

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**PRISCILLA RÉGIA DE ANDRADE CALAÇA**

**Caracterização quanto à viabilidade probiótica de bactérias ácido lácticas  
isoladas de queijo de Coalho artesanal produzido em Pernambuco**

**RECIFE**

**2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**PRISCILLA RÉGIA DE ANDRADE CALAÇA**

**Caracterização quanto à viabilidade probiótica de bactérias ácido lácticas  
isoladas de queijo de Coalho artesanal produzido em Pernambuco**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Taciana  
Cavalcanti Vieira Soares

Co-Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Lúcia  
Figueiredo Porto

**RECIFE**

**2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

**PRISCILLA RÉGIA DE ANDRADE CALAÇA**

**Caracterização quanto à viabilidade probiótica de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanal produzido em Pernambuco**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares – UFRPE (Orientadora)

---

Prof. Dr.<sup>a</sup> Polyanna Nunes Herculano – UFRPE (Banca Examinadora)

---

Prof. Dr.<sup>o</sup> Valdemiro Amaro da Silva Júnior – UFRPE (Banca Examinadora)

---

Prof. Dr.<sup>a</sup> Daniela de Araújo Viana Marques – UPE (Banca Examinadora)

**RECIFE, 23 DE FEVEREIRO DE 2017**

*À memória de Marineide Barreto Figueiredo*

*Por seu amor incondicional*

*Mãe, amiga fiel e confidente.*

*Dedico!*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus, Jesus e Nossa Senhora por guiarem meu caminho. Por orientar e iluminar os meus dias com suas bênçãos. Por me darem força para vencer cada etapa da minha vida. Assim seja!

Aos meus amados pais Graça e Reginaldo, ao meu irmão Thiago e minha filha Larissa pelo apoio, força, confiança, torcida, vibrações positivas e ânimo em meu percurso diário. Obrigada por terem compreendido tantas ausências devido às pesquisas científicas. Foi sempre buscando o nosso melhor! Amo vocês!

Aos meus tios e primos, em especial, à minha adorável tia Fátima e prima Fabiana pelos conselhos, doçura e incentivo aos meus estudos.

Ao meu amado companheiro Bruno Cavalcante pela presença constante em todos os momentos de minha vida, pelo carinho, aconchego, amizade e ternura. Pela paciência e pela disponibilidade em sempre me auxiliar. Você é um presente de Deus para mim!

À minha querida Orientadora Professora Dr.<sup>a</sup> Maria Taciana Cavalcanti pela confiança, consideração e respeito. Por me fazer lembrar em meu trabalho que é possível fazer ciência com bom humor, sem perder o equilíbrio. Um exemplo de ser humano e profissional que tenho a seguir!

Agradeço à minha formidável Co-Orientadora Professora Dr.<sup>a</sup> Ana Porto, pelo incentivo, credibilidade e ensinamentos com sua leveza e dedicação ao fazer pesquisa.

Agradeço aos meus companheiros e parceiros de várias jornadas Luana Brito, Paulo Gusmão, Camila Teodoro, Rogério Veloso e Hilton Nobre. Com vocês conheci os diversos benefícios de uma amizade verdadeira.

Aos meus amigos animados, engraçados, companheiros de trabalho e grupo de pesquisa Meire, Viviane, Gabi, Noé, Ketyline, Priscila, Renan, Túlio, Karol, Ariadne, Alexsandra, Milena e Manu pelo carinho e conversas bacanas. Vocês tornam tornando o ambiente de trabalho sempre prazeroso!

Aos meus amigos de trabalho Rebeca, Pablo “filho”, Elaine, Dayane e Leonardo que foram muito importantes na minha jornada do Mestrado, principalmente na etapa final, em que me disponibilizaram alegria, companheirismo, tempo e orientações para que eu pudesse finalizar com calma os processos práticos e teóricos.

Aos funcionários do CENAPESQ Tia Edna, Susy, Júlio, Adriana, Patrícia, Terezinha, S. Marcelo, Professor Paulo e Professor Guaraná pela disponibilidade em ajudar como facilitadores no cotidiano de todos que fazem parte deste centro de pesquisa.

À Andrezza Monteiro pela amizade, paciência e apoio em tantos momentos cruciais da minha vida! Que sempre me estimulou para a vida acadêmica e profissional. Irmã de coração!

A um ser humano de luz e especial que transborda amor por onde passa Raquel Pedrosa. Sou sua fã incondicional. Meus sentimentos fraternos a você!

Aos amigos do grupo FORBIO com quem tenho o prazer de dialogar os caminhos mais profundos da educação em Biologia, em especial, Professora Dr.<sup>a</sup> Monica Folena, por me fazer sempre acreditar que educar sempre foi e sempre será o caminho para a vitória.

A todos os amigos do LABTECBIO pelo incentivo e amizade.

Aos inesquecíveis amigos do LANAGRO, do Aggeu Magalhães e da Azul Linhas Aéreas, lugares em que aprendi muito como profissional e como pessoa.

À todos os amigos que fiz na Pós-Graduação em Biociência Animal: Karol, Cinthia, Aline, Hilda, Marília Cordeiro, Mayara, Müller, Fernando e Marcus. As aulas com pipocas eram sempre mais inspiradoras!

À todos que de forma direta ou indireta contribuíram e contribuem para a minha abençoada trajetória!

Muita gratidão!

### *Oração de São Francisco*

*“Senhor, fazei-me instrumento de vossa paz!*

*Onde houver ódio, que eu leve o amor;*

*Onde houver ofensa, que eu leve o perdão;*

*Onde houver discórdia, que eu leve a união;*

*Onde houver dúvidas, que eu leve a fé;*

*Onde houver erro, que eu leve a verdade;*

*Onde houver desespero, que eu leve a  
esperança;*

*Onde houver tristeza, que eu leve a alegria;*

*Onde houver trevas, que eu leve a luz;*

*Ó Mestre!*

*Fazei que eu procure mais consolar que ser  
consolado;*

*Compreender que ser compreendido;*

*Amar que ser amado;*

*Pois é dando, que se recebe;*

*É perdoando que se é perdoado;*

*E é morrendo que se vive para a vida eterna!”*

*(Autor Desconhecido)*

## RESUMO

O queijo de Coalho artesanal de Pernambuco apresenta um ecossistema de bactérias complexo o que garante características organolépticas diferenciadas. Os principais gêneros de bactérias ácido lácticas (BAL) estão presentes neste produto e formam uma comunidade estrategicamente organizada. As BAL incluem os gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus* e *Streptococcus*. Muitos desses gêneros são probióticos, sendo os mais estudados pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. O objetivo deste estudo foi analisar a viabilidade probiótica de BAL oriundas de queijo de Coalho artesanal produzido em Pernambuco. Análises específicas foram realizadas para caracterização probiótica das BAL, como teste de sobrevivência a baixos valores de pH (2,5) e na presença dos sais biliares, atividade antagonista e antimicrobiana, resistência a antimicrobianos, atividade hidrofóbica e adesão às células epiteliais. Tais testes foram realizados para auxiliar no processo de caracterização probiótica das BAL. Dentre as 87 BAL avaliadas, constatamos que a BAL 137<sub>v</sub> resistiu às condições de simulação do sistema gastrointestinal e apresentou adesividade ao solvente xilol e às células epiteliais. Em continuidade, apresentou efeito antagônico contra *Klebsiella pneumoniae* ATCC 26665, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633; atividade antimicrobiana contra todas as bactérias indicadoras utilizadas, em especial, *Listeria innocua* ATCC 33090. O sobrenadante com atividade antimicrobiana manteve-se estável à temperatura de 121 °C por 10 minutos em pHs distintos (2,0; 4,0; 7,0; 9,0 e 11,0); e apresentou estabilidade térmica após ser submetido à temperatura de 100 °C por um período de 10, 20 e 30 minutos. Este estudo sugere que a BAL 137<sub>v</sub> é uma promissora bactéria probiótica e agrega valor ao produto tipicamente regional, que é o queijo de Coalho, oferecendo características relevantes à fabricação de alimentos com propriedades benéficas à saúde do consumidor.

Palavras-chave: Bactérias ácido lácticas. Probióticos. Caracterização. Queijo de Coalho.

## ABSTRACT

The artisanal "Coalho" cheese from Pernambuco presents a complex bacterial ecosystem which guarantees differentiated organoleptic characteristics. The major genera of lactic acid bacteria (BAL) are present in the product and form a strategically organized community. BALs include the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus* and *Streptococcus*. Many of the genera are probiotics, being the most studied belonging to the genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*. The objective of this study was to analyze the probiotic viability of BALs derived from "Coalho" cheese produced in Pernambuco. Specific analyzes were performed for the probiotic characterization of BAL, such as survival test and pH lows (2,5) and in the presence of bile salts, antagonistic and antimicrobial activity, antimicrobial resistance, hydrophobic activity and adhesion to epithelial cells. These tests were performed to aid in the probiotic characterization of BAL. Among 87 BALs evaluated, we found that the BAL 137V resisted the simulation conditions of the gastrointestinal system and presented solvent and epithelial cell adhesiveness. In continuity, it had an antagonistic effect against *Klebsiella pneumoniae* ATCC 26665, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633; Antimicrobial activity against all indicator bacteria, in particular *Listeria innocua* ATCC 33090. The antimicrobial activity supernatant was stable at 121 ° C for 10 minutes at different pHs (2.0, 4.0, 7.0, 9 , 0 and 11.0); E presented thermal stability after being submitted to the temperature of 100 °C for a period of 10, 20 and 30 minutes. This study is a BAL 137V is a promising probiotic bacterium and adds value to the typically regional product, which is the curd cheese, offering characteristics relevant to the manufacture of foods with beneficial properties to the health of the consumer.

