menor custo quando comparado com pesquisas *in vivo*. Além disso, testes preliminares de identificação de possíveis efeitos destes lactobacilos é de fundamental importância para justificar sua aplicabilidade na produção animal, mais especificamente, de leitões recém-desmamados. Para tal, o presente estudo visa avaliar a ação probiótica de *Lactobacillus*, advindos da fermentação do

cacau fino, frente à *Escherichia coli* K88⁺, bactéria causadora de grandes prejuízos para leitões no pós-desmame.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PROBIÓTICOS

Os probióticos, termo de origem grega que significa “para vida”, foram definidos por Lilly e Stillwell (1965) como compostos ou extratos teciduais com capacidade de estimular o crescimento microbiano. Parker (1974) denominou probióticos como substâncias suplementares que colaboravam para o equilíbrio da microbiota intestinal. Já Fuller (1989) definiu os probióticos como micro-organismos vivos que, ao serem adicionados em alimentos, poderiam promover efeitos benéficos ao hospedeiro, favorecendo o equilíbrio microbiano a nível intestinal. Entretanto, a definição mais concreta e mais adaptada à realidade do termo, foi dada pela Food and Agriculture Organization/World Health Organization FAO/WHO, em 2002, definindo probióticos como micro-organismos vivos que, administrados em quantidade ideal, promovem benefícios ao hospedeiro.

Para que um micro-organismo seja utilizado como probiótico, alguns fatores precisam ser observados como: a passagem pelo estômago, primeira barreira física e química no percurso até o sítio de ação dos micro-organismos, devido ao baixo pH (Charteris et al., 1998; Rolfe, 2000); a bile, pois se trata de uma secreção digestiva, que emulsifica e solubiliza lipídeos, afetando diretamente os fosfolipídeos e proteínas existentes na membrana celular (Santos, 2010); e as enzimas pancreáticas, que também interferem na colonização dos micro-organismos, devido a solubilização de lipídeos, afetando diretamente a membrana celular (Todorov et al., 2009). Além disso, o micro-organismo precisa ter boa capacidade de adesão ao epitélio intestinal para que haja boa resistência ao trânsito peristáltico, beneficiando o processo de colonização (Santos, 2010). Somado a isso, não podem ser patogênicos e precisam apresentar resistência aos processos de fabricação de ração, mantendo sua viabilidade (Lin et al., 2006).

A maneira como agem no meio intestinal ainda não é bem esclarecida, entretanto, sabe-se que os probióticos produzem bacteriocinas e ácidos

orgânicos, competem com a microbiota patogênica pelos sítios de adesão e nutrientes e sintetizam metabólitos que criam um ambiente desfavorável ao crescimento de organismos patogênicos, impedindo assim a sua proliferação (Mcnaught et al., 2001; Chen & Walker, 2005; Lange, 2005; Chen et al., 2006; Parvez et al., 2006; Araújo et al., 2007; Ng et al., 2009; Nogueira; Gonçalves, 2011). Entretanto, esses efeitos benéficos parecem ser dose dependente e estão ligados, por exemplo, a supressão da microbiota patogênica, boa capacidade de colonização do trato gastrintestinal, e alta taxa de crescimento mesmo diante de baixas exigências nutricionais (Lange, et al. 2010). Portanto, a melhora da saúde intestinal pode estar ligada diretamente com a quantidade e cepas presentes neste sítio. Dentre essas bactérias podemos citar os *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp. (Rolfe, 2000).

Segundo Nurmi & Rantala (1973), a aptidão dessas bactérias pela proteção intestinal é conhecida como exclusão competitiva. Esses autores foram uns dos primeiros a descrever tal aptidão, ao proporem uma experimentação em que o conteúdo do lúmen intestinal de aves adultas, previamente resistentes à infecção por *Salmonella* spp., fosse administrado em aves com um dia de vida, sendo possível observar uma resistência adquirida por estas aves após um período de tratamento.

Alguns estudos demonstram que as bactérias ácido-láticas podem ser utilizadas como probióticos em seres humanos e animais devido às suas propriedades capazes de auxiliar na saúde e bem-estar dos consumidores, havendo necessidade de uma avaliação prévia destes micro-organismos, no que se refere as suas características como capacidade de adesão, resistência às barreiras físicas do trato gastrintestinal e resistência ao pH (Rolfe, 2000; Chen et al., 2006). Outros mecanismos de ação estariam relacionados à competição pelos sítios de adesão e pelos nutrientes com a microbiota patogênica (Ng et al., 2009); a modulação do sistema imune, através da interação com receptores das células epiteliais (Parvez et al., 2006), e redução dos danos teciduais causados por doenças entéricas (Lenoir-Wijnkoop et al., 2007).

Segundo Lenoir-Wijnkoop et al. (2007), os probióticos possuem a capacidade de evitar ou reduzir o tempo de diarreia, diminuindo os danos teciduais causados pela doença entérica. A suplementação das dietas pela

utilização de agentes microbianos baseia-se na simbiose, com a associação de organismos superiores com a microbiota bacteriana, promovendo benefícios a ambos (Pedroso, 2003; Araújo et al., 2007).

Existe, portanto, um grande interesse por parte dos setores industriais e de pesquisa, na busca por micro-organismos capazes de ofertar efeitos benéficos à saúde animal, com menores riscos para o consumidor final (Kumar et al. 2015). Estes micro-organismos, quando adicionados em quantidades ideais na ração animal, podem promover melhora nos índices zootécnicos, com inibição de micro-organismos patogênicos, estimulação do sistema imune e evitar ou reduzir a síntese de compostos tóxicos (López, 2000; Silva e Nornberg, 2003).

2.2. PRINCIPAIS MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS E SUAS CARACTERÍSTICAS

Existem vários micro-organismos que possuem características probióticas. As mais utilizadas são as bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, já possuindo estas um histórico de seguridade (Carvalho et al., 2012). Entretanto, existem outros gêneros capazes de promover efeitos benéficos, como: *Lactococcus* spp., *Enterococcus* spp., e o fungo *Saccharomyces cerevisiae*, entre outras (Carvalho et al., 2012; Sivieri et al., 2013).

Na microbiota intestinal comum de humanos e animais, é possível encontrar os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sendo sua prevalência superior à de outras bactérias, quando se trata de indivíduo sadio (Oliveira, et al., 2017). Um grande representante desses grupos é *Lactobacillus acidophilus*, que é muito utilizado por empresas de alimentos na confecção de produtos com propriedades probióticas, pois esse gênero degrada uma série de açúcares, como frutose, galactose, glicose, lactose, maltose, entre outros (Raizel, et al., 2011).

Os lactobacilos e as bifidobactérias possuem as características desejáveis para uso como probióticos, desde a produção de compostos orgânicos advindos dos processos fermentativos, como ácido acético, ácido láctico e peróxido de hidrogênio que diminuem o pH intestinal, até as bacteriocinas que por sua vez auxiliam na destruição de micro-organismos

indesejáveis pela inibição de sua proliferação, além de reduzirem danos epiteliais (Morais, Jacob, 2006). Como outra forma de controle de enfermidades causadas por micro-organismos, os lactobacilos competem com esses patógenos por nutrientes, o que justifica sua presença ao longo de todo o cólon e intestino delgado (Chen, Walker, 2005). Algumas bactérias probióticas auxiliam na permeabilidade intestinal. Por exemplo, quando ocorre algum distúrbio na microbiota, há uma redução na seletividade intestinal, contribuindo para a passagem de macromoléculas, sendo esta síndrome conhecida como 'leaky gut' (Nogueira, Gonçalves, 2011). Os probióticos reforçam as junções intercelulares no trato gastrintestinal, reduzindo o extravazamento intestinal, aumentando a seletividade da membrana e diminuindo a passagem de macromoléculas para o interior das células, sendo importantes até pela redução de possíveis patógenos intracelulares (Baumgart, Dignass, 2002).

