

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CAMPUS ARARAQUARA**

**INFLUÊNCIA DO CONSUMO DE “IOGURTE” DE  
SOJA FERMENTADO COM *Enterococcus faecium* CRL  
183 NA MICROBIOTA INTESTINAL DE ANIMAIS E  
HUMANOS**

**RAQUEL BEDANI**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas da Universidade Estadual  
Paulista para a obtenção do título de Doutor  
em Alimentos e Nutrição, área Ciência dos  
Alimentos**

**Orientador: Prof. Dr. Elizeu Antonio Rossi**

**Araraquara  
2008**

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

B399i Bedani, Raquel  
Influência do consumo de “Iogurte “ de soja fermentado com  
*Enterococcus faecium* CRL 183 na microbiota intestinal de animais e  
humanos / Raquel Bedani. – Araraquara, 2008.  
122 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita  
Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação  
em Alimentos e Nutrição

Orientador: Elizeu Antonio Rossi

1.Iogurte de soja. 2.*Enterococcus faecium* CRL183. 3.Microbiota  
intestinal. 4.Enzimas. I.Rossi, Elizeu Antonio, orient. II.Título.

**CAPES: 40300005**

**BANCA EXAMINADORA**

Dr. Elizeu Antonio Rossi  
(orientador)

Dra. Susana Marta Isay Saad

Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis

Dra. Iracilda Zeppone Carlos

Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini

Aos meus pais, Dorival e Fátima, exemplos da minha vida. Obrigada pelo amor incondicional e por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos me dando força e carinho para enfrentar todos os desafios.

A minha querida irmã Renata, pelo seu coração generoso e por me mostrar o verdadeiro sentido da vida.

Ao Neto, pelo amor, companheirismo e apoio em todos esses anos juntos.

A vocês, meu amor eterno.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela graça da vida, por sempre iluminar os meus caminhos e por me dar força para enfrentar a vida com alegria e perseverança.

Ao Prof. Elizeu Antonio Rossi, por sua orientação, ensinamentos e dedicação em todos esses anos de minha vida acadêmica. Obrigada por acreditar em meu trabalho e por me mostrar os caminhos da ciência.

A Roseli pela amizade, pelos ensinamentos e pela agradável convivência em todos esses anos no Laboratório de Tecnologia de Alimentos.

Aos meus amigos do Laboratório de Tecnologia de Alimentos: Nadi, Dani, Marla, Dani Peres, Mariana, Nadia e Laura pelo companheirismo e por tornarem nosso ambiente de trabalho extremamente saudável.

A Nadi e a Mari pela valiosa ajuda durante as etapas experimentais deste trabalho.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição da FCFAr-UNESP, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa no início do doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de doutorado e pela bolsa de estágio no exterior.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP (PADC) pelo auxílio financeiro ao projeto de pesquisa.

À Dra. Graciela Font de Valdez, diretora do Centro de Referência para Lactobacilos (CERELA, San Miguel de Tucumán, Argentina), pelo convite para o desenvolvimento de parte do meu projeto de doutorado nesse centro de pesquisa.

À Dra. Maria Pía Taranto (Laboratorio de Tecnología y Desarrollo) e Dra. Gabriela Zárate (Laboratorio de Ecofisiología Tecnológica) pela orientação durante o estágio no CERELA.

Ao Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini e a Veridiana do Departamento de Ciências Biológicas da FCFAr-UNESP pelo auxílio nas técnicas de biologia molecular.

A todos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação e da Biblioteca da FCFAr-UNESP.

A todos que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| <b>LISTA DE TABELAS</b>  | i   |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b>  | iii |
| <b>LISTA DE QUADROS</b>  | vi  |
| <b>RESUMO</b>  | vii |
| <b>ABSTRACT</b>  | ix  |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>  | 1   |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>   | 3   |
| 2.1 Consumo de carne e câncer de cólon   | 3   |
| 2.2 Probióticos e câncer de cólon  | 4   |
| 2.2.1 Mecanismos de ação das bactérias ácido- láticas (BALs)   | 6   |
| 2.3 As bactérias ácido láticas e a produção de substâncias antimicrobianas   | 10  |
| 2.4 <i>Enterococcus</i>  | 12  |
| 2.5 Soja   | 13  |
| 2.5.1 “Iogurte” de soja  | 13  |
| <b>3 OBJETIVO</b>  | 16  |
| 3.1 Objetivo geral   | 16  |
| 3.2 Objetivos específicos  | 16  |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>  | 18  |
| 4.1 “Iogurte” de soja  | 18  |
| 4.2 “Iogurte” de soja esterilizado   | 18  |
| 4.3 Preparo do cultivo puro de <i>Enterococcus faecium</i>   | 18  |
| 4.4 Controle da viabilidade celular do produto fermentado, do produto fermentado esterilizado e da suspensão de cultivo puro | 19  |
| 4.5 Produto não fermentado   | 19  |
| 4.6 Ensaio com ratos   | 19  |
| 4.6.1 Animais experimentais  | 19  |
| 4.6.2 Formulação e processamento da ração  | 20  |
| 4.6.2.1 Caracterização química da farinha de carne   | 21  |
| 4.6.3 Administração dos produtos aos animais   | 22  |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 4.6.4   | Protocolo experimental I  | 23 |
| 4.6.5   | Consumo de ração e controle de peso corpóreo  | 25 |
| 4.6.6   | Eutanásia dos animais   | 25 |
| 4.6.7   | Composição da microbiota intestinal dos ratos   | 25 |
| 4.6.8   | Determinação da sobrevivência gastrointestinal de <i>Enterococcus faecium</i> no cólon e nas fezes de ratos                     | 26 |
| 4.6.8.1 | Isolamento e identificação de <i>Enterococcus faecium</i>   | 26 |
| 4.6.8.2 | Confirmação do <i>Enterococcus faecium</i> por PCR  | 26 |
| 4.6.8.3 | Determinação do pH fecal  | 28 |
| 4.6.8.4 | Conteúdo de amônia fecal  | 28 |
| 4.7     | Ensaio com humanos  | 29 |
| 4.7.1   | Seleção dos voluntários   | 29 |
| 4.7.2   | Protocolo experimental II   | 29 |
| 4.8     | Determinação das atividades das enzimas bacterianas fecais de ratos e humanos   | 31 |
| 4.8.1   | Sistema API-ZYM   | 31 |
| 4.8.2   | Ensaio enzimático: $\beta$ -glucuronidase   | 31 |
| 4.9     | Caracterização de substâncias antimicrobianas produzidas pelo <i>Enterococcus faecium</i>                                       | 32 |
| 4.10    | Determinação da atividade de azorredutase e nitrorredutase em camundongos   | 33 |
| 4.10.1  | Animais experimentais e dieta   | 33 |
| 4.10.2  | Protocolo experimental III  | 33 |
| 4.10.3  | Obtenção dos produtos administrados aos animais e controle da viabilidade celular   | 34 |
| 4.10.4  | Administração dos produtos aos animais  | 34 |
| 4.10.5  | Ensaio enzimático: nitrorredutase e azorredutase  | 34 |
| 4.11    | Determinação da atividade da $\beta$ -glucuronidase, nitrorredutase e azorredutase no cultivo puro de <i>E. faecium</i> CRL 183 | 36 |
| 4.12    | Detecção de fatores de virulência   | 36 |
| 4.13    | Análise estatística dos resultados  | 37 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>  | 40  |
| 5.1 Estudo em modelo animal (ratos)  | 39  |
| 5.1.1 Viabilidade do <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 e do <i>Lactobacillus helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416 nos diversos lotes de produtos formulados               | 39  |
| 5.1.2 Consumo de ração   | 40  |
| 5.1.3 Ganho de peso corpóreo   | 42  |
| 5.1.4 Influência dos produtos em estudo sobre o pH e a concentração de amônia fecais   | 45  |
| 5.1.5 Resistência gastrointestinal e capacidade de adesão do <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 ao cólon  | 55  |
| 5.1.6 Ação do <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 sobre diferentes grupos bacterianos que compõem a microbiota intestinal de ratos   | 70  |
| 5.1.7 Ação do <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 sobre a atividade de enzimas fecais  | 88  |
| 5.1.8 Caracterização de substâncias antimicrobianas produzidas pelo <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183  | 93  |
| 5.2 Estudo clínico   | 96  |
| 5.2.1 Viabilidade do <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 e do <i>Lactobacillus helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> 416 nos diversos lotes do produto fermentado a base de soja | 96  |
| 5.2.2 Determinação de pH e amônia fecais   | 97  |
| 5.2.3 Ensaio enzimáticos   | 100 |
| 5.3 Ensaio realizados no Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA)   | 103 |
| 5.3.1 Determinações enzimáticas (azorredutase e nitrorredutase)  | 103 |
| 5.3.2 Pesquisa de fatores de virulência no <i>E. faecium</i> CRL 183   | 107 |
| <b>6 CONCLUSÕES</b>  | 109 |
| <b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | 111 |



## LISTA DE TABELAS

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Tabela 1.  | Formulação das rações utilizadas durante o período experimental (90 dias) na alimentação de ratos Wistar na avaliação do efeito do “iogurte” de soja na microbiota intestinal | 22 |
| Tabela 2.  | <i>Primers</i> de virulência e de resistência a antibióticos testados em <i>E. faecium</i> CRL 183  | 38 |
| Tabela 3.  | Viabilidade dos microrganismos utilizados na fermentação dos produtos a base de soja e nos cultivos puros de <i>E. faecium</i> em 4 lotes de processamento                    | 39 |
| Tabela 4.  | Consumo médio de ração (g/dia)  | 41 |
| Tabela 5.  | Peso corpóreo médio(g) dos animais dos diferentes grupos de estudo  | 42 |
| Tabela 6.  | Ganhos médios de peso corporal (g) dos diferentes grupos experimentais  | 44 |
| Tabela 7.  | Valores de pH fecal em diferentes tempos de estudo  | 46 |
| Tabela 8.  | Variação de pH aos 60 dias de estudo nas fezes dos animais pertencentes aos diferentes grupos   | 47 |
| Tabela 9.  | Teor médio de amônia fecal dos diferentes grupos de estudo ao longo de 60 dias de experimentação  | 49 |
| Tabela 10. | Ganho de amônia fecal (ppm) durante 60 dias de estudo   | 50 |
| Tabela 11. | População média de <i>Enterococcus</i> sp no cólon dos animais  | 56 |
| Tabela 12. | População das colônias (UFC/g) isoladas do cólon dos animais nos diferentes tempos do período experimental  | 59 |
| Tabela 13. | População média de <i>Enterococcus</i> sp nas fezes dos animais   | 61 |
| Tabela 14. | Contagem das colônias (UFC/g) isoladas e identificadas por espécie, a partir das fezes dos animais nos diferentes tempos do período experimental                              | 65 |
| Tabela 15. | População média de enterobactérias (Log UFC/g) isoladas das fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais   | 71 |

|            |  |     |
|------------|--|-----|
| Tabela 16. | Populações médias de aeróbios totais (Log UFC/g) isoladas das fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais  | 73  |
| Tabela 17. | Populações médias de anaeróbios totais (Log UFC/g) isoladas das fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais  | 75  |
| Tabela 18. | População média de <i>Lactobacillus</i> sp (Log UFC/g) isoladas das fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais  | 77  |
| Tabela 19. | População média de <i>Clostridium</i> sp (Log UFC/g) isoladas das fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais  | 80  |
| Tabela 20. | População média de <i>Bacteroides</i> sp (Log UFC/g) isoladas das fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais  | 83  |
| 1.         | o média de <i>Bifidobacterium</i> sp (Log UFC/g) isoladas das fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais  | 86  |
| Tabela 22. | Atividade enzimática da $\beta$ -glucuronidase ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) nas fezes dos diferentes grupos de estudo em 4 pontos distintos do período experimental, determinada por método espectrofotométrico | 91  |
| Tabela 23. | Grupos de bactérias isolados de fezes de ratos e utilizados como microrganismos indicadores em ensaio de inibição  | 94  |
| Tabela 24. | Viabilidade dos microrganismos utilizados na fermentação do produto a base de soja em 4 lotes de processamento   | 96  |
| Tabela 25. | Valores de pH fecal de voluntários em diferentes tempos de estudo  | 98  |
| Tabela 26. | Conteúdo de amônia fecal (ppm) em voluntários  | 99  |
| Tabela 27. | Atividade enzimática da $\beta$ -glucuronidase ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) nas fezes dos diferentes grupos de estudo em 3 pontos distintos do período experimental   | 102 |
| Tabela 28. | Atividade da azorredutase ( $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) no conteúdo cecal de camundongos BALB/c dos diferentes grupos experimentais  | 104 |
| Tabela 29. | Atividade da nitrorredutase ( $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) no conteúdo cecal de camundongos BALB/c dos diferentes grupos experimentais  | 106 |

## LISTA DE FIGURAS

|            |  |    |
|------------|--|----|
| Figura 1.  | Fotografia das acomodações de ratos Wistar em estante ventilada com sistema de filtração de ar e controle de temperatura utilizada no desenvolvimento do protocolo experimental. | 20 |
| Figura 2.  | Fotografia de rato Wistar imobilizado por meio de tração animal, recebendo produto por gavagem.  | 23 |
| Figura 3.  | Esquema das análises utilizadas no isolamento e confirmação das espécies de <i>Enterococcus</i> encontradas nas fezes dos ratos.   | 28 |
| Figura 4.  | Fotografia da câmara de anaerobiose (Forma Scientific Anaerobic System, modelo 1024).  | 35 |
| Figura 5.  | Consumo médio de ração (g/dia) dos diferentes grupos de estudo.  | 40 |
| Figura 6.  | Ganhos médios de peso corporal (g) dos diferentes grupos de estudo.  | 44 |
| Figura 7.  | Variação de pH nos 60 dias de estudo nas fezes dos animais pertencentes aos diferentes grupos.   | 48 |
| Figura 8.  | Aumento da concentração de amônia fecal aos 60 dias de período experimental.   | 51 |
| Figura 9.  | Correlação entre o pH fecal e o conteúdo de amônia fecal dos animais do grupo I (coeficiente de correlação $r=-0,059$ ).   | 52 |
| Figura 10. | Correlação entre o pH fecal e o conteúdo de amônia fecal dos animais do grupo II (coeficiente de correlação $r=0,821$ ).   | 53 |
| Figura 11. | Correlação entre o pH fecal e o conteúdo de amônia fecal dos animais do grupo III (coeficiente de correlação $r=0,937$ ).  | 53 |
| Figura 12. | Correlação entre o pH fecal e o conteúdo de amônia fecal dos animais do grupo IV (coeficiente de correlação $r=0,939$ ).   | 54 |
| Figura 13. | Correlação entre o pH fecal e o conteúdo de amônia fecal dos animais do grupo V (coeficiente de correlação $r=0,970$ ).  | 54 |
| Figura 14. | Correlação entre o pH fecal e o conteúdo de amônia fecal dos animais do grupo VI (coeficiente de correlação $r=1,000$ ).   | 55 |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Figura 15. | Fotografia da galeria API 20-Strep (Biomeri  ux, França) utilizada no processo de identificação de espécies de <i>Enterococcus</i> sp.  | 58 |
| Figura 16. | População fecal de <i>Enterococcus</i> sp dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo de 90 dias de estudo   | 63 |
| Figura 17. | Dinâmica do <i>E. faecium</i> nas fezes dos animais dos grupos III e VI.   | 66 |
| Figura 18. | Produtos de PCR em gel de agarose obtidos a partir de colônias isoladas do cólon dos animais aos 60 dias de período experimental. Coluna 1: <i>E. faecium</i> do grupo III , Coluna 2: <i>E. faecium</i> do grupo VI, Coluna 3: <i>E. faecium</i> CRL 183, Coluna 4: padrão 100 pb.                     | 67 |
| Figura 19. | Produtos de PCR em gel de agarose obtidos a partir de colônias isoladas do cólon dos animais aos 75 dias de período experimental. Coluna 1: <i>E. faecium</i> do grupo III , Coluna 2: <i>E. faecium</i> do grupo VI, Coluna 3: <i>E. faecium</i> CRL 183, Coluna 4: padrão 100 pb.                     | 67 |
| Figura 20. | Produtos de PCR em gel de agarose obtidos a partir de colônias isoladas do cólon dos animais aos 90 dias de período experimental. Coluna 1: <i>E. faecium</i> do grupo III , Coluna 2: não confirmação do <i>E. faecium</i> do grupo VI, Coluna 3: <i>E. faecium</i> CRL 183, Coluna 4: padrão 100 pb. | 68 |
| Figura 21. | Produtos de PCR em gel de agarose obtidos a partir de colônias isoladas das fezes dos animais aos 60 dias de período experimental. Coluna 1: <i>E. faecium</i> do grupo III, Coluna 2: <i>E. faecium</i> do grupo VI, Coluna 3: <i>E. faecium</i> CRL 183, Coluna 4: padrão 100 pb.                      | 68 |
| Figura 22. | Produtos de PCR em gel de agarose obtidos a partir de colônias isoladas das fezes dos animais aos 75 dias de período experimental. Coluna 1: <i>E. faecium</i> do grupo III, Coluna 2: não confirmação do <i>E. faecium</i> do grupo VI, Coluna 3: <i>E. faecium</i> CRL 183, Coluna 4: padrão 100 pb.  | 69 |
| Figura 23. | Produtos de PCR em gel de agarose obtidos a partir de cepas de <i>E. faecium</i> pelo uso dos primers Ent 1 e Ent 2. Coluna 1: <i>E. faecium</i> CRL 39, Coluna 2: <i>E. faecium</i> CRL 183, Coluna 3: padrão 100 pb.   | 69 |
| Figura 24. | População fecal de enterobactérias dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo de 90 dias de estudo.  | 72 |
| Figura 25. | Populações fecais de aeróbios totais dos animais dos diferentes grupos   | 74 |

|            |  |     |
|------------|--|-----|
|            | experimentais ao longo de 90 dias de estudo.   |     |
| Figura 26. | Populações fecais de anaeróbios totais dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo de 90 dias de estudo.  | 76  |
| Figura 27. | População fecal de <i>Lactobacillus</i> sp dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo de 75 dias de estudo.  | 78  |
| Figura 28. | População fecal de <i>Clostridium</i> sp dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo de 75 dias de estudo.  | 82  |
| Figura 29. | População fecal de <i>Bacteroides</i> sp dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo de 75 dias de estudo.  | 84  |
| Figura 30. | o fecal de <i>Bifidobacterium</i> sp dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo de 75 dias de estudo.  | 87  |
| Figura 31. | Fotografia da galeria API-ZYM (Biomeriéux, França) utilizada na determinação da atividade das enzimas $\beta$ -glucosidase, $\beta$ -glucuronidase e $\beta$ -galactosidase.   | 88  |
| Figura 32. | Comparação das atividades enzimáticas das fezes dos diferentes grupos experimentais utilizando o kit API-ZIM.  | 89  |
| Figura 33. | Fotografia de placas preparadas para os ensaios de produção de substâncias antimicrobianas. A) Placa de <i>E. faecium</i> CRL 183 versus <i>Bacteroides</i> sp. B) Placa de <i>E. faecium</i> CRL 183 versus <i>Clostridium</i> sp.  | 95  |
| Figura 34. | Fotografia dos frascos de “iogurte” de soja e produto não fermentado, em embalagens de 1 litro, distribuídos aos voluntários.  | 97  |
| Figura 35. | Comparação das atividades enzimáticas das fezes dos diferentes grupos de estudo utilizando o kit API-ZIM.  | 101 |
| Figura 36. | Ausência de produtos de PCR obtidos de <i>E. faecium</i> CRL 183 utilizando primers para diferentes fatores de virulência. (1) padrão 1 kb; (2) <i>hyl</i> ; (3) <i>esp</i> ; (4) <i>efaAfs</i> ; (5) <i>efaAfm</i> ; (6) <i>cob</i> ; (7) <i>cpd</i> ; (8) <i>gel</i> ; (9) <i>asa</i> ; (10) <i>ccf</i> ; (11) <i>cyt</i> ; (12) <i>vanA</i> ; (13) <i>vanB</i> ; (14) <i>vanC</i> . | 108 |

## **LISTA DE QUADROS**

|           |  |    |
|-----------|--|----|
| Quadro 1. | Protocolo experimental I utilizado para alimentação de ratos Wistar para avaliação do efeito do “iogurte” de soja na microbiota intestinal | 24 |
| Quadro 2. | Protocolo experimental II  | 30 |

## RESUMO

O objetivo desse trabalho foi investigar a influência do consumo do “iogurte” de soja fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 sobre o perfil e atividade metabólica da microbiota intestinal de animais e humanos, de maneira a evidenciar prováveis mecanismos de ação indireta na diminuição do risco de ocorrência de câncer de cólon.

Os ratos foram divididos em 6 grupos (n=10): I – animais que receberam ração à base de caseína; II – animais que receberam ração à base de carne + 3 mL/kg peso corpóreo/dia do produto não fermentado; III – animais que receberam ração à base de carne + 3 mL/kg peso corpóreo/dia de *E. faecium* ; IV – animais que receberam apenas ração à base de carne; V – animais que receberam ração à base de carne + 3 mL/kg peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado; VI – animais que receberam ração à base de carne + 3 mL/kg peso corpóreo/dia do “iogurte” de soja. Os animais consumiram os diferentes produtos (“iogurte” de soja, “iogurte” de soja esterilizado, suspensão de *E. faecium* e produto não fermentado) durante 4 semanas do período experimental.

Foram estudadas a capacidade de aderência de *Enterococcus faecium* CRL 183 ao cólon e de sobrevivência nas fezes de ratos, além das determinações de pH, concentração de amônia e composição da microbiota fecal. A sobrevivência desse microrganismo no trato gastrointestinal foi verificada por técnicas de isolamento e identificação a partir do cólon e das fezes dos animais que receberam este microrganismo na forma de produto fermentado (“iogurte” de soja) e cultivo puro. Para a confirmação da espécie *E. faecium* foi utilizada a técnica de PCR. A composição da microbiota fecal foi verificada realizando a enumeração dos seguintes grupos de bactérias: aeróbios e anaeróbios totais, *Enterococcus* sp, *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* spp, enterobactérias, *Clostridium* spp e *Bacteroides* spp. Nas fezes dos ratos foram determinadas as atividades da  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase e  $\beta$ -glucuronidase. Para determinação das atividades de nitrorredutase e de azorredutase houve a necessidade de realizar um novo protocolo experimental no Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA, S.M. Tucumán, Argentina), utilizando camundongos. Para determinação da produção de substâncias antimicrobianas por *E. faecium* CRL 183 foi utilizada a técnica “spot-on-the-lawn”. No estudo clínico, foram selecionados 40 indivíduos voluntários saudáveis, de ambos os sexos, com idade entre 40-50 anos. Os indivíduos consumiram 100 mL/dia de “iogurte” de soja ( $10^8$  UFC de *E. faecium*/mL de produto) ou produto não fermentado durante 4 semanas. Nas fezes dos voluntários foram determinadas as atividades da  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase e  $\beta$ -glucuronidase.

Os resultados mostraram que o “iogurte” de soja e o cultivo puro provocaram um aumento tanto na população de bactérias do gênero *Enterococcus* quanto de *E. faecium* nas fezes e no cólon dos animais. Além disso, o produto fermentado de soja permitiu a manutenção da contagem de *E. faecium* no cólon dos animais mesmo após 30 dias do término da administração desse produto demonstrando, assim, a capacidade de adesão desse microrganismo. Nas fezes, a presença de *E. faecium* foi detectada até 15 dias após o término da administração do cultivo puro. O “iogurte” de soja e o cultivo puro de *E. faecium* não provocaram redução na concentração fecal de enterobactérias e *Clostridium* spp, todavia aumentaram a concentração de *Lactobacillus* spp e reduziram a de anaeróbios totais. O “iogurte” de soja também contribuiu para a redução da concentração fecal de *Bacteroides* spp. O cultivo puro de *E. faecium* contribuiu para o aumento da concentração de *Bifidobacterium* spp. A administração do produto fermentado e do cultivo puro de *E.*

*faecium* não foi capaz de provocar a acidificação das fezes dos animais, nem a redução no conteúdo fecal de amônia, ou mesmo de influenciar a atividade da  $\beta$ -galactosidase, todavia aumentaram a atividade da  $\beta$ -glucosidase e reduziram a atividade da  $\beta$ -glucuronidase a partir de resultados obtidos pelo uso da galeria API-ZYM. A cepa *E. faecium* CRL 183 não foi capaz de produzir substâncias antimicrobianas frente aos microrganismos indicadores testados. Nos experimentos com humanos, o consumo de “iogurte” de soja não provocou alterações significativas no pH e conteúdos de amônia fecais dos voluntários. Com relação à determinação da atividade das enzimas fecais utilizando o sistema API-ZYM, os indivíduos que receberam o produto fermentado não mostraram redução na atividade da  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase e  $\beta$ -glucuronidase, no entanto, apresentaram redução na  $\beta$ -glucuronidase quando se utilizou o método espectrofotométrico de determinação.

Os animais que consumiram o produto fermentado mostraram redução nas atividades de azorredutase e de nitrorredutase. Vale aqui destacar que a cepa CRL 183 não apresentou atividade para  $\beta$ -glucuronidase, nitrorredutase e azorredutase.

Frente a esses resultados, há um indicativo de o “iogurte” de soja fermentado com *E. faecium* CRL 183 pode exercer um efeito positivo na inibição do risco de câncer de cólon por meio da redução da atividade de enzimas carcinogênicas. Todavia, tal efeito pode estar relacionado à presença de metabólitos formados durante o processo fermentativo.



## ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of the consumption of soy yoghurt, fermented with *Enterococcus faecium* CRL 183, on composition and metabolic activity of intestinal microbiota of animals and humans, and to verify potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action.

The rats were placed in 6 groups, distinguished by their diets: for 90 days, group I was given a standard casein-based rodent feed and groups II-VI, the beef-based feed. From the 30<sup>th</sup> day, groups II, III, V and VI also received the following products: II) unfermented soy product; III) pure suspension of *E. faecium* CRL 183; V) sterilized soy yoghurt; VI) soy yoghurt. The animals received the different products during 4 weeks.

The capacity of *E. faecium* to adhere on colon and to survive gastrointestinal passage was determined by monitoring rat faecal samples and colon by microbiological and molecular analysis. Species confirmation of *E. faecium* was performed by PCR amplification. The composition of the faecal microbiota was determined by counting culturable bacteria in the following groups: total aerobes and anaerobes, *Enterococcus* spp., Enterobacteria, *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. Enzymatic activities of  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -glucuronidase were verified in rat faecal samples. Nitroreductase and azoreductase activities were determined in the caecal contents of mice. The culture of *E. faecium* CRL 183 was tested for antimicrobial substance production by spot-on-the-lawn assay.

Forty healthy adult volunteers who were between 40 and 50 years old participated of this study. The subjects consumed 100 mL/day of soy yoghurt (group F) or unfermented product (group P) during 4 weeks. In feces of volunteers enzymatic activities of  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -glucuronidase were verified.

The administration of soy yoghurt and pure suspension led to an increase in enterococcal contents and *E. faecium* in the colon and feces of the rats. Moreover, this species was detected in the colon after 30 days of the end of soy yoghurt administration. This result can be an indicative of capacity of adhesion of this microorganism. In the feces, the presence of *E. faecium* was detected after 15 days post ingestion of pure suspension.

Rats that ingested soy yoghurt or the pure suspension of *E. faecium* showed increased numbers of enterococci and lactobacilli, but these products did not cause any reduction in the number of enterobacteria or clostridia. The yoghurt did, however, promote a fall in the count of *Bacteroides* spp. Only the rats that consumed the pure culture of *E. faecium* CRL 183 showed any rise in the number of bifidobacteria.

The fecal pH and ammonia concentration were not decreased after consumption of soy yoghurt and pure suspension. These products had no effect on  $\beta$ -galactosidase activity but they increased  $\beta$ -glucosidase and decreased  $\beta$ -glucuronidase activity. The *E. faecium* CRL 183 is not able to produce antimicrobial substance against indicator microorganisms tested. The soy yoghurt administration promotes a fall in azoreductase and nitroreductase activities in assays with mice.

In the human, the soy yoghurt consumption did not alter fecal pH and ammonia content but  $\beta$ -glucuronidase activity was reduced in this group when the spectrophotometric method was used.

The data suggest that soy yoghurt fermented with *E. faecium* CRL 183 may have a positive effect on prevention of colon cancer by reduction of enzymes involved in

carcinogenic compounds production. However, this effect may be related with the presence of metabolic compounds produced during fermentation process.

## 1 INTRODUÇÃO

As características químicas e nutricionais da soja qualificam-na como um alimento funcional. Estudos mostram que a soja pode ser utilizada de forma preventiva e terapêutica no tratamento de câncer, doenças cardiovasculares, osteoporose e sintomas da menopausa.

Os alimentos fermentados também têm se constituído em importantes componentes da dieta devido não somente as suas características nutricionais, mas também as suas propriedades profiláticas e terapêuticas (Rossi et al., 2003). Todavia, o consumo desses alimentos no Brasil ainda é restrito, provavelmente em função do alto custo que apresentam.

Dentro deste contexto, Rossi et al. (1984) obtiveram a partir do extrato aquoso de soja (“leite” de soja), um produto similar ao iogurte, com custo reduzido, de boa aceitabilidade e que mantém preservadas as características nutricionais e terapêuticas apresentadas pelos produtos fermentados convencionais.

Empregando *Enterococcus faecium* CRL 183 como inóculo para o processo fermentativo do “leite” de soja, Rossi et al. (1999) desenvolveram um “iogurte” de soja, o qual se mostrou capaz de exercer *in vivo* um considerável efeito hipocolesterolêmico. Diversos outros estudos também foram conduzidos para avaliar outras propriedades de saúde desse novo produto. Nesse sentido, vários resultados já foram demonstrados, tais como a atividade anticarcinogênica, particularmente para o câncer de mama (Kinouchi, 2006), e imunomoduladora (Vendramini, 2002), além da capacidade de influenciar positivamente o metabolismo ósseo de ratas ovariectomizadas, contribuindo para a prevenção da osteoporose pós-menopáusia (Bedani et al., 2006; Shiguemoto et al., 2007).

Todos esses resultados positivos já observados comprovam que esse produto de soja fermentado com *E. faecium* CRL 183 apresenta propriedades benéficas à saúde, permitindo classificá-lo como alimento funcional.

Recentemente, a ação do “iogurte” de soja fermentado com *E. faecium* foi estudada com relação ao processo de desenvolvimento do câncer de cólon em ratos induzidos quimicamente. Resultados iniciais mostraram que a incidência de tumores foi menor nos

animais que consumiram cultivo puro de *E. faecium* e do produto não fermentado, seguidos dos animais que receberam o produto fermentado suplementado com cálcio e produto fermentado sem suplementação (Sivieri et al, 2008).

Estudos mostram que a dieta pode influenciar no desenvolvimento do câncer de cólon, havendo evidências que o consumo de produtos fermentados com bactérias probióticas pode prevenir o desenvolvimento deste tipo de câncer, provavelmente por influenciar a microbiota intestinal e a atividade de enzimas que convertem compostos procarcinogênicos em carcinogênicos no intestino.

Considerando que o “iogurte” de soja conta com uma bactéria ácido láctica (BAL) (*E. faecium* CRL 183) muito pouco estudada do ponto de vista de propriedades probióticas e que emprega como matéria-prima a soja, considerada benéfica no sentido de reduzir o risco de doenças crônico-degenerativas, este estudo teve por finalidade verificar a influência do “iogurte” de soja fermentado com *E. faecium* CRL 183 na microbiota intestinal de animais e humanos, procurando evidenciar possíveis mecanismos de ação indireta na redução do risco de câncer de cólon.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Consumo de carne e o câncer de cólon**

O câncer de cólon está entre as principais enfermidades do mundo ocidental. De acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (2008), estimativas de incidência de câncer no Brasil apontam o câncer cólon-retal como o quarto tumor maligno mais freqüente em homens (12.490 casos novos) e o terceiro entre as mulheres (14.500). A maior incidência de casos ocorre na faixa etária entre 50 e 70 anos, mas as possibilidades de desenvolvimento aumentam a partir dos 40 anos.

A dieta apresenta uma importante contribuição para o risco de câncer de cólon, uma vez que mais de 75% dos casos são associados a ela. Embora resultados de estudos epidemiológicos não sejam inteiramente consistentes, o alto consumo de carne vermelha e gordura parece elevar o risco do indivíduo desenvolver câncer de cólon, quando comparado a uma dieta vegetariana (alto conteúdo em fibras) ou a uma dieta pobre em gordura (Hosoda et al., 1996).

A associação entre o consumo de carne e o câncer de cólon é, em muitos casos, atribuída à formação de amins heterocíclicas durante o cozimento. A possibilidade do consumo de carne alterar o metabolismo de nitrogênio e aumentar a produção de promotores endógenos e carcinógenos no cólon tem atraído a atenção de muitos pesquisadores (Bingham, 1997).

Em humanos, o aumento da entrada de nitrogênio no cólon como resultado do alto consumo de carne aumenta a concentração de amônia fecal. A amônia é considerada um promotor de carcinogênese em modelos experimentais com roedores (Tsuji et al., 1992).

A produção de amônia ocorre no cólon a partir da degradação de aminoácidos e da hidrólise da uréia por ureases microbianas. Ela pode ser usada na síntese de proteínas microbianas ou pode entrar na corrente sangüínea (Kim et al., 1998).

A amônia pode promover a carcinogênese pela estimulação da proliferação celular, favorecendo, desta forma, o crescimento de células malignas (Lin e Visek, 1991).

Estudos mostram uma relação entre as mudanças na microbiota intestinal e os níveis de concentração de amônia nas fezes. A amônia é produzida por uma ampla variedade de bactérias intestinais, incluindo *Bacteroides* e *Clostridium*, principalmente a partir da hidrólise enzimática (ureases) da uréia (Wrong e Vince, 1984; Kim et al., 1998). A amônia é considerada como um fator de risco no câncer de cólon, uma vez que ela pode promover alterações na cinética celular do cólon (Ichikawa e Sakata, 1998). Além disso, o acetato de amônia pode levar ao aumento dos adenocarcinomas de cólon induzidos quimicamente (Clinton et al., 1988). Benno e Mitsuoka (1992) encontraram uma redução significativa na concentração de amônia em fezes durante o consumo de *Bifidobacterium longum*. Os pesquisadores sugeriram que a redução na população total de *Bacteroides* e *Clostridium* pela ingestão de *B. longum* pode ter levado a uma menor produção de amônia fecal.

Células bacterianas podem ser um importante fator na determinação da taxa de ligação a toxinas livres no intestino. Já foi demonstrado *in vitro* que compostos mutagênicos, comumente encontrados em dietas ricas em carnes, podem se ligar a bactérias intestinais e a bactérias ácido lácticas (Orrhage et al., 1994). Um possível mecanismo para esse efeito envolve a ligação física de compostos mutagênicos à bactéria.

## **2.2 Probióticos e o câncer de cólon**

Atualmente, o setor de alimentos tem investido de maneira crescente no desenvolvimento de uma classe especial de produtos – os alimentos funcionais – que vem sendo estudada em decorrência de seus vários efeitos benéficos à saúde, destacando-se a capacidade de reduzir o risco de doenças crônico-degenerativas. Um exemplo de alimento funcional que tem sido o foco de intensas pesquisas nos recentes anos refere-se aos produtos processados com probióticos.

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que quando administrados em doses adequadas conferem benefício à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Os efeitos benéficos trazidos pela ingestão de probióticos incluem: alívios dos sintomas causados pela intolerância à lactose, tratamento de diarréias, redução do colesterol sérico,

aumento da resposta imune, efeitos anticarcinogênicos, entre outros (Saavendra, 2001). O consumo diário de  $10^8$  a  $10^9$  UFC de microrganismos probióticos é requerido para o desenvolvimento de qualquer efeito benéfico em humanos (Lee e Salminen, 1995).

Scutti e Rossi (1996) destacaram, dentre os vários efeitos benéficos à saúde atribuídos às culturas lácticas, a prevenção e o tratamento contra diarreia, diminuição dos sintomas da intolerância à lactose, a redução do colesterol sérico, a estimulação da resposta imune e a redução da incidência de tumores. Contudo, segundo os autores, esses efeitos não podem ser atribuídos a todas as bactérias ácido lácticas, assim a seleção e a caracterização da cepa são essenciais para a obtenção do efeito probiótico. Dentre os critérios desejáveis para a seleção de uma bactéria ácido láctica probiótica estão: segurança, origem humana; tolerância ao suco gástrico e à bile; aderência à superfície epitelial e persistência no trato gastrointestinal; imunomodulação (sem efeito pró-inflamatório); atividade antagônica contra patógenos; propriedades antimutagênica e anticarcinogênica; aspectos tecnológicos (crescimento em leite, boas propriedades sensoriais, estabilidade, resistência a fago, viabilidade no processo) (Saarela et al., 2000).

Atualmente o maior consumo de produtos probióticos por humanos na Europa são na forma de produtos lácteos contendo, na maioria das vezes, lactobacilos e ou bifidobactérias. Entretanto, são encontrados produtos em que os microrganismos utilizados são cepas do *Enterococcus* ou leveduras tais como o *Saccharomyces boulardii* (Mercenier et al., 2002). Cepas probióticas promissoras incluem microrganismos dos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* (Lund et al., 2002).

A grande maioria dos estudos sobre os efeitos anticarcinogênicos dos probióticos refere-se ao câncer de cólon, seguido de câncer de mama e de bexiga (Rafter, 2003).