Key words: Lactic acid bacteria. Probiotics. Characterization. "Coalho" cheese.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| LISTA DE FIGURAS .....                                                                                                                                         | 14 |
| LISTA DE TABELAS .....                                                                                                                                         | 15 |
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                             | 17 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                                                                                                                                  | 19 |
| 2.1 Queijo de Coalho .....                                                                                                                                     | 19 |
| 2.2 Bactérias ácido lácticas .....                                                                                                                             | 20 |
| 2.3 Microbiota intestinal e probióticos .....                                                                                                                  | 22 |
| 3 OBJETIVOS .....                                                                                                                                              | 26 |
| 3.1 Geral .....                                                                                                                                                | 26 |
| 3.2 Específicos.....                                                                                                                                           | 26 |
| 4 REFERÊNCIAS.....                                                                                                                                             | 27 |
| CAPÍTULO 1 .....                                                                                                                                               | 31 |
| Podem as bactérias ácido lácticas probióticas apresentarem efeito antitumoral em modelo animal de câncer de cólon? Uma revisão sistemática da literatura ..... | 32 |
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                             | 33 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                                                     | 35 |
| 2.1 Diretrizes .....                                                                                                                                           | 35 |
| 2.2 Critérios de elegibilidade .....                                                                                                                           | 35 |
| 2.3 Fonte de informação e identificação do estudo .....                                                                                                        | 35 |
| 2.4 Método específico para a revisão sistemática .....                                                                                                         | 36 |
| 3 RESULTADOS .....                                                                                                                                             | 36 |
| 3.1 A revisão sistemática .....                                                                                                                                | 36 |
| 3.2 Redução do câncer de cólon .....                                                                                                                           | 37 |
| 3.3 Ingestão de probióticos e ganho de peso corporal.....                                                                                                      | 37 |
| 3.4 Efeito das bactérias probióticas na atividade da $\beta$ -glucuronidase .....                                                                              | 38 |
| 4 DISCUSSÃO .....                                                                                                                                              | 38 |
| 5 CONCLUSÃO.....                                                                                                                                               | 44 |
| 6 AGRADECIMENTOS .....                                                                                                                                         | 44 |
| 7 DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES .....                                                                                                                   | 44 |
| 8 REFERÊNCIAS.....                                                                                                                                             | 44 |
| CAPÍTULO 2 .....                                                                                                                                               | 48 |

|                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Utilização de bactérias ácido lácticas probióticas como estratégia preventiva para infecção operatória em pacientes com câncer colorretal: uma revisão sistemática e metanálise de estudos randomizados ..... | 49 |
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                                                                            | 50 |
| 2 MÉTODOS .....                                                                                                                                                                                               | 51 |
| 2.1 Diretrizes .....                                                                                                                                                                                          | 51 |
| 2.2 Critério da amostra e elegibilidade.....                                                                                                                                                                  | 51 |
| 2.3 Fonte de informação e identificação do estudo .....                                                                                                                                                       | 52 |
| 2.4 Análise estatística.....                                                                                                                                                                                  | 52 |
| 3 RESULTADOS .....                                                                                                                                                                                            | 53 |
| 3.1 Ingestão de probióticos e infecção incisional.....                                                                                                                                                        | 53 |
| 3.2 Detecção de bactérias no sangue.....                                                                                                                                                                      | 54 |
| 3.3 Complicação na infecção cirúrgica .....                                                                                                                                                                   | 56 |
| 4 DISCUSSÃO .....                                                                                                                                                                                             | 56 |
| 5 CONCLUSÃO.....                                                                                                                                                                                              | 64 |
| 6 CONFLITOS DE INTERESSE.....                                                                                                                                                                                 | 64 |
| 7 REFERÊNCIAS.....                                                                                                                                                                                            | 64 |
| CAPÍTULO 3 .....                                                                                                                                                                                              | 69 |
| Caracterização da viabilidade probiótica de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanal produzido em Pernambuco - Brasil .....                                                            | 70 |
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                                                                            | 71 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                                                                                                    | 72 |
| 2.1 Bactérias ácido lácticas e condições de crescimento .....                                                                                                                                                 | 72 |
| 2.2 Resistência ao valor de pH baixo.....                                                                                                                                                                     | 72 |
| 2.3 Resistência à presença de sais de bile .....                                                                                                                                                              | 73 |
| 2.4 Avaliação da atividade antagonista .....                                                                                                                                                                  | 73 |
| 2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana .....                                                                                                                                                               | 74 |
| 2.6 Caracterização de substância antimicrobiana produzida pelas BALS.....                                                                                                                                     | 75 |
| 2.6.1 Sensibilidade à protease .....                                                                                                                                                                          | 75 |
| 2.6.2 Sensibilidade ao pH e temperatura .....                                                                                                                                                                 | 75 |
| 2.7 Teste de resistência a antibióticos .....                                                                                                                                                                 | 75 |
| 2.8 Adesão microbiana a solventes (MATS).....                                                                                                                                                                 | 76 |
| 2.9 Adesão de BAL às células epiteliais in vitro .....                                                                                                                                                        | 77 |
| 3.1 Resistência a valores de pH baixo e à presença de sais biliares .....                                                                                                                                     | 78 |

|                                                                                      |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2 Potencial antagônico .....                                                       | 79  |
| 3.4 Caracterização de substância antimicrobiana produzida pelas BALS.....            | 81  |
| 3.4.1 Sensibilidade à protease .....                                                 | 81  |
| 3.4.2 Sensibilidade ao pH e a temperatura .....                                      | 81  |
| 3.5 Avaliação de resistência a antibióticos.....                                     | 83  |
| 3.6 Adesão microbiana a solventes (MATS).....                                        | 84  |
| 3.7 Adesão de BAL às células epiteliais.....                                         | 84  |
| 4 DISCUSSÃO .....                                                                    | 85  |
| 5 CONCLUSÃO.....                                                                     | 88  |
| 6 REFERÊNCIAS.....                                                                   | 88  |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS .....                                                           | 95  |
| ANEXO 1.....                                                                         | 96  |
| Aceite do primeiro artigo ao periódico: <i>Pesquisa Veterinária Brasileira</i> ..... | 96  |
| ANEXO 2.....                                                                         | 98  |
| Normas para submissão ao periódico <i>Journal Applied Microbiology</i> .....         | 98  |
| ANEXO 3.....                                                                         | 114 |
| Normas para submissão ao periódico <i>Food Microbioloy</i> .....                     | 114 |

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

|                 |                                                                 |    |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> | Diagrama de fluxo para a identificação e seleção de estudo..... | 39 |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------|----|

### CAPÍTULO II

|                 |                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> | Diagrama de fluxo para a identificação e seleção de estudo.....                                                                                                                                                                         | 54 |
| <b>Figura 2</b> | “ <i>Forest plot</i> ” do efeito dos probióticos comparados ao grupo controle no tratamento pré e pós-operatório de acordo com o objetivo primário dos ensaios clínicos em pacientes com CCR para infecção incisional.....              | 56 |
| <b>Figura 3</b> | Detecção de bactérias no sangue, de acordo com a administração de probióticos no período perioperatório, comparados ao grupo controle com o objetivo primário dos ensaios clínicos em pacientes com CCR.....                            | 60 |
| <b>Figura 4</b> | Efeito dos probióticos para minimizar complicações na infecção “ <i>Forest plot</i> ”, comparados ao grupo controle no tratamento pré e pós-operatório de acordo com o objetivo primário dos ensaios clínicos em pacientes com CCR..... | 62 |

### CAPÍTULO III

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> | Média e desvio padrão dos resultados para adesão de BAL ao xilol. Simulação da adesividade intestinal.....                                                                                                                                                                                                             | 83 |
| <b>Figura 2</b> | Análise microscópica da adesão <i>in vitro</i> das BAL 133 <sub>V</sub> (A), 137 <sub>V</sub> (B), 57 <sub>V</sub> (C) e 24 <sub>A</sub> (D) às células epiteliais extraídas do intestino delgado de camundongos da linhagem Swiss albino coradas com Gram. As setas indicam a BAL aderida à superfície das células... | 84 |

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

|                 |                                                                                |    |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> | Avaliação da qualidade dos estudos. Artigos não incluídos para metanálise..... | 40 |
| <b>Tabela 2</b> | Dados das exposições avaliadas nos estudos primários.....                      | 42 |

### CAPÍTULO II

|                 |                                                                  |    |
|-----------------|------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> | Resumo das características dos estudos incluídos na revisão..... | 58 |
|-----------------|------------------------------------------------------------------|----|

### CAPÍTULO III

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> | Efeito do suco gástrico simulado em pH 2,5 na viabilidade de 87 BAL durante a incubação de 0, 1 e 3 horas.....                                                                                                                                                                                 | 77 |
| <b>Tabela 2</b> | Efeito simulado das condições do intestino em pH 8,0 ajustado com 0,5% de sais de bile sobre viabilidade de 27 BAL durante a incubação de 0, 2 e 4 horas.....                                                                                                                                  | 78 |
| <b>Tabela 3</b> | Média dos halos de inibição (mm) do teste de antagonismo in vitro de amostras de BAL isoladas de queijo de Coalho artesanal de Pernambuco, contra bactérias reveladoras.....                                                                                                                   | 78 |
| <b>Tabela 4</b> | Atividade antimicrobiana do sobrenadante de BAL isoladas de queijo de Coalho artesanal em condições variadas determinadas pelo método de diluição crítica.....                                                                                                                                 | 79 |
| <b>Tabela 5</b> | Inibição de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 26665, <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 6057 e <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 pelo sobrenadante obtido através de cultivo de BAL, após tratamento realizado com enzima proteolítica para determinação da natureza do composto inibidor..... | 80 |

|                 |                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 6</b> | Efeito do pH e tratamento térmico sobre na ação das bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas frente às bactérias indicadoras <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 26665, <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 6057 e <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633..... | 81 |
| <b>Tabela 7</b> | Diâmetro do halo da sensibilidade ou resistência a antibióticos de BAL.....                                                                                                                                                                                         | 82 |

## 1 INTRODUÇÃO

Um dos processos utilizados para bioconservação em alimentos é a fermentação, que é realizada através do crescimento de micro-organismos, entre os quais estão as bactérias ácido lácticas (BAL) (SALADINO et al. 2016), geralmente reconhecidas como micro-organismos seguros (GRAS) que modificam e melhoram a qualidade do alimento e, além disso, possuem benefícios nutricionais e terapêuticos (YANG et al., 2012; MUÑOZ et al., 2010). Portanto, a segurança alimentar pode ser melhorada usando BAL que podem diminuir o pH através da produção de diversos ácidos orgânicos como produto final (SALVUCCI et al. 2016).

As BAL constituem um grupo heterogêneo de micro-organismos que compartilham muitas características fisiológicas. Elas são caracterizadas por serem bactérias Gram-positivas, catalase negativa, baixo teor de guanina e citosina, não formadoras de esporos e anaeróbias facultativas. Elas são capazes de fermentar os carboidratos em ácido láctico via metabolismo homo ou hetero-fermentativo (SETTANNI e MOSCHETTI, 2010). Deste modo, as homo-fermentativas produzem ácido láctico como produto principal da fermentação da glicose, e as hetero-fermentativas produzem vários produtos além do ácido láctico, incluindo dióxido de carbono, ácido acético e etanol, a partir da fermentação da glicose (CARR et al., 2002).

As BAL são divididas principalmente em quatro gêneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* (Dalié; Deschamps e Richard-Forget, 2010). Além dos gêneros *Oenococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Bifidobacterium*, que também são selecionados para inúmeras aplicações industriais (SETTANNI e MOSCHETTI, 2010; MASOOD et al., 2011).

Segundo Ozcelik, Kuley e Ozogul (2016) as BAL podem crescer a temperaturas de 5 a 45 °C e em pH ótimo entre 5,5 e 6,5. Além disso, têm necessidades nutricionais complexas, que incluem aminoácidos, peptídeos, bases de nucleotídeos, vitaminas, minerais, ácidos graxos e hidratos de carbono.

Outra característica das BAL é o crescimento em meios com elevado teor de sal, sendo uma propriedade desejável para culturas iniciadoras, uma vez que o NaCl é um dos aditivos mais importantes para a conservação de alimentos, permitindo a participação delas em processos fermentativos, na ausência de bactérias

patogênicas ou indesejáveis que não podem crescer na presença de sais (SALVUCCI et al. 2016).

Entre os antagonistas biológicos naturais, as BAL têm várias aplicações potenciais, sendo indicadas por muitas pesquisas por seus efeitos benéficos sobre a saúde em seres humanos. Além disso, estas bactérias têm um longo histórico de uso em alimentos, por produzirem alguns compostos antagonistas, elas são capazes de controlar as bactérias patogênicas e a deterioração indesejável da microbiota intestinal (DALIÉ; DESCHAMPS e RICHARD-FORGET, 2010).