Finalmente, existe uma grande relação entre a saúde intestinal e a resposta imunológica. Apesar de não estar totalmente elucidado, sabe-se que bactérias probióticas têm efeito imunorregulatório tanto em animais quanto em humanos (Oliveira, et al., 2017). Ocorre estímulo para a produção de IgA pelos linfócitos B e aumento da atividade fagocítica de macrófagos, o que sugere uma ação sistêmica desencadeada pela secreção de mediadores estimulantes do sistema imune (Coppola, Turnes, 2004).

2.3.A FERMENTAÇÃO DO CACAU COMO FONTE DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO

O cacauero (*Theobroma cacao*) possui origem provável na Bacia Amazônica e é cultivada em muitas regiões tropicais do mundo. A importância do seu cultivo está ligada ao aproveitamento de suas sementes, também chamadas de amêndoas para produção de derivados de cacau, tendo como principal produto o chocolate (Alves, 2002).

Para a região de Ilhéus, o cacau é um fruto de extrema importância, culturalmente e economicamente. Durante muitos anos o fruto foi responsável pelo crescimento socioeconômico da região, sendo o estado da Bahia responsável por aproximadamente 52,5% da produção nacional do fruto, segundo dados do IBGE em 2018.

Para a fermentação utiliza-se apenas a semente do cacau; esta é retirada do fruto e passa por um processo fermentativo que pode durar de 3 a 10 dias (Camu et al., 2007). Durante o processo fermentativo da amêndoa ocorre uma série de alterações microbiológicas, no qual participam leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas, estas últimas favorecidas pelo baixo pH, elevada concentração de açúcares e escassa disponibilidade de oxigênio, tendo como destaque bactérias do gênero *Lactobacillus* (Schwan & Wheals, 2004; Santos, 2010). Há produção de etanol pela fermentação dos açúcares promovendo a degradação da pectina. Essa atividade alcaliniza o ambiente e aumenta a temperatura, dando condições para o crescimento das bactérias (Santos, 2010). As bactérias lácticas vão consumir os açúcares e ácidos orgânicos gerando um aumento do pH, enquanto que as bactérias acéticas vão oxidar o etanol produzido pelas leveduras, formando ácido acético. Com a geração de calor desse processo e difusão do ácido acético e do etanol para dentro da amêndoa, ocorre morte do embrião e o fim da fermentação (Schwan, Wheals, 2004).

Ardhana (2003) encontrou na fermentação do cacau *Lactobacillus cellobiosus* e *L. plantarum*, utilizando técnicas tradicionais de cultivo celular; Passos et al. (1984) identificou principalmente *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. delbrueckii* e *L. plantarum* também realizando o processo fermentativo com as técnicas tradicionais de cultivo; e Nielsen et al. (2007) utilizaram uma técnica de eletroforese em gel de gradiente desnaturante e observaram a presença de *L. fermentum* predominantemente. Também foram obtidas outras espécies como *L. plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, entretanto, foi possível demonstrar que diferentes técnicas de fermentação poderiam alterar a dinâmica microbiana, influenciando nas bactérias predominantes ao final do processo.

2.4. USO DE PROBIÓTICOS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL

Diante da crescente preocupação dos mercados internacionais para produtos de origem animal, concomitantemente com a apreensão da comunidade científica com a segurança alimentar, principalmente pelo surgimento de cepas bacterianas mais resistentes; e resíduos nos produtos cárneos, os probióticos passam a ser uma alternativa ao uso de antibióticos na

alimentação animal (Lopez, 2014). Neste contexto, o uso de probióticos como alimento funcional tem sido abordado, visando à produção de alimentos mais saudáveis e isentos de resíduos de antibióticos (Silva e Nornberg, 2003).

Na suinocultura, o desmame é o período mais crítico, pois os leitões passam por um período de estresse causado pela separação das matrizes, troca de ambiente de convívio e a troca repentina da alimentação líquida (leite) para a sólida (ração) (Lalles, 2007). Além disso, no desmame há grande incidência de distúrbios digestivos, causando diminuição no crescimento dos animais e baixa ingestão de alimento pelos leitões (Dlamini, et al. 2017).

Nesse período, há grande incidência da síndrome da diarreia pós-desmame, potencializado pelo aumento de bactérias enteropatogênicas, como a *Escherichia coli* (Rist, et al. 2013). Trata-se de uma doença multifatorial que acomete suínos nas duas primeiras semanas pós-desmame, gerando grande perda econômica nas granjas, levando há gastos com medicamentos, atrasos no desenvolvimento dos leitões e aumento da “refugagem” dos animais (Lima, et al. 2009).

2.5.CULTIVO CELULAR COMO ALTERNATIVA AO MODELO DE EXPERIMENTAÇÃO *IN VIVO*

No final do século XIX houve o primeiro esboço da técnica de cultura celular, desenvolvido por Wilhelm Roux (1885), sendo descrito como uma conservação de células embrionárias em solução salina. O cultivo celular que é compreendido atualmente em laboratórios se iniciou no século XX, com Harrison (1907), com o intuito de estudar o comportamento celular fora do organismo vivo, em um ambiente totalmente controlado (Alves, Guimarães, 2013). Em 1952, George Gey obteve um cultivo celular contínuo, quando criou a primeira linhagem celular (HeLa) advindas de um processo tumoral (Lucey, et al., 2009). Um grande obstáculo encontrado foi à descoberta de limitação no tocante à quantidade de cultivos que podiam ser realizados com outras culturas celulares, sendo intitulado de “Limite de Hayflick”, em 1961, pelos pesquisadores Leonard Hayflick e Paul Moorhead, alterando o pensamento de que as células teriam vida infinita em ambientes com substrato necessários para seu desenvolvimento (Hayflick, Moorhead, 1965).

Thompson e Gearhart (1998) pesquisaram e conseguiram isolar células-tronco humanas, sendo pioneiros na época, pois ainda não se utilizavam as culturas celulares na tentativa de regeneração tecidual. Atualmente, muitos dos esforços da área são para o isolamento e utilização de células tronco, embora ainda se faça muito o uso de culturas celulares diversas em pesquisas laboratoriais para estudo do comportamento tecidual em situações adversas *in vitro* (Alves, Guimarães, 2013).

A primeira cultura celular animal foi desenvolvida em 1962 por Nakamura e outros pesquisadores no Japão, sendo batizada como linhagem Vero, oriunda dos rins do macaco verde africano (Alves, Guimarães, 2013), sendo utilizada até hoje como modelo celular para produção de vacinas.

Atualmente, o modelo experimental com utilização de culturas celulares tem se mostrado factível quando comparado à utilização de animais experimentais, pois, essas são biologicamente menos complexas, há maior controle ambiental, homogeneidade amostral quando comparada à utilização de animais, é economicamente mais viável e fornecem respostas de forma rápida e simplificada. Como os trabalhos com a utilização de cultivos celulares sempre atenderam a demanda de mercado humano, não há informações quanto ao uso de cultura celular humana tendo como finalidade a experimentação de um produto voltado para animais. Diante dessa lacuna e devido à proximidade genética existente entre humanos e os suínos, optou-se pela utilização de uma cultura celular intestinal humana, a linhagem HT29, que são células de adenocarcinoma de cólon humano que possuem capacidade de diferenciação de células intestinais maduras, como células caliciformes. As informações obtidas no presente trabalho podem auxiliar na nutrição dos suínos, visto que a utilização de bactérias probióticas vem sendo estudada por vários pesquisadores, com resultados positivos quanto ao uso destas bactérias na dieta dos animais (Chiquieri, et al. 2007; Robles-Huaynate, et al. 2013; Santos, et al. 2016), havendo uma melhora, principalmente, na saúde intestinal, e, conseqüentemente, melhorando o desempenho dos animais nos diferentes sistemas de produção.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Crescimento e manutenção dos micro-organismos

As cepas testadas, *Lactobacillus fermentum* 6.2, *L. plantarum* 7.1 e *L. plantarum* 5.2 foram isoladas previamente durante a fermentação do cacau fino, e foram mantidas em meio líquido *Lactobacilli* MRS (1% de peptona, 0,8% de extrato de carne, 0,4% extrato de levedura, 2% de glicose, 0,5% de acetato de sódio, 0,2% Hidrogenofosfato dipotássico, 0,02% Sulfato de Magnésio⁷. H₂O, 0.005% Sulfato de manganês⁴. H₂O, 0.02% Citrato triamônio) (HIMEDIA) + 20% de Glicerol e estocada a -80°C. Para experimentação, as cepas foram cultivadas em meio líquido *Lactobacilli* MRS (Man, Rogosa e Sharpe), por 18h em estufa a 37°C com posterior avaliação do seu crescimento.