Estatísticas sobre a incidência mundial de câncer apontam para liderança do câncer de pulmão e mama. Na terceira posição encontra-se o câncer de cólon com aproximadamente um milhão de novos casos diagnosticados a cada ano em todo o mundo, sendo que a metade desses casos leva o indivíduo a óbito (Boyle e Leon, 2002; Parkin et al, 2005).

Várias observações experimentais têm apontado para o potencial efeito protetor das bactérias ácido lácticas contra o desenvolvimento de tumores no cólon (Salminen et al., 1998). Dentro da complexa microbiota intestinal com cerca de  $1 \times 10^{11}$  UFC/g de conteúdo de cólon, as BALs são parte daquelas bactérias com efeitos benéficos. Elas apresentam um papel importante no retardamento da carcinogênese do cólon pela possibilidade de influenciar funções metabólicas, imunológicas e protetoras nesse seguimento do intestino (Wollowski et al., 2001).

### **2.2.1 Mecanismos de ação das bactérias ácido lácticas (BALs)**

Os mecanismos pelos quais as BALs podem inibir o câncer de cólon ainda não estão bem elucidados. No entanto, tais mecanismos podem incluir: alteração da atividade metabólica da microbiota intestinal; alterações das condições fisiológicas do cólon; ligação e ou degradação de carcinógenos potenciais; alterações qualitativas e quantitativas da microbiota intestinal; alterações das condições físico-químicas do cólon; efeitos na fisiologia do hospedeiro (Hirayama e Rafter, 2000; Rafter, 2003).

Várias investigações têm mostrado a influência do consumo de BALs e de produtos fermentados de leite sobre a atividade enzimática da microbiota intestinal associada com a carcinogênese do cólon. O efeito carcinogênico de compostos tóxicos e genotóxicos endógenos é provavelmente influenciado pela atividade de enzimas bacterianas, principalmente a  $\beta$ -glucuronidase, a nitrorredutase e a azorredutase. Tem sido registrado que certas bactérias no cólon convertem procarcinógenos em carcinógenos (Saarela et al., 2000). Essas bactérias possuem um grande número de enzimas que podem ser induzidas ou reprimidas e, dependendo do meio e da fonte de energia, a atividade metabólica dos microrganismos pode ser alterada drasticamente (Burns e Rowland, 2000).

Os carcinógenos ingeridos pela dieta são absorvidos no intestino e detoxificados por conjugação com ácido glucurônico no fígado. Esses glucuronídeos inócuos são eliminados do organismo pela urina ou são excretados pela bile e retornam ao intestino, onde as  $\beta$ -glucuronidases bacterianas os transformam em carcinógenos que acabam retornando à



circulação enterohepática, aumentando assim sua persistência no organismo. Em vista disso, a  $\beta$ -glucuronidase bacteriana parece desempenhar um papel importante na iniciação do câncer de cólon, devido a sua capacidade de hidrolisar vários glucuronídeos e liberar agliconas carcinogênicas no lúmen intestinal (Goldin, 1990; Lidbeck et al., 1992).

A nitrorredutase e azorredutase estão relacionadas à formação de aminas aromáticas nocivas ao organismo (Ling et al., 1992). Estudos em animais têm mostrado que uma dieta rica em carne e gordura animal aumenta a atividade da  $\beta$ -glucuronidase, nitrorredutase e azorredutase (Goldin e Gorbach, 1976).

A azorredutase é responsável pela hidrólise de compostos azo, tais como corantes alimentícios. Os produtos finais dessa reação são aminas aromáticas que podem ser convertidas a compostos N-hidroxi no intestino (Goldin e Gorbach, 1977). Os corantes azo são amplamente utilizados na indústria alimentícia, têxtil, cosmética e farmacêutica. Estes compostos não são absorvidos no intestino, mas podem ser degradados por azorredutases da microbiota intestinal mediante a uma redução da ligação azo que é observada pela diminuição da absorbância de luz visível, dando lugar a aminas aromáticas incolores carcinogênicas.

Enzimas redutoras no fígado também podem catalisar a quebra da ligação azo produzindo aminas aromáticas. No entanto, evidências indicam que as azorredutases microbianas intestinais podem ser mais importantes do que as enzimas hepáticas na redução azo (Chung et al., 1992).

A nitrorredutase pode converter compostos nitro aromáticos a aminas aromáticas, formando compostos nitroso e N-hidroxi, reconhecidamente carcinogênicos (Ling et al., 1994).

Bactérias benéficas e prejudiciais são comumente encontradas no intestino e diferem em suas atividades enzimáticas (Mital e Garg, 1995). As bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* apresentam uma baixa atividade das enzimas que convertem procarcinógenos em carcinógenos se comparada com bactérias dos gêneros *Bacteroides* e *Clostridium* (Hawksworth et al., 1971; Cole et al., 1985). Em vista disso, os

efeitos observados sobre as atividades de enzimas fecais podem ser devido à redução no número de microrganismos produtores de enzimas procarcinogênicas (Ling et al., 1994).

Um consumo aumentado de leite fermentado ou suplementos alimentares com lactobacilos ou bifidobactérias viáveis parece estar correlacionado com a baixa incidência de câncer de cólon (Saarela et al., 2000).

Vários estudos em animais e humanos sugerem que a ingestão de BALs e de produtos fermentados de leite diminuem significativamente as atividades de algumas enzimas fecais que podem estar envolvidas na formação de carcinógenos (Goldin e Gorbach, 1984; Spanhaak et al., 1998).

Goldin e Gorbach (1976) estudaram o efeito da ingestão de *L. acidophilus* em ratos alimentados com uma dieta à base de carne. Eles verificaram que os animais que consumiram essa BAL apresentaram uma menor atividade das enzimas fecais nitrorredutase e azorredutase.

Num estudo preliminar mais recente, Haberer et al. (2003) verificaram que animais alimentados com uma dieta à base de carne e gordura apresentaram uma redução da atividade da  $\beta$ -glucuronidase e azorredutase após o consumo de cepas de *Lactobacillus* por um período de 5 semanas.

Goldin e Gorbach (1984) também estudaram, em humanos, o efeito da ingestão de *L. acidophilus*, cepas NCFM e N-2, sobre a atividade da  $\beta$ -glucuronidase, nitrorredutase e azorredutase. Ambas as cepas tiveram um efeito similar e causaram um declínio significativo na atividade das três enzimas estudadas. Um efeito reverso foi encontrado 10 a 30 dias após o término da ingestão dessa bactéria, sugerindo que o consumo contínuo de *L. acidophilus* seria necessário para se manter o efeito desejado.

Ling et al. (1994) estudaram os efeitos da ingestão de iogurte contendo *Lactobacillus* GG e ou suplemento de fibras sobre a atividade de diversas enzimas ( $\beta$ -glucuronidase, nitrorredutase,  $\beta$ -glucosidase, hidrolase de sais biliares e urease) em 64

mulheres. Eles verificaram que o consumo desse produto diminuiu significativamente as atividades da  $\beta$ -glucuronidase, nitrorredutase e hidrolase de sais biliares.

Benno e Mitsuoka (1992) e Spanhaak et al. (1998) também verificaram, em humanos, uma redução significativa na atividade da  $\beta$ -glucuronidase após a ingestão de *Bifidobacterium longum* e de *Lactobacillus casei*, cepa Shirota, respectivamente.

Nem todos estudos mostram uma correlação entre a administração de probióticos e a atividade da microbiota intestinal. Bartram et al. (1994) realizaram um estudo de intervenção com 12 indivíduos que consumiram iogurte (500 mL) enriquecido com *Bifidobacterium longum*. Nenhuma diferença significativa foi encontrada quanto ao peso fecal, pH, concentração fecal de ácidos graxos de cadeia curta, ácidos biliares e esteróis neutros após 3 semanas de intervenção. Embora tivesse ocorrido um aumento na concentração fecal de *B. longum*, os resultados sugeriram uma pequena ou nenhuma modulação da microbiota residente, indicando a estabilidade da microbiota fecal.

Alguns pesquisadores têm sugerido que um elevado pH intestinal pode estar relacionado ao aumento do risco de câncer de cólon, enquanto que a acidificação do cólon poderia prevenir a formação de carcinógenos. Benno e Mitsuoka (1992) verificaram uma significante redução do pH fecal após 5 semanas de administração de *Bifidobacterium longum* em homens saudáveis.

Modler et al. (1990) sugeriram que o câncer de cólon pode ser modulado diretamente pela redução do pH intestinal por meio da alteração da multiplicação de bactérias putrefativas.

O consumo de leites fermentados contendo *L. acidophilus* tem se mostrado capaz de reduzir significativamente o nível de bactérias fecais putrefativas, tais como *E. coli* e aumentar o nível de *Lactobacillus* no intestino (Shahani e Ayebo, 1980).

Um estudo descritivo em humanos comparou a composição da microbiota fecal de pessoas com diferentes riscos de câncer de cólon. Um alto risco foi associado à presença de *Bacteroides vulgatus* e *Bacteroides stercoris*, enquanto que um baixo risco foi relacionado

à presença de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus S06* e *Eubacterium aerofaciens* (Moore e Moore, 1995).

Morotomi e Mutai (1986), investigaram a habilidade de 22 cepas de bactérias intestinais de se ligarem a pirolizatos mutagênicos e compararam esta habilidade a dietas com fibras. A 3-amina-1,4-dimetil-5H-pirido (Trp-P-1) indol e 3-amina-1-metil-5H-pirido (Trp-P-2) indol foram efetivamente ligadas a todas as bactérias Gram positivas e a algumas Gram negativas. Quando o mecanismo de ligação do Trp-P-2 ao *L. casei* YIT 9018 foi investigado, ele se mostrou dependente do pH, sendo inibida imediatamente pela adição de sais metálicos. No entanto, ainda pouco se sabe sobre esses mecanismos no trato gastrointestinal de humanos.

### **2.3 As bactérias ácido lácticas e a produção de substâncias antimicrobianas**

A produção de substâncias antimicrobianas, por determinados microrganismos, que inibem outros microrganismos (antagonismo) é frequentemente citada como um dos mecanismos pelos quais as comunidades microbianas são reguladas (Tannock, 1998).

As BALs, muitas delas probióticas, podem exercer atividade inibitória frente a outras bactérias devido à competição direta por nutrientes e pela produção de compostos antagonísticos como ácidos orgânicos (principalmente ácido lático e acético), diacetil, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (Ouwehand et al., 1999).

Se as BALs probióticas estiverem metabolicamente ativas durante a passagem através do intestino, é provável que algumas dessas substâncias sejam produzidas. Algumas indicações vêm a partir da observação de que o consumo de certas cepas probióticas reduz o pH fecal, indicando a produção de ácidos orgânicos (Ouwehand et al., 1999).

As bacteriocinas são peptídeos, proteínas ou complexo proteína-carboidrato produzidas por muitas bactérias, incluindo as do gênero *Lactobacillus* (Tannock, 1998). Sabe-se que os *Enterococcus* também são capazes de produzir bacteriocinas denominadas de enterocinas (Lasagno et al., 2002; Franz et al., 2003). A produção dessas substâncias

pode facilitar o estabelecimento da cepa probiótica no meio competitivo do intestino (Klaenhammer e Kullen, 1999), no entanto, a importância *in vivo* da produção de bacteriocina permanece em discussão (Ouwehand et al., 1999).

Embora as bacteriocinas sejam, em muitos casos, efetivas contra espécies taxonomicamente relacionadas à cepa produtora, algumas delas podem apresentar um amplo espectro de inibição contra bactérias patogênicas, como por exemplo, *Listeria monocytogenes* (Saavedra et al., 2003). Outros autores demonstraram a inibição de espécies Gram-negativas tais como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp. e *Vibrio cholerae* (Tomita et al., 1997; Lauková et al., 2003).

A produção de bacteriocinas por bactérias do gênero *Enterococcus* tem sido detectada principalmente em *E. faecium*, seguido de *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. avium*, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* (Lauková e Mareková, 2001).

Existem várias técnicas para se detectar a produção de bacteriocina, todas baseadas na inibição do crescimento de um microrganismo indicador (sensível) por uma cepa teste (produtora). As cepas com atividade antagonística potencial devem ser submetidas a testes confirmatórios da atividade inibitória com a finalidade de se excluir a possibilidade da inibição ter sido devida à produção de ácidos orgânicos ou peróxido de hidrogênio ou à presença de bacteriófagos líticos (De Martinis et al., 2002).

A maioria destes testes está baseada na difusão de bacteriocinas em meio de cultura sólido e semi-sólido a fim de se inibir o crescimento de um microrganismo sensível (Lewus & Montville, 1991). Entre os métodos utilizados estão os ensaios “flip-streak” e “spot-on-the-lawn”.

Lewus e Montville (1991) examinaram 22 cepas de BALs utilizando três técnicas distintas para a detecção de bacteriocinas (difusão em poços, “flip-streak” e “spot-on-the-lawn”). De acordo com os resultados obtidos, o método “flip-streak” produziu valores limitados, enquanto o método de difusão em poços originou um grande número de resultados falso-negativos se comparado com a técnica “spot-on-the-lawn”. De acordo com os pesquisadores, a técnica “spot-on-the-lawn” apresentou mais vantagens

(reprodutibilidade, rapidez) se comparada com os métodos “flip-streak” e difusão em poços.

Spelhaug e Harlander (1989), no estudo de três produtores de bacteriocinas contra vários microrganismos patogênicos de origem alimentar, também verificaram superioridade da técnica “spot-on-the-lawn” em relação à “flip-streak”.

## **2.4 *Enterococcus***

O gênero *Enterococcus* está amplamente presente na natureza e faz parte do grupo das bactérias ácido láticas. São bactérias Gram positivas, não formadoras de esporos, catalase negativa, cocos anaeróbios facultativos que podem ocorrer isoladamente, em pares ou em cadeias.

Bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* apresentam um papel importante na produção de vários alimentos fermentados tradicionais na Europa (Franz et al., 2003). Estudos sobre a microbiota de vários queijos tradicionais de países do Mediterrâneo indicam que os *Enterococcus* sp estão relacionados com a maturação desses queijos, provavelmente através da proteólise, lipólise e quebra do citrato, contribuindo para o sabor e *flavor* característicos (Moreno et al., 2006). Essas bactérias também podem estar presentes em outros tipos de alimentos fermentados, como lingüiças e azeitonas (Hugas et al., 2003).

Atualmente algumas bactérias do gênero *Enterococcus* estão sendo usadas como probióticos em alguns países (Franz et al., 2003), tais como o *E. faecium* e o *E. faecalis*. No Brasil, a ANVISA (2008) já inclui o *E. faecium* na lista dos microrganismos probióticos. Desde fevereiro de 2004, 10 preparações, contendo 9 cepas diferentes de *E. faecium*, estão autorizadas como aditivos em alimentos na União Européia (Moreno et al., 2006).

Há vários estudos a respeito do isolamento e caracterização de bacteriocinas (enterocinas) produzidas por *Enterococcus* spp. Enterocinas têm sido isoladas a partir de cepas de diferentes fontes, incluindo alimentos (queijo, carne, peixe e vegetais), animais e

humanos. As enterocinas podem ser ativas contra patógenos de origem alimentar tais como *Listeria* spp e *Clostridium* spp (Farias et al., 1994; Mendonza et al., 1999). Já foi comprovada a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram negativas como *E. coli* (Tomita et al., 1997) e *Vibrio cholerae* (Simonetta et al., 1997). Além disso, Wachsmann et al. (1999) registraram atividade antiviral da enterocina CRL35.

## **2.5 Soja**

As características químicas e nutricionais da soja qualificam-na como um alimento funcional. Além da qualidade de sua proteína, estudos mostram que a soja pode ser utilizada de forma preventiva e terapêutica no tratamento de doenças cardiovasculares, câncer, osteoporose e sintomas da menopausa (Setchell e Cassidy, 1999). Entre as substâncias presentes na soja responsáveis por esses efeitos, as de maior interesse, atualmente, são as isoflavonas. Dessa forma, a soja é um dos alimentos que oferece as maiores possibilidades para o desenvolvimento de produtos funcionais (Souza et al., 2000).

A soja participa da dieta humana por meio do consumo do próprio grão e de alimentos elaborados a partir dele. A população brasileira ainda consome pouca soja, enquanto que, as dietas japonesas contêm aproximadamente dez vezes mais soja que, por exemplo, as dietas dos norte-americanos e, além disso, os japoneses são, em todo o mundo, os mais longevos e com as mais baixas incidências de doenças hormônio-dependentes (Genovese e Lajolo, 2001).

### **2.5.1 “Iogurte” de soja**

Os alimentos fermentados têm se constituído em importantes componentes da dieta devido não somente as suas características nutricionais, mas também à capacidade de reduzirem o risco de doenças crônico-degenerativas (Rossi et al., 2003). O consumo de produtos fermentados, principalmente aqueles derivados do leite, vêm sendo estimulado devido ao seu valor nutricional e grande número de propriedades terapêuticas.

Norteados por esta situação, Rossi et al. (1984) obtiveram a partir do extrato aquoso de soja, um produto similar ao iogurte, com custo reduzido, de boa aceitabilidade e que mantém as características nutricionais e terapêuticas apresentadas pelos produtos fermentados convencionais.

Dentro desse contexto, Rossi et al. (1994) estudaram 18 cepas bacterianas de *Lactobacillus acidophilus* e *Enterococcus faecium*. Essas cepas foram testadas quanto a sua capacidade de “remoção” do colesterol do meio de cultura em presença de sais biliares. A maior “remoção” do colesterol foi obtida pelo *Enterococcus faecium* CRL 183 e *Lactobacillus acidophilus* CRL 1014 (55,4% e 54%, respectivamente). Apoiado nesses resultados, foi desenvolvido um produto de soja fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 associado com *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416, o qual apresentou propriedades tecnológicas e sensoriais semelhantes aos fermentados tradicionais (Rossi et al., 1999).

A melhora do perfil lipídico devido ao consumo do “iogurte” de soja fermentado com *E. faecium* CRL 183 e *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 foi demonstrada tanto em coelhos quanto em ratos com hipercolesterolemia induzida e, também, em humanos normocolesterolêmicos (Rossi et al., 2000a; 2000b; 2003).

Esse mesmo produto foi também avaliado quanto ao potencial alergênico induzido por ingestão oral e os resultados mostraram que o produto fermentado ocasionou um percentual de degranulação de mastócitos menor que o observado para o produto não fermentado. Concluiu-se que o produto fermentado não apresentou potencial alergênico e que o processo fermentativo reduziu favoravelmente a alergenicidade das proteínas de soja (Carlos et al., 2000).

Vendramini (2002) analisou os níveis de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , além dos mediadores de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio em camundongos que receberam o “iogurte” de soja fermentado com *E. faecium* CRL 183 e *L. helveticus* ssp *jugurti* 416. Foi observado um aumento nos níveis de todas citocinas estudadas, demonstrando a capacidade imunomoduladora desse produto.



Vale aqui ressaltar que como as outras bactérias lácticas, os enterococos, estão presentes em um grande número de produtos lácteos como culturas iniciadoras, em suplementos alimentares e alimentos funcionais (Klein, 2003). A capacidade probiótica do *E. faecium*, bem como as propriedades funcionais do “leite” de soja fermentado com esse microrganismo vêm despertando o interesse crescente dos pesquisadores.

Frente às considerações expostas, tanto as relativas à soja e quanto às BALs, em especial ao *E. faecium* CRL 183, nos pareceu oportuno e de grande interesse estudar a possível ação do “iogurte” de soja fermentado com *E. faecium* CRL 183 sobre a qualidade/quantidade e atividade metabólica da microbiota intestinal de animais e humanos, de maneira a evidenciar prováveis mecanismos de ação indireta na redução do risco de câncer de cólon.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi o de investigar a influência do consumo de “iogurte” de soja fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 sobre a qualidade/quantidade e atividade metabólica da microbiota intestinal, de maneira a evidenciar prováveis mecanismos de ação indireta na redução do risco do câncer de cólon.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Em animais

- Verificar a composição da microbiota intestinal antes, durante e depois da administração do “iogurte” de soja e do cultivo puro de *E. faecium* em ratos alimentados com ração formulada à base de carne;
- Acompanhar a viabilidade de *E. faecium* no cólon e nas fezes;
- Verificar o efeito da administração do “iogurte” de soja fermentado com *E. faecium* CRL 183 nos principais gêneros da microbiota fecal de ratos;
- Verificar a sobrevivência e aderência gastrintestinal de *E. faecium* nos animais (ratos) que receberam o produto fermentado e o cultivo puro desse microrganismo, tanto nas fezes quanto no cólon;
- Determinar parâmetros químicos (pH e amônia) em fezes de ratos;
- Verificar o potencial de inibição do risco de câncer de cólon através da determinação da atividade enzimática da  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -galactosidase, azorredutase e nitrorredutase nas fezes;

- Verificar, *in vitro*, a produção de substâncias antimicrobianas por *E. faecium* contra bactérias isoladas das fezes de ratos.
- Pesquisa de fatores de virulência em *E. faecium* CRL 183.

- Em humanos

- Determinar a atividade enzimática da  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -glucosidase e  $\beta$ -galactosidase nas fezes de voluntários que consumiram “iogurte” de soja associado a sua dieta habitual;
- Avaliar parâmetros químicos (pH e amônia) nas fezes de voluntários que consumiram “iogurte” de soja associado a sua dieta habitual.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 “Iogurte” de soja**

O produto fermentado foi produzido a partir do “leite” de soja processado pela Unidade de Desenvolvimento e Produção de Derivados de Soja – UNISOJA, instalada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP, de acordo com metodologia descrita por Rossi et al., 1984. O inóculo bacteriano convencional foi substituído por 1,5% (v/v) de cultivo de *Enterococcus faecium* CRL 183 e 1,5% (v/v) de cultivo de *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 (coadjuvante do processo fermentativo). A fermentação foi realizada a 37°C até que o produto apresentasse pH 4,5.

### **4.2 “Iogurte” de soja esterilizado**

Para obtenção do “iogurte” de soja esterilizado, o produto fermentado foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos para a inativação de *E. faecium* e de *L. helveticus* ssp. *jugurti*.

### **4.3 Preparo do cultivo puro de *Enterococcus faecium***

As células de *E. faecium* CRL 183 foram semanalmente repicadas (a partir de uma cultura estoque mantida, sob congelamento, em leite esterilizado adicionado de extrato de levedura, glicose e glicerol) em caldo TSB (Tryptic Soy Broth/ Acumedia, Baltimore, EUA) na concentração de 10% (v/v), e mantidas a 37°C/16 horas. Após esse período a suspensão foi centrifugada (Excelsa Baby I, FANEM) a 1173 g por 5 min e o sobrenadante eliminado. Foram adicionados 5 mL de água peptonada esterilizada e uma nova centrifugação foi realizada (1173 g/5 min) e o sobrenadante descartado. Novamente, foi feita a adição de 5 mL de água peptonada esterilizada, e assim mantidas sob refrigeração, até o momento da administração aos animais.

#### **4.4 Controle da viabilidade celular do produto fermentado, do produto fermentado esterilizado e da suspensão de cultivo puro**

O produto fermentado (“iogurte” de soja), o produto fermentado esterilizado (“iogurte” de soja esterilizado) e o cultivo puro destinados aos experimentos foram produzidos semanalmente no próprio laboratório, e mantidos sob refrigeração a  $\pm 5$  °C.

Após o preparo desses produtos foi verificada a viabilidade celular por meio de análise microbiológica. Um grama de produto fermentado, produto fermentado esterilizado e de cultivo puro foram diluídos em 9 ml de uma solução de água tamponada fosfatada, com subsequente preparo das diluições necessárias.

Para a enumeração de bacilos foi utilizado o meio *Lactobacilli* MRS Agar (Difco, França), adicionado de ácido acético esterilizado até pH 5,4. As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose com placas de anaerobac (Probac, Brasil) por 24h a 37°C.

Para a enumeração de cocos foi utilizado o meio M17 ágar (Difco, França). As placas foram incubadas em aerobiose por 24h a 37°C.

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **4.5 Produto não fermentado**

O produto não fermentado apresentava constituição idêntica ao produto fermentado, com exceção dos cultivos bacterianos. Portanto, esse produto não passou pelo processo fermentativo. O produto foi acidificado pela adição direta de ácido láctico, em quantidade suficiente para alcançar pH idêntico ao do produto fermentado (pH 4,5).

#### **4.6 Ensaio com ratos**

##### **4.6.1 Animais experimentais**

Foram utilizados 60 ratos machos, S.P.F. (*Specific Pathogen Free*), da linhagem Wistar (8 semanas de idade) provenientes do CEMIB (UNICAMP, Campinas, SP, Brasil). Durante o período experimental (90 dias) os animais foram mantidos em estante ventilada (Alesco, Brasil) sob fotoperíodo controlado (12 horas claro/12 horas escuro) e temperatura

entre  $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Os animais foram alimentados com ração formulada e água *ad libitum* (Figura 2). Tanto a ração quanto a água foram esterilizadas antes da administração aos animais.

Todos os procedimentos com os animais estiveram de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/Unesp (Parecer nº 29/2005).

Após o período de aclimação, os animais foram pesados no início do experimento, separados por peso corpóreo e agrupados em 6 grupos (n=10), de acordo com o protocolo experimental.



Figura 1. Fotografia das acomodações de ratos Wistar em estante ventilada com sistema de filtração de ar e controle de temperatura utilizada no desenvolvimento do protocolo experimental.

#### **4.6.2 Formulação e processamento da ração**

As rações foram preparadas segundo Reeves et al. (1993) do *American Institute of Nutrition (AIN)*, com modificações na fonte protéica e quantidade de lipídeos. A caseína foi substituída por farinha de carne em quantidade suficiente para atingir o nível protéico

recomendado de 14%. Foi utilizada carne magra (patinho), de forma que a ração formulada, embora apresentando o mesmo teor protéico que a ração padrão, mostrou-se com um menor conteúdo de lipídeos. Não foi acrescentado óleo vegetal para adequar esse conteúdo, uma vez que queríamos que a fonte de proteína e de lipídeos fosse exclusivamente de origem animal.

As rações foram estocadas em embalagens de polietileno, sob congelamento (-14°C) até o dia anterior ao consumo, quando passavam para refrigeração (5°C) e no início do dia para temperatura ambiente (Tabela 1).

Para o processamento da ração à base de carne foi selecionada uma carne bovina magra (patinho), a qual foi moída e levada para estufa de circulação de ar (Quimis, Brasil) a 105°C/3-4h. A carne já seca foi triturada e peneirada para a produção de uma farinha. Os ingredientes secos foram misturados em graal (BHT, bitartarato de colina, L-cistina, mistura vitamínica, mistura mineral, celulose, sacarose, amido dextrinizado e amido de milho) e levados para homogeneização em misturador em V (FABBE, Brasil).

Após a homogeneização dos ingredientes secos, foi adicionada a goma (amido de milho ADRAM, adicionado de água destilada) para dar liga à mistura e permitir a produção de *pellets*.

Os *pellets* foram levados para estufa de circulação de ar (Quimis, Brasil) e secos a 40°C/22h. Depois da secagem, esses *pellets* foram acondicionados em sacos plásticos, esterilizados em autoclave (121°/15 min) e armazenados a -14°C.

Os vários lotes de ração utilizados durante o período experimental foram processados semanalmente.

#### **4.6.2.1 Caracterização química da farinha de carne**

Os seguintes componentes da farinha de carne foram determinados: proteína pelo método de Kjeldahl usando como catalisador o sulfato de cobre (AOAC, 1990) e fator de conversão 6,25 e lipídeos pelo método de Soxhlet (AOAC, 1990). Todas as análises foram realizadas em triplicata

Tabela 1. Formulação das rações utilizadas durante o período experimental (90 dias) na alimentação de ratos Wistar utilizados na avaliação do efeito do “iogurte” de soja na microbiota intestinal.

| <b>Ingredientes (g/kg)</b>                | <b>Ração padrão (AIN-93M)</b> | <b>Ração experimental</b> |
|---|-------------------------------|---------------------------|
| Amido de milho                            | 465,69                        | 441,25                    |
| Caseína                                   | 140,00                        | .....                     |
| Farinha de carne                          | .....                         | 179,49                    |
| Amido dextrinizado                        | 155,00                        | 155,00                    |
| Sacarose                                  | 100,00                        | 100,00                    |
| Óleo de soja                              | 40,00                         | .....                     |
| Gordura animal                            | .....                         | 24,95                     |
| Celulose                                  | 50,00                         | 50,00                     |
| Mistura vitamínica<br>(AIN-93M-MX)        | 35,00                         | 35,00                     |
| Mistura mineral<br>(AIN-93-VX)            | 10,00                         | 10,00                     |
| L-cistina                                 | 1,80                          | 1,80                      |
| Bitartrato de colina<br>(41,1% de colina) | 2,50                          | 2,50                      |
| BHT                                       | 0,008                         | 0,008                     |
| <b>Total</b>                              | <b>1000,00</b>                | <b>1000,00</b>            |

Amido de milho: produto doado pela ADRAM S.A. Indústria e Comércio

Caseína comercial com um conteúdo protéico de 86% (Synth) foi utilizada como controle, Sacarose (Synth) Celulose, amido dextrinizado e bitartrato de colina (Rhostrer)

A porcentagem de proteína e de gordura contidas na farinha de carne foram de 78,0% e 13,9%

BHT (butil hidroxitolueno): antioxidante sintético

#### **4.6.3 Administração dos produtos aos animais**

Antes do início do experimento, os animais foram submetidos a um período de condicionamento de 2 semanas (Rossi et al, 2000b). Na primeira semana os animais foram condicionados para o sabor doce (solução de sacarose 8%). Na segunda semana o condicionamento foi para os sabores doce e ácido (solução de sacarose 8%, acidificada com ácido láctico até pH 4,5).



A administração dos produtos foi realizada por gavagem com o animal imobilizado, por meio de tração manual da pele da região dorsal (Figura 2).



Figura 2. Fotografia de rato Wistar imobilizado por meio de tração animal, recebendo produto por gavagem.

Tanto os produtos quanto a solução de células de *E. faecium* CRL 183 foram administrados aos animais na dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia, garantindo uma população de  $10^9$  UFC/dia de *E. faecium*, durante um período de 4 semanas.

#### 4.6.4 Protocolo experimental I

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos:

**Grupo I** - animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (grupo controle 1) (n=10)

**Grupo II** - animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de produto não fermentado (n=10)

**Grupo III** – animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* CRL 183 através do cultivo puro (n=10)

**Grupo IV** – animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (grupo controle 2) (n=10)

**Grupo V** – animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado (n=10)

**Grupo VI** – animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) (n=10)

Os animais dos grupos II, III, IV, V e VI receberam ração à base de proteína de carne bovina, enquanto os animais do grupo I receberam ração à base de caseína (Quadro 1).

O tempo de estudo foi de 90 dias dividido em 3 períodos: P<sub>1</sub> (período pré-ingestão/30 dias), P<sub>2</sub> (período de ingestão/30 dias) e P<sub>3</sub> (período pós-ingestão/30 dias, divididos em dois períodos de 15 dias). Os animais, no período pré-ingestão, receberam apenas rações. No período de ingestão os animais receberam além das rações os produtos em estudo. No período pós-ingestão os animais voltaram a receber apenas rações.

Quadro 1. Protocolo experimental I utilizado para alimentação de ratos Wistar para avaliação do efeito do “iogurte” de soja na microbiota intestinal.

| Grupos<br>(n=10) | Pré-ingestão<br>30 dias | Ingestão<br>60 dias  | Pós-ingestão           |                        |
|------------------|-------------------------|--|------------------------|------------------------|
|                  |                         |  | 75 dias                | 90 dias                |
| <b>I</b>         | Ração padrão (caseína)  | Ração padrão (caseína)   | Ração padrão (caseína) | Ração padrão (caseína) |
| <b>II</b>        | Ração à base de carne   | Ração à base de carne<br>+<br><b>Produto não fermentado</b>            | Ração à base de carne  | Ração à base de carne  |
| <b>III</b>       | Ração à base de carne   | Ração à base de carne<br>+<br><b>Cultivo puro de <i>E. faecium</i></b> | Ração à base de carne  | Ração à base de carne  |
| <b>IV</b>        | Ração à base de carne   | Ração à base de carne  | Ração à base de carne  | Ração à base de carne  |
| <b>V</b>         | Ração à base de carne   | Ração à base de carne<br>+<br><b>"Iogurte" de soja esterilizado</b>    | Ração à base de carne  | Ração à base de carne  |
| <b>VI</b>        | Ração à base de carne   | Ração à base de carne<br>+<br><b>"Iogurte" de soja</b>                 | Ração à base de carne  | Ração à base de carne  |

Ao final de 30, 60, 75 e 90 dias do período de experimentação, as fezes foram coletadas em recipientes esterilizados e estocadas em jarras de anaerobiose (Ling et al., 1994) a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises (Spanhaak et al., 1998).

#### **4.6.5 Consumo de ração e controle de peso corpóreo**

A quantidade de ração consumida pelos animais foi verificada diariamente para obtenção da ingesta nos diferentes grupos experimentais.

Durante todo período experimental, os animais foram submetidos, semanalmente, a uma avaliação do peso corpóreo.

#### **4.6.6 Eutanásia dos animais**

Os animais foram eutanasiados, após jejum de 24 horas, em câmara de  $\text{CO}_2$  e em três etapas: ao final de 60, 75 e 90 dias do protocolo experimental. Todos os animais foram pesados um dia antes de serem mortos.

Após a eutanásia, de cada animal foi retirado o cólon, em condições de total assepsia, o qual foi pesado e colocado em sacos esterilizados (Nasco, EUA) para homogeneizador de amostras para análise microbiológica (Nova Ética, Brasil) contendo água peptonada, na diluição de 1:100 para a enumeração e identificação de colônias do gênero *Enterococcus*.

#### **4.6.7 Composição da microbiota intestinal dos ratos**

A análise da composição da microbiota intestinal foi baseada na enumeração de bactérias aeróbias e anaeróbias totais, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, Enterobactérias, *Clostridium* e *Bacteroides*.

Um grama de fezes dos animais foi suspenso em 99 mL de água peptonada. Diluições seriadas foram preparadas e a inoculação foi feita em meios de cultura seletivos: aeróbios e anaeróbios totais (ágar Standard Methods - Acumedia, EUA;  $37^{\circ}\text{C}/48\text{h}$ );

*Enterococcus* spp. (ágar KF *Streptococcus* - Acumedia, EUA; 37°C/48h) (Edlund et al., 2000); *Lactobacillus* spp. (ágar MRS, Merck, Alemanha; 37°C/48h, anaerobiose) (Yoshioka, Iseki, Fujita, 1983); *Bifidobacterium* spp. (*Bifidobacterium* medium 25 – BIM-25, 37°C/72h, anaerobiose) (Munoa e Pares, 1988), Enterobactérias (ágar MacConkey - Acumedia, EUA; 37°C/48h) (Brigidi et al., 2001); *Clostridium* spp. (ágar RCA – Difco, França; 37°C/48h, anaerobiose) (Marzotto et al., 2006); *Bacteroides* spp. (ágar BBE - Acumedia, EUA; 37°C/72h, anaerobiose) (Livingston et al., 1978).

#### **4.6.8 Determinação da sobrevivência gastrointestinal de *Enterococcus faecium* no cólon e nas fezes de ratos**

##### **4.6.8.1 Isolamento e identificação de *Enterococcus faecium***

O isolamento foi realizado conforme descrito por Edlund *et al.*, (2000). KF *Streptococcus* Agar (Acumedia, EUA) foi usado como meio seletivo para a contagem do gênero *Enterococcus*.

Colônias com morfologias distintas pré-selecionadas foram semeadas em tubos contendo ágar bile esculina azida (Acumedia, EUA) para confirmação do gênero *Enterococcus*. Para a identificação da espécie *E. faecium* foi utilizado o sistema API-20 Strep (Biomérieux, França) que associa 20 testes bioquímicos (produção de acetona, hidrólise do ácido hipúrico,  $\beta$ -glucosidase, pirolidonil arilamidase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -galactosidase, fosfatase alcalina, leucina aminopeptidase, arginina dihidrolase, acidificação de ribose, acidificação de arabinose, acidificação de manitol, acidificação de sorbitol, acidificação de lactose, acidificação de trealose, acidificação de inulina, acidificação de rafinose, acidificação de amido, acidificação de glicogênio).

##### **4.6.8.2 Confirmação de *Enterococcus faecium* por PCR**

A confirmação do *E. faecium* foi realizada utilizando-se a metodologia molecular PCR, a partir de colônias procedentes das fezes e cólon dos animais.

A extração do DNA genômico do *E. faecium*, isolado aos 0, 30, 60, 75 e 90 dias do período experimental para fezes e aos 60, 75 e 90 dias para o cólon, foi realizado utilizando Kit Dneasy (Qiagen, EUA). Os *primers* utilizados para detecção específica do *E. faecium* foram: Ent 1 (5'-ATTACGGAGACTACACACTTTG-3') e o Ent 2 (5'-TAGCCATAGAAGTTACATCAAG-3') (Invitrogen, Brasil). Os *primers* foram referentes à região 16S-23S rRNA do *E. faecium*.

As reações de PCR foram realizadas em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL contendo 1µM de cada oligonucleotídeo, 1µL de uma mistura desoxiribonucleotídeos 100µM cada (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 1µM de cada *primer*, 2 µL de DNA genômico e 2U de enzima Taq DNA polimerase (Labtrade) num volume final de 50µL. As condições das reações foram estabelecidas de acordo com a temperatura de desnaturação dos oligonucleotídeos utilizados. Os parâmetros para a amplificação foram: 30 ciclos de 1 min a 94°C, 30s a 53°C e 1 minuto a 72°C. O programa também incluiu a pré-incubação a 94°C por 1 minuto, 1 minuto a 72°C e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos finais foram separados utilizando gel de eletroforese com 1,0% de agarose em tampão TAE (Tris 40mM, ácido acético glacial 0,11% e EDTA 1 mM) e então purificados utilizando o kit “QIAquick PCR Purification” (Qiagen, EUA).