Assim, as BAL são úteis para seres humanos e animais, em muitos aspectos, estes incluem prevenção de diarreia, redução da intolerância à lactose, papel no tratamento da úlcera, estímulo da imunidade, tanto a nível intestinal e sistêmico, atividade antifúngica, papel na prevenção de doenças infecciosas, papel na alergia, efeitos benéficos sobre a incidência de câncer de cólon, retardo na progressão do câncer, bem como prevenção de úlcera (MASOOD et al., 2011).

A fim de atuar como um probiótico no trato gastrointestinal, o micro-organismo deve ser capaz de sobreviver às condições ácidas do estômago e resistir a ácidos biliares presentes no início do intestino delgado. Outras propriedades funcionais usadas para caracterizar os probióticos são a produção de compostos antimicrobianos; tais como ácido lático, ácido acético, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (MONTEAGUDO-MERA et al., 2012), e a adesão ao tecido intestinal (ARGYRI et al. 2013).

O desenvolvimento de produtos lácteos com propriedades probióticas são de extrema importância para o desenvolvimento econômico regional. Além disso, a demanda por estes alimentos, devido aos seus benefícios nutracêuticos e funcionais agregados à vida do consumidor, tem aumentado ao longo do tempo. Sendo assim, objetivando agregar valor na produção de laticínios no estado de Pernambuco, tal como o queijo de Coalho artesanal e/ou o processo de confecção, é que se torna essencial o conhecimento da microbiota láctica presente neste alimento, uma vez que importantes bacias leiteiras estão no estado, onde a produção do queijo de coalho recebe destaque como fonte geradora de renda.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Queijo de Coalho

O leite é matéria prima por excelência para a fabricação de produtos lácteos, e dentre estes produtos, o queijo desponta como sendo o mais reconhecido e valorizado agente nutritivo, sendo capaz, pela sua diversidade, de promover a união entre os povos, uma vez que, em cada tipo produzido há uma essência cultural de quem o fabrica no seu processo. Da mesma forma, ocorre com o queijo de Coalho, cuja produção, artesanal ou não, está enraizado no seu modo de fazer a uma herança cultural, passada de geração em geração (DANTAS 2012).

Segundo Paquereau (2016) em Pernambuco, é provável que a prática de se fazer o queijo de Coalho se desenvolveu pelas dificuldades de guardar e distribuir o leite para outras regiões deficitárias. A tecnologia inicial foi trazida pelos colonizadores, ganhou a sua especificidade local ao longo do tempo e passou de geração em geração criando tradições familiares.

Consequentemente, o método de produção do queijo de Coalho, que segue uma tradição familiar histórica, foi ao longo do tempo, sofrendo algumas modificações devido às exigências da segurança alimentar. Dentro do estado de Pernambuco, existe, desde o ano 2000, uma preocupação em preservar o patrimônio imemorrável que é o queijo de Coalho, a partir da conscientização da importância do produto, forte pilar de sustentação econômica da região, para a agricultura familiar dentro do Estado (PAQUEREAU, 2016).

Segundo Dantas (2012) apesar das exigências legais estabelecidas, o queijo de Coalho é produzido, na grande maioria, a partir de leite de vaca cru e por não necessitar de equipamentos caros, é processado de formas variadas obtendo-se diferentes tipos como resultado das mudanças particulares que cada fabricante faz nas etapas do processo de fabricação e do tratamento a que submetem o leite. Para alguns, essa produção rompe com os padrões formais especificados nas normativas vigentes, constituindo em uma inversão ou subversão. Para outros, a produção de queijos artesanais oferece oportunidades de trabalho e renda e está incorporada na alimentação cotidiana da população, suscitando movimentos que almejam valorizar esse alimento com identidade própria (MENEZES, 2011).

Silva et al. (2012), estudaram a diversidade bacteriana presente no queijo de Coalho artesanal de Pernambuco, sempre associando um ecossistema complexo às características organolépticas diferenciadas nos produtos artesanais, e verificaram que os principais gêneros de bactérias ácido-láticas estavam presentes e formavam uma comunidade estrategicamente organizada nesse produto.

## **2.2 Bactérias ácido láticas**

As bactérias ácido láticas podem ser o grupo mais numeroso de bactérias ligadas aos seres humanos. Essas estão naturalmente associadas às superfícies mucosas, principalmente do trato gastrointestinal, e também, estão habitualmente relacionadas com a alimentação (MAKAROVA e KOONIN, 2007).

Graças a algumas de suas propriedades metabólicas, as BAL são geralmente empregadas porque contribuem significativamente para o sabor, textura, valor nutricional e segurança microbiológica de alimentos fermentados. Por estas razões, encontram diversas aplicações industriais (SETTANNI E MOSCHETTI, 2010). Para tanto, certas cepas, principalmente aquelas de gênero *Lactobacillus*, estão cada vez mais sendo comercializadas, caracterizadas como as bactérias probióticas de promoção à saúde (SAVIJOKI, INGMER e VARMANEN, 2006).

Em razão da sua importante aplicação como fermentos, especialmente na indústria de alimentos, as bactérias ácido láticas têm sido intensamente estudadas como agentes bioprotetores (PEYER et al. 2016). Uma boa seleção desses micro-organismos pode permitir o controle do crescimento de fungos e melhorar a vida útil de muitos produtos fermentados e, por conseguinte, reduzir os riscos para a saúde, devido à exposição à micotoxinas. Três mecanismos podem explicar a eficácia antimicrobiana das BAL: (1) a produção de ácido orgânico, (2) competição por nutrientes e (3) produção de compostos antagônicos (DALIÉ, DESCHAMPS E RICHARD-FORGET, 2010).

Propriedades antagonistas de bactérias láticas aliadas à sua história de uso seguro em alimentos fermentados tradicionais tornaram-nas muito atraentes para serem usadas como bioconservantes. As BAL apresentam-se como um grupo interessante quanto a sua eficácia antimicrobiana que pode representar uma boa alternativa na substituição do uso de antibióticos nos alimentos (PARADA et al., 2007).

Sem dúvida, o emprego mais importante da BAL é a sua utilização como cepas iniciadora na fabricação de diversos produtos lácteos fermentados, em particular, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* (SAVIJOKI, INGMER E VARMANEN, 2006). Entretanto, espécies como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* também possuem importante valor comercial para a indústria alimentícia, devido ao emprego na produção de leites fermentados e como culturas iniciadoras na fabricação de queijos para a melhoria da qualidade (BURITI e SAAD, 2007). Além disso, esse potencial probiótico ultrapassa aplicações como culturas adjuntas em vários tipos de produtos alimentícios, por apresentarem preparações terapêuticas (ALMEIDA JR. et al. 2015).

Portanto, determinados estudos mostram que o consumo de BAL implica no transporte reduzido de micro-organismos patogênicos, além de diminuir certos fatores de risco para doença arterial coronária (SHEHATA et al. 2016). Segundo García-Hernandéz et al. (2016) as BAL podem aderir e sobreviver no trato gastrointestinal, onde atuam sobre a estabilidade e a proteção deste ecossistema. Essas bactérias contribuem para o sistema digestivo e os processos do metabolismo, assim como para a modulação da resposta imune local e sistêmica. As BAL exercem o seu efeito probiótico *in vivo* não só através da secreção de substâncias antimicrobianas, mas também através das suas propriedades de adesão a células epiteliais definidos de vários critérios que as cepas probióticas podem desempenhar (DIEPERS et al., 2016).

Todavia, os mecanismos de adesão não estão totalmente compreendidos. Apesar das novas metodologias sofisticadas, a capacidade de adesão bacteriana é mais comumente estudada *in vitro* com linhagens de células epiteliais, muco intestinal imobilizado ou moléculas de matriz extracelular. As bactérias proliferativas competem com patógenos invasores por locais de ligação às células epiteliais e ao glicocálice (MORROW et al., 2012; ARGYRI et al. 2013). Sendo assim, um dos fatores responsáveis pela ação das bactérias patogênicas no trato gastrintestinal se refere a sua capacidade de competição por receptores específicos presentes na mucosa intestinal. Uma das ações atribuídas aos probióticos, em especial aos *Lactobacillus*, é a capacidade de aderência a esses receptores, não sendo eliminados pelos movimentos peristálticos e impedindo que bactérias patogênicas

como *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli* desempenhem seu efeito enteropatogênico (MORAIS E JACOB, 2006).

Portanto, é cada vez mais evidente que os probióticos possam proporcionar efeitos benéficos mesmo sem verdadeira colonização do trato gastrointestinal. Algumas bactérias probióticas passam a fazer parte da microbiota intestinal estabelecida, enquanto outras temporariamente remodelam ou influenciam a comunidade microbiana, exercendo efeitos transitórios somente quando passam (OHLAND e MACNAUGHTON, 2010; ARGYRI et al. 2013).

### **2.3 Microbiota intestinal e probióticos**

O intestino humano é um ecossistema extremamente complexo, onde microbiota, nutrientes e células hospedeiras interagem extensivamente, entretanto, a importância da microbiota para a saúde humana foi subestimada durante décadas, apesar dos grandes avanços em microbiologia. As relações micro-organismo/hospedeiro foram, durante muito tempo, consideradas apenas do ponto de vista patogênico, porque algumas bactérias podem produzir toxinas, invadir a mucosa intestinal, translocar e disseminar, causando infecções sistêmicas (PEREZ, MENEZES e D'ACÂMPORA, 2014; BUTEL 2014).

O termo microbiota intestinal refere-se ao ecossistema essencialmente bacteriano que reside normalmente nos intestinos do homem. É constituído por microbiota nativa (autóctones) e de transição temporária (alóctones), sendo considerado como um dos ecossistemas mais complexos, com cerca de 1.000 bactérias distintas (BARBOSA et al. 2010; PAIXÃO e CASTRO, 2016). Esta microbiota muito complexa é reconhecida como um elemento ativo da fisiologia do intestino, com muitas funções das quais as principais são: metabólica, efeito barreira, e funções tróficas (BUTEL 2014). Para Perez, Menezes e d'Acâmpora (2014) os três níveis de funções benéficas da microbiota para o hospedeiro ocorrem da seguinte forma: (a) escudo biológico, exercendo função de barreira ativa contra o estabelecimento de microbiota patogênica; (b) atividade trófica, como o estímulo à angiogênese pelas células de Paneth e ao sistema imune local e sistêmico. (c) metabólicas, explicadas pela fermentação de alimentos residuais inabsorvíveis, matéria orgânica derivada do próprio hospedeiro, como células descamadas de epitélios e secreções, e metabólitos produzidos pela própria microbiota, resultando na produção de ácidos graxos de cadeia curta, vitaminas (K, B12, folato, biotina,

riboflavina), substratos energéticos como ácido butírico, propiônico e acético para o consumo de colonócitos, hepatócitos e tecidos periféricos, respectivamente.

Antes do nascimento, não há micro-organismos presentes no trato gastrointestinal, mas a colonização ocorre rapidamente durante o parto (Binns 2013). No nascimento, essa microbiota é adquirida no canal do parto, e sua composição definitiva é obtida em torno dos dois anos de idade acompanhando o homem pelo resto de sua vida (Barbosa et al. 2010). Existem evidências de que a seleção bacteriana inicial seja em parte determinada geneticamente. O papel do genótipo do hospedeiro é importante para determinar o padrão de colonização relativo à disponibilidade e qualidade dos sítios de adesão na mucosa intestinal (Leite et al. 2014).