Para obtenção dos sobrenadantes, os lactobacilos foram cultivados em caldo MRS por 48 horas a 37 ° C. Após a incubação, os sobrenadantes foram obtidos através de centrifugação por 8000 x g, a fim de separá-los das células.

A bactéria patogênica utilizada para os demais ensaios foi a *Escherichia coli* K88⁺, proveniente do laboratório de microbiologia do Hospital Veterinário da UESC. Cresceu em meio BHI (Brain-Heart Infusion) por 24 horas a 37°C. Para a realização dos experimentos, a bactéria foi lavada com solução salina 0,9% centrifugada e ressuspensa na mesma solução. Em sequência foi ajustada à concentração de 1x10⁸ CFU ml⁻¹.

3.2. Cultivo das Células HT- 29

As células HT-29 (intestinal humana) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro - BCRJ (Rio de Janeiro) foram cultivadas em meio DMEM (Sigma Chem. Co. St. Louis, MO, USA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco), L-glutamina, penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 100 ug/mL. As células (3x10⁵ células) foram semeadas em garrafas de 75 cm² e incubadas a 37°C em estufa úmida contendo 5% de CO₂. Os repiques foram realizados a cada 72 horas até confluência. Para os tratamentos, as células foram dispostas na densidade de 1,5 x 10⁵ para cada poço em placas de 96 poços, mantidas as mesmas características de cultivo.

3.3. Ensaio de viabilidade celular através da metabolização do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT)

A viabilidade das células HT-29 foi avaliada através da medida da capacidade das células de reduzir o MTT (4,5-dimetil-2-tiazolil-2,5-difenil-tetrazólio) a formazan. O formazan é um pigmento insolúvel que é extraído das células e quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 570 e 620 nm. A redução do MTT é catalisada principalmente pelas desidrogenases mitocondriais e também do citoplasma. Portanto, a alteração da função mitocondrial poderá ser detectada através da variação da capacidade de redução do MTT. Após o tratamento com os sobrenadantes dos lactobacilos, dispostos nas concentrações de 40 mg/mL, com regressão da concentração pela metade, até atingir a concentração de 0,625 mg/mL, foram adicionados 10 uL da solução de MTT (5 mg/mL) seguido de incubação na ausência de luz por 4 horas, tempo necessário para a redução do MTT a formazan. A seguir, 100 uL de SDS 10 % (m/v) (em HCl 0,01 mol/L) foram adicionadas em cada poço a fim de solubilizar os cristais de formazan formados e incubado por 12 horas. Posteriormente, foi realizada a leitura da absorbância correspondente a cada poço determinada por leitura de absorbância com auxílio de um leitor de placas (Expert Plus Asys). Os valores foram expressos em porcentagens de redução de MTT em relação ao controle, onde as células não foram expostas às formulações do sobrenadante (Mosmann, 1983).

3.4. Autoagregação de lactobacilos e coagregação entre lactobacilos e *E. coli* K88⁺

Para avaliar a capacidade de ligação entre as cepas de lactobacilos entre si, foi realizado o ensaio de autoagregação. Os lactobacilos foram lavados duas vezes com solução salina 0,9% após crescimento e ressuspensos na mesma solução até $A_{600nm} = 0,3$. Em sequência, retirou-se uma alíquota de 1 mL da solução e esta foi incubada a 37°C por 5 horas. A absorbância do sistema foi monitorada a cada hora e a porcentagem de autoagregação foi calculada relativamente à absorbância inicial, usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ autoagregação} = (\text{OD}_{\text{inicial}} - \text{OD}_{\text{final}}) / \text{OD}_{\text{inicial}} \times 100$$

Sendo OD a densidade óptica.

No intuito de avaliar a capacidade de associação dos lactobacilos com outras bactérias, foi mensurado a coagregação. Para isso, as cepas de lactobacilos e a bactéria *E. coli* K88⁺ foram lavadas duas vezes com solução salina 0,9% e ressuspendidas na mesma solução até $A_{600\text{nm}} = 0,3$. Após, cada cepa de *Lactobacillus* foi co-incubada com *Escherichia Coli* K88⁺, na proporção de 1:1 – a 37°C por 5 horas. A absorbância também foi mensurada a cada hora e a porcentagem de coagregação foi dada pela seguinte fórmula

$$\% = [((A_x + A_y)/2) - A_{(x+y)}] / [(A_x + A_y)/2],$$

Sendo que A_x e A_y indicam a absorbância das cepas sozinhas (controle) e $A_{(x+y)}$ indicam a absorbância dos lactobacilos com a cepa patogênica.

3.5. Atividade antimicrobiana do sobrenadante de cultura frente a *E. coli* K88⁺

Os sobrenadantes dos lactobacilos foram testados para avaliar sua atividade antimicrobiana, através da técnica de difusão em ágar. A *Escherichia coli* K88⁺ foi cultivada em caldo BHI por 24h a 37°C. Após a incubação, ajustou-se a concentração para 1×10^8 UFC/ml em espectrofotômetro e uma alíquota de 100 µL desta suspensão foi inoculada em placas de Mueller-Hinton ágar. Foram feitos pequenos poços no ágar e foi adicionado em cada poço 100 µL do sobrenadante de cada cepa dos lactobacilos na concentração de 40mg/mL, determinada após pesagem do material seco e diluição em meio de cultura. Após 24h de incubação a 37°C, a presença ou ausência dos halos de inibição foi observada, com mensuração do diâmetro dos halos.

3.6. Formação de biofilme por *E. coli* K88⁺ na presença ou ausência dos lactobacilos isolados da fermentação do cacau

A cepa de *Escherichia coli* K88⁺ foi cultivada em meio BHI e após diluição foram plaqueadas em placa de 96 poços para incubação.

Após o período de incubação a 37 ° C foi realizada avaliação de formação de biofilme nas primeiras 24h de incubação e depois com 48 horas.

Sendo comprovada a formação do biofilme, visto que se trata de uma cepa de *E. coli* enteropatogênica, foi realizada o cultivo com as cepas de lactobacilos e com o sobrenadante dos lactobacilos para verificar se, de alguma forma, há efeito direto na formação do biofilme.

Em sequência, a placa foi levada ao espectrofotômetro para leitura e avaliação da absorbância. Foi utilizado comprimento de onda de 492 nm. Para o cálculo da formação do biofilme, utilizou-se a fórmula:

$$\text{BFI} = x/y;$$

Sendo que x é a densidade ótica no comprimento de onda de 492 nm ($A_{492\text{nm}}$) e y é a densidade ótica do *Streptococcus pyogenes* ($A_{492\text{nm}}=0,07$).

Após o cálculo, foi possível classificar os micro-organismos como: não produtores de biofilme (Índice de Formação de Biofilme – IFB menor ou igual a 0); baixo produtor de biofilme (IFB menor que 1); produtores moderados (IFB entre 1 e 2); produtores (entre 2 e 3) ou grandes formadores de biofilme (IFB maior que 4), seguindo metodologia de Oliveira et al. (2014).

3.7. Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os valores apresentados representam as médias e desvio padrão dos dados obtidos e foram analisados através do GraphPad Prism 5.1. As diferenças estatísticas entre os valores foram determinadas utilizando ANOVA e pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Autoagregação e coagregação

Os valores referentes à autoagregação e coagregação estão dispostos na figura 1. Dentre as cepas avaliadas no presente estudo, o *Lactobacillus fermentum* 5.2 e o *Lactobacillus plantarum* 7.1 apresentaram semelhante capacidade de autoagregação, em torno de 20% (Figura 1a). Apenas o *Lactobacillus plantarum* 6.2 diferiu significativamente dos demais, com valor em torno de 30%. A capacidade de autoagregar é fundamental para a resistência das bactérias às condições adversas do ambiente ao qual elas estão sendo

inseridas, seja na cavidade oral, no trato gastrointestinal ou urogenital (Castagliuolo et al. 2005; Nikolic et al. 2010).