A seguir é apresentado um esquema das etapas de isolamento, identificação e confirmação do *Enterococcus faecium* (Figura 3).

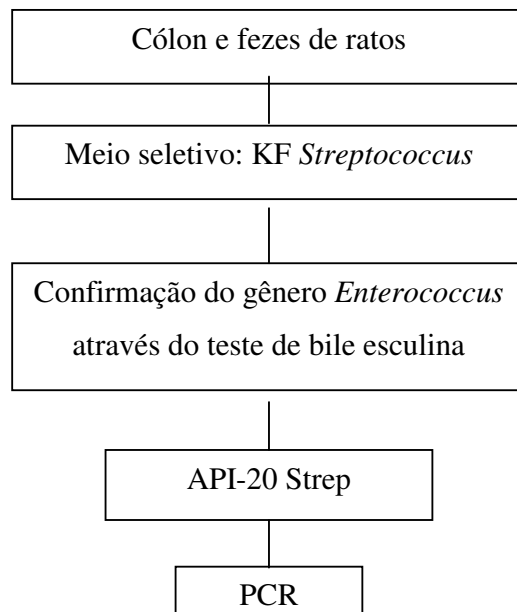


Figura 3. Esquema das análises utilizadas no isolamento e confirmação das espécies de *Enterococcus* encontradas nas fezes dos ratos.

#### 4.6.8.3 Determinação do pH fecal

Para cada grupo experimental, o pH fecal foi determinado na primeira diluição (100g/L de fezes em água destilada) com o auxílio de pHmetro, com eletrodo combinado de vidro (Qualxtron) (Toit et al., 1998).

#### 4.6.8.4 Conteúdo de amônia fecal

O conteúdo de amônia fecal também foi determinado na primeira diluição (100g/L de fezes em água destilada). Utilizou-se um medidor de íon seletivo (modelo 710A, marca Orion) acoplado a um eletrodo de íon seletivo para amônia (modelo 95-12, Orion). O aparelho foi calibrado utilizando soluções padrão de cloreto de amônio 0,1M, nas concentrações de 10, 100 e 1000 mg/L de amônia. Em 25 mL de amostra foi adicionado 0,5

mL de solução ISA (ammonia pH adjusting Ionic Strength Adjuster (Orion) – solução ajustadora de pH e força iônica). Todas as medidas foram realizadas a (25°C).

## **4.7 Ensaios com humanos**

### **4.7.1 Seleção dos voluntários**

Foram selecionados 40 indivíduos voluntários saudáveis, do sexo feminino e masculino, com idade entre 40-50 anos. Nenhum dos voluntários apresentou qualquer história de doença gastrointestinal e não consumiu antibiótico ou repositor de microbiota intestinal pelo menos 2 meses antes do início do estudo. Os voluntários foram devidamente instruídos quanto ao tipo de estudo, objetivos, conduta individual, medidas de segurança e considerações sobre riscos. Os indivíduos selecionados seriam excluídos da pesquisa ao apresentarem algum efeito colateral indesejável; por resolução própria em abandonar a pesquisa ou se fizessem consumo de antibióticos ou repositores de microbiota intestinal durante o período experimental. Este protocolo esteve de acordo com as recomendações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/Unesp (Parecer nº 36/2005).

### **4.7.2 Protocolo experimental II**

O estudo realizado foi duplo cego, randomizado, controlado por placebo, com duração total de 60 dias.

Os indivíduos foram aleatoriamente divididos em 2 grupos, cada um com 20 pessoas. Um grupo consumiu diariamente 100 mL de “iogurte” de soja ( $10^8$  UFC de *E. faecium*/mL de produto) (grupo F), enquanto o outro consumiu diariamente 100 mL de produto não fermentado (grupo P), ambos por um período de 4 semanas (Quadro 2).

Vale aqui ressaltar que a princípio o grupo “placebo” (grupo P) seria composto por indivíduos que consumiriam o “iogurte” de soja esterilizado, no entanto houve substituição

pelo produto não fermentado. Essa substituição foi realizada em virtude da coloração apresentada pelo produto após a esterilização, diferente da coloração do “iogurte” de soja. Como os voluntários foram todos selecionados dentre os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (mesmo local de trabalho), a diferença entre o aspecto dos produtos poderia permitir uma comparação entre os voluntários dos dois grupos de estudo, o que não seria desejável para esse tipo de pesquisa. Além disso, foi verificado a partir dos resultados obtidos com animais que o consumo do produto não fermentado apresenta efeitos positivos na microbiota fecal como, por exemplo, o aumento da concentração de *Lactobacillus* sp e redução de *Clostridium* sp.

Os produtos foram produzidos semanalmente e distribuídos a cada voluntário em garrafas previamente esterilizadas e rotuladas contendo as informações sobre data de produção, validade e dose a ser ingerida.

Quadro 2. Protocolo experimental II.

| <b>Grupos</b> | <b>Pré-ingestão<br/>(15 dias)<br/>t=15</b> | <b>Ingestão<br/>(30 dias)<br/>t=45</b> | <b>Pós-ingestão<br/>(15 dias)<br/>t=60</b> |
|---------------|--|--|--|
| <b>F</b>      | Dieta habitual                             | “Iogurte” de soja                      | Dieta habitual                             |
| <b>P</b>      | Dieta habitual                             | Produto não fermentado                 | Dieta habitual                             |

O tempo de experimentação (60 dias) também foi dividido em 3 períodos: P<sub>1</sub> (período pré-ingestão – 15 dias), P<sub>2</sub> (período de ingestão – 30 dias) e P<sub>3</sub> (período pós-ingestão-15 dias). Os indivíduos no período pré-ingestão (P<sub>1</sub>) consumiram apenas a sua dieta habitual. No período de ingestão (P<sub>2</sub>), os indivíduos além de sua dieta habitual receberam 100mL/dia de produto fermentado (grupo F) ou do produto não fermentado (grupo P) e, finalmente, no período pós-ingestão (P<sub>3</sub>) os indivíduos voltaram a consumir apenas a sua dieta habitual.

Ao final de cada período de experimentação os indivíduos coletaram suas fezes em recipientes esterilizados que foram estocados em jarras de anaerobiose (Ling et al., 1994) a –80°C até o momento das análises (Bouhnik et al., 1996).

As determinações do pH fecal e conteúdo de amônia foram realizadas de acordo com os itens 4.6.8.3 e 4.6.8.4, respectivamente.



## **4.8 Determinação das atividades das enzimas bacterianas fecais de ratos e humanos**

### **4.8.1 Sistema API-ZYM**

A atividade da  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase e  $\beta$ -glucuronidase nas fezes dos animais e humanos foram determinadas com o auxílio do kit API-ZYM (Biomérieux, França) segundo Vlková et al (2005). Amostras fecais (0,1g) foram suspensas em salina (10 mL) e centrifugadas por 10 min a 6988 g. O sedimento resultante foi dissolvido em 2 mL de salina. Essa solução foi inoculada (90  $\mu$ L por cúpula) na galeria de API-ZYM. As atividades enzimáticas foram determinadas de acordo com as instruções do fabricante, por meio de uma escala de 0 (reação negativa) a 5 (atividade máxima).

### **4.8.2 Ensaio enzimático: $\beta$ -glucuronidase**

Amostras fecais de ratos e humanos (100 mg/mL) foram suspensas em tampão fosfato resfriado (5° C) 0,1 M (pH 7,0), homogeneizadas, filtradas e sonicadas (3 x 1 min) a 4°C (Unique). Posteriormente, foram centrifugadas a 500 g por 15 minutos. A fração sobrenadante (extrato fecal) foi utilizada para as análises enzimáticas.

A determinação da atividade da  $\beta$ -glucuronidase foi baseada na metodologia descrita por Goldin et al. (1980). A reação ocorreu a 37°C (pH 6,8) num volume total de 1 mL contendo uma concentração final de 0,02 M de tampão fosfato de potássio, 0,1 mM de EDTA, 1 mM de fenolftaleína- $\beta$ -D-glucuronídeo (Sigma) e 0,2 mL de extrato fecal. A reação foi interrompida em intervalos de 5 minutos pela adição de 5 mL de tampão glicina 0,2 M (pH 10,4) contendo 0,2 M de NaCl. As leituras foram feitas em espectrofotômetro (Ultrospec 1100 pro, Amersham-Biosciences) no comprimento de onda de 540 nm. A reação enzimática foi linear durante 30 minutos e a quantidade de fenolftaleína liberada na reação foi determinada por comparação a uma curva padrão de fenolftaleína.

## **4.9 Caracterização de substâncias antimicrobianas produzidas pelo *Enterococcus faecium***

Para a determinação da produção de substâncias antimicrobianas pelo *E. faecium* CRL 183 foi utilizada a técnica “spot-on-the-lawn” (Lewus e Montville, 1991) com modificações sugeridas por De Martinis, Santarosa e Freitas (2003).

A cultura estoque de *E. faecium* CRL 183 foi inoculada em caldo Soja Trypticase (Acumedia) a 37°C por 24 horas. Dois microlitros das culturas foram depositados na superfície de placas contendo Ágar Soja Trypticase (Acumedia) adicionado de 0,6% de extrato de levedura (Acumedia) (TSAYE), sendo essas placas incubadas anaerobiamente a 37°C por 24 horas. Em seguida, as placas receberam uma sobrecamada de 8 mL de caldo BHI (infusão cérebro-coração, Acumedia) semi-sólido contendo  $10^5$ - $10^6$  UFC/mL das bactérias indicadoras. As placas foram incubadas novamente (37°C/24h) e, a inibição foi verificada pela presença de halo sem crescimento ao redor da colônia.

Os microrganismos indicadores foram obtidos a partir das fezes de ratos coletadas no início do período experimental ( $T_0$ ). Para tanto, amostras fecais foram semeadas (por esgotamento) em meios de cultura para *Enterococcus* spp. (ágar KF *Streptococcus*, Acumedia), Enterobactérias (ágar MacConkey, Acumedia), *Clostridium* spp. (ágar RCM, Difco), *Bacteroides* spp. (ágar BBE, Acumedia) e *Lactobacillus* spp. (ágar MRS, Merck). De cada grupo de bactérias foram selecionadas as colônias com morfologias distintas.

A sensibilidade das substâncias antagonísticas a proteases foi realizada utilizando-se proteinase K (P 8044 Sigma-Aldrich) e protease tipo XIV de *Streptomyces griseus* (P 5147, Sigma-Aldrich).

Foram isoladas, a partir das fezes dos animais, colônias com morfologias distintas de cada grupo de bactérias (*Enterococcus*, Enterobactérias, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacteroides* e *Bifidobacterium*) para serem utilizadas como microrganismos indicadores.

## **4.10 Determinação da atividade de azorredutase e nitrorredutase em camundongos**

### **4.10.1 Animais experimentais e dieta**

Foram utilizados camundongos machos albinos da linhagem Balb/c, provenientes do Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA, SM Tucumán, Argentina), de 6

semanas de vida e com um peso corpóreo inicial de, aproximadamente, 30 gramas. Durante o período experimental (21 dias) os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, sob fotoperíodo controlado (12 horas claro/12 horas escuro) e temperatura entre 23°C ± 2°C. Os animais foram alimentados com ração formulada e água *ad libitum*.

Os animais foram randomicamente divididos em 5 grupos, cada grupo contendo 9 camundongos, com exceção do grupo basal.

#### **4.10.2 Protocolo experimental III**

**Grupo basal** - animais que receberam somente ração padrão (n=3)

**Grupo C** – animais que receberam somente ração a base de carne (n=9)

**Grupo C + I** – animais que receberam ração a base de carne + dose de 3 mL/kg de “iogurte” de soja kg (10<sup>9</sup> UFC de *E. faecium*/mL do produto) (n=9)

**Grupo C + EF** – animais que receberam ração a base de carne + dose de 3 mL/kg (10<sup>9</sup> UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro (n=9)

**Grupo C + P** – animais que receberam ração a base de carne + 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de produto não fermentado (n=9)

O período experimental foi de 21 dias. Os animais receberam durante os 14 dias de estudo, além das rações formuladas, os produtos em estudo (período de ingestão). Na terceira semana a administração dos produtos foi interrompida e os animais voltaram a receber apenas ração (período pós-ingestão). Ao final de 7, 14 e 21 dias, 3 animais de cada grupo eram mortos por deslocamento cervical para a retirada do ceco. O conteúdo cecal foi retirado em câmara de anaerobiose e utilizado nas determinações enzimáticas. É importante salientar que os animais do grupo basal foram mortos no início do experimento para a determinação das atividades enzimáticas e os resultados obtidos foram utilizados como valores de referência (valores pré-ingestão).

#### **4.10.3 Obtenção dos produtos administrados aos animais e controle da viabilidade celular**

A obtenção dos produtos administrados aos animais (“iogurte” de soja, suspensão do cultivo puro de *E. faecium* CRL 183 e produto não fermentado) e o controle da viabilidade celular do “iogurte” de soja e suspensão *E. faecium* CRL 183 foram realizados seguindo a mesma metodologia descrita nos protocolos experimentais I e II (item 4.4).

#### **4.10.4 Administração dos produtos aos animais**

Antes do início do experimento, os animais foram submetidos a um período de condicionamento para o sabor doce e, posteriormente, para o sabor doce e ácido (solução de sacarose 8%, acidificada com ácido láctico até pH 4,5). A administração dos produtos foi realizada por gavagem com o animal imobilizado.

Tanto os produtos quanto a suspensão de células de *E. faecium* CRL 183 foram administrados aos animais na dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia, garantindo uma concentração de  $10^9$  UFC/dia de *E. faecium*, durante um período de 2 semanas.

#### **4.10.5 Ensaio enzimático: nitrorredutase e azorredutase**

As determinações das atividades da azorredutase e nitrorredutase foram realizadas em câmara de anaerobiose (Forma Scientific Anaerobic System, modelo 1024) (Figura 4), com uma atmosfera de 85% de N<sub>2</sub> e 15% de CO<sub>2</sub>. As fezes foram diluídas (100 mg/mL) em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,4) com 0,03% de cisteína, homogeneizadas e o sobrenadante (extrato fecal) foi utilizado para os ensaios enzimáticos. A determinação da atividade da nitrorredutase e azorredutase foi baseada em metodologia descrita por Wise et al. (1982).

A reação de nitrorredutase ocorreu a 37°C num volume total de 0,5 mL com uma concentração final de 0,02 M de tampão fosfato de potássio (pH 7,4) contendo 0,85% de NaCl, 0,5 mM de ácido nitrobenzóico e 0,2 mL de extrato fecal. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético a 10%. As leituras foram feitas em espectrofotômetro

(Cecil 2021 2000 series) a 540 nm. A reação foi linear durante um período de 60 minutos. A quantidade de ácido *p*-aminobenzóico formado na amostra fecal foi determinada pelo método de Bratton e Marshall (1939).

Para a determinação da atividade da azorredutase, ao extrato fecal (150  $\mu$ L) foi adicionado amaranto (Sigma) (concentração final de 1mM). A reação ocorreu a 37°C e foi linear durante 60 minutos. Para interromper a reação, adicionou-se azida de sódio 1mM. Após a centrifugação, a absorbância do sobrenadante foi determinada a 520 nm. A concentração de amaranto foi calculada usando um coeficiente de extinção molar de 27,32  $\text{mmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ .



Figura 4. Fotografia da câmara de anaerobiose (Forma Scientific Anaerobic System, modelo 1024).

#### **4.11 Determinação da atividade da $\beta$ -glucuronidase, nitrorredutase e azorredutase no cultivo puro de *E. faecium* CRL 183**

Para a determinação da atividade da  $\beta$ -glucuronidase, nitrorredutase e azorredutase no *E. faecium* CRL 183, a cepa foi inoculada em caldo LAPTg (Saavedra et al., 2003) numa concentração de 2% (v/v) e incubada a 37°C por 16 horas em câmara de anaerobiose.

Após esse período, o cultivo foi centrifugado (6708 g/15 min) e o sobrenadante eliminado. Ressuspendeu-se o sedimento em tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,4) contendo 0,03% de cisteína. Foi realizada uma nova centrifugação (6708 g/15 min) e o sobrenadante descartado. Ao sedimento formado foi adicionado novamente tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,4) contendo 0,03% de cisteína até atingir uma concentração de 30% (p/v). Além disso, pérolas de vidro de 0,11 mm foram incorporadas para que as células de *E. faecium* fossem rompidas (Minibeadbeater 8). Após o rompimento celular, os tubos foram novamente centrifugados e o sobrenadante (extrato livre de células) foi usado para os ensaios enzimáticos. A atividade da  $\beta$ -glucuronidase foi realizada segundo metodologia descrita por Rowland et al. (1983) e da nitrorredutase e azorredutase de acordo com Wise et al. (1982).

#### **4.12 Detecção de fatores de virulência**

O DNA genômico do *E. faecium* CRL 183 foi isolado segundo metodologia descrita por Pospiech e Neumann (1995). Essa cepa foi avaliada usando a técnica de PCR com *primers* específicos para diferentes genes de virulência e de resistência a antibiótico. Os *primers* usados foram: *hyl n1* e *hyl n2*; *esp 12R* e *esp 14F*; *efaAfs* e *efaAfsr*; *efaAfm* e *efaAfmR*, *cob* e *cobR*; *cpd* e *cpdR*; *gel 12* e *gel 11*; *asa 12* e *asa 11*; *ccf* e *ccfR*; *cyt1* e *cyt 11b*; *vanAf* e *vanAr*; *vanBf* e *vanBr*; *vanC1f* e *vanC1r* (Tabela 2) (Eaton e Gasson, 2001). Os parâmetros para amplificação foram: ciclo inicial de desnaturação (94°C por 2 min); anelamento (51°C por 2 min) e alongamento (72°C por 2 min), seguido de 29 ciclos de desnaturação (94°C por 30 s), anelamento (51°C por 15 s), alongamento (72°C por 15 s) e uma extensão final a 72°C por 15 min. Os produtos finais da PCR foram separados utilizando gel de eletroforese com 2% de agarose em tampão TAE (Tris-acetato 40mM, EDTA 2mM, pH 8,0), corados com brometo de etídeo e fotografados.

#### **4.13 Análise estatística dos resultados**

Os valores médios obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e por teste de médias de Tukey pelo programa SIGMASTAT. As diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0,05$ .

Tabela 2. *Primers* de virulência e de resistência a antibiótico testados em *E. faecium* CRL 183

| <i>Primers</i>   | <b>Função do produto na virulência</b>  |
|--|---|
| <i>Hyl n1/ Hyl n2</i>  | Hialuronidase; relacionado à doença invasiva (Rice et al., 2003)  |
| <i>Gel 12/Gel 11</i>   | Gelatinase; hidrolisa gelatina, colágeno, caseína, hemoglobina e outros compostos bioativos; aumenta a endocardite em modelo animal (Eaton e Gasson, 2001).   |
| <i>Asa 12/Asa 11</i>   | Substância de agregação; aumenta a adesão em células renais e cardíacas (Kreft et al., 1992)  |
| <i>Esp 12R/Esp 14F</i>   | Proteína de superfície de enterococos; localizada na superfície da parede celular e cujas variações na estrutura podem contribuir para a habilidade da bactéria em não ser detectada pelo sistema imunológico em um hospedeiro e persistir nos sítios de infecção (Eaton e Gasson, 2001). |
| <i>efaAfs/efaAfsr</i><br><i>efaAfm/efaAfmR</i>                   | Adesinas de parede celular; ajudam na colonização no tecido hospedeiro (Eaton e Gasson, 2001)   |
| <i>Cob/Cob R</i><br><i>Cpd/Cpd R</i><br><i>Ccf/Ccf R</i>         | Feromônios sexuais, quimiotáticos para leucócitos humanos; facilitam a conjugação (Eaton e Gasson, 2001).   |
| <i>Cyt 1/Cyt 11b</i>   | Citolisina; toxina hemolítica relacionada a severidade de doenças causadas por enterococos em humanos (Ike et al., 1987).   |
| <i>VanAf/VanAr</i><br><i>VanBf/VamBr</i><br><i>VanC1f/VanC1r</i> | Confere resistência ao antibiótico vancomicina (Franz et al., 2003).  |



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudo em modelo animal (ratos)

#### 5.1.1 Viabilidade do *Enterococcus faecium* CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 nos diversos lotes de produtos formulados

Os resultados de viabilidade dos microrganismos (cocos e bacilos) nos produtos em estudo (“iogurte” de soja, “iogurte” de soja esterilizado e cultivo puro de *E. faecium*), realizados durante 4 semanas, estão apresentados na Tabela 3.

Observa-se que nos 4 lotes de processamento dos produtos foi obtido uma população média na ordem de  $10^9$  UFC/mL, tanto de cocos quanto de bacilos, número adequado para que exerçam efeitos probióticos (Vinderola e Reinheimer, 2000; Valsiljevic e Shah, 2008). Cabe destacar que o produto em estudo foi fermentado com um inóculo misto de *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* (bacilos) e *Enterococcus faecium* (cocos), embora somente este último seja considerado probiótico. Por outro lado, o fato dos produtos processados em lotes distintos não terem apresentado diferenças na ordem de grandeza do número de células viáveis foi de grande interesse, pois garantiu uma ingestão regular de cocos e bacilos durante todo o período experimental.

Tabela 3. Viabilidade dos microrganismos utilizados na fermentação dos produtos a base de soja e nos cultivos puros de *E. faecium* em 4 lotes de processamento.

| Semana | "iogurte" de soja                                 |                              | "iogurte" de soja esterilizado                    |                              | Cultivo puro                 |
|--------|---|------------------------------|---|------------------------------|------------------------------|
|        | <i>L. helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> * (UFC/g) | <i>E. faecium</i> ** (UFC/g) | <i>L. helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> * (UFC/g) | <i>E. faecium</i> ** (UFC/g) | <i>E. faecium</i> ** (UFC/g) |
| 1      | $1,1 \times 10^9$                                 | $1,3 \times 10^9$            | -   | -                            | $1,7 \times 10^9$            |
| 2      | $1,2 \times 10^9$                                 | $1,6 \times 10^9$            | -   | -                            | $3,0 \times 10^9$            |
| 3      | $1,4 \times 10^9$                                 | $1,5 \times 10^9$            | -   | -                            | $4,3 \times 10^8$            |
| 4      | $1,0 \times 10^9$                                 | $1,1 \times 10^9$            | -   | -                            | $2,5 \times 10^9$            |

(-) ausência de colônias

\*Ágar MRS (Acumedia, EUA)

\*\*Ágar M17 (Acumedia, EUA)

### 5.1.2 Consumo de ração

Na figura 5 estão apresentados os valores do consumo médio de ração durante todo o período experimental (90 dias).

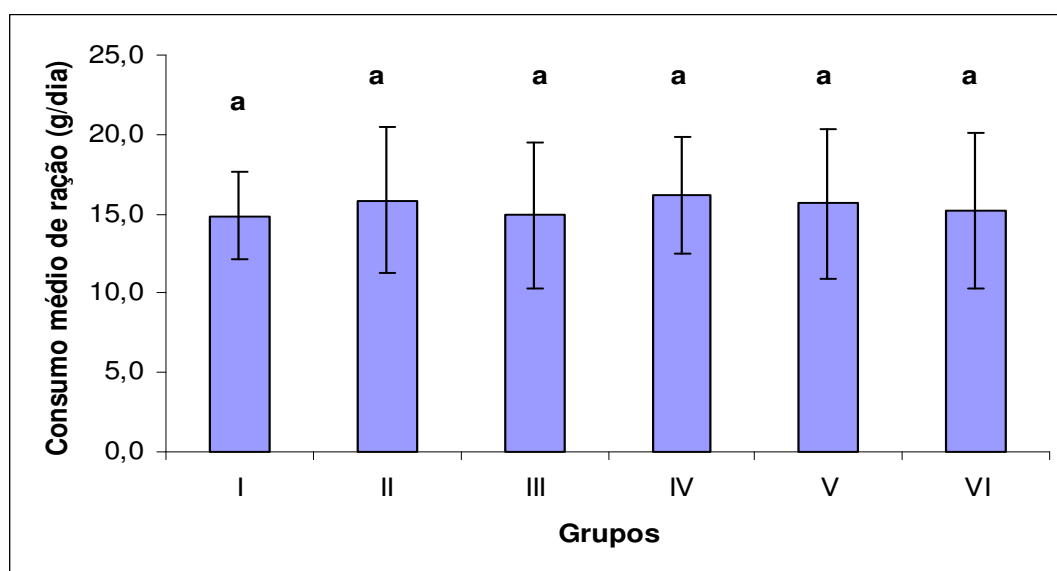


Figura 5. Consumo médio de ração (g/dia) dos diferentes grupos de estudo.

Colunas com letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ )

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto + ração a base de carne )

n=10

Pode-se perceber pela Figura 5 que não houve diferença estatística com relação ao consumo médio de ração durante o período de estudo. Durante as 12 semanas do período experimental os animais consumiram, em média, 15 g de ração por dia. Em vista destes resultados, pode-se dizer que a ingestão dos diferentes produtos (produto não fermentado, suspensão de cultivo puro de *E. faecium*, “iogurte” de soja esterilizado e “iogurte” de soja) não interferiu no consumo médio de ração dos animais em experimentação.

Detalhando um pouco mais a questão do consumo médio de rações, é apresentada a Tabela 4 onde os resultados encontram-se divididos em 2 períodos: A- período no qual os animais consumiram apenas as rações formuladas; B- período no qual os animais consumiram a ração e os produtos em estudo. Tal divisão em períodos foi feita com a finalidade de verificar se a administração dos produtos em estudo levava a uma alteração do consumo de ração. Nota-se que tanto no período A (período no qual os animais consumiram apenas a ração) quanto no período B (período no qual os animais consumiram ração e os produtos em estudo), não houve diferença estatística ( $p>0,05$ ) entre os grupos de estudo, comprovando, desta forma, que a ingestão dos diferentes produtos não alterou o consumo de ração. No entanto, se compararmos o período A com o período B, pode-se perceber que houve uma diminuição do consumo no segundo período (B) para todos os grupos experimentais. Essa redução no consumo de ração pode ser consequência do aumento da idade dos animais.

Tabela 4. Consumo médio de ração (g/dia).

| Grupos | Consumo médio de ração (g) |                          |
|--------|----------------------------|--------------------------|
|        | A                          | B                        |
| I      | 16,9 ± 2,1 <sup>bA</sup>   | 14,0 ± 1,9 <sup>aA</sup> |
| II     | 18,1 ± 4,5 <sup>bA</sup>   | 15,7 ± 4,1 <sup>aA</sup> |
| III    | 18,0 ± 3,8 <sup>bA</sup>   | 13,6 ± 4,5 <sup>aA</sup> |
| IV     | 18,5 ± 2,7 <sup>bA</sup>   | 15,8 ± 3,5 <sup>aA</sup> |
| V      | 18,9 ± 3,3 <sup>bA</sup>   | 15,0 ± 3,5 <sup>aA</sup> |
| VI     | 18,8 ± 3,7 <sup>bA</sup>   | 13,5 ± 4,5 <sup>aA</sup> |

Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $p<0,05$ )

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p<0,05$ )

**A:** período no qual os animais consumiram apenas a ração

**B:** período no qual os animais consumiram ração e os produtos em estudo

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

n=10

### 5.1.3 Ganho de peso corpóreo

Na Tabela 5 são apresentados os valores de peso corpóreo médio dos animais no início e no final do período experimental.

Tabela 5. Peso corpóreo médio(g) dos animais dos diferentes grupos de estudo.

| Grupos | Peso inicial          | Peso final             |
|--------|-----------------------|------------------------|
| I      | 243 ± 20 <sup>A</sup> | 345 ± 42 <sup>B</sup>  |
| II     | 254 ± 16 <sup>A</sup> | 314 ± 32 <sup>AB</sup> |
| III    | 253 ± 19 <sup>A</sup> | 296 ± 37 <sup>A</sup>  |
| IV     | 250 ± 11 <sup>A</sup> | 318 ± 13 <sup>AB</sup> |
| V      | 255 ± 11 <sup>A</sup> | 326 ± 27 <sup>AB</sup> |
| VI     | 250 ± 14 <sup>A</sup> | 292 ± 33 <sup>A</sup>  |

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ )

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

n=10

Pelos resultados apresentados na Tabela 5 pode-se perceber que os animais dos diferentes grupos experimentais não diferiram entre si quanto ao peso corpóreo inicial, fato que não foi verificado para o peso corpóreo final, uma vez que os animais pertencentes aos grupos III e VI, apesar de não diferirem significativamente entre si, apresentaram-se com peso inferior ( $p < 0,05$ ) se comparados com os animais do grupo I.

Na Tabela 6 são apresentados os ganhos médios de peso corpóreo relativo aos animais dos diferentes grupos, ao final do período experimental. Esses mesmos resultados podem ser melhor visualizados na Figura 6. Verifica-se que os animais do grupo I apresentaram um ganho médio de peso corporal maior se comparado com os animais que receberam ração formulada a base de carne vermelha (grupos II, III, IV e VI), o que pode ser atribuído à diferença na composição das rações formuladas fornecidas aos animais. No entanto, não houve diferença entre os animais dos grupos I e V quanto ao ganho médio de

peso corpóreo. Os animais do grupo I receberam ração padrão, cuja fonte protéica foi a caseína. Esse tipo de ração é recomendado pela AIN-93 para ratos em manutenção. Já a ração administrada aos animais dos grupos II, III, IV, V e VI também foi formulada baseada nas indicações da AIN-93 para ratos em manutenção, no entanto a caseína foi substituída pela farinha de carne em quantidade suficiente para se atingir um nível protéico de 14%. Vale destacar que a carne usada para a produção dessa ração foi uma carne magra (patinho), portanto com um conteúdo de lipídeos menor. Desta forma, a ração formulada a base de carne bovina embora apresentasse o mesmo teor protéico que a ração padrão (14%), possuía diferença no tipo de proteína, tipo de lipídeos (origem animal) e quantidade de lipídeos (uma vez que não quisemos acrescentar óleo vegetal para adequarmos à quantidade recomendada pela AIN-93).

Em virtude disso, acredita-se que a diferença no ganho de peso corporal do grupo I comparado com os demais grupos possa ser em função do tipo de proteína e da qualidade/quantidade de lipídeos. No entanto, Brandsch et al. (2006), com o objetivo de verificar o efeito de diferentes proteínas da dieta sobre os lipídeos plasmáticos e hepáticos, observaram que ratos alimentados com uma dieta à base de proteínas da carne e com uma dieta a base de caseína não diferiram entre si quanto ao consumo médio diário de ração e quanto ao ganho de peso corpóreo durante 21 dias de experimentação.

Com relação aos animais que receberam ração a base de carne (grupos II, III, IV, V e VI), embora não tenha havido diferença estatística entre eles quanto ao ganho médio de peso corporal, em termos de valores médios absolutos, aqueles que consumiram o cultivo puro de *E. faecium* (grupo III) e os que consumiram “iogurte” de soja fermentado com *E. faecium* e *L. helveticus* ssp *jugurti* (grupo VI) foram os que apresentaram as menores médias para ganho de peso corporal. Essa tendência de redução do ganho de peso corpóreo pode ser atribuída à presença do microrganismo probiótico *E. faecium*.

Tabela 6. Ganhos médios de peso corporal (g) dos diferentes grupos experimentais.

| Grupos | Ganho de peso corporal (g) |
|--------|----------------------------|
| I      | 103 ± 41 <sup>b</sup>      |
| II     | 72 ± 18 <sup>a</sup>       |
| III    | 50 ± 13 <sup>a</sup>       |
| IV     | 68 ± 18 <sup>a</sup>       |
| V      | 74 ± 19 <sup>ab</sup>      |
| VI     | 49 ± 12 <sup>a</sup>       |

Valores com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p<0,05)

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg (10<sup>9</sup> UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja (10<sup>9</sup> UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

n=10

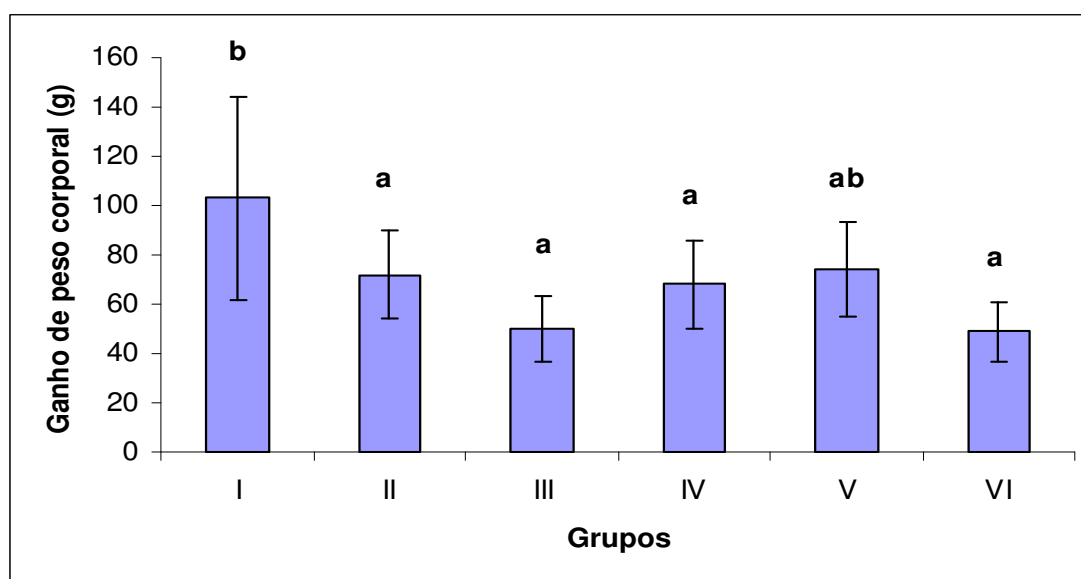


Figura 6. Ganhos médios de peso corporal (g) dos diferentes grupos de estudo.

Colunas com letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si (p<0,05)

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg (10<sup>9</sup> UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja (10<sup>9</sup> UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

n=10

Um estudo realizado com o objetivo de se verificar o efeito da ingestão de “iogurte” de soja fermentado com *E. faecium* e *L. helveticus* ssp *jugurti* sobre o metabolismo lipídico de ratos normo e hipercolesterolêmicos mostrou que o consumo do produto fermentado por ratos provocou uma redução dos níveis de colesterol total, uma diminuição na concentração circulante de triglicerídeos e um aumento na concentração de HDL-c, além da diminuição no peso relativo e absoluto dos tecidos adiposos brancos, aumento no peso do tecido adiposo marrom, diminuição na evolução do peso corporal, diminuição na área e diâmetro dos adipócitos, aumento na taxa lipolítica, diminuição na porcentagem de gordura e na taxa de síntese lipídica. Todos esses efeitos foram observados nos animais que receberam dose de 1ml/rato/dia do produto fermentado de soja, sedentários normo ou hipercolesterolêmicos, durante um período de 8 semanas (Manzoni et al., 2005).

#### **5.1.4 Influência dos produtos em estudo sobre o pH e a concentração de amônia fecais**

Alguns pesquisadores têm sugerido que um elevado pH intestinal pode estar relacionado ao aumento do risco de câncer de cólon, por meio do aumento no número de bactérias putrefativas e de substâncias carcinogênicas (Modler et al., 1990; Benno e Mitsuoka, 1992).

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados do pH fecal dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais em 3 pontos distintos do estudo: t=0 (início do experimento); t=30 (30 dias consumindo as rações formuladas) e t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo). O pH das fezes foi verificado no final de cada período.

Tabela 7. Valores de pH fecal em diferentes tempos de estudo.

| Grupos | pH fecal                   |                           |                           |
|--------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
|        | t=0                        | t=30                      | t=60                      |
| I      | 6,52 ± 0,02 <sup>aA</sup>  | 7,28 ± 0,03 <sup>CA</sup> | 7,13 ± 0,02 <sup>BA</sup> |
| II     | 6,71 ± 0,02 <sup>aBC</sup> | 7,45 ± 0,03 <sup>BB</sup> | 7,93 ± 0,03 <sup>CD</sup> |
| III    | 6,82 ± 0,03 <sup>aCD</sup> | 7,83 ± 0,02 <sup>BD</sup> | 8,43 ± 0,03 <sup>CF</sup> |
| IV     | 6,93 ± 0,03 <sup>aD</sup>  | 7,80 ± 0,02 <sup>BD</sup> | 7,51 ± 0,04 <sup>CB</sup> |
| V      | 6,60 ± 0,10 <sup>aAB</sup> | 7,55 ± 0,02 <sup>BC</sup> | 7,68 ± 0,03 <sup>BC</sup> |
| VI     | 6,74 ± 0,04 <sup>aC</sup>  | 7,82 ± 0,03 <sup>BD</sup> | 8,03 ± 0,03 <sup>CE</sup> |

Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ )  
 Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ )

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

n=10

A partir dos resultados apresentados na tabela 7, pode-se perceber que, de uma maneira geral, houve um aumento do pH fecal no decorrer de 60 dias de estudo para todos os grupos experimentais, com exceção dos grupos I e IV que apresentaram um aumento no tempo t=30 e uma pequena queda no tempo t=60.

Verifica-se, também, na tabela 7 uma diferença estatística no pH fecal inicial entre os diferentes grupos experimentais no t=0. Os animais dos grupos II, III e VI não diferiram estatisticamente entre si. Já, os grupos I e V apresentaram pH fecal inicial estatisticamente menor se comparado com os demais grupos. Para o t=30, pode-se perceber que os grupos III, IV e VI apresentaram pH fecal maior ( $p < 0,05$ ) se comparado com os grupos I, II e V. Esse comportamento foi semelhante ao encontrado no t=60 para os grupos III e VI.