A maior concentração de micro-organismos e atividade metabólica é encontrada no intestino grosso, sendo que a partir do íleo a concentração de bactérias aumenta gradualmente, alcançando  $10^{11}$  a  $10^{12}$  UFC/g no cólon (Bedani e Rossi, 2009). Contudo, embora a microbiota intestinal não inclua micro-organismos de outras partes do tubo digestivo, várias espécies de bactérias mais tolerantes à acidez gástrica são encontradas nesse órgão (Barbosa et al. 2010).

Uma explicação para a afirmativa é que os micro-organismos não colonizam o estômago em grandes quantidades, devido ao baixo pH e ao trânsito rápido desse órgão. Logo, no estômago de um adulto saudável, o número dessas bactérias pode ser de  $10^3$  UFC/mL, sendo os principais habitantes os lactobacilos, enterococos, helicobactérias e bacilos (Binns, 2013). Tem-se estabelecido, experimentalmente, que uma população microbiana no trato digestivo só tem efeito no hospedeiro quando ela está presente em níveis maiores que  $10^7 - 10^8$  UFC/g de conteúdo. Abaixo destes valores, a quantidade de metabólitos produzidos é insuficiente para sua ação (Barbosa et al. 2010).

De acordo com Paixão e Castro (2016) a aderência de alguns micro-organismos na parede do intestino é um importante elemento que controla a composição das comunidades epiteliais e do lúmen. Certas bactérias apresentam estruturas de adesão diferentes na sua superfície, citadas como adesinas, as quais possibilitam o reconhecimento nos enterócitos da mucosa, sendo possível dessa forma, a adesão da bactéria na parede do intestino e possibilitando a sua multiplicação. Neste sentido, os probióticos auxiliam a recompor a microbiota intestinal, através da adesão e colonização da mucosa intestinal, ação esta que

impede a adesão e subsequente produção de toxinas ou invasão das células epiteliais (dependendo do mecanismo de patogenicidade) por bactérias patogênicas (SAAD, 2006).

O trato gastrointestinal (TGI) contribui para melhorar a saúde de numerosas maneiras, que vai além da digestão dos alimentos e absorção de nutrientes. Comunidades microbianas residentes no TGI são grandes e complexas, e desempenham um papel importante na manutenção da homeostase intestinal e regulação do sistema imunológico, bem como influenciam o desenvolvimento do hospedeiro e sua fisiologia (PATURI et al. 2015). Para tanto, a sobrevivência e colonização de bactérias probióticas no TGI são propriedades essenciais que conferem benefícios à saúde do indivíduo (REN et al. 2014).

Uma microbiota normal não é simplesmente uma coleção de micro-organismos, mas reflete uma inter-relação entre diferentes grupos que, possivelmente, trabalham juntos para beneficiar o hospedeiro. Além disso, acredita-se que a existência de uma grande diversidade de organismos no TGI seria benéfica (Binns 2013). Para tanto, é importante compreender a influência dos probióticos sobre a composição bacteriana do intestino, uma vez que as alterações podem conduzir a certas desordens metabólicas (PAJARILLO et al. 2015).

Uma das primeiras recomendações para uso probiótico foi o tratamento e/ou prevenção de diarreia (BUTEL 2014). Deste modo, é plausível constatar o grande papel da utilização de probióticos no controle e regeneração da microbiota. Uma vez que comprovada a eficiência dos probióticos na prevenção e tratamento de diarreia associada aos antibióticos, principalmente após longa exposição (PAIXÃO e CASTRO 2016). Entretanto, alguns probióticos parecem ser mais eficazes na melhora dos sintomas quando a diarreia resulta de infecção viral (e não bacteriana), caso sejam usados no início da infecção e em quantidades suficientes (BINNS 2013).

Para Savino et al. (2015) os probióticos podem exercer uma ação direta sobre a composição microbiana do intestino, influenciando os resultados clínicos em gastroenterologia pediátrica, por exemplo. Estas doenças incluem enterocolite necrosante, diarreia associada a antibióticos e colite, cólica infantil, gastroenterite aguda e síndrome do intestino irritável. Portanto, através dos probióticos há uma estimulação da produção de citocinas imunomoduladoras que podem modular ou limitar a extensão de um processo inflamatório intestinal (NOGUEIRA e

GONÇALVES, 2011). Por consequência, a microbiota intestinal e a resposta imune passam a ser as duas categorias utilizadas para tratamentos relacionados ao TGI (PAIXÃO e CASTRO, 2016).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Caracterizar quanto a viabilidade probiótica bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanal produzido em Pernambuco.

#### 3.2 Específicos

- Analisar os critérios de funcionalidades das BAL através da contagem de células viáveis frente aos efeitos baixos valores de pH e da presença de sais de bile;
- Avaliar a capacidade antagonista das BAL contra os micro-organismos indicadores *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pseudomonae* ATCC 26665, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Listeria innocua* ATCC 33090;
- Comprovar a capacidade hidrofóbica das bactérias ácido lácticas frente ao solvente orgânico xilol;
- Determinar a resistência das BAL frente aos antimicrobianos Rifampicina 5 µg, Tetraciclina 30 µg, Penicilina 10U, Ciprofloxacina 5 µg, Estreptomicina 10 µg, Cefalexina 30 µg, Ampicilina 10 µg e Gentamicina 10 µg;
- Analisar a ação de substâncias inibidoras de patógenos produzidas pelas bactérias ácido lácticas;
- Avaliar a capacidade de adesão das bactérias ácido lácticas às células epiteliais extraídas de intestino delgado de camundongo Swiss albino.

## 4 REFERÊNCIAS

- ALWAN, A. et al. (1998) Quantitative assay of *Salmonella* adherence to intestinal epithelial cells: A new method for assessing novel intervention products. **Journal of Microbiological Methods**. 33:163-170.
- ARGYRI, A. A.; ZOUMPOPOULOU, G.; KARATZAS, K. A. G. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. **Food microbiology**. 33:282–91.
- BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. (2007) Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**. 57:373-380.
- COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. (2004). Probiotics and immune response. **Ciência Rural, Santa Maria**. 34:1297-1303.
- DALIÉ, D. K. D.; DESCHAMPS, A. M.; RICHARD-FORGET, F. (2010). Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. **Food Control**. 21:370-380.
- DIEPERS, A-C.; KROMKER, V.; ZINKE, C.; WENTE, N.; PAN, L.; PAULSEN, K. E PADUCH, J-H. (2016). *In vitro* ability of lactic acid bacteria to inhibit mastitis-causing pathogens. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**. 1-9.
- FUJIWARA, D.; INOUE, S.; WAKABAYASHI, H.; FUJII, T. (2004). The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression. **International Archives of Allergy and Immunology**. 135:205-215.
- GARCÍA-HERNÁNDEZ, Y.; PÉREZ-SÁNCHEZ, T.; BOUCOURT, R.; BALCÁZAR, L. J.; NICOLI, J. R.; MOREIRA-SILVA, J.; RODRÍGUEZ, Z.; FUERTES, H.; NUÑEZ, O.; ALBELI, N. E HALAIHEL, N. (2016) **Research in Veterinary Science**. 108:125-132.
- GUO, C. F. et al. (2012). Screening for cholesterol-lowering probiotic based on deoxycholic acid removal pathway and studying its functional mechanisms *in vitro*. **Anaerobe**. 18:516-522.

- LEANDRO, E. S.; LIMA, G. K.; CARVALHO, A. F.; PEREIRA, O. G.; MORAES, C. A. (2014). Flow cytometric assessment of *Lactococcus lactis* isolates viability after lyophilization. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**. 3:391-396.
- MAKAROVA, K. S.; KOONIN, E. V. (2007). Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. **Journal of Bacteriology**. 189:1199-1208.
- MASOOD, M. I.; QADIR, M. I.; SHIRAZI, J. H.; KHAN, I. U. (2011). Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. **Critical Reviews in Microbiology**. 37:91-98.
- MONTEAGUDO-MERA, A.; RODRÍGUEZ-APARICIO, L.; RÚA, J.; MARTÍNEZ-BLANCO, H.; NAVASA, N.; GARCÍA-ARMESTO, M. R.; FERRERO, M. A. (2012). In vitro evaluation of physiological probiotic properties of diferente lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. **Journal of functional foods**. 4:531-541.
- MORAIS, M. B., JACOB, C. M. A., (2006). The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. **Jornal de Pediatria**. 82:S189-197.
- Morrow, L.E., Gogineni, V., Malesker, M.A., (2012). Probiotics in the intensive care unit. **Nutr. Clin. Pract.** 27:235-241.
- Muñoz, R.; Arena, M. E.; Silva, J.; González, S. N. (2010). Inhibition of mycotoxin-producing *Aspergillus nomius* VSC 23 by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Microbiology**. 41:1019-1026.
- NCCLS (2003).Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard (8th ed.), Wayne, **PA: NCCLS document M2-A8**. NCCLS.
- NG, S. C.; HART, A. L.; KAMM, M. A.; STAGG, A. J.; KNIGHT, S. C. (2009). Mechanisms of action of probiotics: recent advances. **Inflamm Bowel Dis**. 15:300-310.
- OELSCHLAEGGER, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions – A review. **International Journal of Medical Microbiology**. 300:57-62.
- OHLAND, C.L., MACNAUGHTON, W.K., (2010). Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol**. 298:807-819.

- OLIVEIRA-SERQUEIRA, T. C. G.; RIBEIRO, C. M.; GOMES, M. I. F. V. (2008). Probiotics as potential biotherapeutic agentes targeting intestinal parasites. **Ciência Rural**, Santa Maria. 38:2670-2679.
- PARADA, J. L.; CARON, C. R.; MEDEIROS, A. B. P.; SOCCOL, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. **Braz. arch. biol. technol.** 50:512-542.
- PERDIGÓN, G.; GALDEANO, C. M.; VALDEZ, J. C.; MEDICI, M. (2002) Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. **European Journal of Clinical Nutrition**. 56:S21-S26.
- SAVIJOKI, K.; INGMER, H.; VARMANEN, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Appl Microbiol Biotechnol**. 71:394-406.
- SETTANNI, L; MOSCHETTI, G. (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**. 27:691-697.
- SHEHATA, M. G.; EL SOHAIMY, S. A.; EL-SAHN, M. A. E YOUSSEF, M. M. (2016). Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. **Annals of Agricultural Science**. 61:65-75
- TANJA, L. et al. (2010) Probiotic properties of *Lactobacillus* isolates originating from porcine intestine and feces. **Anaerobe**. 16: 293-300.
- THIRABUNYANON, M.; THONGWITTAYA, N. (2012). Protection activity of a novel probiotic strain of *Bacillus subtilis* against *Salmonella Enteritidis* infection. **Research in Veterinary Science**. 93:74-81.
- TSAI, Y. T.; CHENG, P. C.; PAN, T. M. (2012). The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. **Appl Microbiol Biotechnol**. 96:853-862.
- VARAVALLO, M. A.; THOMÉ, J. N.; THESHIMA, E. (2008). Application of probiotic bacteria for prevention and treatment of gastrointestinal diseases. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. 29:83-104.
- VILLENA, J.; VIZOSO-PINTO, M. G.; RODRIGUEZ, V.; SALVA, S.; ALVAREZ, S.; KITAZAWA, H. (2013). Modulation of mucosal antiviral immune response by immunobiotic lactic acid bacteria – Part I: the intestinal mucosa. **Microbial**

**pathogens and strategies for combating them:** science, technology and education. 1805-1813.

XIE, N.; ZHOU, T.; LI, B. (2012). Kefir yeasts enhance probiotic potentials of *Lactobacillus paracasei* H9: The positive effects of coaggregation between the two strains. **Food Research International**. 45:394-401.