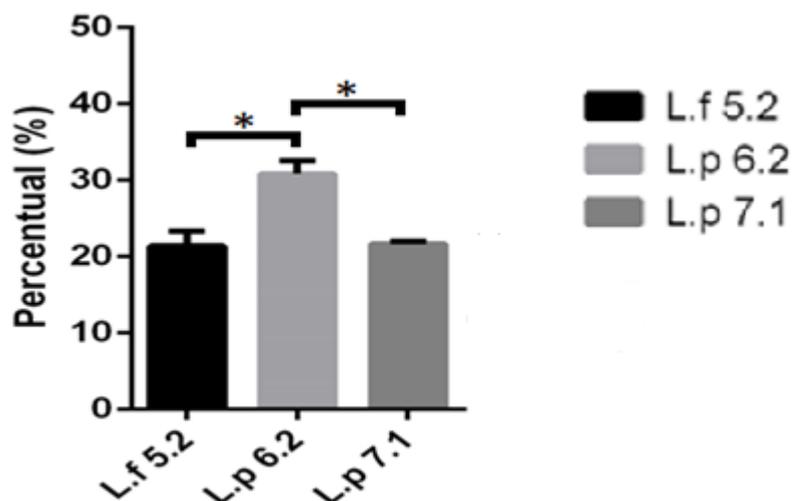


Figura 1. Valores de autoagregação Resultados dispostos em percentual das médias dos dados obtidos de autoagregação dos lactobacilos isolados. É possível observar diferença estatística significativa ($p < 0,05$), pelo Teste de Tukey, quando comparamos o tratamento L.p 6.2 ($\pm 30\%$) com os demais tratamentos.

Os dados do presente estudo se assemelham a outros estudos, com uma variação de autoagregação entre 20% e 30%. Grigoryan et al. (2017), em estudo com duas cepas de *Lactobacillus* spp., encontraram valores de agregação variando entre 20 e 30%. Lima (2016), em experimento realizado com seis cepas de bactérias ácido-láticas, dentre estas três *Lactobacillus* spp., encontrou valores de autoagregação variando de 16% a 35%.

Valeriano et al. (2014) e Dicks et al. (2017) observaram uma correlação positiva entre o aumento da capacidade de autoagregação das cepas de *Lactobacillus* com o aumento do tempo de incubação. No presente trabalho também foi possível observar tal correlação (Figura 2) em que a relação tempo/capacidade de autoagregação foi positiva, ou seja, na medida em que o tempo de incubação aumentou, foi possível observar um maior percentual de *Lactobacillus* auto agregados.

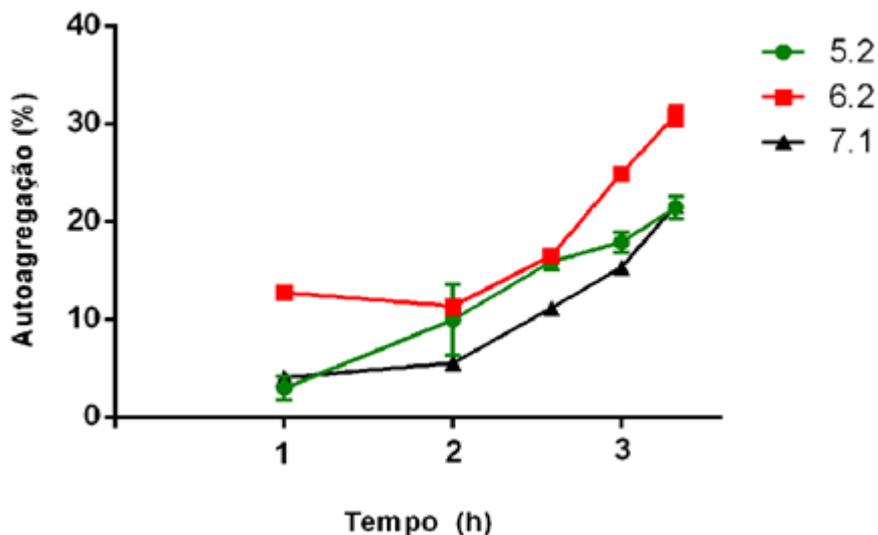


Figura 2. Percentual de autoagregação em função do tempo. É possível constatar que, na medida em que o tempo de incubação aumenta, o percentual de autoagregação das três cepas de lactobacilos estudados também aumenta, evidenciando o que foi constatado por outros trabalhos.

Dicks et al. (2017) sugerem que uma boa capacidade de autoagregação permite a formação de uma barreira, capaz de bloquear a adesão de bactérias patogênicas na mucosa. Isto foi reforçado por Campana et al. (2017), que associaram a autoagregação com a capacidade dos microorganismos probióticos de persistirem em quantidade satisfatória no trato gastrintestinal; logo, pode haver maior número de *Lactobacillus* aderindo a mucosa e impossibilitando que bactérias patogênicas tenham seu efeito deletério.

Os valores da coagregação obtidos no presente estudo das três cepas estudadas mostram capacidade entre moderada a boa de se ligarem à *E. coli* K88⁺, sendo o *L. plantarum* 6.2 a cepa que apresentou melhor capacidade de ligação (Figura 3).

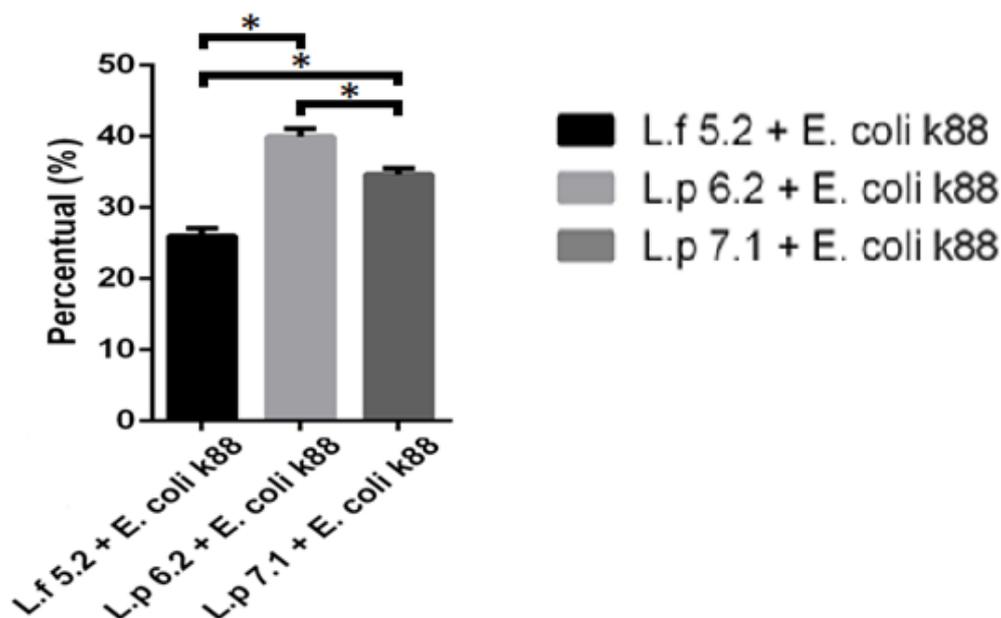


Figura 3. Valores de coagregação. Resultados dispostos em percentual das médias dos dados obtidos de coagregação dos lactobacilos com a *E. coli* K88⁺. É possível observar diferença estatística significativa ($p < 0,05$), pelo Teste de Tukey, quando comparamos o tratamento L.p 6.2 ($\pm 40\%$) com os demais tratamentos.