Na Tabela 8 e na Figura 7 estão apresentadas as variações de pH fecal aos 60 dias de experimentação, isto é, as diferenças entre o tempo inicial (t=0) e o tempo 60 dias (t=60) que corresponde ao último dia de administração dos produtos. Os valores indicam que os animais dos grupos I e IV foram os que apresentaram um menor aumento no pH fecal. No entanto, os animais pertencentes aos grupos II (animais que consumiram o produto não fermentado), III (animais que consumiram cultivo puro de *E. faecium*) e VI (animais que



consumiram “iogurte” de soja fermentado com *E. faecium*) foram os que apresentaram um maior aumento do pH. Esses resultados sugerem que, embora o *E. faecium* seja uma bactéria ácido-lática, o consumo desse microrganismo contribuiu para a ocorrência de uma alcalinização das fezes, ao contrário do que se esperava. Por outro lado, fica evidente que também a ingestão dos produtos contendo soja (II, V e VI) provocou um aumento do pH.

Tabela 8. Variações do pH aos 60 dias de estudo nas fezes dos animais pertencentes aos diferentes grupos.

| Grupos | Aumento de pH fecal       |
|--------|---------------------------|
| I      | 0,61 ± 0,03 <sup>A</sup>  |
| II     | 1,22 ± 0,02 <sup>BC</sup> |
| III    | 1,61 ± 0,00 <sup>D</sup>  |
| IV     | 0,58 ± 0,06 <sup>A</sup>  |
| V      | 1,08 ± 0,13 <sup>B</sup>  |
| VI     | 1,29 ± 0,06 <sup>C</sup>  |

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p<0,05)

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg (10<sup>9</sup> UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja (10<sup>9</sup> UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

n=10

Alguns autores já verificaram que nem sempre a administração de BALs determina um abaixamento do pH fecal.

Bouhnik et al. (1996) em estudo realizado com humanos avaliaram os efeitos de uma ingestão prolongada de leite fermentado com *Bifidobacterium* sp com ou sem adição de inulina. Os resultados mostraram que não houve variação no pH fecal no decorrer dos 3 períodos experimentais (período anterior à ingestão do leite fermentado com *Bifidobacterium* sp; período de ingestão do leite fermentado com *Bifidobacterium* sp e período pós-ingestão do leite fermentado com *Bifidobacterium* sp). De acordo com os autores, o pH fecal pode não ser um bom indicador da acidificação intestinal.

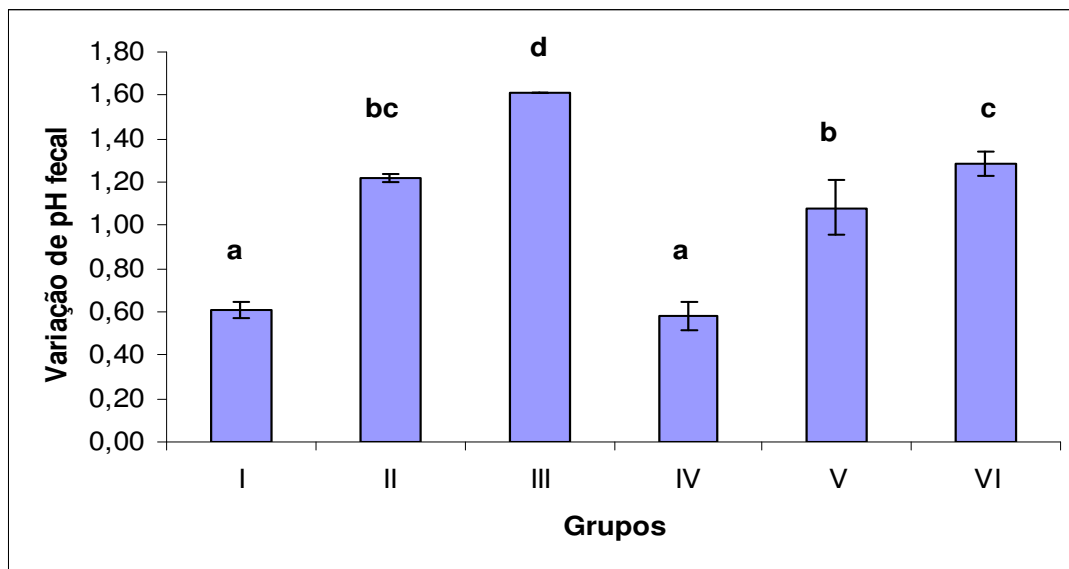


Figura 7. Variação do pH nos 60 dias de estudo, em relação ao período inicial, nas fezes dos animais pertencentes aos diferentes grupos.

Colunas com letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ )

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

n=10

Nessa mesma linha de pensamento, Toit et al. (1998) verificaram em animais alimentados com uma dieta rica em gordura, que a administração de uma mistura de microrganismos probióticos (*L. johnsonii* e *L. reuteri*) não apresentou efeito sobre os valores de pH fecal.

Por outro lado, Benno e Mitsuoka (1992) verificaram que indivíduos que consumiram *B. longum* durante 5 semanas apresentaram uma redução do pH fecal a partir da terceira semana de consumo. A normalização do pH fecal foi observada após o término do consumo do probiótico.

Em nosso estudo fica claro que o *E. faecium* (microrganismo probiótico) não foi capaz de reduzir o pH fecal como era esperado. Provavelmente esse microrganismo

metaboliza a proteína da carne produzindo metabólitos alcalinos como, por exemplo, a amônia. Visando checar tal hipótese, o teor de amônia foi determinado nas fezes dos animais em estudo, ao longo de 60 dias de experimentação.

Na tabela 9 são apresentados os resultados do conteúdo de amônia fecal dos animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais em 3 pontos distintos do estudo: t=0 (início do experimento); t=30 (30 dias consumindo as rações formuladas) e t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo). O conteúdo de amônia das fezes foi verificado no final de cada período.

Tabela 9. Teor médio de amônia fecal dos diferentes grupos de estudo ao longo de 60 dias de experimentação.

| Grupos | Conteúdo de amônia (ppm)    |                             |                             |
|--------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|        | t=0                         | t=30                        | t=60                        |
| I      | 105,33 ± 1,53 <sup>bF</sup> | 76,73 ± 0,31 <sup>aA</sup>  | 150,43 ± 0,51 <sup>cA</sup> |
| II     | 95,47 ± 0,50 <sup>aE</sup>  | 100,50 ± 0,50 <sup>bB</sup> | 209,83 ± 0,76 <sup>cD</sup> |
| III    | 85,47 ± 0,50 <sup>aD</sup>  | 141,83 ± 0,76 <sup>bC</sup> | 260,90 ± 0,85 <sup>cF</sup> |
| IV     | 62,23 ± 0,25 <sup>aB</sup>  | 175,93 ± 0,90 <sup>cE</sup> | 172,87 ± 0,81 <sup>bB</sup> |
| V      | 74,47 ± 0,45 <sup>aC</sup>  | 145,93 ± 0,90 <sup>bD</sup> | 185,83 ± 0,76 <sup>cC</sup> |
| VI     | 56,60 ± 0,40 <sup>aA</sup>  | 210,87 ± 0,81 <sup>bF</sup> | 236,90 ± 0,85 <sup>bE</sup> |

Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p<0,05)

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p<0,05)

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg (10<sup>9</sup> UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja (10<sup>9</sup> UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne)

t=0 (início do experimento); t=30 (30 dias consumindo as rações formuladas) e t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo)

n=10

A partir dos resultados apresentados na tabela 9, pôde-se perceber que, de uma maneira geral, houve um aumento do conteúdo de amônia fecal no decorrer de 60 dias de estudo para todos os grupos experimentais. Todavia, se compararmos o conteúdo de amônia após 60 dias de experimentação, verifica-se que os animais que consumiram o cultivo puro de *E. faecium* (III) e o “iogurte” de soja fermentado com *E. faecium* (VI) apresentaram o maior conteúdo de amônia fecal em relação aos demais grupos, explicando, assim, os

maiores valores de pH nas fezes desses animais. Tais observações podem ser melhor visualizadas pelos resultados expressos na Tabela 10 e na Figura 8, onde são apresentados os aumento da concentração de amônia fecal aos 60 dias de período experimental.

Alguns pesquisadores têm sugerido que um elevado pH intestinal pode estar relacionado com o aumento do risco de câncer de cólon, ao contrário da acidificação poderia contribuir para prevenir a formação de carcinógenos. Além disso, a redução do pH intestinal está relacionada à prevenção do crescimento de bactérias putrefativas (Modler et al., 1990). Pelos nossos resultados, é possível afirmar que o consumo de *E. faecium* não contribuiu para acidificação do pH fecal, portanto, a prevenção da formação de carcinógenos e do crescimento de bactérias putrefativas pode ter ficado comprometida. Nesse sentido, é provável que outros fatores sejam mais determinantes na modulação desses efeitos mencionados, uma vez que, Sivieri et al. (2008) observaram uma menor incidência de tumores em animais que consumiram o cultivo puro de *E. faecium* CRL 183. Por outro lado, o produto de soja fermentado com *E. faecium* CRL 183 não inibiu o desenvolvimento de focos de criptas aberrantes (biomarcadores de oncogenes do cólon), indicando não ter sido capaz de suprimir a expansão clonal das células iniciadas por DMH (dimetilhidrazina) na mucosa intestinal (Silva, Sivieri e Rossi, 2007) (dados não publicados).

Tabela 10. Ganho de amônia fecal (ppm) durante 60 dias de estudo.

| Grupos | Ganho de amônia fecal (ppm) |
|--------|-----------------------------|
| I      | 45,10 ± 1,15 <sup>A</sup>   |
| II     | 114,36 ± 1,52 <sup>C</sup>  |
| III    | 175,43 ± 0,38 <sup>D</sup>  |
| IV     | 110,63 ± 1,4 <sup>B</sup>   |
| V      | 111,37 ± 1,03 <sup>BC</sup> |
| VI     | 180,30 ± 1,25 <sup>E</sup>  |

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p<0,05)

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg (10<sup>9</sup> UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja (10<sup>9</sup> UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

n=10

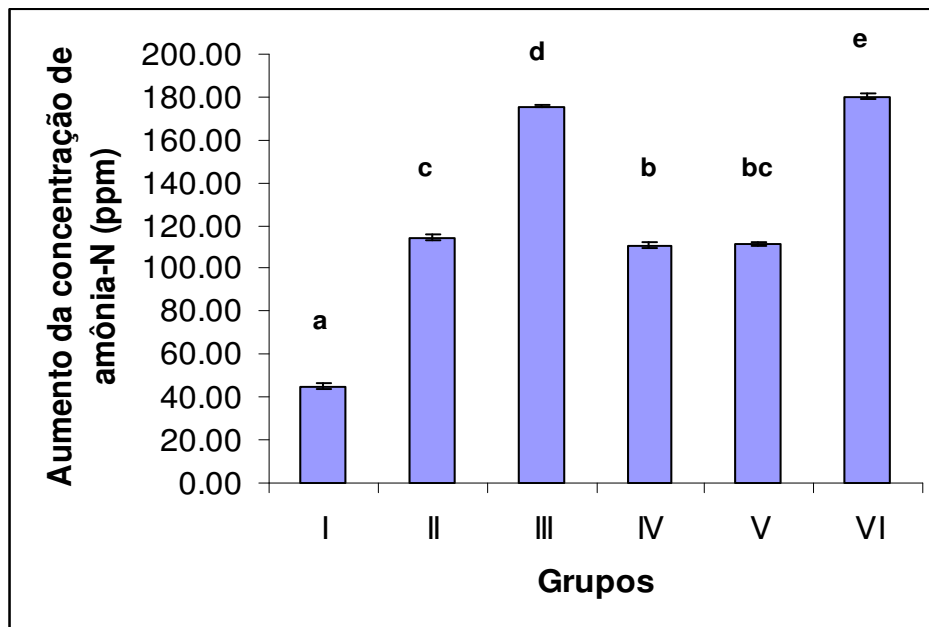


Figura 8. Aumento da concentração de amônia fecal aos 60 dias de período experimental.

Colunas com letras minúsculas iguais não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ )

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

n=10

O estudo de Kim et al. (1998) revela que o ambiente ácido no intestino poderia reduzir a taxa de produção de amônia pelas bactérias intestinais, bem como a concentração de amônia intestinal.

Embora apenas com 3 pontos, foi possível constatar uma alta correlação ( $r > 0,82$ ) entre o pH fecal e o conteúdo de amônia fecal para os grupos que receberam ração formulada à base de carne vermelha (grupos II, III, IV, V e VI). Tal correlação não foi observada nos animais do grupo I ( $r = -0,059$ ), ou seja, mesmo havendo um aumento do conteúdo de amônia fecal, o pH fecal não sofreu grandes variações. Esses resultados permitem afirmar que a presença da carne, como fonte protéica, determina um comportamento distinto em relação à caseína (grupo I). Isso nos permite imaginar que se as

dietas de todos os grupos fossem a base de caseína, os efeitos observados pelos produtos em estudo poderiam ser totalmente diferentes dos observados.

Nas Figuras 9, 10, 11, 12, 13 e 14 estão apresentadas as correlações entre o pH fecal e o conteúdo de amônia fecal, nos tempos 0, 30 e 60 dias, para os diferentes grupos experimentais.

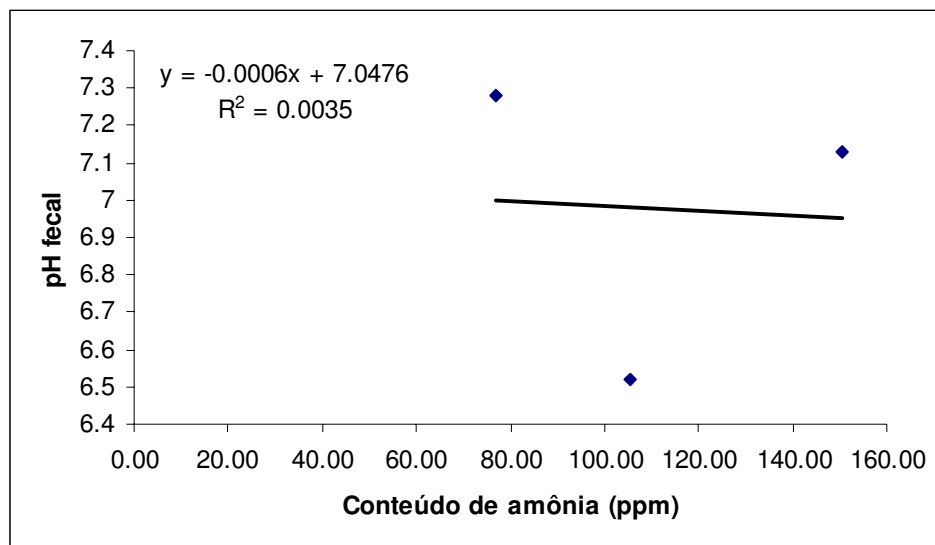


Figura 9. Correlação entre o pH fecal e o conteúdo de amônia fecal dos animais do grupo I (coeficiente de correlação  $r=-0,059$ ).

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1)

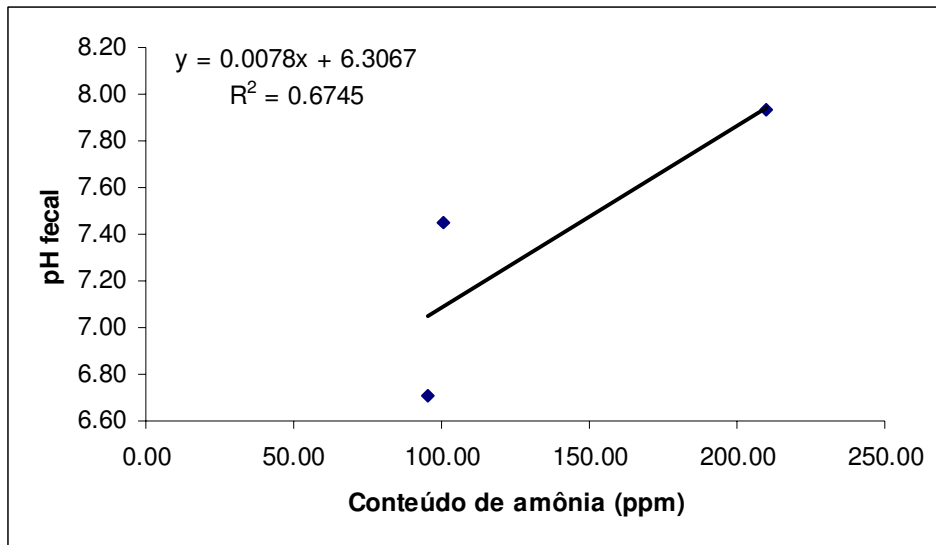


Figura 10. Correlação entre o pH fecal e o conteúdo de amônia fecal dos animais do grupo II (coeficiente de correlação  $r = 0,821$ ).

**Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de produto não fermentado + ração a base de carne

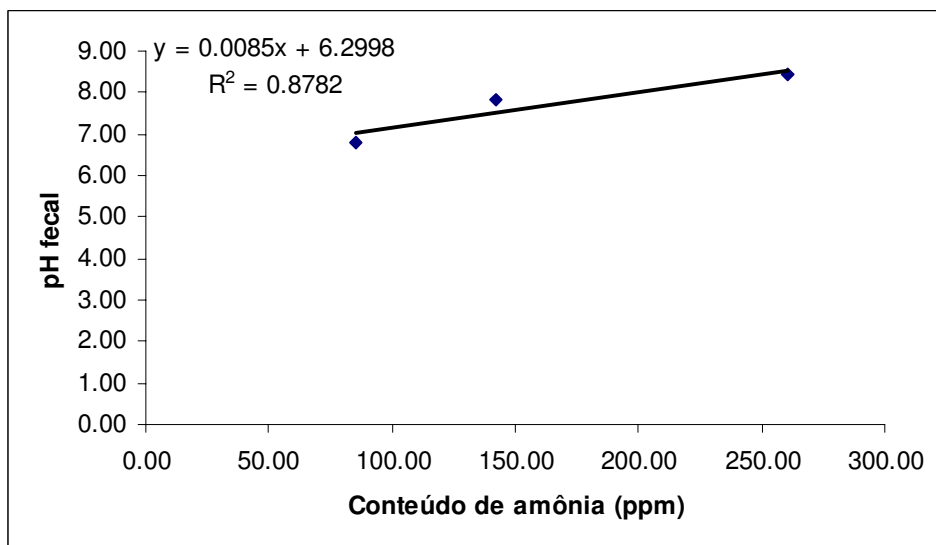


Figura 11. Correlação entre o pH fecal e o conteúdo de amônia fecal dos animais do grupo III (coeficiente de correlação  $r = 0,937$ ).

**Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne

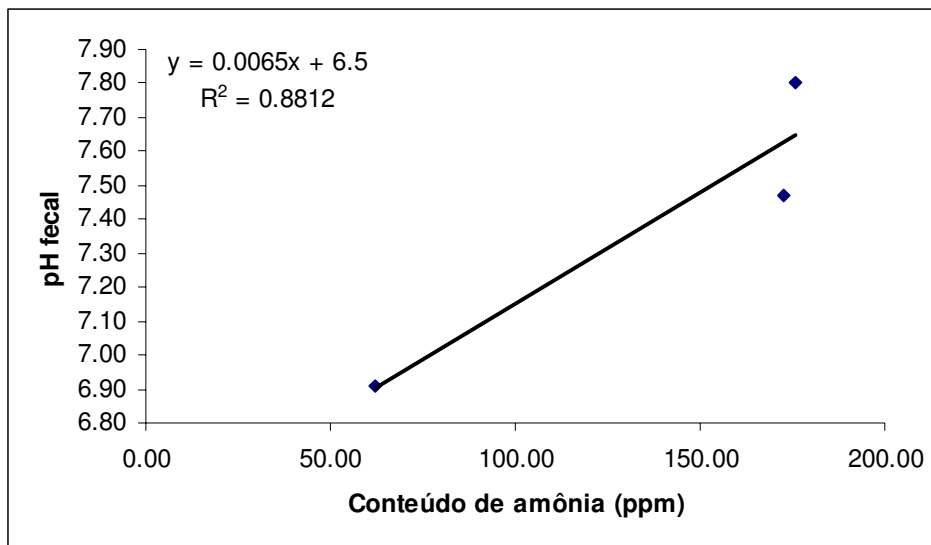


Figura 12. Correlação entre o pH fecal e o conteúdo de amônia fecal dos animais do grupo IV (coeficiente de correlação  $r = 0,939$ ).

**Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2)

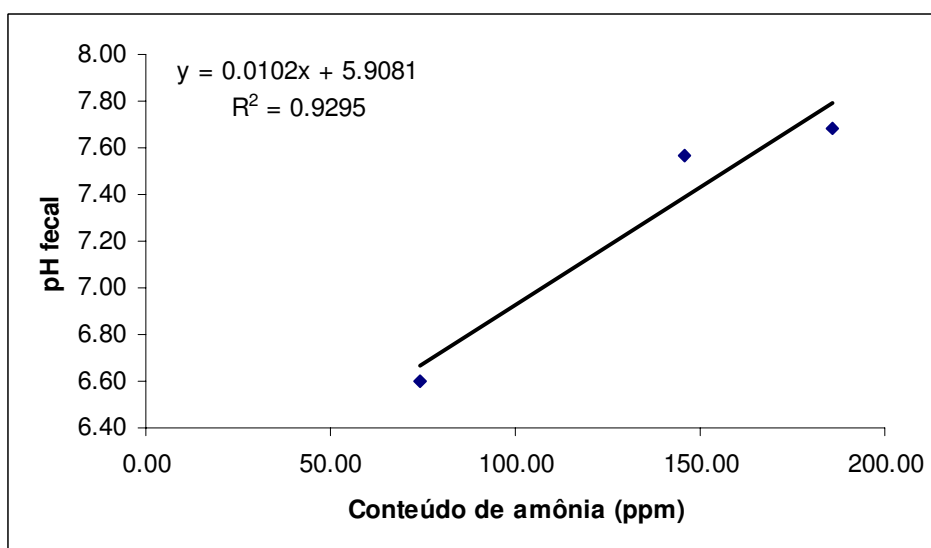


Figura 13. Correlação entre o pH fecal e o conteúdo de amônia fecal dos animais do grupo V (coeficiente de correlação  $r = 0,970$ ).

**Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne



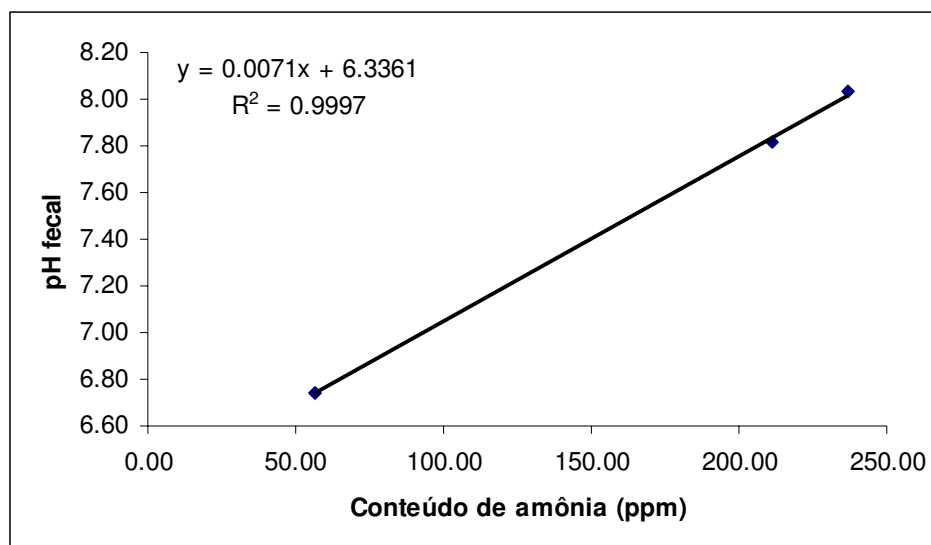


Figura 14. Correlação entre o pH fecal e o conteúdo de amônia fecal dos animais do grupo VI (coeficiente de correlação  $r = 1,000$ ).

**Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

### 5.1.5 Resistência gastrintestinal e capacidade de adesão do *Enterococcus faecium* CRL 183 ao cólon

Como já mencionado anteriormente, a princípio foi planejado fazer a identificação do gênero *Enterococcus* e de suas espécies apenas nas fezes dos animais. Entretanto, tal identificação nos permitiria fazer considerações somente quanto à capacidade, ou não, desse microrganismo sobreviver às condições gastrintestinais. Assim, optamos por fazer, primeiramente, a enumeração e identificação de *Enterococcus* no próprio cólon extraído dos animais, a fim de que pudéssemos verificar também a capacidade de adesão dessa bactéria láctica veiculada pelos produtos em estudo. Também, como já explicado, o sacrifício dos animais foi realizado em momentos distintos, procurando visualizar o decaimento do número de *Enterococcus* aderidos ao cólon após a interrupção da administração dos produtos que os continham, além de verificar possíveis alterações qualitativas e quantitativas na microbiota intestinal em decorrência da presença desse microrganismo.

Portanto, para enumerar *Enterococcus* sp no cólon, os animais foram sacrificados em 3 etapas. A primeira etapa (n=4) foi realizada no t=60 dias, que correspondeu ao último dia de administração dos produtos aos grupos II, III, V e VI. Vale salientar que a administração dos produtos aos animais foi feita durante 30 dias. Na segunda etapa (n=3) o sacrifício ocorreu no t=75 dias, que correspondeu a 15 dias após o término da administração dos produtos aos animais. Na terceira etapa mais 3 animais foram sacrificados no t=90 dias, que correspondeu a 30 dias após o término da administração dos produtos aos animais.

Na Tabela 11 estão apresentados os resultados da população de *Enterococcus* spp. (UFC/g) presentes no cólon dos diferentes grupos experimentais e em 3 tempos distintos: t=60, t=75 e t=90 dias.

Tabela 11. População média de *Enterococcus* spp. no cólon dos animais.

| Grupos | População de <i>Enterococcus</i> sp (UFC/g) |                   |                   |
|--------|---|-------------------|-------------------|
|        | t=60  | t=75              | t=90              |
| I      | $2,4 \times 10^4$                           | $8,9 \times 10^4$ | $1,5 \times 10^5$ |
| II     | $1,2 \times 10^5$                           | $9,7 \times 10^4$ | $8,4 \times 10^3$ |
| III    | $8,4 \times 10^5$                           | $5,0 \times 10^4$ | $5,4 \times 10^4$ |
| IV     | $3,3 \times 10^4$                           | $7,6 \times 10^4$ | $8,3 \times 10^4$ |
| V      | $5,9 \times 10^4$                           | $8,1 \times 10^4$ | $1,8 \times 10^4$ |
| VI     | $1,9 \times 10^5$                           | $4,5 \times 10^5$ | $4,0 \times 10^5$ |

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=4); t=75 (15 dias consumindo apenas as rações formuladas; n=3); t=90 (30 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

Média referente à triplicata de cada determinação

Os resultados apresentados mostram que no t=60 dias, os animais pertencentes aos grupos I, IV e V apresentaram uma população na ordem de  $10^4$  UFC/g, enquanto os animais pertencentes aos grupos II, III e VI apresentaram uma população maior de *Enterococcus* sp, na ordem de  $10^5$  UFC/g.

As maiores populações de *Enterococcus* spp. obtidas no cólon dos animais dos grupos III e VI provavelmente estão relacionadas ao consumo da suspensão de cultivo puro de *E. faecium* pelos animais do grupo III e do “iogurte” de soja fermentado com *E. faecium* pelos animais do grupo VI. Todavia, os animais que receberam o produto não fermentado (grupo II) também apresentaram população de *Enterococcus* spp. na ordem de  $10^5$  UFC/g.

Após 15 dias do término da administração dos produtos em estudo (t=75), pôde-se perceber que os animais dos grupos I, IV e V mantiveram a população de *Enterococcus* spp. na ordem de  $10^4$  UFC/g. Já os animais dos grupos II e III apresentaram uma diminuição na população de *Enterococcus* sp, fato não observado para os animais do grupo VI, os quais mantiveram a população na ordem  $10^5$  UFC/g mesmo após duas semanas sem consumirem o “iogurte” de soja.

Após 30 dias do término da administração dos produtos (t=90 dias), os animais dos grupos IV e V mantiveram a população na ordem de  $10^4$  UFC/g, o que não ocorreu nos animais pertencentes ao grupo I. O grupo I apresentou um aumento de 1 ciclo logarítmico, em virtude de um aumento no número de *E. faecalis* (Tabela 11). Os animais dos grupos III e VI mantiveram a mesma população verificada no t=75 dias. Já os animais do grupo II apresentaram redução na população de *Enterococcus* spp., passando de  $10^4$  UFC/g para  $10^3$  UFC/g.

Vale aqui destacar que em termos de manutenção de *Enterococcus* sp no cólon, o consumo de “iogurte” de soja foi mais eficaz se comparado com o consumo da suspensão do cultivo puro de *E. faecium*, embora ambos os produtos possuíssem a mesma população de células viáveis ( $10^9$  UFC/mL).

Há vários estudos que comprovam os efeitos benéficos do consumo de bactérias lácticas em humanos (Ribic et al; 2005; LeBlanc & Perdigón, 2004; Ling, 1995), mas para tanto é

necessário que essas bactérias permaneçam viáveis no trato gastrintestinal e colonizem o intestino (Mater et al., 2005). Embora sabendo da existência de diferenças entre os vertebrados, os ratos são modelos muito utilizados para verificar os efeitos probióticos dos microrganismos (Montesi et al; 2005; Ribic et al; 2005; LeBlanc & Perdigón, 2004).

Visando um melhor entendimento do comportamento observado, foi feita a identificação das espécies de *Enterococcus* encontradas no cólon dos animais dos distintos grupos de estudo. Para tanto, todas as colônias com morfologias distintas confirmadas como sendo do gênero *Enterococcus* foram submetidas a testes bioquímicos com a galeria do API 20-Strep (Figura 15).



Figura 15. Fotografia da galeria API 20-Strep (Biomeri ux, França) utilizada no processo de identifica o de espécies do *Enterococcus* sp.

Na Tabela 12 estão apresentadas as espécies de *Enterococcus* identificadas através do sistema API 20 Strep. Pode-se notar que no t=60 dias a espécie *E. faecium* foi encontrada nos cólons dos animais dos grupos I, II, III e VI. Todavia, os animais dos grupos I e II apresentaram uma menor popula o de *E. faecium* (na ordem de  $10^2$  UFC/g) se comparado com a popula o obtida nos animais dos grupos III e VI que foi da ordem de  $10^5$  UFC/g. Acredita-se que o *E. faecium*, embora em menor concentra o, já fazia parte da microbiota dos animais dos grupos I e II, mas com o decorrer do tempo a microbiota se modificou e o *E. faecium* desapareceu (75 e 90 dias de experimenta o). Uma possível explica o para esse fen meno pode estar relacionada à idade dos animais. Existem estudos que apontam para uma mudança na microbiota intestinal ao longo do tempo (Saunier e Dore, 2002; Hopkins, 2002). No t=60 dias, 100% das espécies do gênero *Enterococcus* spp. presentes no cólon dos animais dos grupos III e VI eram de *E. faecium*, o que não ocorreu

nos animais dos grupos I e II, uma vez que foram encontradas as espécies *E. faecalis* (grupo I) e *E. avium* (grupo II). Este resultado é bem interessante, pois sugere que o *E. faecium* pode sobreviver às condições do trato gastrointestinal e possivelmente, colonizar o intestino dos ratos que receberam tanto a suspensão de células quanto o “iogurte” de soja. Além disso, pôde-se verificar que os animais dos grupos IV e V não apresentaram *E. faecium* no cólon, sendo 100% das espécies do gênero *Enterococcus* representadas pelo *E. faecalis*, o que era esperado de certa forma. Comparando-se os grupos IV e V, verificou-se que ambos apresentaram uma população de *E. faecalis* na ordem de  $10^4$  UFC/g, portanto o consumo do “iogurte” de soja esterilizado não contribuiu para mudar esse perfil. Bejuk et al. (2000) analisaram 153 cepas de *Enterococcus* isoladas das fezes de humanos e constataram que 90% eram da espécie *E. faecalis*.

Tabela 12. População das colônias (UFC/g) isoladas do cólon dos animais nos diferentes tempos do período experimental.

| Grupos |                    | t=60              |                    | t=75              |                    | t=90              |
|--------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| I      | <i>E. faecium</i>  | $1,2 \times 10^2$ | <i>E. avium</i>    | $1,8 \times 10^3$ | <i>E. avium</i>    | $1,7 \times 10^3$ |
|        | <i>E. faecalis</i> | $2,4 \times 10^4$ | <i>E. faecalis</i> | $9,0 \times 10^4$ | <i>E. faecalis</i> | $1,5 \times 10^5$ |
| II     | <i>E. faecium</i>  | $8,8 \times 10^2$ | <i>E. avium</i>    | $9,6 \times 10^4$ | <i>E. avium</i>    | $8,4 \times 10^3$ |
|        | <i>E. avium</i>    | $1,1 \times 10^5$ |                    |                   |                    |                   |
| III    | <i>E. faecium</i>  | $8,2 \times 10^5$ | <i>E. faecium</i>  | $5,0 \times 10^4$ | <i>E. faecium</i>  | $2,6 \times 10^3$ |
|        |                    |                   |                    |                   | <i>E. faecalis</i> | $5,3 \times 10^4$ |
| IV     | <i>E. faecalis</i> | $3,3 \times 10^4$ | <i>E. faecalis</i> | $8,0 \times 10^4$ | <i>E. faecalis</i> | $8,5 \times 10^4$ |
| V      | <i>E. faecalis</i> | $5,9 \times 10^4$ | <i>E. avium</i>    | $8,2 \times 10^4$ | <i>E. avium</i>    | $1,8 \times 10^4$ |
| VI     | <i>E. faecium</i>  | $1,9 \times 10^5$ | <i>E. faecium</i>  | $4,4 \times 10^5$ | <i>E. faecium</i>  | $4,0 \times 10^5$ |

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=4); t=75 (15 dias consumindo apenas as rações formuladas; n=3); t=90 (30 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

Os resultados microbiológicos, confirmados bioquimicamente (API 20-Strep), demonstraram que os animais que consumiram apenas ração a base de carne vermelha (grupo IV) não apresentaram *E. faecium* no cólon. Já os animais que consumiram o cultivo puro e o “iogurte” de soja apresentaram uma elevada população desse microrganismo. Como no grupo IV (controle 2) não foi encontrado *E. faecium*, pode-se dizer que a presença dessa espécie no cólon dos animais do grupo III e VI foi decorrente da administração do produto fermentado e do cultivo puro. No entanto, vale ressaltar que os animais dos grupos I e II, embora em menor quantidade, também apresentaram *E. faecium*.

De acordo com Jin *et al* (2000), o *E. faecium* ocupa sítios de ligação na mucosa intestinal, os quais permitem a sua aderência. Estes pesquisadores também observaram que o *E. faecium* se adere muito bem na mucosa intestinal de porcos evitando a aderência de *Escherichia coli*.

No t=75 dias (15 dias após o término da administração dos produtos) foi verificado que para os animais do grupo I, a espécie *E. faecium* foi substituída pela espécie *E. avium*, enquanto a *E. faecalis* se manteve. No grupo II, não foi verificada a presença de *E. faecium*, apenas a de *E. avium*. Nos grupos III e VI, 100% da população de *Enterococcus* spp. continuou sendo de *E. faecium*, no entanto para o grupo III essa população sofreu uma diminuição. Nos animais do grupo IV a espécie encontrada continuou sendo a de *E. faecalis*. Já no grupo V, embora tenha havido uma manutenção da população, houve uma mudança de *E. faecalis* para *E. avium*.

Analisando-se o t=90 dias (30 dias após o término da administração dos produtos), pode-se perceber que não houve alteração no tipo de espécies encontradas no cólon, no entanto, no grupo I houve um aumento no número de *E. faecalis* (de  $10^4$  UFC/g para  $10^5$  UFC/g) e, no grupo II uma redução de *E. avium* (de  $10^4$  UFC/g para  $10^3$  UFC/g). Para os animais dos grupos IV e V não foi observada mudança na qualidade e quantidade de microrganismos se comparado com o período anterior (t=75). Para os animais do grupo III foi verificada uma redução do número de *E. faecium* e o aparecimento da espécie *E. faecalis* em população superior à apresentada para o *E. faecium*. Já no grupo VI, mesmo após 30 dias do término da administração do “iogurte” de soja, a população de *E. faecium* se manteve na ordem de  $10^5$  UFC/g.

De uma maneira geral, os animais que receberam *E. faecium*, por meio de uma suspensão do cultivo puro (grupo III) ou por meio do “iogurte” de soja (grupo VI), apresentaram uma maior população desse microrganismo no cólon (t=60 dias). Todavia, o decaimento após 30 dias ocorreu somente no grupo que recebeu o cultivo puro (grupo III).

Na Tabela 13 estão apresentados os resultados da população de *Enterococcus* spp. (UFC/g) presentes nas fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais e em 5 tempos distintos: t=0, t=30, t=60, t=75 e t=90 dias.