YANG, E.; FAN, L.; JIANG, Y.; DOUCETTE, C.; FILLMORE, S. (2012). Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. **AMB Express a Springer Open Journal**. 2:1-12.

ZAMFIR, M.; CORNEA, C. P.; VUYSR, L.; GROSU-TUDOR, S. S. (2014). Biodiversity and biotechnological potential of lactic acid bacteria. **Agro Life Scientific Journal**. 3:169-176.

ZOUMPOPOULOU, G.; FOLIGNE, B.; CHRISTODOULOU, K.; et al. (2008) *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. **International Journal of Food Microbiology**. 121:18–26.

## CAPÍTULO 1

Artigo aceito pelo periódico

*Pesquisa Veterinária Brasileira*

Qualis A2 – Manuscrito ID PVB 4866.R1

## **Podem as bactérias ácido lácticas probióticas apresentarem efeito antitumoral em modelo animal de câncer de cólon? Uma revisão sistemática da literatura**

P.R.A. Calaça<sup>1,2</sup>, R.P. Bezerra<sup>1,2</sup>, A.L.F. Porto<sup>1,2,3</sup>, M.T.H. Cavalcanti<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco – Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>2</sup> Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ), Universidade Federal Rural de Pernambuco – Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>3</sup> Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Brazil

### **RESUMO**

O Câncer de cólon é um dos tipos mais comuns de câncer no mundo e a segunda principal causa de morte relacionada a esta doença em países desenvolvidos. Até 75% dos casos estão associados com a alimentação, indicando que uma pessoa pode reduzir o seu risco simplesmente através de modificação na dieta. Estudos em animais demonstram que várias cepas de bactérias ácido lácticas protegem contra o câncer de cólon em roedores, embora os dados em humanos sejam limitados e conflitantes. O objetivo deste estudo foi investigar a eficácia das bactérias ácido lácticas no tratamento e redução do câncer de cólon em modelo animal. Foram realizadas buscas sistemáticas em bases de dados eletrônicas alcançando 1079 artigos relacionados, entretanto apenas 6 artigos foram eleitos de acordo com os critérios de elegibilidade para análise. Todos os artigos avaliados apresentaram resultados satisfatórios quanto à inibição do câncer de cólon em ratos e camundongos ao utilizarem cepas predominantemente do gênero *Lactobacillus*. Este estudo pode responder a hipótese de que as bactérias ácido lácticas apresentam efeito preventivo e antitumoral contra o câncer de cólon.

**Palavras-chave:** Bactérias ácido lácticas. Probióticos. Câncer de cólon. Revisão sistemática.

## 1 INTRODUÇÃO

O Câncer de cólon é um dos tipos mais comuns de câncer no mundo e a segunda principal causa de morte relacionada a esta doença em países desenvolvidos (Asha & Gayathri 2012). Segundo o Instituto Nacional do Câncer – INCA (Brasil 2014), a estimativa no Brasil é para 15.070 novos casos de câncer de cólon e reto em homens e 17.530 em mulheres. Um risco estimado de 15,44 casos novos a cada 100 mil homens e 17,24 a cada 100 mil mulheres. A dieta contribui para esta estimativa. Até 75% dos casos estão associados com a alimentação, indicando que uma pessoa pode reduzir o seu risco simplesmente através de modificação na dieta (Chen et al. 2012). De acordo com Lee et al. (2008) apesar dos avanços recentes na compreensão dos processos biológicos resultantes do desenvolvimento do câncer, continua a existir uma necessidade de agentes novos e eficazes para controlar a doença.

Os probióticos são as culturas vivas de organismos benéficos que estimulam seletivamente o crescimento de bactérias nativas no intestino, beneficiando assim o hospedeiro (Asha & Gayathry 2012). A maioria dos probióticos disponíveis no mercado são as bactérias ácido lácticas (BAL), tais como *Lactobacillus* e *Streptococcus* que apresentam propriedades de sobrevivência no intestino definidas e atividades biológicas associadas, além disso podem ser ingeridos em produtos lácteos fermentados ou como um suplemento (Kumar et al. 2012, Desrouillères et al. 2015). As BAL são úteis para os seres humanos e animais, em muitos aspectos estes incluem prevenção de diarreia, estímulo da imunidade, tanto a nível intestinal e sistêmico, papel na prevenção de doenças infecciosas, bem como nos efeitos sobre a incidência de câncer de cólon e no retardo da progressão do câncer (Massood et al. 2011). Estudos em animais demonstram que vários isolados de BAL protegem contra o câncer de cólon em roedores, embora os dados humanos sejam limitados e conflitantes. A maioria dos ensaios humanos relata que as cepas testadas podem exercer efeitos anticancerígenos, diminuindo a atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase (Asha & Gayathry 2012). Portanto, o desenvolvimento do tumor pode ser devido a alterações na célula epitelial induzida pela  $\beta$ -glucuronidase que entra no intestino, e onde a microbiota normal tem o importante papel de desconjugar este composto por enzimas sintetizadas por micro-organismos do intestino, sendo as BAL importantes neste papel (Rachid et al. 2002).

Acredita-se que os Focos de Criptas Aberrantes (ACF), ou pelo menos alguns deles, podem ser precursores de câncer colorretal. A maior concentração de câncer, em humanos, coincide com áreas mais distais do cólon, em que o câncer colorretal é mais frequente. Esta mesma situação foi verificada em animais, quando adenocarcinomas foram induzidos em cólon de ratos. O tamanho destas lesões tende a aumentar com o tempo. A presença de displasias foi um marco na evolução destas lesões para a progressão neoplásica (Ogata et al. 2010). O câncer de cólon pode ser induzido em roedores por meio da aplicação de diversos carcinógenos químicos, um deles, a 1,2-dimetilhidrazina (DMH), que é um agente carcinogênico completo, por induzir as etapas de iniciação e promoção em estudos do câncer de cólon por apresentar alta especificidade para várias espécies de roedores (Newell & Heddle 2004, Tanaka 2009, Femia 2010).

Os ACF induzidos por DMH são estabelecidos como um substituto biomarcador de câncer de cólon, considerando sua alta correlação com a carcinogênese e sua recapitulação de características patológicas e moleculares de pacientes potenciais com este câncer (Zhu et al. 2014). O câncer de cólon induzido por DMH experimental em ratos é um processo prolongado de múltiplos estágios, apresentando características de cinética celular, molecular e histopatológica da tumorigênese que imita o câncer colorretal humano (Kumar et al. 2012). Além da redução e /ou a inibição da formação de ACF, outros mecanismos são investigados quanto aos efeitos quimiopreventivos relativo de agentes dietéticos contra carcinogênese colorretal (Desrouillères et al. 2015).

Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a eficácia das BAL com características probióticas no tratamento e redução do câncer de cólon em modelo animal, uma vez que não há documentos exaustivos que relatem a experiência. Portanto, toda a informação relevante sobre este tema tem sido reunida e analisada com o objetivo de esclarecer o papel dos probióticos na saúde humana e animal, identificando as lacunas na base de conhecimento existente, e determinar a qualidade dos estudos realizados sobre o conteúdo abordado.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Diretrizes**

Para a realização da revisão sistemática, foram seguidas as diretrizes estabelecidas pelo PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*) (Moher et al. 2009).

### **2.2 Critérios de elegibilidade**

Os artigos considerados elegíveis para inclusão na revisão foram aqueles que apresentaram estudos originais realizados com animais (ratos *Wistar* e camundongos albino *Swiss*, *C57/bl6* e *Balb/c*), publicados em inglês, espanhol ou português no período de 2005 a 2015, que relacionassem a administração de bactérias ácido lácticas probióticas no tratamento e redução do câncer de cólon.

Os artigos não originais foram excluídos (revisões, editoriais, cartas, comentários e capítulos de livros), bem como estudos com outros animais que não fossem os descritos pelo critério de elegibilidade, estudos com ratos e/ou camundongos fêmeas gestantes e estudos que não identificassem a dosagem de probiótico administrada. Trabalhos experimentais com modelo celular de câncer de cólon encontrados foram utilizados, apenas, na discussão dos resultados.

### **2.3 Fonte de informação e identificação do estudo**

Foi realizada uma busca sistemática a fim de identificar evidências sobre a eficácia das bactérias ácido lácticas com características probióticas na redução do câncer de cólon em modelo animal. Utilizou-se bases de dados eletrônicas incluídas na PubMed, Science Direct, LILACS, Scielo e Scopus. Os termos de pesquisa utilizados foram: “probiotic”, “acid lactic bacteria” e “colon cancer”. Os termos foram cruzados um com o outro para conseguir maior abrangência e relevância dos resultados.

Os artigos identificados através da estratégia de busca foram avaliados de forma independente. A fase inicial de seleção dos artigos consistiu na análise dos títulos, seguida da análise de resumos e por fim realizada a leitura integral dos estudos para verificar os critérios de elegibilidade.

Com o objetivo de facilitar a coleta de dados e determinar a inclusão ou exclusão dos estudos com maior confiabilidade, a dúvida clínica foi estruturada

conforme o acrônimo PECO, onde P- Pacientes: Ratos e/ou camundongos; E- Exposição: Animais que receberam suplementação com bactérias ácido lácticas probióticas (independente da natureza, modo de preparo e dosagem); C- Controle: Animais que receberam nutrição normal e/ou leite; O-desfecho (*Outcome*): mortalidade global (Brasil, 2012).

## **2.4 Método específico para a revisão sistemática**

Os populares métodos de funil para testar viés de publicação na metanálise são inadequados e potencialmente enganosos quando o número de estudos incluídos é pequeno e a heterogeneidade é grande (Engels et al. 2000, Macaskill et al. 2001). No entanto, os estudos selecionados para a revisão sistemática, foram avaliados quanto à qualidade utilizando os princípios do programa de habilidades de avaliação crítica para esta ferramenta de estudo (CASP 2014, Baglioni et al. 2016), como relatado na Tabela 1.

Este instrumento é projetado para o julgamento da qualidade do estudo de uma forma sistemática e transparente. O julgamento de qualidade é, assim, derivado através de um conjunto de questões metodológicas padronizadas aplicadas a todos os estudos em questão. Para os fins do presente estudo, perguntas foram escolhidas para a avaliação da qualidade com foco nos seguintes temas: questão de pesquisa; recrutamento; características do grupo de controle; rigor nas medidas de pesquisa; e fatores de confusão.

## **3 RESULTADOS**

### **3.1 A revisão sistemática**

A busca nas bases de dados ScienceDirect, Pubmed e Scopus, alcançaram 580, 108 e 391 artigos, respectivamente, totalizando 1079 artigos, como mostra a figura 1. Os artigos que não se enquadravam nos critérios de elegibilidade foram excluídos, perfazendo 1068. As bases de dados LILACS e Scielo não apresentaram artigos durante a busca sistemática.

Por meio da pesquisa nas bases de dados obteve-se 6 artigos completos para análise, sendo estes ensaios clínicos randomizados e não randomizados, descritos em idioma inglês. Os anos de publicação variaram de 2009 a 2015, publicados em

revistas de alto impacto. O número amostral de animais variou de 17 a 56, com uma média de 39,5.