A coagregação é um dos mecanismos dos lactobacilos para interferirem sobre os patógenos, pois formam uma barreira que diminui a adesão e colonização da mucosa pelos micro-organismos patogênicos e facilitam a eliminação destes pelo trato gastrintestinal (Younes et al. 2012; Campana et al., 2017).

Tuo et al. (2013) em estudo realizado com cepas de *L. plantarum* incubadas com *E. coli* O157:H7, encontraram valores em torno de 25% de coagregação. Mais recentemente, um estudo realizado por Almeida (2017), utilizando oito cepas de *Lactobacillus*, observou valor médio de coagregação de 14%, em incubação com *E. coli* INCQS 00171 e de 2% com *Salmonella enteritidis*.

Tareb et al. (2013), utilizando a mesma bactéria patogênica do presente estudo em co-incubação com *L. rhamnosus* CNCM-I-3698, encontraram níveis de coagregação bem inferiores ao deste estudo (cerca de 8%) após 4h de incubação.

Em contrapartida, Pessoa et al. (2017) encontraram valores superiores a 40% de coagregação, utilizando as três cepas de *Lactobacillus* avaliadas pelo presente trabalho, quando associadas à *Gardnerella vaginalis*.

Esses dados demonstram a capacidade das três cepas de lactobacilos em autoagregar, sendo esta propriedade favorável à permanência da bactéria no sítio de interesse e conseqüentemente seu efeito probiótico. Além disso, as cepas também foram capazes de coagregar com *E. coli* K88⁺, demonstrando outra propriedade probiótica destes lactobacilos que favorecem a retirada de bactérias patogênicas do ambiente intestinal.

4.2. Atividade antimicrobiana

A fim de avaliar o efeito antimicrobiano dos sobrenadantes dos *Lactobacillus* (na concentração de 40mg/mL) sobre *E coli* K88⁺, foi realizado o teste de difusão em ágar (Figura 3). Como resultado, foi possível observar que os sobrenadantes das cepas de *L. plantarum* 6.2 e 7.1 e *L. fermentum* 5.2 não inibiram o crescimento de *E. coli* K88⁺.



Figura 4. Atividade antimicrobiana dos sobrenadantes por difusão em ágar. É possível perceber que não há formação de halos de inibição quando utilizamos os sobrenadantes de *Lactobacillus* na concentração de 40 mg/mL.

Arena et al. (2016) encontraram grande variabilidade entre cepas de lactobacilos no tocante à atividade antimicrobiana, o que leva a crer que tal propriedade seja cepa-específica. Barros et al. (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* spp. isolados de frangos, contra diferentes cepas de *Salmonella* spp. e demonstraram interferência no crescimento com a

formação de halos de inibição para todas as cepas de *Salmonella* spp. desafiadas.

Pereira e Gómez (2007) encontraram efeito inibitório utilizando *Lactobacillus acidophilus* contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* K88⁺. Em outro estudo utilizando a mesma bactéria do presente trabalho, *E. coli* K88⁺, Valeriano et al. (2014) observaram inibição de crescimento da *E. coli* utilizando o sobrenadante de *Lactobacillus mucosae* LM1.

Vineetha et al. (2016) isolaram um lactobacilo (LGFCP4) do trato gastrintestinal de galinhas d'Angola e avaliaram sua capacidade inibitória frente a cepas de *E. coli* spp. e *Salmonella* spp., constatando a formação de halos de inibição. Campana et al. (2017) utilizaram uma cepa de *Lactobacillus plantarum* de um produto comercial, e encontraram discreta atividade antimicrobiana contra alguns patógenos intestinais, incluindo *E. coli* O157:H7 ATCC35150.

Pessoa et al. (2017) observaram atividade antimicrobiana contra *Gardnerella vaginalis*, utilizando as mesmas cepas usadas no presente trabalho, sendo que *L. plantarum* 6.2 e 7.1 exibiram atividade antimicrobiana, enquanto o sobrenadante de *L. fermentum* 5.2 não foi capaz de inibir o crescimento da bactéria estudada por eles.

Souza (2000) relatou uma diminuição do pH (em torno de 4,4) pela *E. coli* em processos metabólicos fisiológicos, com produção de ácido e gás pela fermentação da glicose. Pessoa et al. (2017) avaliaram o pH dos sobrenadantes das cepas estudadas no presente trabalho e observaram valores entre 3,7 a 4,7. Esses valores de pH podem não ser o suficiente para que haja um efeito inibitório no crescimento da *E. coli* K88⁺ pelas três cepas de lactobacilos estudadas.

4.3. Formação de biofilme

Os dados obtidos quanto à formação do biofilme pela *E. coli* K88⁺ na presença dos sobrenadantes das cepas de *Lactobacillus* na concentração de 40 mg/mL, estão apresentados na figura 4. Dos três sobrenadantes avaliados, o que apresentou maior interferência na formação do biofilme de *E. coli* K88⁺ foi o obtido de *L. plantarum* 7.1, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos.

Seguindo o critério de avaliação da formação de biofilme descrito por Oliveira et al. (2014), a cepa de bactéria patogênica utilizada, *E. coli* K88⁺, demonstrou ser grande produtora de biofilme (IFB maior que 4).

A capacidade de formação de biofilme pode estar implicada na capacidade de virulência da bactéria, uma vez que interfere diretamente na ação de agentes antimicrobianos (Donelli e Guaglianone, 2004). Além disso, bactérias em biofilmes são mais resistentes a condições desfavoráveis do meio onde se encontram quando comparadas com sua forma planctônica.

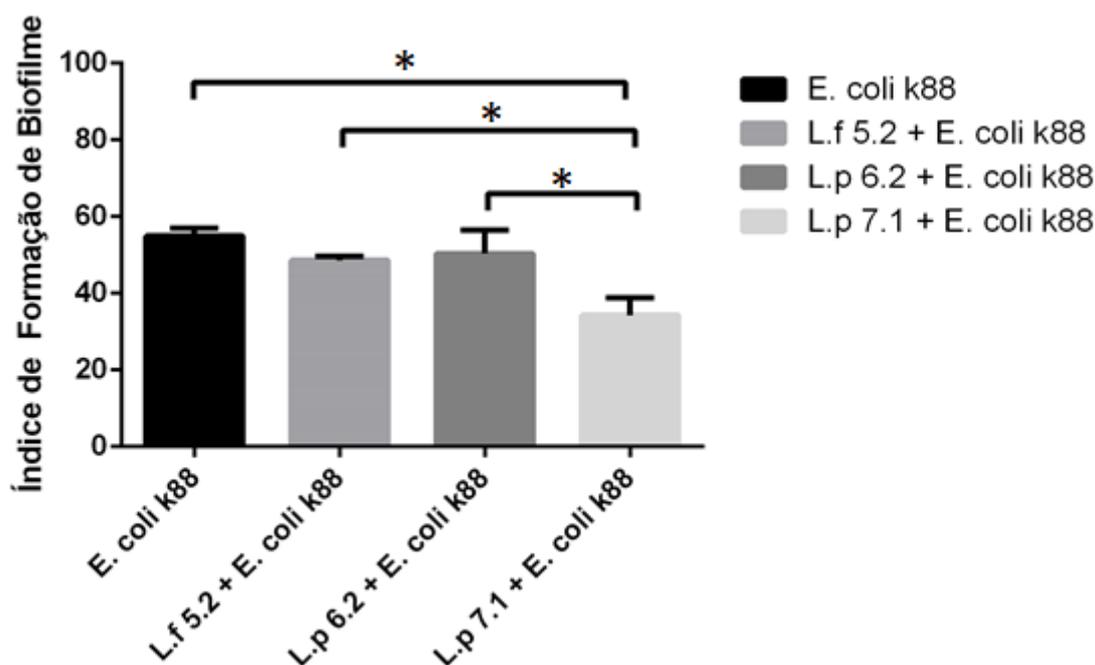


Figura 5. Formação do biofilme pela *E. coli* K88⁺, em incubação ou não com sobrenadante de *L. fermentum* 5.2, *L. plantarum* 6.2 e 7.1. Os dados demonstram diferenças estatísticas que foram determinadas pelo Teste de Tukey. É possível observar significância estatística ($p < 0,05$) quando comparamos o tratamento L.p 7.1 + *E. coli* K88⁺ com os demais tratamentos.