Tabela 13. População média de *Enterococcus* spp. nas fezes dos animais.

| Grupos | t=0               | t=30              | t=60              | t=75              | t=90              |
|--------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| I      | $1,5 \times 10^6$ | $4,3 \times 10^5$ | $1,1 \times 10^6$ | $3,8 \times 10^5$ | $5,9 \times 10^7$ |
| II     | $1,2 \times 10^6$ | $1,9 \times 10^7$ | $1,8 \times 10^7$ | $1,3 \times 10^8$ | $1,1 \times 10^7$ |
| III    | $9,2 \times 10^5$ | $2,0 \times 10^7$ | $2,2 \times 10^8$ | $1,3 \times 10^8$ | $1,4 \times 10^7$ |
| IV     | $2,4 \times 10^6$ | $3,0 \times 10^7$ | $1,1 \times 10^7$ | $2,7 \times 10^6$ | $3,5 \times 10^7$ |
| V      | $1,7 \times 10^6$ | $1,1 \times 10^7$ | $1,7 \times 10^7$ | $7,9 \times 10^6$ | $8,8 \times 10^6$ |
| VI     | $1,4 \times 10^6$ | $8,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^8$ | $1,4 \times 10^8$ | $2,1 \times 10^8$ |

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=0 (início, n=10); t=30 (30 dias consumindo rações formuladas, n=10); t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=4); t=75 (15 dias consumindo apenas as rações formuladas; n=3); t=90 (30 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

Pode-se verificar pelos resultados apresentados na tabela 13 que no início do período experimental (t=0) todos os grupos tiveram uma população na ordem de  $10^6$  UFC/g de *Enterococcus* spp., com exceção do grupo III que apresentou uma população na ordem de  $10^5$  UFC/g.

Após 30 dias de consumo de ração formulada (t=30), verifica-se que os animais pertencentes aos grupos que consumiram ração a base de carne bovina (II, III, IV, V e VI) apresentaram população de *Enterococcus* spp. na ordem de  $10^7$  UFC/g, portanto um aumento de 1 ciclo logarítmico. No entanto, os animais que receberam ração formulada a

base de caseína apresentaram uma redução na população desse gênero bacteriano. Esses resultados sugerem que o consumo da ração a base de carne bovina pode ter estimulado o crescimento do gênero *Enterococcus*.

No t=60 dias (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo), os animais pertencentes aos grupos que consumiram a suspensão de cultivo puro de *E. faecium* (grupo III) e o “iogurte” de soja fermentado com *E. faecium* (grupo VI) foram os que apresentaram maior população de *Enterococcus* spp, na ordem de  $10^8$  UFC/g. As maiores populações obtidas nas fezes desses animais pode estar relacionada à administração de produtos contendo microrganismo do gênero *Enterococcus* (*E. faecium*), uma vez que no grupo controle (grupo IV) não foi encontrado *E. faecium*.

Após 15 dias do término da administração dos produtos em estudo (t=75), é possível perceber que os animais dos grupos III e VI mantiveram a população de *Enterococcus* spp. na ordem de  $10^8$  UFC/g. Já os grupos I, IV e V apresentaram queda de 1 ciclo logarítmico, enquanto os animais do grupo II mostraram um aumento na população desse gênero bacteriano de  $10^7$  a  $10^8$  UFC/g. Vale salientar que esse aumento foi devido ao aumento no número de *E. faecalis* (Tabela 14).

Após 30 dias do término da administração dos produtos (t=90), observa-se que os animais dos grupos II e III apresentaram redução de 1 ciclo logarítmico na população de *Enterococcus* spp., enquanto que os grupos V e VI mantiveram a população na ordem de  $10^6$  e  $10^8$  UFC/g, respectivamente.

Assim como ocorreu para o cólon, em termos de manutenção da população de *Enterococcus* spp. nas fezes, o consumo de “iogurte” de soja foi mais eficaz em manter uma população estável se comparado com o consumo da suspensão do cultivo puro de *E. faecium*, embora ambos os produtos possuíssem a mesma população de células viáveis ( $10^9$  UFC/mL).

É importante ressaltar que a população de microrganismos do gênero *Enterococcus* nas fezes apresentou-se superior se comparada com a obtida no cólon dos animais nos períodos t=60, t=75 e t=90. Algumas hipóteses podem ser levantadas para se explicar esses



resultados: 1- As fezes percorrem uma maior extensão do intestino e, desta forma, podem carrear uma maior quantidade de *Enterococcus* spp. se comparado com a população desse gênero aderido ao cólon; 2- Após a retirada, o cólon foi lavado com salina para a remoção das fezes, o que também pode ter acarretado uma redução na quantidade de *Enterococcus* spp. aderido; 3- A homogeneização do cólon pode não ter permitido a retirada total de *Enterococcus* spp., restando ainda microrganismos aderidos ao epitélio do cólon. Vale destacar que as análises foram realizadas na suspensão obtida após a homogeneização.

Na figura 16 estão apresentados os resultados relativos à concentração média de *Enterococcus* spp. (Log UFC/g) nas fezes dos animais dos diferentes grupos em estudo durante 90 dias de período experimental.

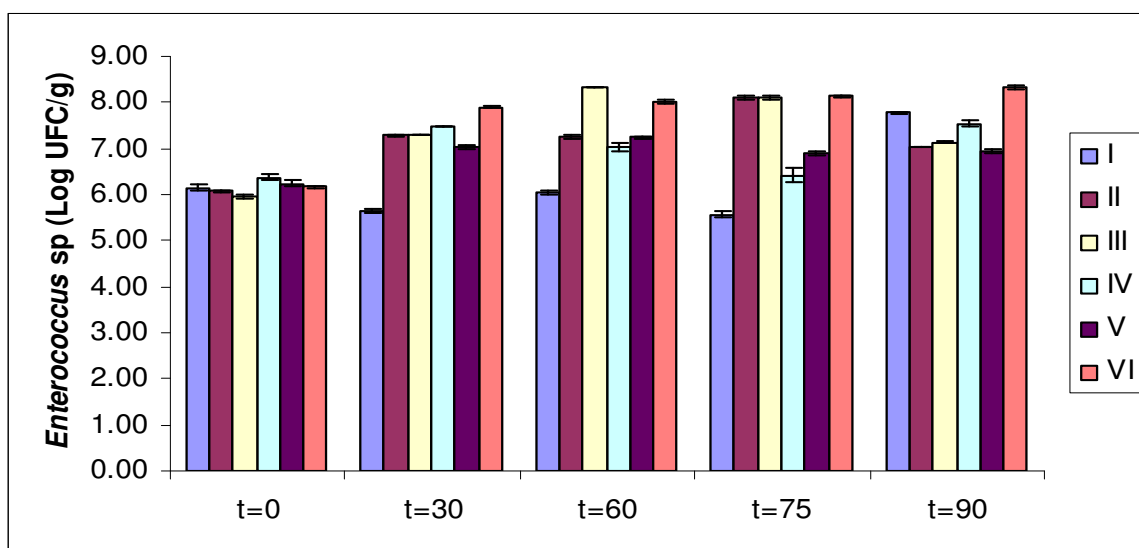


Figura 16. População fecal de *Enterococcus* spp. dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo de 90 dias de estudo

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=0 (início, n=10); t=30 (30 dias consumindo rações formuladas, n=10); t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=4); t=75 (15 dias consumindo apenas as rações formuladas; n=3); t=90 (30 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

Todas as colônias com morfologias distintas confirmadas como sendo do gênero *Enterococcus*, isoladas das fezes dos animais dos diferentes grupos de estudo, foram submetidas a testes bioquímicos com a galeria do API 20 Strep (Figura 14).

Na Tabela 14 são apresentadas as espécies de *Enterococcus* identificadas através do sistema API 20 Strep.

Pode-se notar que no início do período experimental (t=0), 100% das espécies do gênero *Enterococcus* presentes nas fezes dos diferentes grupos experimentais eram de *E. faecalis*.

Após 30 dias de consumo de ração formulada (t=30) houve uma mudança na microbiota das fezes. Os animais que receberam ração a base de carne bovina (II, III, IV, V e VI) apresentaram além da espécie *E. faecalis*, a espécie *E. avium*. Os animais do grupo I continuaram apresentando apenas a *E. faecalis*, no entanto numa contagem menor se comparada com o período anterior.

No t=60 dias nota-se uma mudança na microbiota fecal nos grupos III e VI, mostrando uma substituição da espécie *E. avium* pela espécie *E. faecium*. É provável que essa substituição tenha sido em decorrência da administração da suspensão de cultivo puro de *E. faecium* e de “iogurte” de soja, uma vez que não foi encontrado *E. faecium* nas fezes dos animais do grupo IV (controle 2). Entretanto, os animais que consumiram “iogurte” de soja (grupo VI) apresentaram população de *E. faecium* superior em 1 ciclo logarítmico se comparada com a do grupo que consumiu o cultivo puro (grupo III).

É importante ressaltar que após 15 dias do término da administração dos produtos (t=75), a população de *E. faecium* se manteve na ordem de  $10^6$  UFC/g para o grupo III, enquanto para o grupo VI houve uma redução de  $10^7$  UFC/g para  $10^6$  UFC/g. No entanto, após 30 dias do término da administração dos produtos, não se verificou *E. faecium* nas fezes dos animais dos grupos III e VI. Fato que não ocorreu para o cólon, uma vez que essa espécie foi encontrada mesmo após 30 dias do término da administração dos produtos (t=90 dias). Isso demonstra que no t=90 já não havia mais eliminação de células viáveis de *E. faecium* nas fezes, indicando, provavelmente, uma forte aderência desse microrganismo ao cólon.

Tabela 14. Contagem das colônias (UFC/g) isoladas e identificadas por espécie, a partir das fezes dos animais nos diferentes tempos do período experimental utilizando a galeria API 20 Strep.

| Grupos | T=0                |                   | t=30                                  |  | T=60                                    |  | t=75  |   | t=90                                  |  |
|--------|--------------------|-------------------|---------------------------------------|--|---|--|---|---|---------------------------------------|--|
|        | <i>E. faecalis</i> | $1,5 \times 10^6$ | <i>E. faecalis</i>                    | $4,3 \times 10^5$                      | <i>E. faecalis</i><br><i>E. avium</i>   | $1,1 \times 10^6$<br>$1,6 \times 10^4$ | <i>E. faecalis</i>  | $3,8 \times 10^5$   | <i>E. faecalis</i><br><i>E. avium</i> | $5,9 \times 10^7$<br>$4,5 \times 10^4$ |
| II     | <i>E. faecalis</i> | $1,2 \times 10^6$ | <i>E. faecalis</i><br><i>E. avium</i> | $9,5 \times 10^6$<br>$9,5 \times 10^6$ | <i>E. faecalis</i><br><i>E. avium</i>   | $1,8 \times 10^7$<br>$3,1 \times 10^5$ | <i>E. faecalis</i><br><i>E. avium</i>                         | $1,3 \times 10^8$<br>$4 \times 10^5$                        | <i>E. faecalis</i><br><i>E. avium</i> | $1,1 \times 10^7$<br>$1,1 \times 10^5$ |
| III    | <i>E. faecalis</i> | $9,2 \times 10^5$ | <i>E. faecalis</i><br><i>E. avium</i> | $1,7 \times 10^7$<br>$2,9 \times 10^6$ | <i>E. faecalis</i><br><i>E. faecium</i> | $2,2 \times 10^8$<br>$5,5 \times 10^6$ | <i>E. faecalis</i><br><i>E. faecium</i><br><i>E. avium</i>    | $1,2 \times 10^8$<br>$3,5 \times 10^6$<br>$1,0 \times 10^7$ | <i>E. faecalis</i><br><i>E. avium</i> | $1,4 \times 10^7$<br>$4 \times 10^5$   |
| IV     | <i>E. faecalis</i> | $2,4 \times 10^6$ | <i>E. faecalis</i><br><i>E. avium</i> | $3,0 \times 10^7$<br>$5,5 \times 10^5$ | <i>E. faecalis</i>                      | $1,1 \times 10^7$                      | <i>E. faecalis</i>  | $2,7 \times 10^6$   | <i>E. faecalis</i><br><i>E. avium</i> | $3,4 \times 10^7$<br>$1,3 \times 10^6$ |
| V      | <i>E. faecalis</i> | $1,7 \times 10^6$ | <i>E. faecalis</i><br><i>E. avium</i> | $1,0 \times 10^7$<br>$7,0 \times 10^5$ | <i>E. faecalis</i><br><i>E. avium</i>   | $1,0 \times 10^7$<br>$6,8 \times 10^6$ | <i>E. faecalis</i><br><i>E. avium</i><br><i>E. gallinarum</i> | $5,7 \times 10^6$<br>$2,3 \times 10^6$<br>$5,0 \times 10^4$ | <i>E. faecalis</i><br><i>E. avium</i> | $8,3 \times 10^6$<br>$5,5 \times 10^5$ |
| VI     | <i>E. faecalis</i> | $1,4 \times 10^6$ | <i>E. faecalis</i><br><i>E. avium</i> | $7,9 \times 10^7$<br>$1,4 \times 10^6$ | <i>E. faecalis</i><br><i>E. faecium</i> | $8,4 \times 10^7$<br>$1,6 \times 10^7$ | <i>E. faecalis</i><br><i>E. faecium</i>                       | $1,4 \times 10^8$<br>$2,0 \times 10^6$                      | <i>E. faecalis</i>                    | $2,1 \times 10^8$                      |

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=0 (início, n=10); t=30 (30 dias consumindo rações formuladas, n=10); t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=4); t=75 (15 dias consumindo apenas as rações formuladas; n=3); t=90 (30 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

Para uma melhor visualização, na Figura 17 é apresentado o perfil da população média de *E. faecium* (Log UFC/g) nas fezes dos animais dos grupos III e VI ao longo do período experimental.

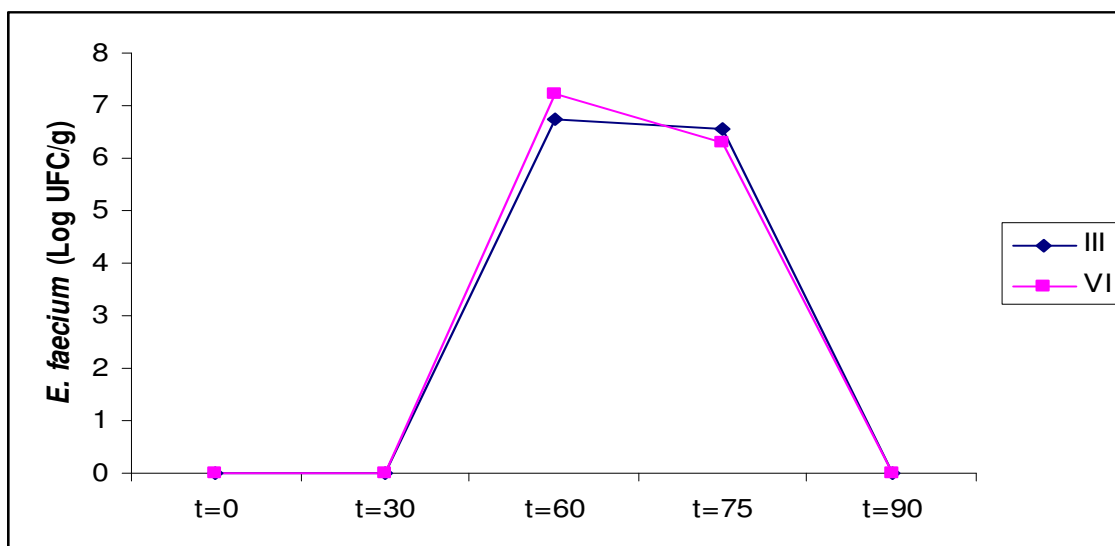


Figura 17. Dinâmica da população de *E. faecium* nas fezes dos animais dos grupos III e VI.

**Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=0 (início, n=10); t=30 (30 dias consumindo rações formuladas, n=10); t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=4); t=75 (15 dias consumindo apenas as rações formuladas; n=3); t=90 (30 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

Sob o ponto de vista funcional e de segurança e para verificar se um microrganismo é probiótico ou não, a determinação da sobrevivência no trato gastrointestinal é essencial. A viabilidade do microrganismo pode ser afetada no instante da exposição ao ácido gástrico ou a sais biliares. Um dos pré-requisitos para aderência do microrganismo no intestino é a sua sobrevivência ao trânsito gastrointestinal (Lund *et al.*, 2002). Para confirmarmos que o *Enterococcus faecium* CRL 183, administrado por meio do cultivo puro e do produto fermentado, realmente sobreviveu às condições do trato gastrointestinal no modelo em estudo, e era o mesmo que aderiu ao cólon e que também foi identificado nas fezes, foi

realizado a PCR tanto das colônias isoladas do cólon quanto das fezes dos animais dos grupos III e VI.

Com relação ao *E. faecium* isolado do cólon dos animais, nas Figuras 18, 19 e 20 estão apresentados os produtos de PCR obtidos por *primers* específicos para a espécie *E. faecium* aos 60, 75 e 90 dias do período experimental.

Conforme já mostrado na tabela 12, as colônias da espécie *E. faecium*, isoladas do cólon dos animais, foram identificadas nos grupos I, II, III e VI, no entanto, quando submetidas a PCR, apenas as colônias isoladas dos grupos III e VI foram confirmadas como sendo da espécie *E. faecium* (Figura 18).

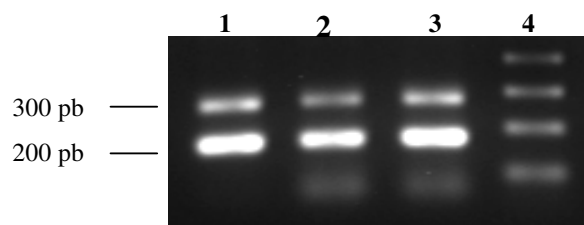


Figura 18. Produtos de PCR em gel de agarose obtidos a partir de colônias isoladas do cólon dos animais aos 60 dias de período experimental. Coluna 1: *E. faecium* do grupo III, Coluna 2: *E. faecium* do grupo VI, Coluna 3: *E. faecium* CRL 183, Coluna 4: padrão 100 pb.

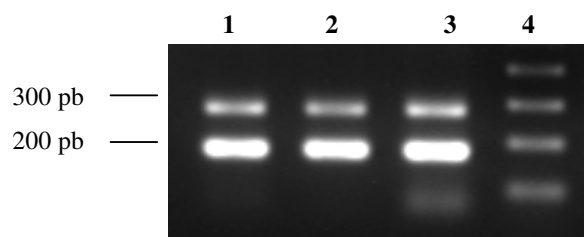


Figura 19. Produtos de PCR em gel de agarose obtidos a partir de colônias isoladas do cólon dos animais aos 75 dias de período experimental. Coluna 1: *E. faecium* do grupo III, Coluna 2: *E. faecium* do grupo VI, Coluna 3: *E. faecium* CRL 183, Coluna 4: padrão 100 pb.

Vale destacar que, aos 75 dias de experimentação, as espécies isoladas dos grupos III e VI também foram confirmadas para a espécie *E. faecium* (Figura 19). No entanto, aos 90 dias de experimentação, não houve confirmação da espécie *E. faecium* para o grupo VI

(Figura 20). Estes resultados confirmam a hipótese inicial de que o *E. faecium* pode sobreviver à passagem do trato gastrointestinal e permanecer no cólon dos animais até 15 dias após o término da administração tanto do cultivo puro quanto do “iogurte” de soja.

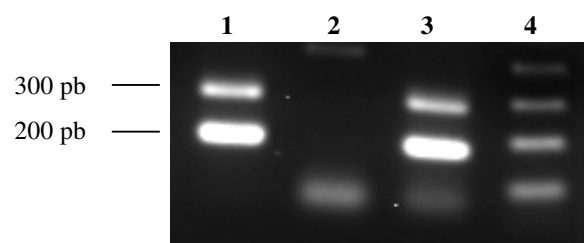


Figura 20. Produtos de PCR em gel de agarose obtidos a partir de colônias isoladas do cólon dos animais aos 90 dias de período experimental. Coluna 1: *E. faecium* do grupo III , Coluna 2: não confirmação do *E. faecium* do grupo VI, Coluna 3: *E. faecium* CRL 183, Coluna 4: padrão 100 pb.

Com relação ao *E. faecium* isolado das fezes dos animais, as Figuras 21 e 22 apresentam os produtos de PCR obtidos aos 60 e 75 dias do período experimental. Pode-se verificar a confirmação dos resultados obtidos na tabela 14, ou seja, as colônias identificadas como *E. faecium* nos grupos III e VI, pelo sistema API 20 Strep, foram confirmadas pela PCR, com exceção do grupo VI aos 75 dias do período experimental.

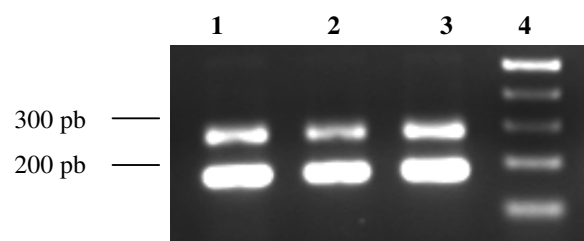


Figura 21. Produtos de PCR em gel de agarose obtidos a partir de colônias isoladas das fezes dos animais aos 60 dias de período experimental. Coluna 1: *E. faecium* do grupo III , Coluna 2: *E. faecium* do grupo VI, Coluna 3: *E. faecium* CRL 183, Coluna 4: padrão 100 pb.

Aos 75 dias do período experimental, constata-se que apenas as colônias identificadas como sendo da espécie *E. faecium* no grupo que consumiu o cultivo puro (grupo III) foram

confirmados pela PCR. Para os animais que receberam o “iogurte” de soja (grupo VI) os resultados foram negativos para presença de *E. faecium* (Figura 22).

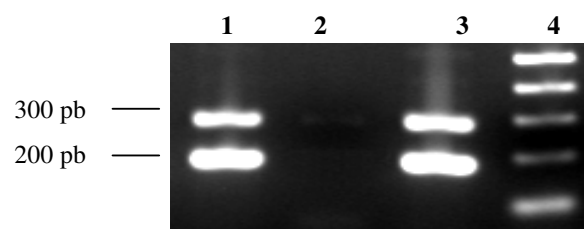


Figura 22. Produtos de PCR em gel de agarose obtidos a partir de colônias isoladas das fezes dos animais aos 75 dias de período experimental. Coluna 1: *E. faecium* do grupo III, Coluna 2: não confirmação do *E. faecium* do grupo VI, Coluna 3: *E. faecium* CRL 183, Coluna 4: padrão 100 pb.

Pelos resultados apresentados, a combinação dos *primers* Ent 1 e Ent 2 gerou dois produtos de amplificação: um fragmento de 200 pb e outro de 300 pb. Uma segunda cepa de *E. faecium* (CRL 39) foi introduzida neste estudo com o objetivo de verificar o padrão de bandas gerado com a mesma combinação de *primers*.

A Figura 23 mostra a detecção de fragmentos de DNA amplificados a partir do DNA genômico de *E. faecium* CRL 39. Observa-se duas bandas com 300 pb e 400 pb. Estes resultados dão um indicativo de que o *E. faecium* isolados do cólon e das fezes refere-se à cepa CRL 183.

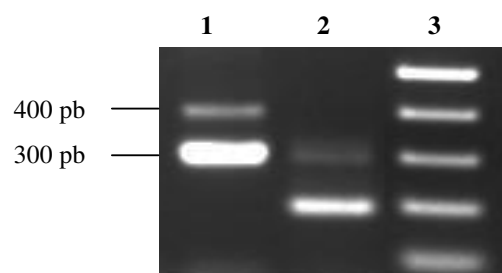


Figura 23. Produtos de PCR em gel de agarose obtidos a partir de cepas de *E. faecium* pelo uso dos *primers* Ent 1 e Ent 2. Coluna 1: *E. faecium* CRL 39, Coluna 2: *E. faecium* CRL 183, Coluna 3: padrão 100 pb.

Fazendo-se um paralelo entre a contagem de *E. faecium* e o conteúdo de amônia fecal, os animais que apresentaram uma maior contagem desse microrganismo (grupos III e VI) no t=60 foram os que apresentaram maior aumento de amônia fecal, sugerindo que, além da ração formulada a base de carne, a presença de *E. faecium* pode ter contribuído para o aumento do conteúdo de amônia nas fezes, ao contrário do que era esperado, considerando que o *E. faecium* é uma bactéria ácido-lática, com características probióticas.

#### 5.1.6 Ação do *Enterococcus faecium* CRL 183 sobre diferentes grupos bacterianos que compõem a microbiota intestinal de ratos

Visando conhecer melhor a relação do *E. faecium* com as enterobactérias, representadas principalmente por *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* sp, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., dentre outras, esse grupo de microrganismos foi isolado e quantificado nas fezes dos animais pertencentes aos distintos grupos de estudo. Os resultados podem ser observados pela Tabela 15 e Figura 24.

Ao se comparar a população média de enterobactérias no início do experimento (t=0) e após 30 dias de consumo de ração formulada (t=30) verifica-se um aumento significativo no número desses microrganismos para todos os grupos. Esse aumento foi mais pronunciado nos grupos que receberam ração formulada a base de carne vermelha (grupos II, III, IV, V e VI) se comparado com o grupo que recebeu ração a base de caseína (grupo I), sugerindo que a ração a base de carne bovina pode apresentar um efeito promotor no crescimento de enterobactérias. É válido mencionar que certas enterobactérias, como alguns tipos de *Escherichia coli*, apresentam um potencial patogênico (Silvi et al., 1999).

Comparando-se o t=60 dias com o t=30, pode-se notar que os animais pertencentes aos grupos III e IV apresentaram uma redução significativa na população de enterobactérias, enquanto no grupo VI foi verificado um aumento, embora pouco pronunciado se comparado com os animais pertencentes aos grupos I, II e V. O consumo da ração a base de caseína, do produto não fermentado, do “iogurte” de soja esterilizado e, em menor grau do “iogurte” de soja, podem ter contribuído para o aumento desses tipos de microrganismos.



Tabela 15. População média de enterobactérias (Log UFC/g) isoladas das fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais.

| Grupos | t=0                     | t=30                    | T=60                     | t=75                      | t=90                      |
|--------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| I      | 4,79±0,06 <sup>aC</sup> | 5,1± 0,05 <sup>bA</sup> | 6,86±0,04 <sup>dA</sup>  | 6,16 ± 0,01 <sup>cA</sup> | 6,16 ± 0,01 <sup>cA</sup> |
| II     | 4,84±0,01 <sup>aC</sup> | 7,69±0,05 <sup>bC</sup> | 8,84±0,18 <sup>dD</sup>  | 7,53±0,07 <sup>bC</sup>   | 7,98±0,01 <sup>cB</sup>   |
| III    | 4,21±0,06 <sup>aB</sup> | 8,99±0,09 <sup>dF</sup> | 8,18±0,02 <sup>cBC</sup> | 7,93±0,02 <sup>bD</sup>   | 7,93±0,02 <sup>bB</sup>   |
| IV     | 4,71±0,04 <sup>aC</sup> | 8,72±0,04 <sup>dE</sup> | 8,10±0,02 <sup>cB</sup>  | 7,50±0,07 <sup>bC</sup>   | 8,23±0,07 <sup>dD</sup>   |
| V      | 3,89±0,11 <sup>aA</sup> | 6,80±0,04 <sup>bB</sup> | 8,36±0,05 <sup>eC</sup>  | 7,11±0,03 <sup>cB</sup>   | 8,10±0,07 <sup>dC</sup>   |
| VI     | 4,00±0,00 <sup>aA</sup> | 7,96±0,06 <sup>bD</sup> | 8,07±0,01 <sup>cB</sup>  | 8,34±0,03 <sup>dE</sup>   | 9,13±0,01 <sup>eE</sup>   |

Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p<0,05)

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p<0,05)

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg (10<sup>9</sup> UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja (10<sup>9</sup> UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=0 (início, n=10); t=30 (30 dias consumindo rações formuladas, n=10); t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=4); t=75 (15 dias consumindo apenas as rações formuladas; n=3); t=90 (30 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

Ao se comparar os diferentes grupos no t=60 dias, constatou-se que os animais que consumiram a ração a base de caseína foram os que apresentaram menor população de enterobactérias se comparados com os animais que receberam ração a base de carne bovina (grupos II, III, IV, V e VI). Nota-se também que os grupos III, IV e VI não diferiram estatisticamente entre si. Em termos de valores médios absolutos, os animais que consumiram o produto não fermentado e o “iogurte” de soja esterilizado foram os que apresentaram as maiores populações de enterobactérias.

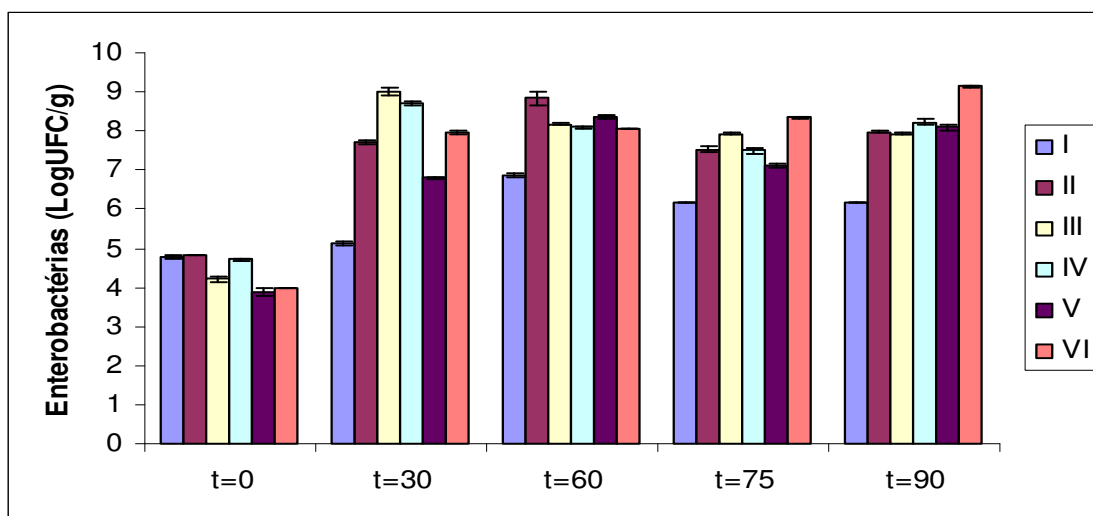


Figura 24. População fecal de enterobactérias dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo de 90 dias de estudo.

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=0 (início, n=10); t=30 (30 dias consumindo rações formuladas, n=10); t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=4); t=75 (15 dias consumindo apenas as rações formuladas; n=3); t=90 (30 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

Após 15 dias do término da administração dos produtos (t=75), houve uma redução significativa no número de enterobactérias para todos os grupos, com exceção do grupo que consumiu “iogurte” de soja.

Após 30 dias do término da administração dos produtos, o aumento das enterobactérias voltou a ocorrer em todos os grupos com exceção dos grupos I e III que apresentaram uma manutenção da população em relação ao período anterior, ressaltando que a maior população continuou sendo para os animais do grupo VI.

Os resultados relativos à população de aeróbios totais nas fezes dos animais dos diferentes grupos de estudo podem ser observados na Tabela 16 e Figura 25.

Tabela 16. Populações médias de aeróbios totais (Log UFC/g) isoladas das fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais.

| Grupos | t=0                      | t=30                    | t=60                    | t=75                    | t=90                    |
|--------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| I      | 7,96±0,05 <sup>cCD</sup> | 6,82±0,04 <sup>aA</sup> | 7,47±0,05 <sup>bA</sup> | 6,81±0,10 <sup>aA</sup> | 9,47±0,05 <sup>dE</sup> |
| II     | 8,00±0,02 <sup>aD</sup>  | 8,25±0,01 <sup>bD</sup> | 8,89±0,08 <sup>cC</sup> | 9,14±0,01 <sup>dD</sup> | 9,29±0,01 <sup>eD</sup> |
| III    | 7,68±0,06 <sup>aA</sup>  | 9,01±0,02 <sup>cF</sup> | 9,22±0,05 <sup>dD</sup> | 9,18±0,01 <sup>dD</sup> | 8,80±0,03 <sup>bB</sup> |
| IV     | 7,86±0,01 <sup>aB</sup>  | 8,87±0,02 <sup>cE</sup> | 8,71±0,05 <sup>bB</sup> | 8,69±0,06 <sup>bC</sup> | 9,04±0,09 <sup>dC</sup> |
| V      | 7,83±0,02 <sup>bB</sup>  | 7,48±0,02 <sup>aB</sup> | 8,72±0,01 <sup>dB</sup> | 8,37±0,03 <sup>cB</sup> | 7,72±0,10 <sup>bA</sup> |
| VI     | 7,89±0,03 <sup>bBC</sup> | 7,61±0,01 <sup>aC</sup> | 8,71±0,02 <sup>cB</sup> | 9,41±0,02 <sup>dE</sup> | 9,94±0,06 <sup>eF</sup> |

Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p<0,05)

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p<0,05)

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg (10<sup>9</sup> UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja (10<sup>9</sup> UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=0 (início, n=10); t=30 (30 dias consumindo rações formuladas, n=10); t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=4); t=75 (15 dias consumindo apenas as rações formuladas; n=3); t=90 (30 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

A partir dos dados apresentados na tabela 16, percebe-se que os animais que consumiram os diferentes produtos (grupos II, III, V e VI) apresentaram aumento na população de aeróbios totais ao se comparar os períodos t=30 e t=60, o que não ocorreu para o grupo IV (controle 2).

Analisando-se o tempo t=60 verifica-se que os grupos IV, V e VI não diferiram estatisticamente entre si. Já o grupo III foi o que apresentou maior população de aeróbios totais, indicando que a suspensão de cultivo puro de *E. faecium* pode ter estimulado o crescimento dessa classe de microrganismos.

Após 30 dias do término da administração dos produtos (t=90) ocorreu um aumento na população de aeróbios totais para os grupos I, II, IV e VI, enquanto os grupos III e V apresentaram uma redução em relação ao t=60.

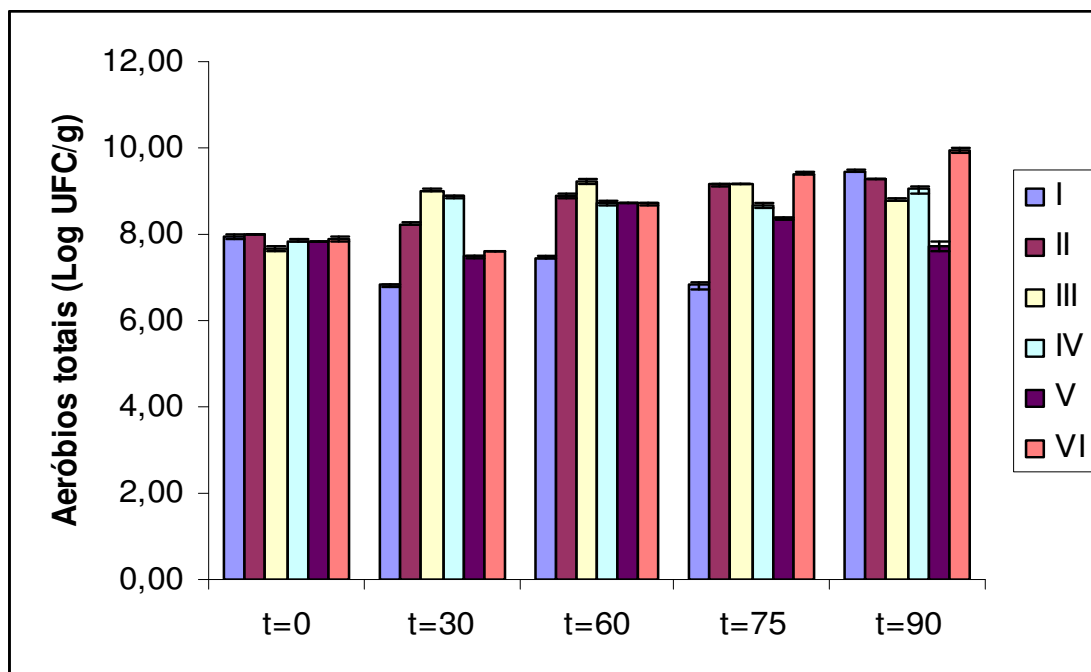


Figura 25. Populações fecais de aeróbios totais dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo de 90 dias de estudo.

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=0 (início, n=10); t=30 (30 dias consumindo rações formuladas, n=10); t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=4); t=75 (15 dias consumindo apenas as rações formuladas; n=3); t=90 (30 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

Os anaeróbios totais constituíram-se em outro grupo de microrganismos pesquisado nas fezes dos animais em estudo. Os resultados podem ser observados na Tabela 17 e pela Figura 26.

Pelos dados apresentados na tabela 17, verifica-se que, com exceção dos grupos I e V, todos os outros grupos apresentaram um aumento significativo na população de anaeróbios totais após 30 dias de consumo de ração formulada a base de carne bovina (t=30).

No t=60 dias, houve uma redução na população de anaeróbios totais para os grupos III e IV e, uma manutenção na população para o grupo VI se comparado com o período anterior (t=30).