### 3.2 Redução do câncer de cólon

Os artigos utilizaram predominantemente o gênero *Lactobacillus* para análise do efeito no tratamento do câncer e seu potencial antitumoral em ratos e camundongos. A maioria dos animais teve o câncer de cólon induzido por DMH (Brasil, 2012, Kumar et al. 2012, Zhu et al. 2014).

Asha e Gayathry (2012) utilizaram cepas de *Lactobacillus fermentum* e *L. plantarum* por 21 dias administrando doses diárias de  $2 \times 10^8$  UFCg<sup>-1</sup> em camundongos albinos *Swiss* alcançando resultados de 87,5% e 77,5% no decréscimo de ACF distribuídas na parte distal do cólon, respectivamente (Tabela 2). Chen et al. (2012) conseguiram uma redução do tumor de 50,3% ao ingerir  $1 \times 10^8$  UFC/g de *Lactobacillus acidophilus* em camundongos Balb/c por 28 dias, corroborando com os resultados de Desrouillères et al. (2015) que ao utilizarem *L. acidophilus*, *L. casei* ou *L. rhamnosus* em doses diárias de  $1 \times 10^9$  UFC/mL de leite durante 15 dias obtiveram 47% na redução das criptas aberrantes. Do mesmo modo, Zhu et al. (2014) obtiveram uma redução de 40% do tumor, bem como o decréscimo do ACF quando administraram  $2 \times 10^9$  UFC/g de *L. salivarius* em ratos por 105 dias,. Kumar et al. (2012) inocularam  $10^9$  UFC/mL de *L. plantarum* por 182 dias e conseguiram uma redução de 42,13% no número médio de tumor por ratos, além de 50,96% de inibição na peroxidação de ácido linoléico. Urbanska et al. (2009) associaram à dieta de camundongos  $10^{10}$  UFC/mL de *L. acidophilus* para 2% de iogurte em 140 dias de administração do probiótico e relataram redução de 46% no número de adenomas.

### 3.3 Ingestão de probióticos e ganho de peso corporal

Urbanska et al. (2009) verificaram que para os camundongos tratados *L. acidophilus*, o peso corporal manteve-se constante durante 17 dias em relação ao grupo de animais controle, minimizando a inflamação intestinal e retardando a progressão de adenomas. Kumar et al. (2012) observaram que uso de *L. plantarum* na alimentação dos animais tratados resultou em um aumento significativo no ganho de peso em comparação ao grupo não tratado. Este aumento de peso pode ser devido à absorção aumentada de produtos alimentares, cerca de 10%. A

administração de *L. fermentum* nos animais aumentou em média 6 g do peso corporal, assim como foi evidenciado que no grupo de animais pré-cancerígenos, o aumento de peso mostrou-se maior em relação ao grupo de animais pós-cancerígenos, onde o acréscimo do peso corporal foi relativamente mais baixo (Asha & Gayathri 2012).

### **3.4 Efeito das bactérias probióticas na atividade da $\beta$ -glucuronidase**

Asha e Gayathry (2012) relataram que a atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase foi significativamente reduzida em todos os grupos experimentais, em comparação com os ratos alimentados com a dieta controle. Sendo assim, os animais tratados com *L. fermentum* obtiveram uma redução de 70,4% na atividade da enzima. Uma significativa redução da atividade da  $\beta$ -glucuronidase foi observada apenas nos grupos pré-carcinógenos tratados com o probiótico, enquanto que a diminuição foi menor em animais pós-carcinógenos tratados com o mesmo micro-organismo. Desrouillères et al. (2015) observaram que a atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase foi reduzida em 49% com administração de *L. acidophilus* quando comparada ao grupo controle.

## **4 DISCUSSÃO**

Apesar do crescente número de estudos realizados em modelos animais relacionando o uso de probióticos, é importante destacar que a relativa escassez de estudos realizados sobre o uso de animais e o câncer de cólon, bem como estudos realizados em humanos, a heterogeneidade observada nos estudos sobre as doses administradas, tamanho amostral e duração do tratamento são fatores limitantes. Estudos experimentais em modelo animal podem contribuir para um melhor tratamento em relação ao câncer de cólon, colaborando para qualidade de vida e auxiliando a rotina médica.

Thirabonyanon et al. (2009) relatam que a aplicação de probióticos como um alimento funcional é importante para aumentar continuamente a saúde humana a cada ano. Embora os mecanismos precisos pelos quais BAL inibem câncer de cólon não sejam completamente conhecidos, vários mecanismos têm sido propostos: (a) o aumento da resposta imune do hospedeiro, (b) potenciais agentes cancerígenos degradantes, (c) alterações na microbiota intestinal que produzem carcinógenos, (d)

a produção de compostos anti-tumorigênicos ou anti-mutagênicos no cólon, e (e) alteração das atividades metabólicas intestinal (Lee et al. 2008).

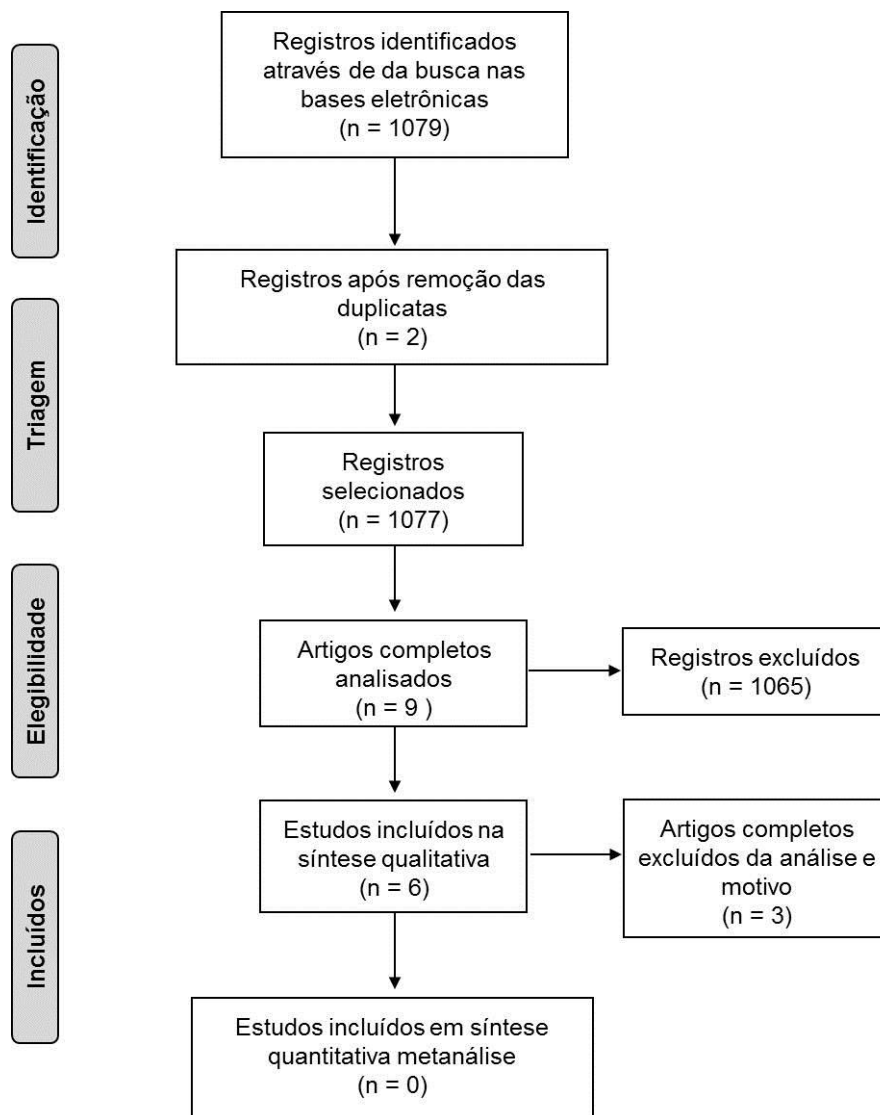
A utilização de modelo celular de câncer de cólon como as células caco-2 e HT-29 vêm sendo experimentadas para elucidar os mecanismos de ação das BAL frente à doença. O extrato de butanol de *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212 dependendo da dose inibe o crescimento de câncer de cólon em células Caco-2 e HT-29 (Wang et al. 2014). Thirabunyanon et al. (2009), utilizando células caco-2, sugerem que cepas probióticas de BAL podem aderir às células epiteliais do intestino, local onde se origina a ação probiótica no câncer de cólon. *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus fermentum* são normalmente encontrados como cepas originais em produtos lácteos fermentados e são recomendados como probióticos benéficos. Desrouillères et al. (2015) relataram que a administração oral de *Enterococcus faecium* CRL 183 resulta numa redução significativa da formação induzida do câncer colorretal em ratos Wistar machos e que esta estaria associada ao sistema imunitário.

Lee et al. (2007) observaram a inibição o crescimento da linhagem celular de câncer de cólon humano - Caco-2 quando utilizaram *Bacillus polyfermenticus* SCD. Desse modo, a bactéria probiótica reduz significativamente o crescimento e a viabilidade da linhagem de cultura celular de HT-29 e os níveis da enzima dipeptidil-peptidase IV foram significativamente reguladas, sugerindo que estas células podem ter começado a se diferenciar.

Segundo Chen et al. (2012), usando modelos animais de câncer de cólon, concluíram que a microbiota do cólon está envolvida na etiologia da carcinogênese. Por exemplo, uma série de estudos indica que as bactérias específicas, tais como *Streptococcus bovis*, *Bacteroides* e *Clostridia* podem promover o câncer do cólon, ao passo que as cepas de bactérias probióticas podem inibir o crescimento tumoral. Nos modelos animais, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum* são capazes de reduzir a incidência de tumores no cólon e ACF, respectivamente. Os resultados de Desrouillères et al. (2015) sugerem que sua fórmula probiótica foi capaz de reduzir o estágio inicial de desenvolvimento do câncer colorretal, demonstrando a capacidade de numerosas cepas pertencentes às espécies *L. acidophilus*, *L. casei* e *L. rhamnosus* para prevenir ou inibir a formação de criptas aberrantes. Entretanto, inferem que embora o mecanismo preciso pelo qual *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* e *L. rhamnosus* LBC80R CLR2 em inibir a formação de

ACF ainda seja desconhecido, os autores acreditam que este efeito pode estar relacionado a diversos mecanismos, incluindo alteração da microbiota e enzimas intestinais, aumento da resposta imune do hospedeiro e a inativação de compostos carcinogênicos.

Kumar et al. (2012) observaram que certas bactérias probióticas, tais como *L. plantarum*, são capazes de diminuir o câncer de cólon. Esta cepa exerce a sua ação anticancerígena através de suas propriedades antioxidantes. Foi verificado que a administração em longo prazo de *L. plantarum* é necessária para conseguir o efeito inibidor máximo.