Mahdhi et al. (2018) utilizaram polissacarídeos extracelulares, secretados por *Lactobacillus plantarum* e *Bacillus* spp., e observaram diminuição na formação do biofilme em *E. coli* ATCC35218. Gómez et al. (2016), em estudo realizado com diversas cepas de *Lactobacillus* spp. encontraram inibição total na formação de biofilme de *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium*.

Em trabalho realizado por Melo et al. (2016) utilizando duas cepas do presente estudo, sendo elas *L. fermentum* 5.2 e *L. plantarum* 7.1, encontraram resultados satisfatórios quanto a redução da formação de biofilme de

Staphylococcus aureus quando este associado ao *L. fermentum* 5.2, enquanto que houve baixa inibição na formação do biofilme pelo *L. plantarum* 7.1. Os dados do presente trabalho diferem dos de Melo et al. (2016), que foi possível observar maior redução na formação do biofilme pelo *L. plantarum* 7.1. Tais resultados demonstram que há fortes indícios de que a capacidade de interferência na formação de biofilme pelas cepas estudadas seja cepa-específica vide que existem diversos produtos formados nos processos metabólicos dos lactobacilos, como ácido lático, ácido acético, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (Tulumoglu et al., 2013).

4.4. Ensaio de viabilidade celular da linhagem HT 29 na presença de sobrenadantes de lactobacilos

A viabilidade das células HT-29 após interação por uma hora com o sobrenadante das cepas de lactobacilos está apresentada na figura 5.

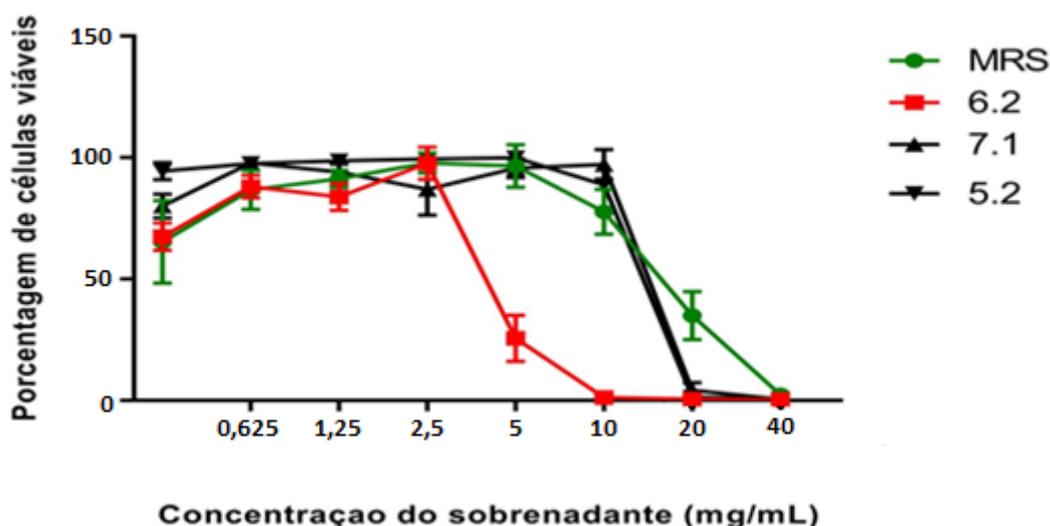


Figura 6. Ensaio de viabilidade celular após 24h de interação das células HT-29 com o meio de cultura de lactobacilos (MRS) e com os sobrenadantes das cepas de *Lactobacillus* spp. avaliadas. No eixo X estão dispostas as concentrações do sobrenadante utilizadas, e no eixo Y a porcentagem de células vivas.

O sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* 6.2 apresentou maior citotoxicidade às células, sendo possível verificar redução da viabilidade de HT-29 já na concentração de 5 mg/mL. Na concentração de 10 mg/mL houve morte celular de toda a cultura, diferente dos sobrenadantes de *L. fermentum* 5.2 e *L. plantarum* 7.1, que apresentaram menor toxicidade em concentrações semelhantes. Outros autores demonstraram citotoxicidade em níveis inferiores

a deste estudo, dentre estes, Chen et al. (2017) utilizando concentrações de 0,2 mg/mL até 0,7 mg/mL de diferentes cepas de *Lactobacillus* spp. advindos da própria microbiota humana. Utilizando as células HT-29, encontraram citotoxicidade para todas as faixas de concentração avaliadas.

Thirabunyanon et al. (2009), avaliaram o potencial antiproliferativo de *Lactobacillus fermentum*, com células HT-29, e encontraram citotoxicidade na concentração de 0,1 mg/mL. Tais resultados podem ser explicados devido à acidificação do meio, realizado pelos lactobacilos, na fermentação de glicogênio e produção de ácido lático (Pessoa, et al. 2017).

O conjunto dos dados apresentados neste estudo demonstram que, na concentração de 40 mg/mL, os sobrenadantes dos lactobacilos avaliados não podem ser utilizados na alimentação animal e humana, devido a alta toxicidade sobre as células HT-29. Entretanto, a capacidade de atuar inibindo a formação de biofilme sobre a cepa de *E. coli* K88⁺, bactéria frequentemente associada às diarreias em leitões no período pós-desmame (Utyiama et al. 2006) revela que esses sobrenadantes possam ser utilizados no controle bacteriano das instalações das granjas. Vários estudos revelam que bactérias em biofilme são mais resistentes a produtos utilizados para seu controle/eliminação e aos mecanismos de defesa do hospedeiro do que quando estão na forma planctônica (Barbosa, 2015).

Essa possibilidade de uso dos lactobacilos para reduzir a formação de biofilme de *E. coli* K88⁺ é de grande importância nos sistemas de produção, pois diminui consideravelmente a recidiva de infecções e contaminações nos suínos e pode interferir de forma considerável no custo de produção (EMBRAPA, 2016).

Alem disso, a boa capacidade de autoagregar e coagregar dos lactobacilos, entre 20 e 30%, abre uma nova linha de investigação quanto ao uso dessas bactérias em associação à ração animal ou a prebióticos. Esses aditivos alimentares associados poderiam minimizar os efeitos deletérios sobre as células humanas e animais. Porém, serão necessários estudos adicionais para confirmar essas premissas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As bactérias láticas estudadas no presente trabalho apresentaram boa capacidade de autoagregação e coagregação, sendo a cepa de *Lactobacillus Plantarum* 6.2 a que apresentou melhores valores das variáveis analisadas. É possível observar uma correlação positiva entre a autoagregação e coagregação, corroborando com a ideia de que a autoagregação é fator crucial para aumento da viabilidade das bactérias.

As três cepas estudadas não foram capazes de impedir o crescimento da *Escherichia coli* K88⁺ no teste de inibição em ágar, entretanto, o sobrenadante da cepa de *Lactobacillus plantarum* 7.1 se mostrou capaz de interferir e inibir a formação de biofilme pela *E. coli* K88⁺, diferentemente das demais cepas avaliadas, que, apesar de terem capacidade de interferência na formação do biofilme, não foram tão eficientes quanto o *Lactobacillus plantarum* 7.1.

Os dados obtidos mostram a capacidade de utilização dos lactobacilos estudados, como produto para higienização e sanitização de instalações de granjas, e mostram também a possibilidade de uso na alimentação animal desde que sejam realizados mais estudos com outros produtos que possam diminuir os efeitos deletérios apresentados pelos lactobacilos.

6. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M.E. de. Avaliação de propriedades biotecnológicas desejáveis em oito cepas de *Lactobacillus* com potencial probiótico isoladas da fermentação do cacau fino. 2018. 38 pág. Dissertação – (Mestrado em Biologia e Biotecnologia de Micro-organismos). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2018.

ALVES, S. A. M. Epidemiologia da vassoura de bruxa (*Crinipellis perniciososa* (STAHEL) SINGER) em cacauzeiros enxertados em Uruçuca, Ba. 2002. 70p. Dissertação - (Mestrado em Agronomia). Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba SP, 2002.