Tabela 17. Populações médias de anaeróbios totais (Log UFC/g) isoladas das fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais.

| Grupos | t=0                      | T=30                    | t=60                     | t=75                    | t=90                    |
|--------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| I      | 7,49±0,07 <sup>dCD</sup> | 6,33±0,02 <sup>aA</sup> | 7,34±0,05 <sup>cA</sup>  | 6,81±0,02 <sup>bA</sup> | 6,81±0,02 <sup>bA</sup> |
| II     | 7,58±0,04 <sup>aC</sup>  | 8,04±0,04 <sup>bC</sup> | 8,97±0,04 <sup>eE</sup>  | 8,47±0,03 <sup>dD</sup> | 8,30±0,01 <sup>cC</sup> |
| III    | 7,30±0,11 <sup>aB</sup>  | 9,40±0,02 <sup>eF</sup> | 8,55±0,06 <sup>dC</sup>  | 8,40±0,02 <sup>cD</sup> | 7,72±0,00 <sup>bB</sup> |
| IV     | 7,34±0,05 <sup>aBD</sup> | 8,88±0,02 <sup>eE</sup> | 8,34±0,03 <sup>cB</sup>  | 7,96±0,03 <sup>bC</sup> | 8,76±0,07 <sup>dE</sup> |
| V      | 7,53±0,01 <sup>aC</sup>  | 7,46±0,01 <sup>aB</sup> | 8,79±0,07 <sup>cD</sup>  | 7,53±0,04 <sup>aB</sup> | 8,46±0,01 <sup>bD</sup> |
| VI     | 7,00±0,10 <sup>aA</sup>  | 8,51±0,06 <sup>bD</sup> | 8,47±0,07 <sup>bBC</sup> | 8,87±0,01 <sup>cE</sup> | 9,36±0,01 <sup>dF</sup> |

Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p<0,05)

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p<0,05)

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg (10<sup>9</sup> UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja (10<sup>9</sup> UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=0 (início, n=10); t=30 (30 dias consumindo rações formuladas, n=10); t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=4); t=75 (15 dias consumindo apenas as rações formuladas; n=3); t=90 (30 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

Analisando-se os diferentes grupos no t=60, percebe-se que os animais que consumiram o produto não fermentado (grupo II) e o “iogurte” de soja esterilizado (grupo V) foram os que apresentaram maiores populações de anaeróbios totais. Não houve diferença significativa entre os grupos que consumiram *E. faecium* por meio da suspensão de cultivo puro (grupo III) ou por meio do “iogurte” de soja (grupo VI).

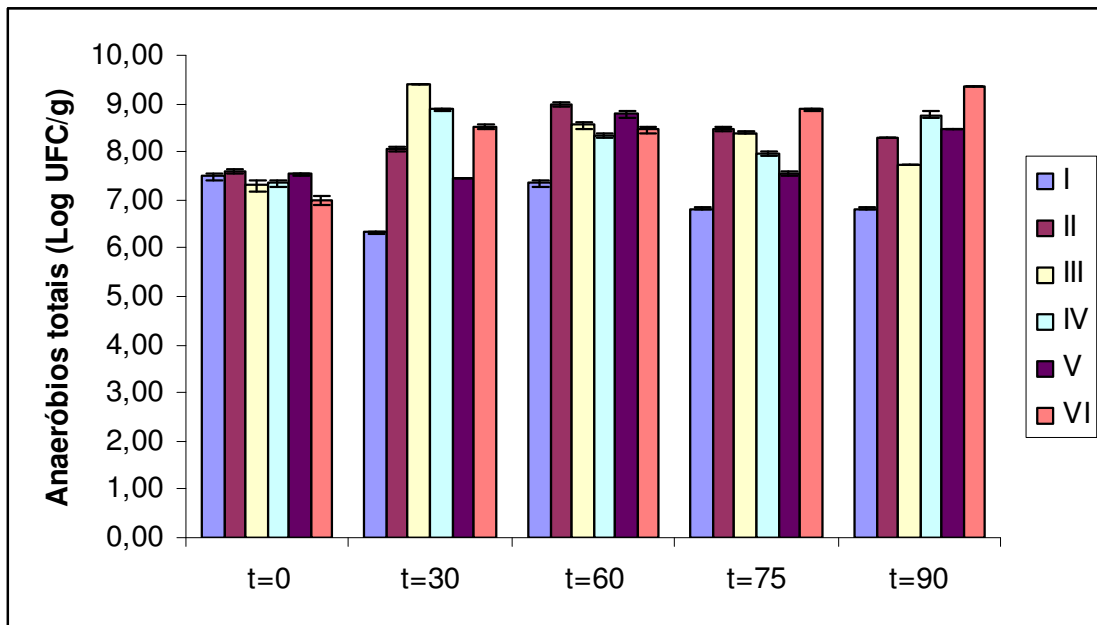


Figura 26. Populações fecais de anaeróbios totais dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo de 90 dias de estudo.

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que recebem somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=0 (início, n=10); t=30 (30 dias consumindo rações formuladas, n=10); t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=4); t=75 (15 dias consumindo apenas as rações formuladas; n=3); t=90 (30 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

Após 15 dias do término da administração dos produtos (t=75) pode-se observar uma redução na população de anaeróbios totais para todos os grupos com exceção do grupo VI e após 30 dias do término da administração dos produtos (t=90) a população volta a subir para os grupos IV, V e VI. Já os animais pertencentes aos grupos II e III apresentaram uma redução no número de anaeróbios totais em relação ao período anterior (t=75).

Um outro gênero pesquisado nas fezes dos animais foi o *Lactobacillus* spp. Os resultados são apresentados na Tabela 18 e também pela Figura 27.

Tabela 18. População média de *Lactobacillus* spp. (Log UFC/g) isoladas das fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais.

| Grupos | t=0                        | t=30                      | t=60                      | t=75                      | t=90 |
|--------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------|
| I      | 7,60 ± 0,02 <sup>CA</sup>  | 6,07 ± 0,03 <sup>AB</sup> | 6,54 ± 0,05 <sup>BB</sup> | 6,80 ± 0,18 <sup>BC</sup> | Nd   |
| II     | 7,70 ± 0,02 <sup>dB</sup>  | 6,11 ± 0,03 <sup>AB</sup> | 6,85 ± 0,03 <sup>CC</sup> | 6,78 ± 0,03 <sup>BC</sup> | Nd   |
| III    | 7,65 ± 0,04 <sup>bAB</sup> | 6,30 ± 0,05 <sup>aC</sup> | 8,13 ± 0,01 <sup>cE</sup> | 7,68 ± 0,03 <sup>bE</sup> | Nd   |
| IV     | 7,69 ± 0,03 <sup>CB</sup>  | 5,85 ± 0,01 <sup>BA</sup> | 5,83 ± 0,02 <sup>BA</sup> | 5,23 ± 0,04 <sup>AA</sup> | Nd   |
| V      | 7,84 ± 0,05 <sup>dC</sup>  | 6,08 ± 0,02 <sup>BB</sup> | 6,56 ± 0,04 <sup>CB</sup> | 5,91 ± 0,03 <sup>AB</sup> | Nd   |
| VI     | 7,69 ± 0,02 <sup>dB</sup>  | 6,71 ± 0,03 <sup>aD</sup> | 7,16 ± 0,04 <sup>cD</sup> | 7,05 ± 0,05 <sup>bD</sup> | Nd   |

Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p<0,05)

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p<0,05)

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg (10<sup>9</sup> UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja (10<sup>9</sup> UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=0 (início, n=10); t=30 (30 dias consumindo rações formuladas, n=10); t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=4); t=75 (15 dias consumindo apenas as rações formuladas; n=3); t=90 (30 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

nd – não determinada

Pelos resultados apresentados na Tabela 18 e pela Figura 27, nota-se que todos os grupos apresentaram uma redução significativa de *Lactobacillus* spp. após a mudança de ração comercial (t=0) para as rações formuladas (t=30). Esses resultados sugerem que tanto a ração formulada a base de caseína quanto à base de carne bovina contribuíram para a redução no número de *Lactobacillus* spp. na microbiota fecal dos animais dos diferentes grupos.

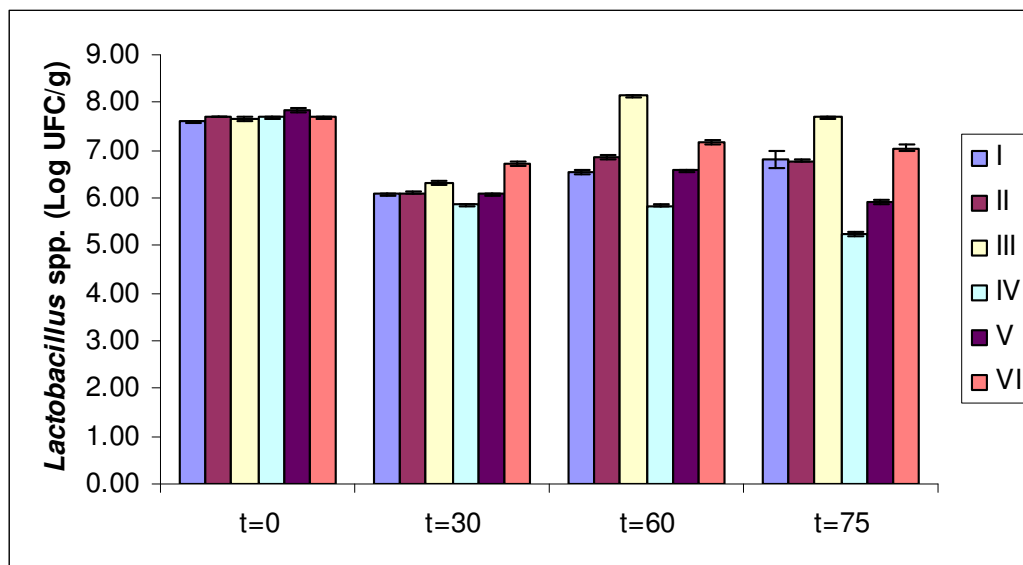


Figura 27. População fecal de *Lactobacillus* spp. dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo de 75 dias de estudo.

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=0 (início, n=10); t=30 (30 dias consumindo rações formuladas, n=10); t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=4); t=75 (15 dias consumindo apenas as rações formuladas; n=3)

Ao se comparar o t=60 e t=30, verifica-se um aumento na população do gênero *Lactobacillus* para todos os grupos experimentais, com exceção do grupo IV (controle 2), indicando que o produto não fermentado, a suspensão de cultivo puro de *E. faecium*, o “iogurte” de soja esterilizado e o “iogurte” de soja contribuíram, em maior ou menor grau, para o aumento fecal de *Lactobacillus* spp. nos diferentes grupos em estudo.

É importante destacar que os animais pertencentes ao grupo que recebeu a suspensão de cultivo puro de *E. faecium* (grupo III) e o grupo que recebeu “iogurte” de soja fermentado com *E. faecium* (grupo VI) foram os que apresentaram as maiores populações de *Lactobacillus* sp no t=60 dias.



As bactérias do gênero *Lactobacillus*, juntamente com as do gênero *Bifidobacterium*, são consideradas benéficas por apresentarem atividades anti-carcinogênicas e imunomoduladoras (Kaur et al., 2002)

Após 15 dias do término da administração dos produtos (t=75), nota-se, em relação ao período anterior, uma redução na população fecal de *Lactobacillus* spp. em todos os grupos com exceção do grupo I, o qual apresentou uma manutenção na população desse gênero.

Embora tenha havido uma redução significativa de *Lactobacillus* spp. nas fezes dos animais dos grupos II, III, IV, V e VI, percebe-se que os grupos que apresentaram as maiores populações continuaram sendo os grupos III e VI, mesmo após 15 dias do término da administração da suspensão de cultivo puro e do “iogurte” de soja (t=75). As populações de *Lactobacillus* spp., e dos demais gêneros no ponto t=90 não foram realizadas por insuficiência de amostra.

Na Tabela 19 e na figura 28 estão apresentados os resultados relativos à população de *Clostridium* spp. nas fezes dos animais em estudo. Trata-se de um gênero importante a ser pesquisado em razão dos prováveis efeitos indesejáveis que podem exercer no meio intestinal.

De acordo com os resultados da Tabela 19, os animais pertencentes aos grupos III e VI apresentaram aumento na população fecal de *Clostridium* spp. após 30 dias de consumo de ração a base de carne bovina, no entanto, nesse mesmo período, os grupos II e V não mostraram mudança significativa na população desse gênero de bactérias, enquanto os grupos I e IV apresentaram redução.

Ao se comparar o t=0 e t=30 dias, constatou-se que alguns grupos apresentaram aumento e, outros, redução da população de *Clostridium*, o que não nos permitiu chegar a conclusões claras quanto à influência das rações formuladas sobre o conteúdo fecal de *Clostridium* sp. No entanto, se analisarmos de maneira pontual os diferentes grupos no t=30, nota-se que os animais que consumiram rações formuladas a base de carne bovina

apresentaram populações significativamente maiores de *Clostridium* se comparadas aos animais pertencentes ao grupo que recebeu ração formulada a base de caseína.

Tabela 19. População média de *Clostridium* spp. (Log UFC/g) isoladas das fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais.

| Grupos | t=0                        | T=30                       | t=60                      | t=75                       | t=90 |
|--------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|------|
| I      | 7,32 ± 0,01 <sup>CA</sup>  | 6,32 ± 0,02 <sup>AA</sup>  | 6,29 ± 0,03 <sup>AB</sup> | 6,42 ± 0,01 <sup>BA</sup>  | Nd   |
| II     | 7,62 ± 0,03 <sup>BC</sup>  | 7,57 ± 0,01 <sup>BB</sup>  | 5,92 ± 0,01 <sup>AA</sup> | 7,61 ± 0,04 <sup>BB</sup>  | Nd   |
| III    | 7,51 ± 0,07 <sup>ABC</sup> | 8,27 ± 0,00 <sup>DC</sup>  | 8,03 ± 0,01 <sup>CE</sup> | 7,89 ± 0,03 <sup>BC</sup>  | Nd   |
| IV     | 7,97 ± 0,00 <sup>DE</sup>  | 7,61 ± 0,01 <sup>BB</sup>  | 7,37 ± 0,03 <sup>AC</sup> | 7,83 ± 0,05 <sup>CC</sup>  | Nd   |
| V      | 7,45 ± 0,07 <sup>AB</sup>  | 7,65 ± 0,11 <sup>abB</sup> | 7,71 ± 0,11 <sup>bd</sup> | 7,62 ± 0,00 <sup>abB</sup> | Nd   |
| VI     | 7,55 ± 0,01 <sup>ABC</sup> | 7,69 ± 0,01 <sup>BB</sup>  | 7,70 ± 0,04 <sup>bd</sup> | 8,23 ± 0,01 <sup>CD</sup>  | Nd   |

Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p<0,05)

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p<0,05)

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne;

**Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg (10<sup>9</sup> UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja (10<sup>9</sup> UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=0 (início, n=10); t=30 (30 dias consumindo rações formuladas, n=10); t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=4); t=75 (15 dias consumindo apenas as rações formuladas; n=3); t=90 (30 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

nd – não determinada

Analisando-se o t=30 e t=60 dias, os animais que consumiram o produto não fermentado (grupo II) e, em menor proporção, os que consumiram a suspensão de cultivo puro de *E. faecium* (grupo III) apresentaram redução na concentração fecal de *Clostridium* spp., o que não ocorreu para os animais que receberam o “iogurte” de soja (grupo VI) e o “iogurte” de soja esterilizado (grupo V), cujas populações mantiveram-se similares nos dois períodos.

Vale aqui destacar que a redução na população desse gênero de bactérias mostrada no grupo III pode não ser exclusivamente em função do consumo do cultivo puro, uma vez que o grupo que recebeu apenas ração a base de carne (grupo IV) também apresentou redução nesse mesmo período. Já no grupo II, a redução foi mais expressiva se comparada

ao grupo III, sugerindo que o consumo do produto não fermentado pode ter desempenhado um maior efeito sobre a redução de *Clostridium* spp.

De acordo com diversos pesquisadores, a redução na população do gênero *Clostridium* parece ser benéfica ao organismo. Bactérias pertencentes a esse gênero podem ser prejudiciais devido a sua atividade metabólica ou caráter patogênico de algumas espécies (Montesi et al., 2005). Além disso, espécies do gênero *Clostridium* e *Bacteroides* podem estar envolvidas em processos inflamatórios de doenças intestinais (Guarner e Malagelada, 2003).

Nesse sentido, Mastromarino et al. (1978) verificaram que as espécies *C. butyricum*, *C. innocuum*, *C. indolis*, *C. paraputrificum*, *C. tertium* e *C. sartagoforme* estão presentes em grande proporção na microbiota fecal de pacientes com câncer de cólon. Esses clostrídios contribuem para a formação de carcinógenos a partir de ácidos biliares (Benno e Mitsuoka, 1992). Além disso, espécies do gênero *Clostridium* podem estar envolvidas na formação de amônia, substância tóxica ao epitélio intestinal.

Após 15 dias do término da administração dos produtos (t=75) pode-se perceber que os grupos II e VI apresentaram aumento na população fecal de *Clostridium* se comparados ao período anterior. Acredita-se que o “iogurte” de soja possa ter ajudado na manutenção da população de *Clostridium* spp, mas com o término da sua administração esse efeito não pôde mais ser verificado. Esse comportamento foi semelhante para o grupo que recebeu o produto não fermentado (grupo II), pois, após o término do consumo, a concentração de clostrídeos fecais volta a subir. No entanto, para o grupo que recebeu o cultivo puro esse comportamento não foi observado, visto que a população média de clostrídeos fecais continuou reduzindo mesmo após o término da sua administração.

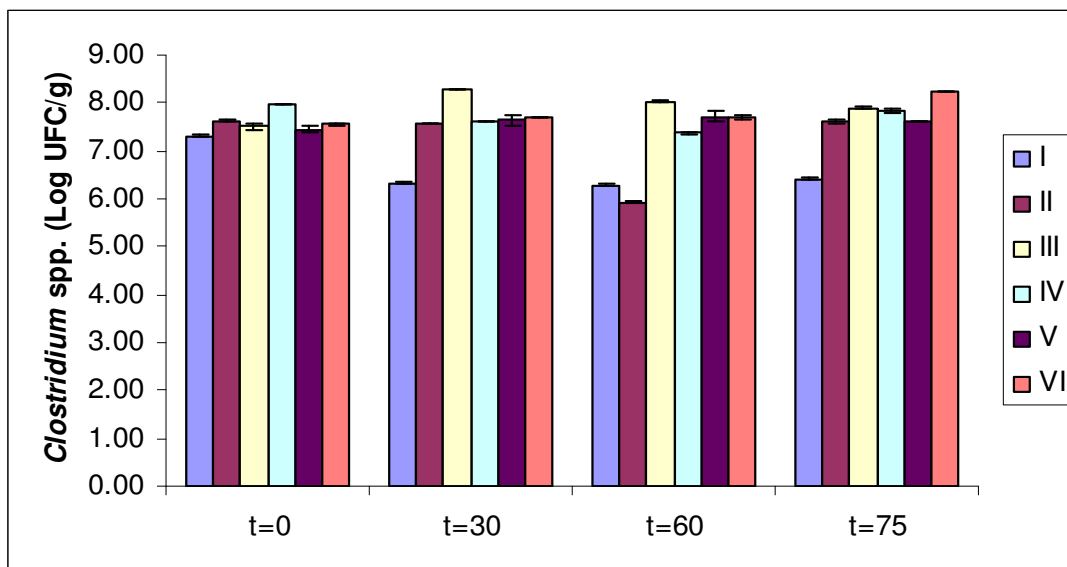


Figura 28. População fecal de *Clostridium* spp. dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo de 75 dias de estudo.

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=0 (início, n=10); t=30 (30 dias consumindo rações formuladas, n=10); t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo, n=4); t=75 (15 dias consumindo apenas as rações formuladas, n=3); t=90 (30 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

Os resultados relativos à população de *Bacteroides* são apresentados na Tabela 20 e na Figura 29.

Ao se comparar a população média de *Bacteroides* spp. no início do experimento (t=0) e após 30 dias de consumo de rações formuladas (t=30), pode-se verificar que os grupos IV, V e VI apresentaram aumento significativo desse gênero. Embora não se tenha verificado diferença estatística entre os períodos t=0 e t=30 para os grupos II e III, observou-se que, em termos de valores médios absolutos, também houve uma tendência de aumento na população fecal desse grupo de bactérias. Já para os animais pertencentes ao grupo I, a mudança da ração comercial para uma ração formulada a base de caseína promoveu, num primeiro momento, a redução da população média desses microrganismos.

Tabela 20. População média de *Bacteroides* spp. (Log UFC/g) isoladas das fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais.

| Grupos | t=0                        | t=30                      | t=60                        | t=75                       | t=90 |
|--------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|------|
| I      | 2,33 ± 0,03 <sup>bB</sup>  | 2,06 ± 0,05 <sup>aA</sup> | 2,51 ± 0,06 <sup>cAB</sup>  | 2,57 ± 0,03 <sup>cA</sup>  | Nd   |
| II     | 2,17 ± 0,06 <sup>aAB</sup> | 2,50 ± 0,05 <sup>aB</sup> | 3,29 ± 0,27 <sup>bC</sup>   | 3,33 ± 0,15 <sup>bB</sup>  | Nd   |
| III    | 2,21 ± 0,21 <sup>aAB</sup> | 2,46 ± 0,05 <sup>aB</sup> | 2,60 ± 0,18 <sup>abAB</sup> | 3,04 ± 0,33 <sup>bAB</sup> | Nd   |
| IV     | 2,42 ± 0,14 <sup>aB</sup>  | 2,81 ± 0,14 <sup>bC</sup> | 2,78 ± 0,08 <sup>bB</sup>   | 2,88 ± 0,03 <sup>bAB</sup> | Nd   |
| V      | 2,03 ± 0,26 <sup>aAB</sup> | 2,47 ± 0,06 <sup>bB</sup> | 2,85 ± 0,05 <sup>cB</sup>   | 2,47 ± 0,11 <sup>bA</sup>  | Nd   |
| VI     | 1,89 ± 0,11 <sup>aA</sup>  | 2,80 ± 0,20 <sup>bC</sup> | 2,34 ± 0,07 <sup>aA</sup>   | 3,28 ± 0,25 <sup>cB</sup>  | Nd   |

Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p<0,05)

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p<0,05)

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg (10<sup>9</sup> UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja (10<sup>9</sup> UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=0 (início, n=10); t=30 (30 dias consumindo rações formuladas, n=10); t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=4); t=75 (15 dias consumindo apenas as rações formuladas; n=3); t=90 (30 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

nd – não determinada

Analisando-se os diferentes grupos no t=30, observa-se que as maiores populações de *Bacteroides* spp são encontradas nos grupos que receberam ração a base de carne bovina em relação ao grupo que recebeu ração a base de caseína, sugerindo que a ração à base de carne bovina pode contribuir para o crescimento de *Bacteroides* spp.

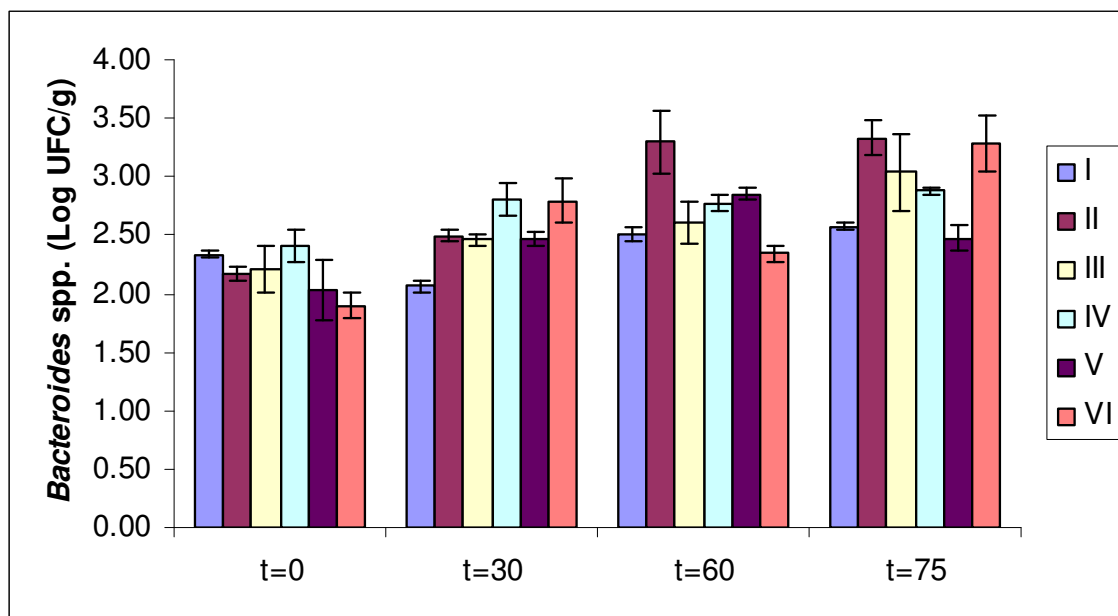


Figura 29. População fecal de *Bacteroides* spp. dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo de 75 dias de estudo.

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=0 (início, n=10); t=30 (30 dias consumindo rações formuladas, n=10); t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=4); t=75 (15 dias consumindo apenas as rações formuladas; n=3); t=90 (30 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

Comparando-se o t=30 com o t=60 dias, verifica-se que apenas os animais do grupo VI apresentaram redução na população média de *Bacteroides*, indício de que o “iogurte” de soja pode ter contribuído para a redução desse gênero de bactérias.

Ao contrário do que ocorreu para o gênero *Clostridium* (Tabela 19), o produto não fermentado contribuiu para o aumento na população fecal de *Bacteroides*.

Ao se analisar os diferentes grupos no t=60 percebe-se que as menores populações de *Bacteroides* spp. são encontradas para os animais que consumiram ração a base de

caseína, a suspensão do cultivo puro de *E. faecium* e o “iogurte” de soja. Todavia, após 15 dias do término da administração desse produto a população de *Bacteroides* voltou a subir.

Estudos mostram que o aumento do consumo da carne vermelha e gordura podem estimular o crescimento de *Bacteroides* sp (Moore e Moore, 1995), sendo que determinadas espécies desse gênero, em função de seu metabolismo, podem liberar carcinógenos ou mutagênicos (Kingston et al., 1990) e, desta forma, podem estar associadas ao aumento de risco de câncer de cólon. Além disso, algumas espécies desse gênero, como por exemplo, *B. fragilis*, estão envolvidas na etiologia da diarreia em animais e humanos (Krzyzanowsky e Avila-Campos, 2003).

Finalmente, um último gênero da microbiota dos animais foi estudado: *Bifidobacterium* sp, cujos resultados encontram-se na Tabela 21 e na Figura 30.

A partir dos resultados apresentados na tabela 21, nota-se que após 30 dias consumindo rações formuladas (t=30), os animais dos diferentes grupos de estudo mostraram redução na população fecal de *Bifidobacterium* spp., sugerindo que o consumo dessas rações pode ter contribuído para a redução da população média desse gênero de bactérias.

Porém ao se comparar t=30 e t=60, verifica-se que os animais que receberam a suspensão do cultivo puro de *E. faecium* (grupo III) apresentaram aumento da população fecal de bifidobactérias. Com relação aos animais que consumiram o produto não fermentado (grupo II) e o “iogurte” de soja (grupo VI), a concentração fecal desse gênero de bactérias não apresentou diferença estatística de um período para o outro. Já para os animais que receberam o “iogurte” de soja esterilizado, a população média de bifidobactérias diminuiu significativamente nesse mesmo período. Esses resultados são um indicativo de que os constituintes dos diferentes produtos à base de soja administrados aos animais não contribuem para o aumento de bifidobactérias.

Tabela 21. População média de *Bifidobacterium* spp. (Log UFC/g) isoladas das fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais.

| Grupos | t=0                        | t=30                       | t=60                      | t=75                        | t=90 |
|--------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|------|
| I      | 6,86 ± 0,14 <sup>CA</sup>  | 6,09 ± 0,07 <sup>bA</sup>  | 5,07 ± 0,03 <sup>aA</sup> | 6,64 ± 0,13 <sup>cBC</sup>  | Nd   |
| II     | 7,13 ± 0,16 <sup>cAB</sup> | 6,11 ± 0,03 <sup>abA</sup> | 5,23 ± 0,07 <sup>aA</sup> | 6,87 ± 0,75 <sup>bcCD</sup> | Nd   |
| III    | 7,27 ± 0,01 <sup>cB</sup>  | 6,72 ± 0,02 <sup>aB</sup>  | 7,04 ± 0,07 <sup>bE</sup> | 7,24 ± 0,04 <sup>cC</sup>   | Nd   |
| IV     | 8,06 ± 0,23 <sup>cC</sup>  | 6,25 ± 0,09 <sup>bA</sup>  | 5,85 ± 0,13 <sup>aC</sup> | 5,81 ± 0,01 <sup>aAB</sup>  | Nd   |
| V      | 7,75 ± 0,09 <sup>cC</sup>  | 6,04 ± 0,07 <sup>bA</sup>  | 5,52 ± 0,02 <sup>aB</sup> | 6,01 ± 0,02 <sup>bBD</sup>  | Nd   |
| VI     | 7,82 ± 0,02 <sup>cC</sup>  | 6,34 ± 0,06 <sup>aC</sup>  | 6,23 ± 0,01 <sup>aD</sup> | 6,98 ± 0,14 <sup>bC</sup>   | Nd   |

Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p<0,05)

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p<0,05)

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg (10<sup>9</sup> UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja (10<sup>9</sup> UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=0 (início, n=10); t=30 (30 dias consumindo rações formuladas, n=10); t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=4); t=75 (15 dias consumindo apenas as rações formuladas; n=3); t=90 (30 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

nd – não determinada

Analisando-se os diferentes grupos no t=60, nota-se que as maiores populações de *Bifidobacterium* spp. são encontradas nos animais que consumiram a suspensão de cultivo puro de *E. faecium* e o “iogurte” de soja, sendo um indício de que a presença do microrganismo pode representar um fator importante para o aumento da população desse gênero de bactérias.

Estudos revelam que o aumento de bifidobactérias intestinais pode representar efeitos benéficos para o hospedeiro, como a produção de ácidos graxos de cadeia curta, redução do pH intestinal, diminuição dos produtos de putrefação, inibição do crescimento de patógenos e imunomodulação (Mitsuoka, 1990). Além disso, a promoção de bifidobactérias pode suprimir microrganismos indesejáveis tais como enterobactérias, que são, em muitos casos, patogênicas (Rubio et al., 1995), embora tal fato não tenha sido observado em nosso estudo.



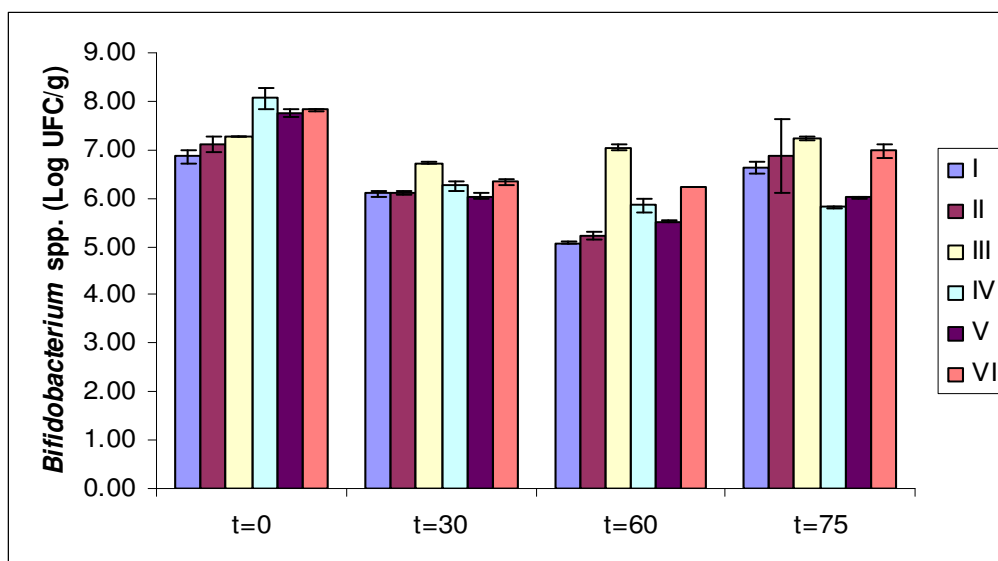


Figura 30. População fecal de *Bifidobacterium* spp. dos animais dos diferentes grupos experimentais ao longo de 75 dias de estudo.

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=0 (início, n=10); t=30 (30 dias consumindo rações formuladas, n=10); t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=4); t=75 (15 dias consumindo apenas as rações formuladas; n=3); t=90 (30 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

Após 15 dias do término da administração dos diferentes produtos (t=75), os animais pertencentes aos grupos II, V e VI apresentaram aumento significativo da população de bifidobactérias, fato que não ocorreu logo após o consumo de tais produtos. Esses resultados sugerem que o consumo desses produtos podem não ter estimulado o crescimento de bifidobactérias. No entanto, o grupo III, mesmo após o término da administração da suspensão de *E. faecium*, continuou mostrando aumento na população média de bifidobactérias. Uma possível explicação para o aumento da concentração fecal de bifidobactérias no t=75 pode estar relacionada ao fato de que mesmo após 15 dias do término da administração do cultivo puro, o *E. faecium* ainda continua presente no cólon e nas fezes dos animais (Tabelas 12 e 14), sugerindo que o microrganismo continua

modulando a microbiota intestinal, no sentido de promover um aumento da população fecal de *Bifidobacterium* spp.

Vale ressaltar que as características intrínsecas de cada animal, bem como a idade, podem ser considerados como fatores de interferência, ou mesmo de interação, nos resultados observados em nosso estudo (Goldin e Gorbach, 1977; Mai e Morris, 2004).

### 5.1.7 Ação do *Enterococcus faecium* CRL 183 sobre a atividade de enzimas fecais

Vários estudos em animais e humanos sugerem que a ingestão de BALs e produtos fermentados de leite diminuem significativamente as atividades de determinadas enzimas fecais que podem estar envolvidas na formação de carcinógenos (Goldin e Gorbach, 1984; Spanhaak et al., 1998).

O sistema API-ZYM permite a determinação semiquantitativa da atividade de 19 enzimas distintas (Figura 31). Três delas podem estar relacionadas com a ocorrência do câncer de cólon:  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -glucuronidase e  $\beta$ -galactosidase (Goldin, 1990; Lidbeck et al., 1992; Saarela et al., 2000). De acordo com vários estudos, essas enzimas podem converter compostos não mutagênicos a compostos mutagênicos (George et al., 2004).

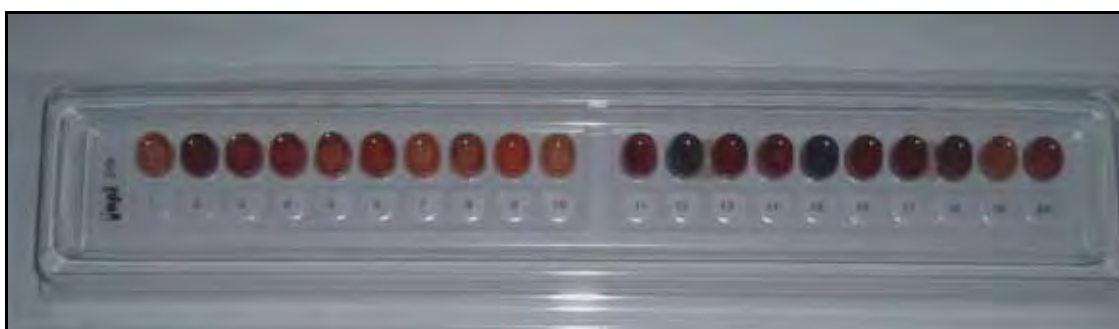


Figura 31. Fotografia da galeria API-ZYM (Biomérieux, França) utilizada na determinação da atividade das enzimas  $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -glucuronidase e  $\beta$ -galactosidase.

As atividades enzimáticas verificadas nas fezes dos animais dos diferentes grupos de estudo estão apresentadas na Figura 32. Pode-se observar que o consumo da suspensão

de cultivo puro de *E. faecium* (grupo III) e do “iogurte” de soja (grupo VI) não exerceram efeito sobre a  $\beta$ -galactosidase fecal, uma vez que a atividade não foi alterada após a ingestão desses produtos.

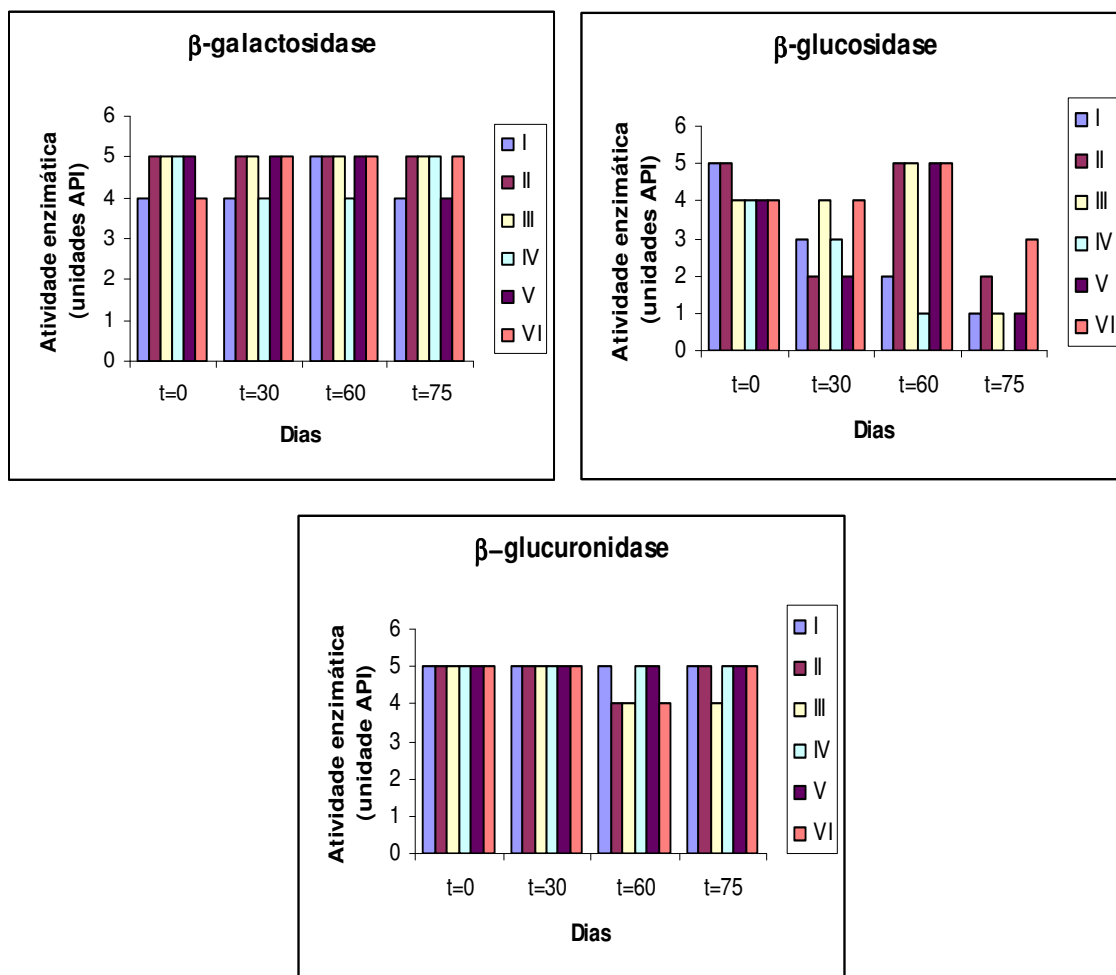


Figura 32. Comparação das atividades enzimáticas das fezes dos diferentes grupos experimentais utilizando o kit API-ZIM.