**Figura 1.** Diagrama de fluxo para a identificação e seleção de estudo.

**Tabela 1.** Avaliação da qualidade dos estudos. Artigos não incluídos para metanálise.

| <b>Estudo<br/>Study</b>              | <b>A pergunta da<br/>pesquisa foi<br/>formulada<br/>claramente?</b> | <b>Os camundongos<br/>foram recrutados em<br/>uma forma aceitável?</b> | <b>O grupo controle é<br/>uma população não<br/>clínica?</b> | <b>O grupo controle é<br/>descrito<br/>adequadamente?</b> | <b>A análise foi avaliada e<br/>descrita de forma<br/>abrangente?*</b> | <b>Que variáveis<br/>confusas foram<br/>contabilizadas pelos<br/>autores?</b> |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Asha &amp; Gayathri<br/>2012</b>  | Sim                                                                 | Sim                                                                    | Sim                                                          | Sim                                                       | Não                                                                    | Relação caso-controle                                                         |
| <b>Chen et al. 2012</b>              | Sim                                                                 | Sim                                                                    | Sim                                                          | Sim                                                       | Não                                                                    | Relação caso-controle                                                         |
| <b>Desrouillères et al.<br/>2015</b> | Sim                                                                 | Sim                                                                    | Sim                                                          | Sim                                                       | Não                                                                    | Relação caso-controle                                                         |
| <b>Zhu et al. 2014</b>               | Sim                                                                 | Sim                                                                    | Sim                                                          | Sim                                                       | Não                                                                    | Relação caso-controle                                                         |
| <b>Urbanska<br/>et al. 2009</b>      | Sim                                                                 | Sim                                                                    | Sim                                                          | Sim                                                       | Não                                                                    | Relação caso-controle                                                         |
| <b>Kumar<br/>et al. 2012</b>         | Sim                                                                 | Sim                                                                    | Sim                                                          | Sim                                                       | Não                                                                    | Relação caso-controle                                                         |

\* Entende-se que o estudo relatou todos os dados necessários para realizar os cálculos de metanálise.

A justificativa é que os radicais livres e peróxidos lipídicos foram considerados muito importantes em carcinogênese. Além disso, os radicais livres formados durante a ativação por DMH foram considerados como sendo um fator importante na carcinogênese do cólon. Zhu et al. (2014) identificaram que *L. salivarius* pode modelar significativamente as mudanças da microbiota intestinal de rato, iniciada por DMH. Estas alterações foram acompanhadas com níveis de ácido graxos de cadeia curta, aumento e diminuição da atividade da enzima azorredutase. Também verificou que a formação de ACF foi diminuída pelo consumo de *L. salivarius*. De acordo com Asha & Gayathry (2012) a administração de *L. fermentum*, *L. plantarum*, ou vincristina diminuiu a incidência de ACF no cólon, e quando o tratamento era combinado alcançava-se um nível de inibição de 90%, fornecendo evidências convincentes para um efeito simbiótico. A administração oral de *L. acidophilus* reduziu eficazmente o crescimento do câncer de cólon e a extensão dos tecidos afetados. Isto sugere que a pré-inoculação com *L. acidophilus* foi associada com o crescimento tumoral suprimido (Chen et al. 2012).

O consumo de *L. acidophilus* em modelos animais experimentais diminuiu a atividade da enzima fecal  $\beta$ -glucuronidase, azorredutase e nitrorredutase. As atividades destas enzimas foram bem correlacionadas com o número de bactérias ácido lácticas no intestino. Estas enzimas formam produtos mutagênicos e carcinogênicos (LeBlanc et al. 2008). A  $\beta$ -glucuronidase é uma enzima fecal capaz de desconjugar toxinas e/ou agentes cancerígenos que tenham sido previamente desintoxicados no fígado pela conjugação do ácido glicurônico. Desrouillères et al. (2015) observaram que uma redução na atividade dessas enzimas pode conduzir a uma redução da exposição à substância carcinogênica, assim, uma redução na incidência de câncer colorretal. Estudos utilizando modelos animais mostraram a capacidade de outras preparações probióticas para diminuir a atividade dessa enzima e alguns estudos clínicos demonstraram também os mesmos efeitos inibidores (Kim & Jin 2001, LeBlanc et al. 2008). Tem sido relatado que os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* produziram baixos níveis de  $\beta$ -glucuronidase, enquanto que os anaeróbios estritos, como os *Bacteroides* sp., *Eubacterium* sp., e *Clostridium* sp., produzem níveis elevados dessas enzimas (Joossens et al. 2008). Segundo Asha & Gayathry (2012) a atividade da  $\beta$ -glucuronidase e a concentração de amônia fecal pareceram seguir um padrão similar ao da inibição de ACF.

**Tabela 2.** Dados das exposições avaliadas nos estudos primários.

| Referência                       | Animal de Estudo             | Peso Corporal | Micro-organismo                                                             | Desenho do Estudo                 | Seguimento | Tamanho da amostra | Dose diária                                | Endpoint                                                                                                                                                           |
|----------------------------------|------------------------------|---------------|-----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------|--------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Asha &amp; Gayathri 2012</b>  | Camundongos<br>Albinos swiss | 25-35g        | <i>Lactobacillus fermentum</i> ,<br><i>Lactobacillus plantarum</i>          | Caso-controle,<br>Randomizado     | 21 dias    | 17                 | 2 x 10 <sup>8</sup> UFC/g                  | - <i>L. fermentum</i> :<br>87,5% inibição do<br>câncer de cólon<br>- <i>L. plantarum</i> :<br>77,5% inibição do<br>câncer de cólon.                                |
| <b>Chen et al. 2012</b>          | Camundongos<br>BALB/cByJ     | 20g           | <i>Lactobacillus acidophilus</i>                                            | Caso-controle,<br>Randomizado     | 28 dias    | 45                 | 1 x 10 <sup>8</sup> UFC/g                  | 50,3% na redução<br>do tumor                                                                                                                                       |
| <b>Desrouillères et al. 2015</b> | Ratos F344                   | NR*           | <i>Lactobacillus acidophilus</i> ,<br><i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> | Caso-controle,<br>Randomizado     | 15 dias    | 56                 | 2 mL de leite<br>(1 x 10 <sup>9</sup> UFC) | 47% na redução do<br>câncer de cólon                                                                                                                               |
| <b>Zhu et al. 2014</b>           | Ratos F344                   | NR            | <i>Lactobacillus salivarius</i>                                             | Caso-controle,<br>Randomizado     | 105 dias   | 50                 | 2 x 10 <sup>9</sup> UFC/g                  | - 40% na redução<br>do câncer de cólon;<br>- Decréscimo na<br>alta multiplicidade<br>do câncer.                                                                    |
| <b>Urbanska et al. 2009</b>      | Ratos Apc (Min/+)            | 20-25g        | <i>Lactobacillus acidophilus</i>                                            | Caso-controle,<br>Randomizado     | 140 dias   | 33                 | 2% de yogurt<br>(10 <sup>10</sup> UFC/mL)  | - Manteve o peso<br>corporal constante<br>durante o<br>tratamento<br>- Minimizou a<br>inflamação<br>intestinal;<br>- Retardou a<br>progressão geral de<br>pólipos. |
| <b>Kumar et al. 2012</b>         | Ratos Albinos Wistar         | NR            | <i>Lactobacillus plantarum</i>                                              | Caso-controle,<br>Não Randomizado | 182 dias   | 36                 | 10 <sup>9</sup> UFC/mL                     | -42,13% no número<br>médio de tumor por<br>ratos.                                                                                                                  |

\* Não Referenciado (NR).

## 5 CONCLUSÃO

A reunião dos artigos a respeito do tratamento e efeito antitumoral com dietas associadas às bactérias ácido lácticas em modelo animal mostrou que a possibilidade de um tratamento menos invasivo para o câncer de cólon é possível, consequentemente aumentando a qualidade de vida dos pacientes e auxiliando na rotina médica.

## 6 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos fornecida à Priscilla Régia de Andrade Calaça.

## 7 DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Os autores não têm interesses conflitantes.

## 8 REFERÊNCIAS

- Asha e Gayathri D. (2012). Synergistic impact of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and vincristine on 1,2-dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis in mice. **Exp. Ther. Med.** 3:1049-1054.
- Baglioni C., Nissen C., Schweinoch A. e Riemann D. (2016). Polysomnographic Characteristics of Sleep in Stroke: A Systematic Review and Meta- Analysis. **PLoS One** 11:1–23.
- Brasil. Ministério da Saúde. (2012). Diretrizes metodológicas: elaboração de revisão sistemática e metanálise de ensaios clínicos randomizados. Brasília: Ministério da Saúde.
- Chen C.C., Lin W.C., Kong M.S., Shi H.N., Walker W.A. e Lin C.W. (2012). Oral inoculation of probiotics *Lactobacillus acidophilus* NCFM suppresses tumour growth both in segmental orthotopic colon cancer and extra-intestinal tissue. **Br. J. Nutr.** 107:1623-1634.

Critical Appraisal Skills Programme (CASP). (2014). CASP Checklists (URL used) Oxford: **CASP**.

Desrouillères K, Millette M, Vu KD, Touja R, Lacroix M. (2015). Cancer preventive effects of a specific probiotic fermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 on male F344 rats treated with 1,2-dimethylhydrazine. **J. Funct. Foods**. 17:816-827.

Engels E.A., Schmid C.H., Terrin N., Olkin I. e Lau J. (2000). Heterogeneity and statistical significance in metaanalysis: an empirical study of 125 metaanalyses. **Stat. Med**. 19:1707–28.

Femia A.P. (2010). Gene expression profile and genomic alterations in colonic tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in rats. **BMC Cancer**. 10:194.

INCA - Instituto Nacional de Câncer. (2014). Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**.

Joossens M., De Preter V., Van Steen K., Vermeulen N., Huys G., Verbeke K., Vandamme P., Rutgeerts P. e Vermeire S. (2008). W1196 Stability of Gut Microbiota Over Time in Crohn's Disease Patients Compared to Healthy Relatives. **Gastroenterology**. 134:A – 653.

Kim D.H. e Jin Y.H. (2001). Intestinal Bacterial 13-Glucuronidase Activity of Patients with Colon Cancer. **Arch. Pharm. Res**. 24:564–567.

Kumar R.S., Kunnami P., Yuvaraj N., Paari K.A., Pattukumar V., Thirunavukkarasu C. e Arul V. (2012). *Lactobacillus plantarum* AS1 Isolated from South Indian. **Appl. Biochem. Biotechnol**. 166:620–631.

LeBlanc A.M., LeBlanc J.G., Pérdigon G., Miyoshi A., Langella P., Azevedo V. e Sesma F. (2008). Oral administration of a catalase-producing *Lactococcus lactis* can prevent a chemically induced colon cancer in mice. **J. Med. Microbiol**. 57:100–5.

Lee D., Jang S., Kim M., Kim J.H., Chung M.J. e Kim K.J. (2008). Anti-proliferative effects of *Bifidobacterium adolescentis* SPM0212 extract on human colon cancer cell lines. **BMC Cancer**. 8:1-8.

Lee N.K., Park J.S., Park E. e Paik H.D. (2007). Adherence and anticarcinogenic effects of *Bacillus polyfermenticus* SCD in the large intestine. **Lett. Appl. Microbiol.** 44:274-278.

Macaskill P, Walter SD, Irwig L. (2001). A comparison of methods to detect publication bias in meta-analysis. **Stat. Med.** 20:641–54.

Masood M.I., Qadir M.I., Shirazi J.H. e Khan I.U. (2011). Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. **Crit. Rev. Microbiol.** 37:91-98.

Moher D., Liberati A., Tetzlaff J. e Altman D.G. (2009). The PRISMA Group. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. **PLoS Med.** 151:264-9.

Newell L.E. e Heddle J.A. (2004). The potent colon carcinogen, 1, 2-dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. **Mut. Res.** 564:1-7.