ALVES, E.A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. In: MOLINARO, Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis (Org.). Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. v.2. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. p. 215-253.

ARDHANA, M.M.; FLEET, G.H. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 86, n. 1, 87-99, 2003.

ARENA, M.P.; SILVAIN, A.; NORMANNO, G.; GRIECO, F.; DRIDER, D.; SPANO, G.; FIOCCO, D. Use of *Lactobacillus plantarum* strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Frontiers Microbiology* 7:464, 2016.

BARROS, M.R.; ANDREATTI FILHO, R.L.; LIMA, E.T.; CROCCI, J.A. Avaliação in vitro da atividade inibitória de *Lactobacillus* spp., isolados do ingluvío e cecos de aves sobre *Salmonella*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, n.4, p.863-868, 2009.

BAUMGART DC, DIGNASS AU. Intestinal barrier function. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 5(6):685-694, 2002.

CAMPANA, R.; HEMERT, S.; BAFFONE, W. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Biomed Central, Gut Pathogens*, 9:12, 2017.

CAMU, N.; WINTER, T. de; VERBRUGGHE, K.; CLEENWERCK, I.; VANDAMME, P.; TAKRAMA, J.S.; VANCANNEYT, M.; VUYST, L de. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Applied Environmental Microbiology*, v. 73, n.6, 1809-1824, 2007.

CASTAGLIUOLO, I.; GALEAZZI, F.; FERRARI, S.; MARINA, E.; BRUN, P.; CAVAGGIONI, A.; TORMEN, D.; STURNIOLO, G.C.; MORELLI, L.; PALÚ, G. Beneficial effect of auto-aggregating *Lactobacillus crispatus* on experimentally induced colitis in mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 43 (2005) 197–204.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI L.; COLLINS, J.K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *Journal of Food Protection*, vol. 61, n. 12, p. 1636–1643, 1998.

CHEN, C.C.; WALKER, W. A. Probiotics and Prebiotics: Role in Clinical Disease States. *Advances in Pediatrics*, v.52, p.77-113, 2005.

CHEN, Y. J.; MIN, B. J.; CHO, J. H.; KWON, O. S.; SON, K. S.; KIM, H. J.; KIM, I. H. Effects of Dietary *Bacillus*-based Probiotic on Growth Performance, Nutrients Digestibility, Blood Characteristics and Fecal Noxious Gas Content in Finishing Pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 19, n. 4, p. 587-592, 2006.

CHEN, Z.Y.; HSIEH, Y.M; HUANG, C.C.; TSAI, C.C. Inhibitory Effects of Probiotic *Lactobacillus* on the Growth of Human Colonic Carcinoma Cell Line HT-29. ***Molecules***, 2017, 22, 107.

CHIQUIERI, J.; SOARES, R.T.R.N.; HURTADO NERY, V.L.; CARVALHO, E.C.Q.; COSTA, A.P.D. Bioquímica sangüínea e altura das vilosidades intestinais de suínos alimentados com adição de probiótico, prebiótico e antibiótico. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. 2007;8(2):97-104.

DICKS, L.M.T.; DEANE, S.M.; KLOPPER, K.B. Aciduric strains of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus rhamnosus*, isolated from human feces, have strong adhesion and aggregation properties. *Probiotics&Antimicrob. Prot.* 2017.

DLAMINI, Z.C.; LANGA, R.L.S.; AIYEGORO, O.A.; OKOH, A.I. Effects of probiotics on growth performance, blood parameters and antibody stimulation in piglets. *South African Journal of Animal Science*, v.47, n.6, p. 766-775. 2017.

DONELLI, G.; GUAGLIANONE, E. Emerging role of *Enterococcus* spp in catheter-related infections: Biofilm formation and novel mechanisms of antibiotic resistance. *The Journal of Vascular Access*. 2004; v. 5, p. 3-9.

EMBRAPA. Bem-estar animal na produção de suínos: toda granja. Brasília-DF. ABCS: Sebrae, 2016. 38 pág.; il; color. (Bem-estar animal na produção de suínos).

KUMAR, H.; SALMINEN, S.; VERHAGEN, H.; ROWLAND, I.; HEIMBACH, J.; BAÑARES, S.; YOUNG, T.; NOMOTO, K.; LALONDE, M. Novel probiotics and prebiotics: Road to the market. **Current Opinion in Biotechnology**. vol. 32, pp. 99–103, 2015.

GÓMEZ, N.C.; RAMIRO, J.M.P.; QUECAN, B.X.V.; FRANCO, B.D.G. de M. Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation. *Frontiers in Microbiology*, June, 2016. v. 7, article 863.

GRIGORYAN, S.; BAZUKYAN, I.; TRCHOUNIAN, A. Aggregation and adhesion activity of Lactobacilli isolated from fermented products in vitro and in vivo: a potential probiotic strain. *Probiotics&Antimicro. Prot.* 2017.

HACIN, B.; ROGELJ, T.; MATIJASIC, B.B. Lactobacillus isolates from weaned piglets mucosa with inhibitory activity against common porcine pathogens. *Folia Microbial* 53, 569-579. 2008.

LALLES, J.P.; BOSI, P.; SMIDT, H.; STOKES, C.R. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proc. Nutr. Soc.* 66, 260-268. 2007.

LANGE, C. F. M.; PLUSKE, J. R.; GONG, J.; NYACHOTI, C. M. Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. *Livestock Science, Champaign*, v. 134, n.1/3, p.124-134, 2010.

LENOIR-WIJNKOOP, I.; SANDERS, M. E.; CABANA, M.D.; CAGLAR, E.; CORTHER, G.; RAYES, N.; SHERMAN, P.M.; TIMMERMAN, H. M.; VANEECHOUTTE, M.; VAN LOO, J.; WOLVERS, D.A.W. Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract. *Nutrition Reviews*, v.65, p. 46989, 2007.

LIMA G.J.M.M.; MORES N.; SANCHES R.L. As diarréias nutricionais na suinocultura. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37 (Supl 1): s17-s30. 2009.

LIMA, C.E. Potencial probiótico de bactérias ácido-láticas isoladas de ração de peixe. 2016. 41 pág. Dissertação – (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2016.

LIN, W.H.; HWANG, C.F.; CHEN, L.W.; TSEN, H.Y. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiology*, v.23, p.7481, 2006.

LÓPEZ, J. Probiotics in animal nutrition. In: International Symposium on Recent Advances in Animal Nutrition, 2000, Seoul. Proceedings... Seoul : Seoul National University, 2000. p.33–54.

LUCEY, B.P.; NELSON-REES, W.A.; HUTCHINS, G.M. Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. Arch Pathol Lab Med 133(9): 1463-1467. 2009.

MAHDHI, A.; LEBAN, N.; CHAKROUN, I.; BAYAR, S.; MAHDOUANI, K.; MAJDOUB, H.; KOUIDHI, B. Use of extracellular polysaccharides, secreted by *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus* spp., as reducing indole production agents to control biofilm formation and efflux pumps inhibitor in *Escherichia coli*. Microbial Pathogenesis 125, 2018, pág. 448-453.

MCNAUGHT, C.E.; MACFIE, J. Probiotics in clinical practice: a critical review of the evidence. Nutrition Research, v. 21, p.343-353. 2001.

MELO, T.A.; SANTOS, T.F. dos; ALMEIDA, M.E. de; FONTES JUNIOR, L.A.G.; ANDRADE, E.F.; REZENDE, R.P.; MARQUES, L.M.; ROMANO, C.C. Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by *Lactobacillus* isolated from fine cocoa. BMC Microbiology 16:250. 2016.

MORAIS, M.B. de; JACOB, C.M.A. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. Jornal de Pediatria - Vol. 82, Nº5(Supl), 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods, v.65, Issues 1–2, 16 December 1983, Pages 55-63.

NIELSEN, D.S.; TENIOLA, O.D.; BAN-KOFFI, L.; ANDERSSON, T.S.; HOLZAPFEL, W.H. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. Int. J. Food. Microbiol., v. 114, n. 2, 168–186, 2007.