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg ( $10^9$  UFC/mL)/dia de *E. faecium* através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=0 (início, n=10); t=30 (30 dias consumindo rações formuladas, n=10); t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo, n=4); t=75 (15 dias consumindo apenas as rações formuladas, n=3)

Com relação  $\beta$ -glucosidase, os animais dos grupos I e II apresentaram atividade máxima dessa enzima (valor 5), enquanto os grupos III, IV, V e VI apresentaram valor 4 na escala API-ZYM de atividade enzimática no início do período experimental (t=0).

Após 30 dias do consumo de rações formuladas (t=30) foi verificada uma redução na atividade da  $\beta$ -glucosidase para os grupos I, II, IV e V, enquanto os grupos III e VI mantiveram o mesmo valor do período anterior. Acredita-se que a redução na atividade dessa enzima possa ser decorrente de uma diminuição de seus substratos presentes na ração, uma vez que houve a mudança de ração comercial para ração formulada, no entanto tal diminuição não pôde ser detectada nos grupos III e VI.

No t=60 dias, os animais que receberam o produto não fermentado (grupo II), cultivo puro (grupo III), “iogurte” de soja esterilizado (grupo V) e o “iogurte” de soja (grupo VI) apresentaram um aumento na atividade enzimática da  $\beta$ -glucosidase. Já os grupos controles I e IV continuaram apresentando redução na atividade enzimática.

Após 15 dias do término da administração dos produtos (t=75) pôde-se verificar que todos os grupos apresentaram redução na atividade da  $\beta$ -glucosidase.

Como mencionado anteriormente, a atividade da  $\beta$ -glucosidase pode estar implicada na geração de substâncias carcinogênicas, no entanto alguns pesquisadores relacionam-na com efeitos anticarcinogênicos, uma vez que ela pode estar envolvida na liberação de compostos polifenólicos, por exemplo, as isoflavonas (Messina, 1999). Tais efeitos dependerão da dieta, ou seja, dos substratos disponíveis para enzima  $\beta$ -glucosidase.

Com relação à  $\beta$ -glucuronidase, observa-se que no início do experimento (t=0) a atividade dessa enzima era máxima, resultado que não foi alterado após 30 dias do consumo das rações formuladas tanto a base de caseína, quanto a base de carne vermelha. Entretanto, no t=60 foi verificada uma redução na atividade enzimática nos grupos que receberam o produto não fermentado (grupo II), cultivo puro de *E. faecium* (grupo III) e o “iogurte” de soja (grupo VI). Esses resultados sugerem que tanto os constituintes do produto não fermentado como o microrganismo *E. faecium* podem ter contribuído para a redução da atividade da  $\beta$ -glucuronidase.

Após 15 dias do término da administração dos produtos, pode-se perceber que os animais dos grupos II e VI apresentaram um aumento de 1 ponto na escala API-ZYM para a atividade da  $\beta$ -glucuronidase, enquanto os animais do grupo III mantiveram o mesmo valor do período anterior.

A atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase também foi determinada por método espectrofotométrico e os resultados estão apresentados na tabela 22.

Tabela 22. Atividade enzimática da  $\beta$ -glucuronidase ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) nas fezes dos diferentes grupos de estudo em 4 pontos distintos do período experimental, determinada por método espectrofotométrico.

| Grupos | t=0                             | t=30                             | t=60                           | t=75                             |
|--------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| I      | 9,62 $\pm$ 1,96 <sup>aA</sup>   | 107,54 $\pm$ 23,37 <sup>cB</sup> | 45,67 $\pm$ 5,51 <sup>bB</sup> | 15,8 $\pm$ 2,12 <sup>abAD</sup>  |
| II     | 17,07 $\pm$ 1,59 <sup>aB</sup>  | 42,99 $\pm$ 5,61 <sup>bA</sup>   | 22,81 $\pm$ 2,64 <sup>aA</sup> | 55,05 $\pm$ 11,58 <sup>bBC</sup> |
| III    | 16,09 $\pm$ 1,17 <sup>aB</sup>  | 41,71 $\pm$ 5,16 <sup>bA</sup>   | 36,48 $\pm$ 3,64 <sup>bB</sup> | 7,81 $\pm$ 1,39 <sup>aA</sup>    |
| IV     | 24,14 $\pm$ 2,44 <sup>aC</sup>  | 48,84 $\pm$ 7,39 <sup>bA</sup>   | 41,61 $\pm$ 5,33 <sup>bB</sup> | 34,39 $\pm$ 3,85 <sup>abBD</sup> |
| V      | 19,22 $\pm$ 1,69 <sup>bBC</sup> | 25,36 $\pm$ 3,31 <sup>bA</sup>   | 47,55 $\pm$ 8,83 <sup>cB</sup> | 4,43 $\pm$ 0,47 <sup>aA</sup>    |
| VI     | 18,87 $\pm$ 1,93 <sup>aB</sup>  | 19,56 $\pm$ 0,95 <sup>aA</sup>   | 44,03 $\pm$ 7,97 <sup>bB</sup> | 61,75 $\pm$ 10,71 <sup>cC</sup>  |

Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ )

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ )

**Grupo I:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica foi caseína (controle 1); **Grupo II:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia do produto não fermentado + ração a base de carne; **Grupo III:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de *E. faecium* ( $10^9$  UFC/mL)/através do cultivo puro + ração a base de carne; **Grupo IV:** animais que receberam somente ração cuja fonte protéica era a carne bovina (controle 2); **Grupo V:** animais que receberam 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja esterilizado + ração a base de carne; **Grupo VI:** animais que receberam dose de 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) + ração a base de carne

t=0 (início, n=10); t=30 (30 dias consumindo rações formuladas, n=10); t=60 (30 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=4); t=75 (15 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

Atividade  $\beta$ -glucuronidase foi expressa em microgramas de fenoltaleína liberada por minuto por grama de fezes

Os resultados apresentados na Tabela 22 mostram que após o consumo de rações formuladas (caseína e carne) houve um aumento significativo da atividade da  $\beta$ -

glucuronidase para todos os grupos experimentais, com exceção dos grupos V e VI cujas atividades não se mostraram significativamente superiores se comparadas ao período anterior. Todavia, se analisarmos em termos de valores médios absolutos, os grupos V e VI mostraram um pequeno aumento de atividade enzimática. Quando se analisa os diferentes grupos no t=30, percebe-se que não houve diferença significativa entre os grupos que consumiram ração a base de carne, no entanto os animais que consumiram ração a base de caseína apresentaram atividade enzimática significativamente superior.

De acordo com resultados de Goldin e Gorbach (1976) uma dieta a base de carne eleva a atividade das enzimas  $\beta$ -glucuronidase, nitrorredutase e azorredutase na microbiota de ratos.

Comparando-se o t=30 e t=60, apenas os animais que consumiram o produto não fermentado mostraram redução da atividade da  $\beta$ -glucuronidase, enquanto que os animais que receberam o “iogurte” de soja e o “iogurte” de soja esterilizado apresentaram aumento dessa atividade, já o grupo que recebeu a suspensão de *E. faecium* manteve atividade sem alterações significativas. O menor valor da atividade da  $\beta$ -glucuronidase também pode ser verificado para os animais que consumiram o produto não fermentado quando se compara os diferentes grupos no t=60. Esses resultados sugerem que os constituintes do “iogurte” podem apresentar um efeito mais expressivo na redução da atividade da  $\beta$ -glucuronidase do que a presença do *E. faecium* ou mesmo do processo fermentativo. Verifica-se que após o término do consumo do produto não fermentado a atividade da enzima volta a subir.

A  $\beta$ -glucuronidase é produzida por uma ampla variedade de bactérias intestinais incluindo enterobactérias, bacteróides e clostrídeos. É importante ressaltar que, nas condições de estudo, a cepa CRL 183 não apresentou atividade para  $\beta$ -glucuronidase.

A redução da atividade enzimática observada no grupo que recebeu o produto não fermentado poderia ser explicada pela redução na concentração de *Clostridium* encontrada nesse mesmo grupo de animais (Tabela 18) (Hawksworth et al., 1971; Cole et al., 1985).

Esses resultados diferem daqueles obtidos pelo sistema API ZYM, onde a redução observada para os grupos que consumiram o “iogurte” de soja e a suspensão do cultivo

puro (comparação do t=30 e t=60) não foi confirmada pelo método espectrofotométrico. Uma possível explicação para a discrepância dos resultados pode estar relacionada ao fato de que no sistema API-ZYM utilizou-se para a determinação das atividades enzimáticas o precipitado formado após a centrifugação das fezes em tampão fosfato. Já no método espectrofotométrico, as atividades enzimáticas foram quantificadas no sobrenadante formado após centrifugação (extrato fecal). Em virtude disso, não se pode afirmar que a presença do microrganismo contribuiu para a redução da atividade dessa enzima. Sugere-se, portanto, que o efeito pode estar muito mais relacionado à composição química da mistura básica utilizada para a obtenção do “iogurte” de soja do que com a bactéria em si, ou mesmo com o processo fermentativo.

É importante ressaltar que a padronização das condições para os ensaios biológicos não anula as diferenças fisiológicas individuais dos animais as quais podem ter influenciado de maneira significativa as respostas obtidas.

#### **5.1.8 Caracterização de substâncias antimicrobianas produzidas pelo *Enterococcus faecium* CRL 183**

Foram isoladas 25 colônias morfologicamente distintas a partir das fezes dos animais, pertencentes aos seguintes grupos de bactérias: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacteroides* e enterobactérias (Tabela 23). Todas as bactérias pertencentes a esses grupos tiveram seus crescimentos avaliados frente ao *E. faecium* CRL 183.

Os resultados mostraram que o *E. faecium* CRL 183 não foi capaz de inibir o desenvolvimento das bactérias relatadas na Tabela 23. Tais resultados foram, de certa forma, inesperados, pois o *E. faecium* CRL 183, em estudo anterior (Sivieri et al., 2008), conforme já mencionado, mostrou-se capaz de exercer modulação na microbiota de ratos Wistar e de inibir, de forma significativa, o desenvolvimento de tumores de cólon em animais quimicamente induzidos por dimetilhidrazina. Supunha-se que tal efeito fosse em parte decorrente da capacidade da cepa CRL 183 em produzir substâncias antimicrobianas, o que não foi observado em relação às bactérias testadas. Vale destacar que vários pesquisadores constataram tal capacidade para determinadas cepas do *E. faecium* (Saavedra

et al., 2003; Sarantinopulos et al., 2002). Entretanto, sabe-se que vários fatores interferem na produção dessas substâncias.

Tabela 23. Grupos de bactérias isolados de fezes de ratos e utilizados como microrganismos indicadores em ensaios de inibição.

| Colônias                           | Grupos de bactérias     |
|------------------------------------|-------------------------|
| E1, E2, E3, E4                     | <i>Enterococcus</i> sp  |
| L1, L2, L3                         | <i>Lactobacillus</i> sp |
| C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 | <i>Clostridium</i> sp   |
| B1, B2, B3, B4, B5                 | <i>Bacteroides</i> sp   |
| ENT1, ENT2, ENT3, ENT4             | Enterobactérias         |

*Enterococcus* sp (ágar KF *Streptococcus*, Acumedia); *Lactobacillus* sp (ágar MRS, Merck); *Clostridium* sp (ágar RCM, Difco); *Bacteroides* sp (ágar BBE, Acumedia); Enterobactérias (ágar MacConkey, Acumedia).

A incubação da cepa produtora em anaerobiose foi realizada para tentar prevenir a produção de peróxido de hidrogênio. Além disso, o meio TSAYE não contendo glicose pode inibir a produção de ácido (De Martinis et al., 2001). Todavia, Audisio et al. (2001) verificaram em seu estudo que o *E. faecium* pode se multiplicar tanto em meios sem glicose (LAPT) quanto em meios contendo açúcar. No entanto a produção de bacteriocinas por essa espécie não foi observada em meio sem açúcar. Segundo os autores, haveria uma dependência entre a presença de frutose e sacarose e a concentração de bacteriocina produzida. Desta forma, com relação ao presente estudo o uso do meio TSAYE pode justificar a não produção de substâncias antimicrobianas pelo *E. faecium* CRL 183.

Na Figura 33 são apresentadas placas onde foram realizados os testes de produção de substâncias antimicrobianas, ilustrando os resultados negativos encontrados, isto é, ausência de halos de inibição ao redor dos pontos contendo a cultura de *E. faecium*.



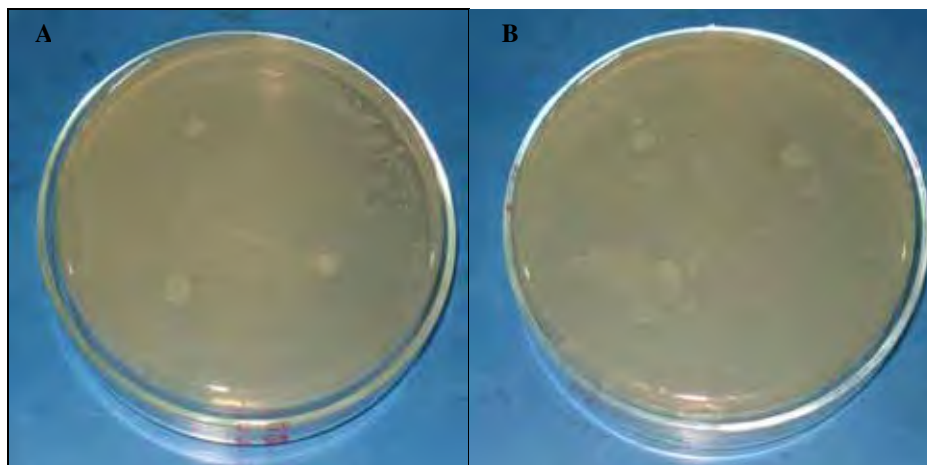


Figura 33. Fotografia de placas preparadas para os ensaios de produção de substâncias antimicrobianas. A) Placa de *E. faecium* CRL 183 versus *Bacteroides* sp. B) Placa de *E. faecium* CRL 183 versus *Clostridium* sp.

De acordo com Sarantinopoulos et al. (2002), a máxima produção de enterocina por *E. faecium* FAIR-E 198 foi obtida no meio MRS contendo 2% de glicose, a 37°C e pH controlado em 6,5. O uso de leite desnatado como meio de crescimento resultou em baixa produção de enterocina. Porém, GIRAFFA et al. (1995) concluíram que o leite é um meio apropriado para o crescimento e produção de enterocina por *E. faecium* 7C5.

Saavedra et al. (2003) testando várias cepas de *E. faecium*, incluindo a CRL 183, verificaram que apenas as cepas CRL 988 e CRL 1385 mostraram atividade inibitória contra *L. innocua* 7 e *L. monocytogenes* Scott e foi verificado também que essas cepas apresentaram o gene para a enterocina A. Entretanto, cepas que também possuíam esse mesmo gene (CRL 397, CRL 210, CRL 485; CRL 47) não apresentaram atividade inibitória frente aos microrganismos indicadores testados. Por outro lado, a cepa CRL 35 apresentou espectro de inibição, embora não tenha apresentado o fragmento correspondente à enterocina A, sugerindo que essa cepa produz um peptídeo antimicrobiano diferente. No entanto, a cepa CRL 183 não apresentou nem o espectro de inibição, nem a seqüência de DNA correspondente ao gene de enterocina A (Saavedra et al. 2003).

Os resultados apresentados nesse trabalho representam um forte indicativo de que a cepa CRL 183 não produz bacteriocinas, porém outros estudos precisam ser realizados

utilizando outros meios de cultura e outros microrganismos indicadores a fim de se ter um melhor embasamento para se confirmar a incapacidade de produção de bacteriocinas por essa cepa.

## 5.2 Estudo clínico

### 5.2.1 Viabilidade do *Enterococcus faecium* CRL 183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416 nos diversos lotes do produto fermentado a base de soja

Os resultados de viabilidade dos microrganismos (cocos e bacilos) nos diferentes lotes de “iogurte” de soja administrados aos voluntários do estudo estão apresentados na Tabela 24.

Tabela 24. Viabilidade dos microrganismos utilizados na fermentação do produto a base de soja em 4 lotes de processamento.

| Semana | "Iogurte" de soja                                 |                              |
|--------|---|------------------------------|
|        | Lotes   |                              |
|        | <i>L. helveticus</i> ssp <i>jugurti</i> * (UFC/g) | <i>E. faecium</i> ** (UFC/g) |
| 1      | 5,2 x 10 <sup>8</sup>                             | 9,0 x 10 <sup>8</sup>        |
| 2      | 1,3 x 10 <sup>9</sup>                             | 8,1 x 10 <sup>8</sup>        |
| 3      | 6,2 x 10 <sup>8</sup>                             | 5,9 x 10 <sup>8</sup>        |
| 4      | 6,0 x 10 <sup>8</sup>                             | 6,1 x 10 <sup>8</sup>        |

\*Ágar MRS (Acumedia, EUA)

\*\*Ágar M17 (Acumedia, EUA)

Pode-se verificar que nos 4 lotes foi obtido uma contagem de cocos na ordem de 10<sup>8</sup> UFC/g. Embora seja uma concentração menor do que aquela obtida nos lotes processados para a administração aos animais, esse número ainda é adequado para que os produtos sejam considerados probióticos (Vinderola e Reinheimer, 2000). Cabe destacar que o produto em estudo (Figura 34) foi fermentado com um inóculo misto de *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* (bacilos) e *Enterococcus faecium* (cocos), sendo que somente este último é considerado probiótico.



Figura 34. Fotografia dos frascos de “Iogurte” de soja e produto não fermentado, em embalagens de 1 litro, distribuídos aos voluntários.

### **5.2.2 Determinação de pH e amônia fecais**

Na Tabela 25 estão apresentados os resultados do pH fecal dos voluntários pertencentes aos diferentes grupos em 3 pontos distintos do estudo:  $t=15$  (15 dias consumindo apenas a dieta habitual);  $t=45$  (30 dias consumindo o “iogurte” de soja ou o produto não fermentado) e  $t=60$  (15 dias após o término do consumo do “iogurte” de soja ou do produto não fermentado). O pH das fezes foi verificado ao final de cada período experimental.

Pelos resultados apresentados na tabela 25, nem o consumo de “iogurte” de soja, nem o do produto não fermentado foram capazes de alterar o pH fecal dos indivíduos ao longo dos períodos estudados. No entanto, em termos de valores médios absolutos, os indivíduos que consumiram o produto não fermentado apresentaram valor de pH fecal menor após o consumo desse produto se comparado ao pH no início do período experimental. Vale ressaltar que essa tendência não foi observada para os voluntários que consumiram o produto fermentado.

Esses resultados diferem daqueles obtidos com animais, uma vez que tanto os ratos que receberam o produto fermentado quanto os que receberam o produto não fermentado apresentaram um aumento significativo de pH fecal. Além de se tratar de modelos experimentais diferentes, é importante destacar que os voluntários não modificaram sua

dieta habitual durante o período experimental. Esses fatores podem ter contribuído para essa diferença de resultados.

Tabela 25. Valores de pH fecal de voluntários em diferentes tempos de estudo.

| Grupos | pH fecal                  |                           |                           |
|--------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|        | t=15                      | t=45                      | t=60                      |
| F      | 6,74 ± 0,64 <sup>aA</sup> | 7,03 ± 0,36 <sup>aA</sup> | 6,89 ± 0,76 <sup>aA</sup> |
| P      | 7,15 ± 0,31 <sup>aB</sup> | 6,69 ± 0,60 <sup>aA</sup> | 6,90 ± 0,59 <sup>aA</sup> |

Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p<0,05)

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p<0,05)

**F:** indivíduos que consumiram 100 mL/dia de “iogurte” de soja (10<sup>8</sup> UFC de *E. faecium* /mL de produto) (n=20); **P:** indivíduos que consumiram 100 mL/dia do produto não fermentado (n=20).

t=15 (15 dias consumindo apenas a dieta habitual); t=45 (30 dias consumindo “iogurte” de soja ou produto não fermentado); t=60 (15 dias após o término do consumo dos produtos em estudo).

Bouhnik et al. (1996) investigando o efeito do consumo de leite fermentado com bifidobactérias em humanos também não verificaram mudanças significativas ao longo de três períodos estudados (início, ingestão e pós-ingestão). Fato semelhante foi observado por Spanhaak et al. (1998) em indivíduos que consumiram durante 4 semanas leite fermentado por *Lactobacillus casei* Shirota. Por outro lado, Venturi et al. (1999) verificaram redução do pH fecal em pacientes com colite ulcerativa a partir do vigésimo dia de consumo de uma mistura de probióticos (3 cepas de bifidobactérias, 4 cepas de lactobacilos e 1 cepa de estreptococos). De acordo com Florent et al. (1985) o pH fecal não é necessariamente um bom indicador para fermentação e acidez no cólon.

A tabela 26 apresenta os resultados do conteúdo de amônia fecal dos indivíduos pertencentes aos dois grupos experimentais em 3 pontos distintos do estudo. O conteúdo de amônia das fezes foi verificado ao final de cada período.

Tabela 26. Conteúdo de amônia fecal (ppm) em voluntários.

| Grupos   | Conteúdo de amônia (ppm)     |                            |                             |
|----------|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
|          | t=15                         | t=45                       | t=60                        |
| <b>F</b> | 46,30 ± 12,33 <sup>aA</sup>  | 41,57 ± 8,66 <sup>aB</sup> | 48,21 ± 9,40 <sup>aA</sup>  |
| <b>P</b> | 42,49 ± 10,58 <sup>abA</sup> | 32,52 ± 9,95 <sup>aA</sup> | 44,44 ± 13,34 <sup>bA</sup> |

Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si (p<0,05)

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si (p<0,05)

**F:** indivíduos que consumiram 100 mL/dia de “iogurte” de soja (10<sup>8</sup> UFC de *E. faecium* /mL de produto) (n=20); **P:** indivíduos que consumiram 100 mL/dia do produto não fermentado (n=20).

t=15 (15 dias consumindo apenas a dieta habitual); t=45 (30 dias consumindo “iogurte” de soja ou produto não fermentado); t=60 (15 dias após o término do consumo dos produtos em estudo).

Com relação aos indivíduos que consumiram o “iogurte” de soja pode-se verificar que não houve diferença significativa no conteúdo de amônia fecal para os 3 períodos analisados. Em termos de tendência, observa-se uma redução na concentração de amônia logo após o consumo do produto fermentado. Entretanto, o valor da concentração de amônia aumenta após o término da administração do produto. Esse comportamento também pode ser observado para os voluntários que consumiram o produto não fermentado, no entanto, em termos de valores médios absolutos, a redução no conteúdo de amônia foi maior após o consumo desse produto (redução de aproximadamente 10 ppm) se comparado com o consumo do produto fermentado (redução de aproximadamente 5 ppm). Após o término do consumo do produto não fermentado, o conteúdo de amônia foi estatisticamente superior se comparado com o valor alcançado no t=45.

Assim como ocorreu para o pH fecal, os resultados do conteúdo de amônia fecal também diferem daqueles obtidos com animais. Novamente aqui, diferenças no modelo experimental e na dieta podem explicar os resultados.

Com base nos resultados do estudo com animais, pôde-se verificar que o grupo que consumiu o produto não fermentado mostrou redução significativa de bactérias do gênero *Clostridium*, que de acordo com a literatura, estão envolvidas com a produção de amônia no intestino (Wrong e Vince, 1984). Em relação ao estudo com humanos, uma hipótese para a redução, em termos de valores absolutos, do conteúdo de amônia fecal dos indivíduos que consumiram o produto não fermentado também envolveria uma provável diminuição na

população de *Clostridium* sp. Porém, a enumeração de clostrídeos nas fezes humanas não foi realizada.

### **5.2.3 Ensaio enzimáticos**

As atividades da  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucosidase e  $\beta$ -glucuronidase determinadas nas fezes dos voluntários por meio do sistema API-ZYM estão apresentadas na figura 35.

Com relação à  $\beta$ -galactosidase, o consumo tanto do produto não fermentado quanto do “iogurte” de soja não provocaram alterações na atividade dessa enzima. Porém, o consumo do produto não fermentado provocou aumento de 1 unidade na escala API da atividade da enzima  $\beta$ -glucosidase, enquanto que os indivíduos que consumiram o “iogurte” de soja mostraram redução em 1 unidade. Após o término do consumo do “iogurte” de soja nota-se o aumento da atividade dessa enzima.

Em relação à  $\beta$ -glucuronidase, o grupo de indivíduos que recebeu “iogurte” de soja não apresentou alteração na atividade dessa enzima durante todo o período experimental. No entanto, percebe-se que o consumo do produto não fermentado provocou aumento na atividade dessa enzima. Com o término da administração desse produto a atividade volta a cair 1 unidade na escala API.

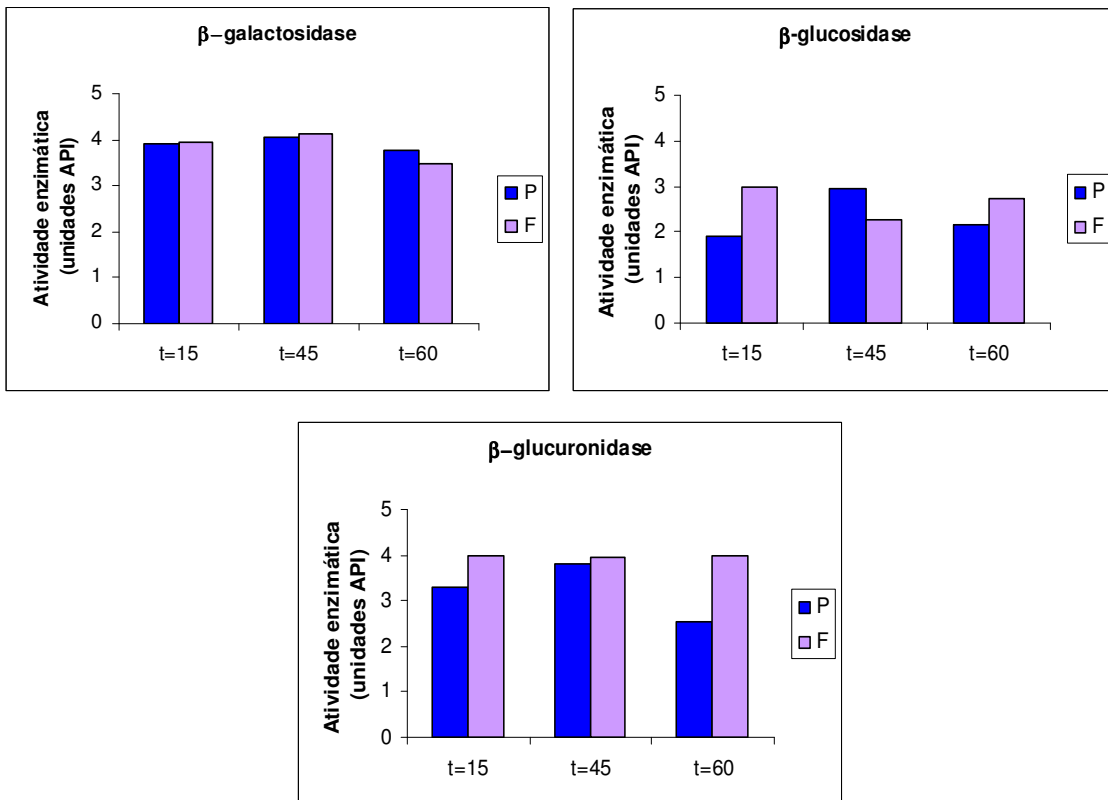


Figura 35. Comparação das atividades enzimáticas das fezes dos diferentes grupos de voluntários utilizando o kit API-ZIM.

**F:** indivíduos que consumiram 100 mL/dia de “iogurte” de soja ( $10^8$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) (n=20); **P:** indivíduos que consumiram 100 mL/dia do produto não fermentado (n=20).

t=15 (15 dias consumindo apenas a dieta habitual); t=45 (30 dias consumindo “iogurte” de soja ou produto não fermentado); t=60 (15 dias após o término do consumo dos produtos em estudo).

Assim como no ensaio com animais, a atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase também foi determinada por método espectrofotométrico e os resultados estão apresentados na tabela 27.

Tabela 27. Atividade enzimática da  $\beta$ -glucuronidase ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) nas fezes dos diferentes grupos de estudo em 3 pontos distintos do período experimental.

| Grupos   | Atividade da $\beta$ -glucuronidase ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) |                                 |                                 |
|----------|---|---------------------------------|---------------------------------|
|          | t=15  | t=45                            | t=60                            |
| <b>F</b> | 52,12 $\pm$ 11,92 <sup>bA</sup>   | 38,01 $\pm$ 11,95 <sup>aA</sup> | 52,59 $\pm$ 8,13 <sup>bA</sup>  |
| <b>P</b> | 51,51 $\pm$ 7,09 <sup>aA</sup>  | 42,39 $\pm$ 15,34 <sup>aA</sup> | 49,00 $\pm$ 15,51 <sup>aA</sup> |

Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ )

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ )

**F:** indivíduos que consumiram 100 mL/dia de “iogurte” de soja ( $10^8$  UFC de *E. faecium* /mL de produto) (n=20); **P:** indivíduos que consumiram 100 mL/dia do produto não fermentado (n=20).

t=15 (15 dias consumindo apenas a dieta habitual); t=45 (30 dias consumindo “iogurte” de soja ou produto não fermentado); t=60 (15 dias após o término do consumo dos produtos em estudo).

Atividade  $\beta$ -glucuronidase ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ):  $\mu\text{g}$  de fenoltaleína produzida por min por g de fezes

A partir dos resultados da Tabela 27, pode-se verificar que não houve diferença significativa entre os grupos no início do período experimental, no entanto, após o consumo do “iogurte” de soja os indivíduos apresentaram uma redução significativa da atividade dessa enzima. Tal efeito não pôde ser evidenciado no grupo que recebeu o produto não fermentado. Embora se verifique, em termos de valores médios absolutos, uma redução na atividade enzimática após o consumo do produto não fermentado (t=45), esse valor não foi estatisticamente diferente daquele encontrado no início do experimento (t=15). Após o término do consumo do “iogurte” de soja a atividade da enzima volta a subir, atingindo valor semelhante ao do início do experimento.

No entanto, quando comparamos os dois grupos em cada tempo, não se verifica diferença estatística entre eles, mas, em termos de valores médios absolutos, os indivíduos que consumiram o “iogurte” de soja apresentaram menor atividade da enzima.

Assim como ocorreu no experimento com animais, os resultados da atividade da  $\beta$ -glucuronidase obtidos pelo sistema API-ZYM no estudo clínico não foram semelhantes àqueles obtidos pelo método espectrofotométrico.



Além disso, os resultados obtidos no ensaio em humanos foram diferentes daqueles apresentados no ensaio com animais, ou seja, para os animais a redução da atividade da  $\beta$ -glucuronidase foi obtida com a administração do produto não fermentado, já para os humanos esse efeito foi verificado com o consumo do “iogurte” de soja.

É importante salientar que, diferentemente do que ocorreu no experimento com ratos, não houve um controle da dieta dos voluntários participantes da pesquisa. Desta forma, além de se tratar de modelos experimentais distintos, os resultados podem ter sido influenciados pela dieta.

### **5.3 Ensaio realizado no Centro de Referência para Lactobacilos (CERELA)**

#### **5.3.1 Determinações enzimáticas (azorredutase e nitrorredutase)**

As enzimas investigadas nesse estudo foram escolhidas por seu papel na produção de metabólitos carcinogênicos a partir de substâncias da dieta ou geradas endogenamente (Goldin e Gorbach, 1977, 1980).

As atividades das enzimas azorredutase e nitrorredutase em fezes de camundongos estão apresentadas nas tabelas 28 e 29, respectivamente.

As bactérias fecais apresentam enzimas que podem ser induzidas ou reprimidas. A habilidade de reduzir compostos azo e nitro pode ser influenciada por uma dieta rica em carne e gordura (Mallet et al., 1983). No entanto, a redução do amaranto e do ácido *p*-nitrobenzóico não foram influenciadas pelo consumo da ração a base de carne, ou seja, o consumo de ração a base de carne não induziu o aumento da atividade da azorredutase e nitrorredutase nas fezes dos animais se comparado com os valores de referência (animais que consumiram ração padrão).

Pelos resultados apresentados na tabela 28, pôde-se notar que apenas os animais que receberam o “iogurte” de soja durante 14 dias ( $T_{14}$ ) apresentaram redução na atividade da azorredutase quando se compara ao valor de referência ( $T_0$ ) e ao  $T_7$ . Esses resultados não

punderam ser evidenciados nem para o grupo que recebeu a suspensão de células, nem para o grupo que consumiu o produto não fermentado.

Tabela 28. Atividade da azorredutase ( $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) no conteúdo cecal de camundongos BALB/c dos diferentes grupos experimentais.

| Grupos | Azorredutase ( $\mu\text{mol}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ ) |                           |                            |                           |
|--------|--|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
|        | T <sub>0</sub>   | T <sub>7</sub>            | T <sub>14</sub>            | T <sub>21</sub>           |
| Basal  | 5,39 ± 0,75 <sup>aA</sup>  | 5,39 ± 0,75 <sup>aA</sup> | 5,39 ± 0,75 <sup>aBC</sup> | 5,39 ± 0,75 <sup>aA</sup> |
| C      | 5,39 ± 0,75 <sup>aA</sup>  | 4,49 ± 0,27 <sup>aA</sup> | 4,37 ± 0,42 <sup>aB</sup>  | 4,71 ± 0,47 <sup>aA</sup> |
| C + I  | 5,39 ± 0,75 <sup>bA</sup>  | 4,37 ± 0,59 <sup>bA</sup> | 2,57 ± 0,35 <sup>aA</sup>  | 4,26 ± 1,55 <sup>bA</sup> |
| C + EF | 5,39 ± 0,75 <sup>aA</sup>  | 4,11 ± 1,52 <sup>aA</sup> | 3,94 ± 0,82 <sup>aAB</sup> | 4,02 ± 0,99 <sup>aA</sup> |
| C + P  | 5,39 ± 0,75 <sup>abA</sup>   | 5,05 ± 0,42 <sup>aA</sup> | 6,35 ± 0,31 <sup>bC</sup>  | 4,79 ± 0,04 <sup>aA</sup> |

Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ )

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ )

**Basal:** ração padrão (valor de referência); **C:** ração a base de carne; **C+I:** ração a base de carne + 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto); **C+EF:** ração a base de carne + 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de *E. faecium* CRL 183 ( $10^9$  UFC/mL) através do cultivo puro; **C+P:** ração a base de carne + 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de produto não fermentado.

T<sub>0</sub> (início, n=3); T<sub>7</sub> (7 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=3); T<sub>14</sub> (14 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=3); T<sub>21</sub> (7 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

Atividade da azorredutase foi expressa em micromoles de *amaranth* transformado por hora por grama de fezes

Ao analisar os diferentes grupos no T<sub>14</sub>, nota-se que, os animais que receberam o “iogurte” de soja apresentaram atividade da azorredutase significativamente menor se comparada aos animais tratados apenas com ração de carne, o que não ocorreu nos grupos que consumiram a suspensão de células e o produto não fermentado. Após o término do consumo do “iogurte” de soja (T<sub>21</sub>), a atividade dessa enzima aumenta atingindo níveis similares aos do grupo basal e ao do grupo que recebeu apenas ração de carne. Esses resultados sugerem que, mais do que a presença do *E. faecium* CRL 183, os metabólitos formados durante o processo fermentativo podem ter contribuído para a redução da atividade da azorredutase.

Os efeitos benéficos dos alimentos funcionais fermentados podem ser exercidos diretamente pela ingestão dos microrganismos vivos (probióticos) ou indiretamente como resultado da ingestão de metabólitos microbianos produzidos durante a fermentação (Vinderola, 2008). Durante esse processo, as bactérias ácido-láticas produzem uma ampla variedade de metabólitos secundários, alguns dos quais têm sido relacionados com propriedades benéficas à saúde. Dentre esses metabólitos estão: vitaminas do complexo B, peptídeos bioativos, ácidos orgânicos, exopolissacarídeos, etc. A presença de peptídeos bioativos em leite fermentado, juntamente com a capacidade da parede celular da bactéria ácido-lática em ativar o sistema imunológico poderia explicar os efeitos benéficos observados em leites fermentados contendo, por exemplo, bactérias não viáveis (Vinderola, 2008; Morata de Ambrosini et al., 1996). Portanto, uma possível explicação para o efeito positivo do “iogurte” de soja, ao contrário da suspensão do cultivo puro de *E. faecium* CRL 183, seria a presença de metabólitos bioativos formados durante o processo fermentativo, os quais seriam capazes de contribuir para a redução da atividade da azorredutase. Vale ressaltar que a fermentação do “iogurte” de soja se dá por uma ação conjunta do *E. faecium* CRL 183 e o *L. helveticus* ssp *jugurti* 416.