NIKOLIC, M.; JOVCIC, B.; KOJIC, M.; TOPISIROVIC, L. Surface properties of Lactobacillus and Leuconostoc isolates from homemade cheeses showing autoaggregation ability. *European Food Research and Technology*, vol. 231, no. 6, pp. 925–931, 2010.

NG, S.C.; HART, A.L.; KAMM, M.A.; STAGG, A.J.; KNIGHT, S.C. Mechanisms of Action of Probiotics: Recent Advances. *Inflammatory Bowel Diseases*, v.15, n.2, p.300-310, 2009.

NOGUEIRA, J.C.R.; GONÇALVES, M. da C.R. Probióticos – Revisão de Literatura. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v.15, n.4, p. 487-492, 2011.

NURMI, E.; RANTALA, M. New aspects of Salmonella infection in broiler production. *Nature*, v. 241, p. 210-211, 1973.

OLIVEIRA, P.S.; SOUZA, S.G.; CAMPOS, G.B.; da SILVA, D.C.; SOUSA, D.S.; ARAÚJO, S.P.F.; FERREIRA, L.P.; SANTOS, V.M.; AMORIM, A.T.; SANTOS, A.M.O.G.; TIMENETSKY, J.; CRUZ, M.P.; YATSUDA, R.; MARQUES, L.M. Isolation, pathogenicity and disinfection of Staphylococcus aureus carried by insects in two public hospitals of Vitória da Conquista, Bahia, Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2014; v.18, n.2 , p. 129–136.

OLIVEIRA, G.L.V. de; LEITE, A.Z.; HIGUCHI, B.S.; GONZAGA, M.I.; MARIANO, V.S. Intestinal dysbiosis and probiotic applications in autoimmune diseases. *Immunology*. 2017; v.152, p. 1-12.

PARVEZ, S., MALIK, K.A., AHKANG, S., KIM, H.Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*: 100, p.11711185, 2006.

PASSOS, F.M.L.; SILVA, D.O.; LOPEZ, A.; FERREIRA, C.L.L.F.; GUIMARAES, W.V. Characterization and distribution of lactic acid bacteria from traditional cocoa bean fermentations in Bahia. *Journal of Food Science*, v.49, p.205- 208. 1984.

PEDROSO, A. A. Estrutura da comunidade de bactéria do trato intestinal de frangos suplementados com promotores de crescimento. 2003. 103p. Tese - (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.

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.

PESSOA, W.F.B.; MELGAÇO, A.C.C; ALMEIDA, M.E; RAMOS, L.P.; REZENDE, R.P.; ROMANO, C.C. In Vitro Activity of Lactobacilli with Probiotic Potential Isolated from Cocoa Fermentation against *Gardnerella vaginalis*, **BioMed Research International**, v. 2017, Article ID 3264194, 10 pages, 2017. DOI: 10.1155/2017/3264194.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A.M.; REIS FILHO, A.D. dos. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. Revista Ciência & Saúde, Porto Alegre, v. 4, n. 2, p. 66-74, jul./dez. 2011.

RIST, V.T.S.; WEISS, E.; EKLUND, M.; MOSENTHIN, R. Impact and activity on microbiota composition and activity in the gastrointestinal tract of piglets in relation to gut health: Anim. 7, 1067-1078. 2013.

ROBLES-HUAYNATE, R.A.; THOMAZ, M.C.; SANTANA, A.E.; MASSON, G.C.I.H.; AMORIM, A.B.; SILVA, S.Z.; RUIZ, U.S.; WATANABE, P.H.; BUDIÑO, F.E.L. Efeito da adição de probiótico em dietas de leitões desmamados sobre as características do sistema digestório e do desempenho. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal. 2013;14(1):248-258

ROLFE, R. D. The Role of Probiotic Cultures in the Control of Gastrointestinal Health. Journal of Nutrition: 130, p. 396S-402S, 2000.

SANTOS, T.F. Potencial probiótico de bactérias lácticas da fermentação do cacau (*Theobroma cacao*) em modelo de colite experimental. 2010. 71p. Dissertação (Mestrado em Biologia e Biotecnologia de Microrganismos). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus. 2010.

SANTOS, A.V.; FIALHO, E.T.; ZANGERÔNIMO, M.G.; CANTARELLI, V. de S.; TEOFILO, T. da S.; MOLINO, J.P. Aditivos antibiótico, probiótico e prebiótico em rações para leitões desmamados precocemente. *Ciência Animal Brasileira*, Goiânia, v.17, n.1, p. 1-10, jan./mar. 2016.

SCHWAN, R.F.; WHEALS, A.E. The Microbiology of Cocoa Fermentation and its Role in Chocolate Quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 44, p.205221, 2004.

SILVA, L.P.; NORBERG, J.L. Prebióticos na nutrição de não ruminantes. *Ciência Rural*. V.33, n.5, p. 983-990. 2003.

SIVIERI, K.; BEDANI, R.; CAVALLINI, D.C.U.; ROSSI, E.A. Probiotics and Intestinal Microbiota: Implications in Colon Cancer Prevention. *Lactic Acid Bacteria – R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. Rijeka:Intech, 2013, Ch 9, p. 217-242.

SOUZA, C. de. CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA DOS ANTÍGENOS SOMÁTICOS E PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE SUÍNOS COM DIARRÉIA NO ESTADO DO PARANÁ. 2000. 106p. Dissertação (Mestrado em Patologia). Univerisdade Federal do Paraná, setor de ciências agrárias, Curitiba. 2000.

TAREB,R.; BERNARDEAU, M.; GUEGUEN, M.; VERNOUX, JP. In vitro characterization of aggregation and adhesion properties of viable and heat-killed forms of two probiotic *Lactobacillus* strains and interaction with foodborne zoonotic bactéria, especially *Campylobacter jejuni*. *Journal of Medical Microbiology* 62: 637-649, 2013.

THIRABUNYANON, M.; BOONPRASOM, P.; NIAMSUP, P. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. **Biotechnology Letters**, 2009, 31: pág. 571-576.

TODOROV, S.D.; DICKS, L.M.T. Bacteriocin production by *Pediococcus pentosaceus* isolated from marula (*Scerocarya birrea*). *International Journal of Food Microbiology*. 132: 117-126. 2009.

TULUMOGLU,S; YUKSEKDAG, Z.N.; BEYATLI, Y.; SIMSEK, O.; CINAR, B.; YASAR, E. Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces. *Elsevier Anaerobe*, v.30, 120-125, 2013.

TUO, Y.; YU, H.; AI, L.; WU, Z.; GUO, B.; CHEN, W. Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Science* Vol. 96 No. 7, pág. 4252-4257, 2013.

UTIYAMA, C.E.; OETTING, L.L.; GIANI, P.A.; RUIZ, U. dos S.; MIYADA, V.S. Efeitos de antimicrobianos, prebióticos, probióticos e extratos vegetais sobre a microbiota intestinal, a freqüência de diarréia e o desempenho de leitões recém-desmamados. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 35, n.6, p. 2359-2367, 2006.

VALERIANO, V.D.; PARUNGAO-BALOLONG, M.M.; K-KANG. D. In vitro evaluation of the mucin-adhesion ability and probiotic potential of *Lactobacillus mucosae* LM1. *Journal of Applied Microbiology* 117, 485497, 2014.

VINEETHA, P.G.; TOMAR, S.; SAXENA, V.K.; SUSAN, C.; SANDEEP, S.; ADIL, K.; MUKESK, K. Screening of *Lactobacillus* isolates from gastrointestinal tract of guinea fowl for probiotic qualities using in vitro tests to select species-specific probiotic candidates. *British Poultry Science*, 2016.

YOUNES, J.A.; VAN DER MEI, H.C.; VAN DEN HEUVEL, E.; BUSSCHER, H.J.; REID, G. Adhesion forces and coaggregation between vaginal staphylococci and lactobacilli. *PLoS ONE*, vol. 7, no. 5, Article ID e36917, 2012.