Com relação à nitrorredutase, após 14 dias do período experimental, apenas os animais que consumiram o produto fermentado apresentaram redução significativa da atividade dessa enzima (T<sub>14</sub>). Verifica-se também pela tabela 29 que os animais que receberam o “iogurte” de soja são os que possuem a menor atividade enzimática se comparada aos demais grupos no T<sub>14</sub>. Assim como ocorreu com a azorredutase, acredita-se que o efeito de redução da atividade da nitrorredutase possa ser em função da presença de metabólitos formados durante a fermentação do produto, uma vez que nem a suspensão de *E. faecium* CRL 183, nem o produto não fermentado apresentaram efeito positivo.

Estudos têm mostrado que a atividade de enzimas carcinogênicas tais como nitrorredutase e β-glucuronidase apresenta-se diminuída em indivíduos saudáveis que receberam a fração livre de células proveniente do produto fermentado com *Bifidobacterium breve* (Romond et al., 1998). Esta mesma fração foi capaz de modificar benéficamente a microbiota intestinal de camundongos e humanos (Romond et al., 1997; Mullié et al., 2002).

Tabela 29. Atividade da nitrorredutase ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ ) no conteúdo cecal de camundongos BALB/c dos diferentes grupos experimentais

| Grupos | Nitrorredutase ( $\mu\text{mol.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ ) |                            |                           |                            |
|--------|---|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
|        | T <sub>0</sub>  | T <sub>7</sub>             | T <sub>14</sub>           | T <sub>21</sub>            |
| Basal  | 0,77 ± 0,12 <sup>aA</sup>                               | 0,77 ± 0,12 <sup>aA</sup>  | 0,77 ± 0,12 <sup>aB</sup> | 0,77 ± 0,12 <sup>aA</sup>  |
| C      | 0,77 ± 0,12 <sup>aA</sup>                               | 0,72 ± 0,07 <sup>aA</sup>  | 0,75 ± 0,03 <sup>aB</sup> | 0,78 ± 0,05 <sup>aA</sup>  |
| C + I  | 0,77 ± 0,12 <sup>bcA</sup>                              | 1,08 ± 0,19 <sup>cb</sup>  | 0,41 ± 0,15 <sup>aA</sup> | 0,51 ± 0,07 <sup>abA</sup> |
| C + EF | 0,77 ± 0,12 <sup>aA</sup>                               | 1,09 ± 0,09 <sup>aB</sup>  | 1,10 ± 0,08 <sup>aC</sup> | 0,73 ± 0,32 <sup>aA</sup>  |
| C + P  | 0,77 ± 0,12 <sup>aA</sup>                               | 0,82 ± 0,06 <sup>aAB</sup> | 1,10 ± 0,10 <sup>bc</sup> | 0,77 ± 0,07 <sup>aA</sup>  |

Valores com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ )

Valores com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p < 0,05$ )

**Basal:** ração padrão (valor de referência); **C:** ração a base de carne; **C+I:** ração a base de carne + 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de “iogurte” de soja ( $10^9$  UFC de *E. faecium* /mL de produto); **C+EF:** ração a base de carne + 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de *E. faecium* CRL 183 ( $10^9$  UFC/mL) através do cultivo puro; **C+P:** ração a base de carne + 3 mL/kg de peso corpóreo/dia de produto não fermentado.

T<sub>0</sub> (início, n=3); T<sub>7</sub> (7 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=3); T<sub>14</sub> (14 dias consumindo, além das rações formuladas, os produtos em estudo; n=3); T<sub>21</sub> (7 dias consumindo as rações formuladas; n=3)

Atividade da nitrorredutase foi expressa em micromoles de ácido *p*-aminobenzóico liberado por hora por grama de fezes.

É importante destacar que após o término da administração do produto fermentado (T<sub>21</sub>), a atividade da enzima tem uma pequena elevação, mas que não chega a diferir significativamente do período anterior T<sub>14</sub>, dando um indicativo de que, no caso da nitrorredutase, o efeito do “iogurte” de soja pode permanecer mesmo depois de uma semana do término da administração do produto.

Testes enzimáticos realizados com a cepa CRL 183 mostraram que, nas condições estudadas, ela não apresenta atividade para  $\beta$ -glucuronidase, nitrorredutase e azorredutase.

Um outro ponto que deve ser destacado, e que foi mencionado anteriormente, é que o “iogurte” de soja é produzido a partir da fermentação do *E. faecium* CRL 183 juntamente com *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti* 416. A presença dessa cepa de lactobacilos considerada, a princípio, apenas como coadjuvante tecnológico do processo fermentativo, pode ter contribuído para o efeito positivo desse produto sobre redução da atividade dessas enzimas carcinogênicas. Resultados de outro trabalho também desenvolvido em nosso

laboratório (dados não publicados) mostraram que essa cepa apresenta algumas propriedades probióticas, tais como a capacidade de resistir às condições ácidas e básicas do trato gastrointestinal, de aderir ao epitélio de células Caco-2 e impedir a adesão da *E. coli* O157:H7.

### **5.3.2 Pesquisa de fatores de virulência no *E. faecium* CRL 183**

Os fatores de virulência são representados por qualquer componente do microrganismo que aumente sua capacidade em causar ou potencializar a doença. Desta forma, mesmo uma substância que não seja tóxica ao hospedeiro pode ser considerada um fator de virulência se, em sua ausência, o microrganismo se tornar menos capaz de provocar a doença. Os genes e produtos de genes relacionados ao crescimento normal do microrganismo estão excluídos dessa definição (Schaechter et al., 1999).

De acordo com resultados obtidos por Saavedra et al. (2003), o *E. faecium* CRL 183 é uma bactéria ácido-lática que apresenta ausência do fator de virulência *efaAfm* e, portanto, considerada segura para ser utilizada como cultura *starter* na produção de queijos.

A Figura 36 ilustra resultados de pesquisa de genes de virulência em *E. faecium* CRL 183, obtidos por PCR.

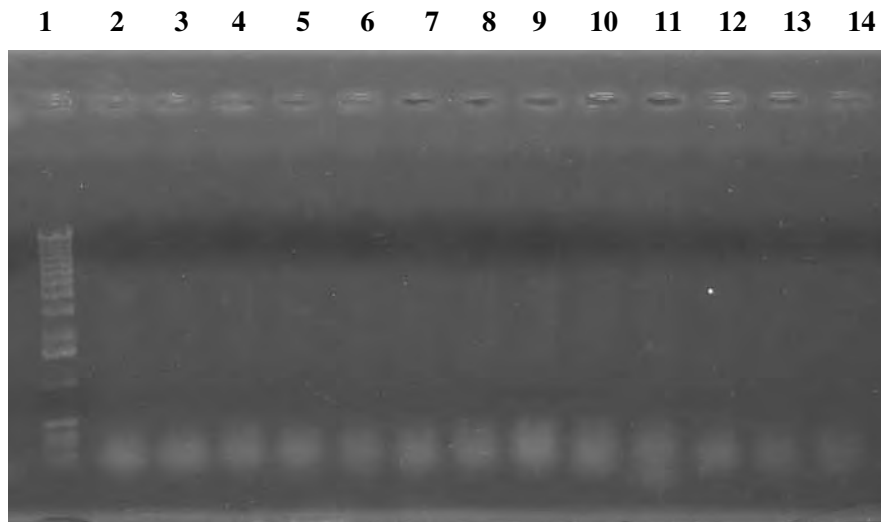


Figura 36. Ausência de produtos de PCR obtidos de *E. faecium* CRL 183 utilizando primers para diferentes fatores de virulência. (1) padrão 1 kb; (2) *hyl*; (3) *esp*; (4) *efaAfs*; (5) *efaAfm*; (6) *cob*; (7) *cpd*; (8) *gel*; (9) *asa*; (10) *ccf*; (11) *cyt*; (12) *vanA*; (13) *vanB*; (14) *vanC*.

Não houve a detecção de produtos da PCR a partir do uso de diferentes *primers* para genes de virulência. Com respeito aos fatores de virulência, a FAO/WHO (2002) recomenda, como um critério de segurança importante para os probióticos, a ausência de tais fatores. Além disso, a ausência de gene de resistência a antibióticos também é um fator de extrema importância na escolha de um probiótico.

## 6 CONCLUSÕES

Nas condições de estudo pode-se afirmar que:

- O “iogurte” de soja e o cultivo puro provocaram um aumento tanto na população do gênero *Enterococcus* quanto na espécie *E. faecium* no cólon e nas fezes dos animais, indicando que esse microrganismo foi capaz de sobreviver às condições do trato gastrointestinal e aderir à mucosa intestinal. Tais resultados foram confirmados por meio de PCR;
- O “iogurte” de soja permitiu a manutenção da população de *E. faecium* no cólon dos animais mesmo após 15 dias do término da administração desse produto;
- O “iogurte” de soja e o cultivo puro de *E. faecium* não foram capazes de provocar redução na população fecal de enterobactérias e *Clostridium* spp., embora tenham propiciado um aumento na concentração de *Lactobacillus* spp.;
- O cultivo puro de *E. faecium* permitiu uma redução na população fecal de anaeróbios totais;
- O “iogurte” de soja contribuiu para a redução da população fecal de *Bacteroides* spp.;
- O “iogurte” de soja e o cultivo puro de *E. faecium* não foram capazes de provocar a acidificação das fezes dos animais, nem mesmo a redução no conteúdo fecal de amônia;
- Em ratos, o “iogurte” de soja e o cultivo puro de *E. faecium* não influenciaram a atividade da  $\beta$ -galactosidase, porém aumentaram a atividade da  $\beta$ -glucosidase e reduziram a atividade da  $\beta$ -glucuronidase (API-ZYM). No entanto, o resultado da  $\beta$ -glucuronidase não foi confirmado quando a atividade foi determinada por método espectrofotométrico;
- A cepa *E. faecium* CRL 183 não foi capaz de produzir substâncias antimicrobianas frente aos microrganismos indicadores testados;

- O consumo de “iogurte” de soja não provocou alterações significativas no pH e conteúdos de amônia fecais dos indivíduos adultos, com idade entre 40 e 50 anos e de ambos os sexos, embora tenha sido capaz de reduzir a atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase.
- Em camundongos, o consumo de “iogurte” de soja provocou redução na atividade das enzimas nitrorredutase e azorredutase;

Frente ao exposto, pode-se afirmar que o “iogurte” de soja fermentado com o *Enterococcus faecium* CRL 183, de maneira geral, tem o potencial para reduzir o risco de câncer de cólon, principalmente pela sua capacidade de modular beneficemente a microbiota intestinal, aumentando a população de *Lactobacillus* spp. e reduzindo a de *Bacteroides* spp., e diminuindo as atividades das enzimas  $\beta$ -glucuronidase, azorredutase e nitrorredutase.



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm). Acesso em: 17 jul. 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURE CHEMIST. Official methods of analysis of the AOAC, 15 ed. Washington, **Assoc. Off. Agric. Chem.**, 1990.

AUDISIO, M.C.; OLIVER, G.; APELLA, M.C. Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin synthesis of *Enterococcus faecium*. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 63, p. 235-241, 2001.

BARTRAM, H.P.; SCHEPPACH, W.; GERLACH, S.; RUCKDESCHEL, G.; KELBER, E. Does yoghurt enriched with *Bifidobacterium longum* affect colonic microbiology and fecal metabolites. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 59, p. 428-432, 1994.

BEDANI, R.; ROSSI, E.A.; LEPERA, J.S.; WANG, C.C.; VALDEZ, G.F. Efeito do consumo de um novo produto fermentado de soja enriquecido com isoflavonas e cálcio sobre o tecido ósseo de ratas. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 56, p. 146-152, 2006.

BEJUK, D., BEGOVAC, J., GAMBERGER, D., TEPES, N.K. Evaluation of phenotypic characteristics for differentiation of enterococcal species using an example based algorithm. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.38, p.201-205, 2000.

BENNO, Y.; MITSUOKA, T. Impact of *Bifidobacterium* on human fecal microflora. **Microbiol. Immunol.**, v. 36, p. 683-694, 1992.

BINGHAM, S. Meat, starch and non-starch polysaccharides, are epidemiological and experimental findings consistent with acquired genetic alterations in sporadic colorectal cancer? **Cancer Lett.**, v. 114, p. 25-34, 1997.

BOUHNİK, Y.; FLOURIE, B.; D'AGAY-ABENSOUR, L.; PORCHAT, P.; GRAMET, G.; DURAND, M.; RAMBAUD, J.C. Administration of transgalacto-oligosaccharides increases fecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. **J. Nutr.**, v. 127, p. 444-448, 1997.

BOYLE, P.; LEON, M.E. Epidemiology of colonrectal cancer. **Br. Med. Bull.**, v. 64, p. 1-25, 2002.

BRANDSCH, C.; SHUKLA, A.; HIRCHE, F.; STANGL, G.I.; EDER, K. Effect of proteins from beef, pork, and turkey meat on plasma and liver lipids of rats compared with casein and soy protein. **Nutrition**, v.22, p. 1162-1170, 2006.

BRATTON, C.A.; MARSHALL, E.K. A new coupling component of sulfanilamide determination. **J. Biol. Chem.**, v. 128, p. 537-555, 1939.

BRIGIDI, P.; VITALI, B.; SWENNEN, E.; BAZZOCCHI, G.; MATTEUZZI, D. Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea. **Res. Microbiol.**, v. 152, p. 735-741, 2001.

BURNS, A.J.; ROWLAND, I.R. Anti-carcinogenic of probiotics and prebiotics. *Curr. Issues Intest. Microbiol.*, v. 1, p. 13-24, 2000.

CARLOS, I.Z.; ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.C.; MACHADO, C.O.; CYRILLO, R.N.S.; PERRAZO, F.F.; VADEZ, G.F. Avaliação do potencial alergênico de um novo produto fermentado de soja. **Rev. Ciên. Farm.**, São Paulo, v. 21, p. 103-113, 2000.

CHUNG, K.T.; STEVENS-JUNIOR, S.E.; CERNIGLIA, C.E. The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. **Critical Review in Microbiology**, v. 18, p. 175-190, 1992.

CLINTON, S.K.; BOSTWICK, D.G.; OLSON, L.M.; MANGIAN, H.J.; VISEK, W.J. Effects of ammonium acetate and sodium cholate on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced colon carcinogenesis of rats. **Cancer Res.**, v. 48, p. 3035-3039, 1988.

COLE, C.B.; FULLER, R.; MALLET, A.K.; ROWLAND, I.R. The influence of the host on expression of intestinal microbial enzyme activities involved in metabolism of foreign compounds. **J. Appl. Bacteriol.**, v. 69, p. 549-553, 1985.

DE MARTINIS, E.C.P.; ALVES, V.F.; FRANCO, B.D.G.M.; Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. **Food Reviews International**, v. 18, p. 191-208, 2002.

DE MARTINIS, E.C.P.; PUBLIO, M.R.P.; SANTAROSA, P.R.; FREITAS, F.Z. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged Brazilian meat products. **Braz. J. Microbiol.**, v. 32, p. 32-37, 2001.

DE MARTINIS, E.C.P.; SANTAROSA, P.R.; FREITAS, F.Z. Caracterização preliminar de bacteriocinas produzidas por seis cepas de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos embalados a vácuo. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 23, p. 195-199, 2003.

EATON, T.J.; GASSON, M.J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, p. 1628-1635, 2001.

EDLUND, C.; BEYER, G.; HIEMER-BAU, M.; ZIEGE, S.; LODE, H.; NORD, C.E. Comparative effects of mixifloxacin and clarithromycin on normal intestinal microflora. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 32, p. 81-85, 2000.

FAO/WHO. Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, april 30 and may 1, 2002.

FARIAS, M.E.; RUIZ HOLGADO, A.A.P.; SESMA, F. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from regional cheeses: inhibition of foodborne pathogens. **J. Food Prot.**, v. 57, p. 1013-1015, 1994.

FLORENT, C.; FLOURIÉ, B.; LEBLOND, A.; RAUTUREAU, M.; BERNIER, J.J.; RAMBAUD, J.C. Influence of chronic lactulose in man (an *in vivo* study). **J. Clin. Invest.**, v. 75, p. 608-613, 1985.

FRANZ, C.M.A.P.; STILES, M.E.; SCHELEIFER, K.H.; HOLZAPFEL, W.H. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 80, p. 105-122, 2003.

GENOVESE, M.I; LAJOLO, F.M. Isoflavonas da soja: fatores que influem nos tipos e teores em alimentos. **Food Ingredients**, v. 11, p. 62-64, 2001.

GEORGE, S.E.; WOLF, D.C.; BROOKS, L.R.; BAILEY, K.C.; HOOTH, M.J.; NELSON, G.M. Changes in cecal microbial metabolism of rats induced by individual and mixture of drinking water disinfection by-products. **Cancer Lett.**, v. 204, p. 15-21, 2004

GIRAFFA, G.; CARMINATI, D.; TARELLI, G. T. Inhibition of *Listeria innocua* in milk by bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* 7C5. **J. Food Prot.**, v. 58, p. 621-623, 1995.

GOLDIN, B.R. Intestinal microflora: metabolism of drugs and carcinogens. **Ann. Med.**, v. 22, p. 43-48, 1990.

GOLDIN, B.R.; GORBACH, S.L. Alterations in fecal microflora enzymes related to diet, age, *Lactobacillus* supplements, and dimethylhydrazine. **Cancer**, v. 40, p. 2421-2426, 1977.

GOLDIN, B.R.; GORBACH, S.L. Alterations of the intestinal microflora by diet, oral antibiotics and *Lactobacillus*: decreased production of free amines from aromatic nitro compounds, azo dyes and glucuronides. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 73, p. 689-695, 1984.

GOLDIN, B.R.; GORBACH, S.L. The relationship between diet and rat fecal bacterial enzymes implicated in colon cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 57, p. 371-375, 1976.

GOLDIN, B.R.; SWENSON, L.; DWYER, J.; SEXTON, M.; GORBACH, S.L. Effect of diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements on human fecal bacterial enzymes. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 64, p. 255-261, 1980.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, v. 361, 512-519, 2003.

HABERER, P.; TOIT, M.; DICKS, L.M.T.; AHRENS, F.; HOLZAPFEL, W.H. Effect of potentially probiotic lactobacilli on faecal enzyme activity in minipigs on high-fat, high-cholesterol diet – a preliminary in vivo trial. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 87, p. 287-291, 2003.

HAWKSWORTH, G.; DRASAR, B.S.; HILL, M.J. Intestinal bacteria and the hydrolysis of glycoside bonds. **J. Med. Microbiol.**, v. 4, p. 451-459, 1971.

HIRAYAMA, K.; RAFTER, J. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. **Microbes Infect.**, v. 2, p. 681-686, 2000.

HOPKINS, M.J.; SHARP, R.; MACFARLANE, G.T. Variation in human intestinal microbiota with age. **Digest Liver Dis.**, v. 34, p. S12-20, 2002

HOSODA, M.; HASHIMOTO, H.; HE, D.; MORITA, H.; HOSONO, A. Effects of administration of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* LA-2 on fecal mutagenicity and microflora in the human intestine. **J. Dairy Sci.**, v. 79, p. 745-749, 1996.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, M.T. Functionality of enterococci in meat products. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 88, p. 223-233, 2003.

ICHIKAWA, H.; SAKATA, T.M. Stimulation of epithelial cell proliferation of isolated distal colon of rats by continuous colonic infusion of ammonia or short-chain fatty acids is nonadditive. **J. Nutr.**, v. 128, p. 843-847, 1998.

IKE, Y.; HASHIMOTO, H.; CLEWELL, D.B. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, p. 1524-1528, 1987.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2008**: incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA: 2007. ISBN 978-85-7318-126-5. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=tabelasestados.asp&UF=BR>. Acesso em: 04/01/2008.

JIN, L.Z., MARQUARDT, R.R., ZHAO, X. A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, p.4200-4204, 2000.

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

KIM, K.I.; LEE, W.S.; BENEVENGA, N.J. Feedings diets containing high levels of milk products or cellulose decrease urease activity and ammonia production in rat intestine. **J. Nutr.**, v. 128, p. 1186-1191, 1998.

KINGSTON, D.G.I.; VAN TASSEL, R.L.; WILKINS, T.D. The fecapentaenes, potent mutagens from human feces. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 3, p. 391-400, 1990.

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

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

KLEIN, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and gastrointestinal tract. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 88, p. 123-131, 2003.

KREFT, B.; MARRE, R.; SCHRAMM, U.; WIRTH, R. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 25-30, 1992.

KRZYZANOWSKY, F.; AVILA-CAMPOS, M. Detection of non-enterotoxigenic and enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in stool samples from children in São Paulo, Brazil. **Rev. Int. Med. trop. S. Paulo.**, v. 45, p. 1-3, 2003.

LASAGNO, M.; BEOLEITO, V.; SESMA, F.; RAYA, R.; FONT, G.; ERASO, A. Selection of bacteriocin producer strains of lactic acid bacteria from a dairy environment. **New Microbiol.**, v. 25, p. 37-44, 2002.

LAUKOVÁ, A.; GUBA, P.; NEMCOVÁ, R.; VASILKOVÁ, Z. Reduction of Salmonella in gnotobiotic Japanese quails caused by enterocin A-producing EK13 strain of *Enterococcus faecium*. **Vet. Res. Comm.**, v. 27, p. 275-280, 2003.

LAUKOVÁ, A.; MAREKOVÁ, M. Production of bacteriocins by different enterococcal isolates. **Folia Microbiol.**, v. 6, p. 49-52, 2001.

- LEBLANC, A M; PERDIGÓN, G. Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer. **Med. Sci.Monit.**, v.10, n.4, p.96-104, 2004.
- LEE, Y.; SALMINEN, S. The coming of age of probiotics. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 6, p. 241-245, 1995.
- LEWUS, C.B.; MONTVILLE, T. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **J. Microbiol. Methods**, v. 13, p. 145-150, 1991.
- LIDBECK, A.; NORD, C.E.; GUSTAFSSON, J.A.; RAFTER, J. Lactobacilli, anticarcinogenic activities and human intestinal microflora. **Eur. J. Cancer Prev.**, v. 1, p. 341-353, 1992.
- LING, W. Diet and colonic microflora interaction in colorectal cancer. **Nutr. Res.**, v.15, n.3, p.439-454, 1995.
- LIN, H.C.; VISEK, W.J. Large intestinal pH and ammonia in rats: dietary fat and protein interactions. **J. Nutr.**, v. 121, p. 832-843, 1991.
- LING, W.H.; HÄNNINEN, O.; MYKKÄNEN, H.; HEIKURE, M.; SALMINEN, S.; VONWRIGHT, A. Colonization and fecal enzyme activities after oral *Lactobacillus* GG administration in elderly nursing home residents. **Ann. Nutr. Metab.**, v. 36, p. 162-166, 1992.
- LING, W.H.; KORPELA, R.; MYKKÄNEN, H.; SALMINEN, S.; HÄNNINEN, O. *Lactobacillus* strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. **J. Nutr.**, v. 124, p. 18-23, 1994.
- LIVINGSTON, S.J.; KOMINOS, S.D.; YEE, R.B. New medium for selection and presumptive identification of *Bacteroides fragilis* group. **J. Clin. Microbiol.**, v. 7, p. 448-453, 1978.
- LUND, B., ADMSSON, I., EDLUND, C. Gastrointestinal transit survival of an *Enterococcus faecium* probiotic strain administered with or without vancomycin. **Int. J. Food Microbiol.**, v.77, p.109-115, 2002.
- MAI, V.; MORRIS, JG. Colonic bacterial flora: changing understandings in the molecular age. **J. Nutr.**, v 134, p. 459-464, 2004.
- MALLET, A.K.; BEARNE, C.A.; ROWLAND, I.R. Metabolic activity and enzyme induction in rat fecal microflora maintained in continuous culture. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 46, p. 591-595, 1983.
- MANZONI, M.S.J.; ROSSI, E.A.; CARLOS, I.Z.; VENDRAMINI, R.C.; DUARTE, A.C.G.O.; DÂMASO, A.R. The fermented soy product supplemented with isoflavonas affected fat depots in juvenile rats. **Nutrition**, v. 21, p. 1018-1024, 2005.

MARZOTTO, M.; MAFFEIS, C.; PATERNOSTER, T.; FERRARIO, R.; RIZZOTTI, L.; PELLEGRINO, M.; DELLAGLIO, F.; TORRIANI, S. *Lactobacillus paracasei* A survives gastrointestinal passage and affects the fecal microbiota of healthy infants. **Res. Microbiol.**, v. 157, p. 857-866, 2006.

MASTROMARINO, A.J.; REDDY, B.S.; WYNDER, E.L. Fecal profiles of anaerobic microflora of large bowel cancer patients and patients with nonhereditary large bowel polyps. **Cancer Res.**, v. 38, p. 4458-4462, 1978.

MATER, D.D.G., BRETIGNY, L., FIRMESSE, O., FLORES, M.J., MOGENET, A., BRESSON, J.L., CORTIER, G. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 250, p.185-187, 2005.

MENDONZA, F.; MAQUEDA, M.; GÁLVEZ, A.; MARTÍNEZ-BUENO, M.; VALDIVIA, E. Antilisterial activity of peptide AS-48 and study of changes induced in the cell envelope properties of an AS-48 adapted strain *Listeria monocytogenes*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, p. 618-625, 1999.

MERCENIER, A.; PAVAN S.; POT, B. Probiotic as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. **Curr. Pharm. Design**, v. 8, p. 99-110, 2002.

MESSINA, M.J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 70, p. 439S-450S, 1999.

MITAL, B.K.; GARG, S.K. Anticarcinogenic, hypocholesterolemic, and antagonistic activities of *Lactobacillus acidophilus*. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 21, p. 175-214, 1995.

MITSUOKA, T. Bifidobacteria and their role in human health. **J. Ind. Microbiol.**, v. 6, p. 263-268, 1990.

MODLER, G.M.; McKELLAR, R.C.; YAGUCHI, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 23, p. 29-41, 1990.

MONTESI, A., GARCÍA-ALBIACH, R., POZUELO, M.J., PINTADO, C., GONI, I., ROTGER, R. Molecular and microbiological analysis of caecal microbiota in rats fed with diets supplemented either with prebiotics or probiotics. **Int. J. Food Microbiol.**, v.98, p.281-289, 2005.

MOORE, W.E.; MOORE, L.H.; Intestinal floras of populations that have a high risk of colon cancer. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 91, p. 3202-3207, 1995.

MORATA DE AMBROSINI, V.; GONZALEZ, S.; PERDIGÓN, G.; PESCE DE RUIZ HOLGADO, A.; OLIVER, G. Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species. **Chemistry and Pharmacy Bulletin**, v. 44, p. 2263-2267, 1996.

MORENO, M.R.F.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; VUYST, L.D. The role and application of enterococci in food and health. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 106, p. 1-24, 2006.

MOROTOMI, M.; MUTAI, M. In vitro binding of potent mutagenic pyrolysates to intestinal bacteria. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 77, p. 195-201, 1986.

MULLIÉ, C.; YAZOUH, A.; SINGER, E.; LECROIX, F.; BLAREAU, J.P.; ROMOND, M.B.; ROMOND, C. Partial characterization of Bifidobacterium breve C50 cell-free whey compounds inducing modifications to intestinal microflora. **J. Dairy Sci.**, v.85, p. 1383-1389, 2002.

MUNOA, F.J.; PARES, R. Selective medium for isolation and enumeration of Bifidobacterium spp. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 54, 1988.

ORRHAGE, K.; SILLERSTROM, E.; GUSTAFSSON, F.A. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. **Mutat. Res.**, v. 311, p. 239-248, 1994.

OUWEHAND, A.C.; KIRJAVAINEN, P.V.; SALMINEN, S. Probiotics: mechanisms and established effects. **Int. Dairy J.**, v. 9, p. 43-52, 1999.

PARKIN, M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global cancer statistics 2002. **CA Cancer J. Clin.**, v. 55, p. 74-108, 2005.

POSPIECH, A.; NEUMANN, B. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram positive bacteria. **Trends Genet.**, v. 11, p. 217-218, 1995.

RAFTER, J. Probiotics and colon cancer. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 17, n. 5, p. 849-859, 2003.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76 rodent diet. **J. Nutr.**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.

RIBIC, C.H., CERAR, A., POKORN, D., PERSE, M., ZEBIC, A. Effects of kefir containing various levels of fat on chemical induced colorectal epithelial tumor in Wistar rats. **Nutr. Res.**, v.25, p.1-11, 2005.

RICE, L.B.; CARIAS, L.; RUDIN, S.; VAEL, C.; GOOSSENS, H.; KONSTABEL, C.; KLARE, I.; NALLAPAREDDY, S.R.; HUANG, W.; MURRAY, B.E. A potential virulence gene, hlyEfm, predominates in *Enterococcus faecium* of clinical origin. **Journal of Infectious Diseases**, v.187, p. 508-512, 2003.

ROMOND, M.B.; AIS, A.; GUILLEMOT, F.; BOUNOUADER, R.; CORTOT, A.; ROMOND, C. Cell-free whey from milk fermented with Bifidobacterium breve C50 used



to modify the colonic microflora of healthy subjects. **J. Dairy Sci.**, v. 81, p. 1229-1235, 1998.

ROMOND, M.B.; HADDOU, Z.; MIELCARECK, C.; ROMOND, C. Bifidobacteria and human health: regulatory effect of indigenous bifidibacteria on *Escherichia coli* intestinal colonization. **Anaerobe**, v. 3, p. 131-136, 1997.

ROSSI, E.A. Desenvolvimento e avaliação biológica do potencial hipocolesterolêmico de um novo produto probiótico de soja. Tese (Livre Docência)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000a.

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

ROSSI, E.A.; REDDY, K.V.; SILVA, R.S.S.F. Formulation of soy-whey yogurt using response surface methodology. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 27, p. 387-390, 1984.

ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.C.; CARLOS, I.Z.; OLIVEIRA, M.G.; VALDEZ, G.F. Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre os lípides séricos de homens adultos normocolesterolêmicos. **Arq. Latin. Nutr.**, v. 53, p. 47-51, 2003.

ROSSI, E.A.; VENDRAMINI, R.C.; CARLOS, I.Z.; PEI, Y.C.; VALDEZ, G.F. Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties. **Eur. Food. Res. Technol.**, v. 209, p. 305-307, 1999.

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

ROWLAND, I.R.; MALLET, A.K.; WISE, A. A comparison of the activity of five microbial enzymes in caecal contents from rats, mice, hamsters and response to dietary pectin. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 69, p. 143-148, 1983.

RUBIO, L.A.; SPENCER, R.; GRANT, G.; PUSZTAI, A. The inclusion of lupin (*Lupinus angustifolius*) seed meal or its fibre residue in the diet reduces the levels of *Escherichia coli* in both small and large intestines of the rats. **Microb. Ecol. Health Dis.**, v. 8, p. 101-105, 1995.

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

SAAVEDRA, J.M. Clinical application of probiotic agents. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 1147S-1151S, 2001

SAAVEDRA, L.; TARANTO, M.P.; SESMA, F.; VALDEZ, G.F. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 88, p. 241-245, 2003.

SALMINEN, S.; BOULEY, C.; BOUTRON-RUAULT, M.C.; CUMMINGA, J.H.; FRANCK, A.; GIBSON, G.R.; ISOLAURI, E.; MOREAU, M.C.; ROBERTFROID, M.; ROWLAND, I. Functional food science of gastrointestinal physiology and function. **Br. J. Nutr.**, v. 80, p. 147S-171S, 1998.

SARANTINOPOULOS, P.; LEROY, F.; LEONTOPOULOU, E.; GEORGALAKI, M. D.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E.; DE VUYST, L. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 72, p. 125-136, 2002.

SAUNIER, K.; DORÉ, J. Gastrointestinal tract and the elderly: functional foods, gut microflora and healthy ageing. **Digest Liver Dis.**, v. 34, p. S19-24, 2002.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EISENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. Mechanisms of microbial disease. 3th edition, Ed. Lippincott, Williams & Wilkins, 1999.

SETCHELL, K.D.; CASSIDY, A. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human. **J. Nutr.**, v. 129, p. 758S-767S, 1999.

SCUTTI, L. F.; ROSSI, E. A. . Propriedades profiláticas e terapêuticas das culturas lácticas. **Cadernos de Nutrição** (São Paulo), v. 12, p. 9-18, 1996.

SHAHANI, K.M.; AYEBO, A.D. Role of dietary lactobacilli in gastrointestinal microecology. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 33, p. 2448-2457, 1980.

SHIGUEMOTO, G.E; ROSSI, E.A.; BALDISSERA, V.; GOUVEIA, C.H.; VALDEZ, G.M.F.; PEREZ, S.E.A. Isoflavone-supplemented soy yoghurt associated with resistive physical exercise increase bone mineral density of ovariectomized rats. **Maturitas**, 2007 (in Press).

SILVA, M.F.; ROSSI, E.A. Influência do “iogurte” de soja fermentado com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus* ssp *jugurti*, associado ao exercício físico, no desenvolvimento do câncer de cólon em ratos. Araraquara, 2006. 45p. (Relatório para FAPESP).

SILVI, S.; RUMMEY, C.J.; CRESCI, A.; ROWLAND, I.R. Resistant starch modifies gut microflora and microbial metabolism in human flora-associated rats inoculated with faeces from Italian and UK donors. **J. Appl. Microbiol.**, v. 86, p. 521-530, 1999.

SIMONETTA, A.C.; MORAGUES DE VELASCO, L.G.; FRISÓN, L.N. Antibacterial activity of enterococci strains against *Vibrio cholerae*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 24, p. 139-143, 1997.

SIVIERI, K.; SPINARDI-BARBISAN, A.L.T.; BARBISAN, L.F.; BEDANI, R.; PAULY, N.D.; CARLOS, I.Z.; BENZATTI, R.C.; VENDRAMINI, R.C.; ROSSI, E.A. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon câncer in male Wistar rats. **Eur. Food Res. Technol.**, 2008 (versão online).

SOUZA, G.; VALLE, J.L.E.; MORENO, I. Efeitos dos componentes da soja e seus derivados na alimentação humana. **Bol. SBCTA**, 34, p. 61-69, 2000.

SPANHAAK, S.; HAVENAAR, R.; SCHAAFSMA, G. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 52, p. 899-907, 1998.

SPELHAUG, S.R.; HARLANDER, S.K. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. **J. Food Prot.**, v. 52, p. 856-862, 1989.

TANNOCK, G. W. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. **Int. Dairy J.**, v. 8, p. 527-533, 1998.

TOIT, M.; FRANZ, C.M.A.P.; DICKS, L.M.T.; SCHILLINGER, U.; HABERER, P.; WARLIES, B.; AHRENS, F.; HOLZAPFEL, W.H. Characterisation and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 40, p. 93-104, 1998.

TOMITA, H.; FUJIMOTO, S.; TANIMOTO, K.; IKE, Y. Cloning and genetic organization of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pPDI. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 7843-7855, 1997.

TSUJII, M.; KAWANO, S.; TSUJII, S.; NAGANO, K.; ITO, T.; HAYASHI, N.; FUSAMOTO, H.; KAMADA, T.; TAMURA, K. Ammonia: a possible promoter in *Helicobacter pylori* related gastric carcinogenesis. **Cancer Lett.**, v. 65, p. 15-18, 1992.

VASILJEVIC, T.; SHAH, NP. Probiotics – from Metchnikoff to bioactives. **Int. Dairy J.**, v. 18, p. 714-728, 2008.

VENDRAMINI, A.P. **Efeito da ingestão de um produto de soja fermentado com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus helveticus***. 2002. 96f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

VENTURI, A.; GIONCHETTI, P.; RIZZELLO, F.; JOHANSSON, R.; ZUCCONI, E.; BRIGIDI, P.; MATTEUZZI, D.; CAMPIERI, M. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 13, p. 1103-1108, 1999.

VINDEROLA, CG. Dried cell-free fraction of fermented milks: new functional additives for the food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 19, p. 40-46, 2008.

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

VLKOVÁ, E.; NEVORAL, J.; JENCIKOVA, B.; KOPECNY, J.; GODEFROOIJ, J.; TROJANOVÁ, I.; RADA, V. Detection of infant faecal bifidobacteria by enzymatic methods. **J. Microbiol. Methods**, v. 60, p. 365-373, 2005.

WACHSMAN, M.B.; FARIAS, M.E.; TAKEDA, E.; SESMA, F.; RUIZ HOLGADO, A.P.; TORRES, R.A.; COTO, C.E. Antiviral activity of enterocin CRL35 against herpes viruses. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 12, p. 293-299, 1999.

WISE, A.; MALLETT, K.; ROWLAND, I.R. Dietary fibre, bacterial metabolism and toxicity of nitrate in the rat. **Xenobiotica**, v. 12, p. 111-118, 1982.

WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G.; POOL-ZOBEL, B. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 451S-455S, 2001.

WRONG, O.M.; VINCE, A. Urea and ammonia metabolism in the human large intestine. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 43, p. 77-86, 1984.

YOSHIOKA, H.; ISEKI, K.; FUJITA, K. Development and difference of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. **Pediatrics**, v. 72, p. 317, 1983.