Ogata D.C., Greca F.H., Luz M.A., Ioshii S.O. e Tomasich F.D.S. (2010). Foco de criptas aberrantes e câncer da junção colorretal: análise da presença de lesões precoces microscópicas na periferia do câncer colorretal e correlação com a expressão da  $\beta$ -catenina e Ki-67. **Ver. Col. Bras. Cir.** 37:114–20.

Rachid M.M., Gobbato N.M., Valdez J.C.I., Vitalonp H.H. e Perdigon G. (2002). Effect of yogurt on the inhibition of an intestinal carcinoma by increasing cellular apoptosis. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.** 15:209–16.

Tanaka T. (2009). Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. **J. Carcinog.** 8:2009.

Thyabonyanon M., Boonprasom P. e Niamsup P. (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated. **Biotechnol. Lett.** 31:571-576.

Urbanska A.M., Bhathena J., Martoni C. e Prakash S. (2009). Estimation of the Potential Antitumor Activity of Microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* Yogurt Formulation in the Attenuation of Tumorigenesis in Apc(Min/+) Mice. **Dig. Dis. Sci.** 54:264-273.

Wang S., Zhang L. e Fan R. (2014). Induction of HT-29 cells apoptosis by lactobacilli isolated from fermented products. **Research in Microbiology.** 165:202-214.

Zhu J., Zhu C., Ge S., Zhang M., Jiang L. e Cui J. (2014). *Lactobacillus salivarius* Ren prevent the early colorectal carcinogenesis in 1, 2-dimethylhydrazine-induced rat model. **J. Appl. Microbiol.** 117:208-216.

## CAPÍTULO 2

Artigo a ser submetido ao periódico

*Journal Applied Microbiology*

Qualis A2

**Utilização de bactérias ácido lácticas probióticas como estratégia preventiva para infecção operatória em pacientes com câncer colorretal: uma revisão sistemática e metanálise de estudos randomizados**

P.R.A. Calaça<sup>1,2</sup>, R.P. Bezerra<sup>1,2</sup>, A.L.F. Porto<sup>1,2,3</sup>, M.T.H. Cavalcanti<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco – Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>2</sup> Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ), Universidade Federal Rural de Pernambuco – Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>3</sup> Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Brazil

## **RESUMO**

O câncer colorretal é o terceiro mais comum e perigoso câncer em homens e mulheres após os cânceres de mama, próstata e pulmão. Como exemplo dos procedimentos cirúrgicos realizados para minimizar os danos aos pacientes com este tipo de câncer, a ressecção de metástases hepáticas por câncer colorretal é a melhor escolha para o tratamento. Contudo, a infecção após operação abdominal continua a ser um fator importante que afeta a morbidade dos pacientes. Acredita-se que a terapia com probióticos pode melhorar o resultado clínico e laboratorial de pacientes submetidos à cirurgia gastrointestinal. O objetivo deste estudo foi investigar a eficácia de bactérias ácido lácticas probióticas em pacientes com câncer colorretal nas fases pré e pós-operatórias. Foram realizadas buscas sistemáticas em bases de dados eletrônicas alcançando 1080 artigos relacionados, entretanto apenas 7 artigos foram eleitos de acordo com os critérios de elegibilidade para análise qualitativa e quantitativa. A maioria dos artigos avaliados apresentaram resultados significativamente satisfatórios quanto à prevenção de inflamações cirúrgicas em pacientes submetidos à ressecção do câncer colorretal ao utilizarem cepas predominantemente do gênero *Lactobacillus*. Este estudo pode responder a hipótese de que as bactérias ácido lácticas probióticas apresentam efeito preventivo contra inflamações cirúrgicas de câncer colorretal.

Palavras-chave: Câncer colorretal. Probióticos. Metanálise. Perioperatório.

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro mais comum e perigoso câncer em homens e mulheres após os cânceres de mama, próstata e de pulmão (Derouillères et al. 2015). Mais de 50% do tumor primário são originados a partir do trato gastrointestinal (TGI), especialmente do cólon e do reto. Ele foi classificado como a segunda maior causa de morte por tumor ao redor do mundo, devido à morbidade e à mortalidade do CCR ter aumentado ano a ano, e o fígado é o local mais comum de metástases (Liu et al. 2015).

A ressecção cirúrgica continua a ser um forte pilar para o tratamento do CRC com a extensão da cirurgia e a necessidade de quimioterapia e radiação variando por fase e apresentação da doença (Addae et al. 2017). Entretanto, a infecção após operação abdominal continua a ser um fator importante que afeta a morbidade dos pacientes (Liu et al. 2011). Com o desenvolvimento das técnicas cirúrgicas avançadas e melhoria da assistência perioperatória, as taxas de morbidade e mortalidade foram consideravelmente reduzidas (Liu et al. 2013). A ocorrência de infecção de sítio cirúrgico (ISC) estende a duração da hospitalização, aumentando os custos de admissão e reduzindo potencialmente a qualidade de vida dos pacientes (Aisu et al. 2015).

Cuidados em longo prazo dos sobreviventes do CCR e do tratamento agudo são extremamente importantes. Os pacientes que concluíram o tratamento são conhecidos por sofrerem de vários sintomas crônicos. Muitos pacientes com este câncer sofrem de sintomas intestinais crônicos que afetam a qualidade de vida significativamente (Lee et al., 2014). Segundo Euguchi et al. (2011) a perturbação da microbiota intestinal parece ser um fator importante induzindo a infecção do sítio cirúrgico perioperatório. Esta perturbação é causada pelo stress da cirurgia invasiva, a administração de antibióticos para prevenir a infecção, a fraqueza do peristaltismo do trato intestinal e a atrofia da mucosa intestinal devido ao jejum perioperatório e isquemia intestinal.

Liu et al. (2011) acreditam que a terapia com probióticos pode melhorar o resultado clínico e laboratorial de pacientes submetidos à cirurgia gastrointestinal. A administração de probióticos em pacientes submetidos a estas cirurgias tem sido realizada para obter uma ação competitiva ao anti-

inflamatório na microbiota por substituição das bactérias responsáveis por inflamações pós-operatórias (Gianotti et al. 2010). Todavia, tem sido relatado que os probióticos podem desempenhar um papel importante na estabilidade do ambiente microbiológico (Backhed et al. 2005; Braga et al. 2011).

Assim, o objetivo deste estudo foi investigar a eficácia de bactérias lácticas probióticas em pacientes com CCR nas fases pré e pós-operatória, uma vez que a medicina tem buscado tratamentos alternativos que possam estar associados aos quimioterápicos já existentes para o tratamento de uma doença, em sua maioria, incapacitante. Portanto, toda a informação relevante sobre este tema tem sido reunida e analisada com o objetivo de esclarecer o papel dos probióticos na saúde humana e animal, identificando as lacunas na base de conhecimento existente, e determinar a qualidade dos estudos realizados sobre o conteúdo abordado.

## **2 MÉTODOS**

### **2.1 Diretrizes**

Para a realização da revisão sistemática, foram seguidas as diretrizes estabelecidas pelo PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) (Mother et al. 2009).

### **2.2 Critério da amostra e elegibilidade**

Os artigos considerados elegíveis para inclusão na revisão foram aqueles que apresentaram estudos originais realizados com humanos, publicados em inglês, espanhol ou português no período de 2005 a 2016, que relacionassem a administração de bactérias probióticas nos períodos pré e pós-operatório de pacientes em tratamento do CCR.

Os artigos não originais foram excluídos (revisões, editoriais, cartas, comentários e capítulos de livros), bem como estudos com humanos que não fossem descritos pelo critério de elegibilidade, ou seja, que não identificassem a dosagem de probiótico administrada. Trabalhos experimentais com modelo celular e animal (camundongos e ratos) de CCR encontrados foram utilizados, apenas, na discussão dos resultados.

### 2.3 Fonte de informação e identificação do estudo

Foi realizada uma busca sistemática a fim de identificar evidências sobre a eficácia das bactérias ácido lácticas probióticas na profilaxia do CCR em pacientes em fase perioperatória. Utilizou-se bases de dados eletrônicas incluídas na PubMed, Science Direct, LILACS, Scielo e Scopus. Os termos de pesquisa utilizados foram: “probiotic”, “perioperative”, “acid lactic bacteria” e “colon cancer”. Os termos foram cruzados um com o outro para conseguir maior abrangência e relevância nos resultados.

Os artigos identificados através da estratégia de busca foram avaliados de forma independente. A fase inicial de seleção dos artigos consistiu na análise dos títulos, seguida da análise de resumos e por fim realizada a leitura integral dos estudos para verificar os critérios de elegibilidade.

Com o objetivo de facilitar a coleta de dados e determinar a inclusão ou exclusão dos estudos com maior confiabilidade, a dúvida clínica foi estruturada conforme o acrônimo PECO, onde P- Pacientes: Adultos; E- Exposição: Pacientes que receberam suplementação com bactérias probióticas (independente da natureza, modo de preparo e dosagem); C- Controle: Pacientes que receberam nutrição normal e/ou leite; O-desfecho (*Outcome*): mortalidade global (Brasil, 2012).

### 2.4 Análise estatística

Foram estimados os riscos de infecção incisional, detecção de bactérias no sangue e complicações na infecção quanto ao efeito dos probióticos comparados ao grupo controle no tratamento pré e pós-operatório de acordo com o objetivo primário dos ensaios clínicos em pacientes com CCR.

Os dados foram sintetizados e inseridos no MedCalc® Statistical Software para avaliar o desfecho através do odds ratio (OR), de acordo com Altman, Deeks e Sackett (1998). O OR com 95% de confiança (IC) foi utilizado para verificar a significância das diferenças entre os grupos tratamento e controle. Optou-se pelo emprego de OR em vez do risco relativo para o cálculo das diferenças que são apresentadas em representações gráficas do tipo *forest plot*, que mostra os resultados individuais dos estudos e os resultados da

metanálise (Rodrigues e Ziegelmann, 2010). Portanto, foi utilizado o método de *Peto*, de acordo com as diretrizes de Brasil (2012).

Embora os critérios de elegibilidade quanto aos desenhos dos estudos incluídos, bem como características clínicas estivessem semelhantes em relação à administração dos probióticos e os pacientes com CCR, optamos por não ignorar a heterogeneidade para avaliarmos o grau de confiança dos resultados. Logo, o modelo estatístico utilizado foi o *chi-squared test*, segundo Baglioni et al. (2016). Na estatística  $I^2$  um valor próximo a 0% indica não heterogeneidade entre os estudos, próximo a 25% indica baixa heterogeneidade, próximo a 50% indica heterogeneidade moderada e próximo a 75% indica alta heterogeneidade entre os estudos (Higgins et al. 2003; Rodrigues e Ziegelmann, 2010).

### 3 RESULTADOS

A busca nas bases de dados ScienceDirect, Pubmed e Scopus, alcançaram 581, 108 e 391 artigos, respectivamente, totalizando 1080 artigos, como mostra a Figura 1. Os artigos que não se enquadravam nos critérios de elegibilidade foram excluídos, perfazendo 1071. As bases de dados LILACS e Scielo não apresentaram artigos durante a busca sistemática.

Por meio da pesquisa nas bases de dados obteve-se 7 artigos completos para análise, sendo estes ensaios clínicos randomizados, descritos em idioma inglês. Os anos de publicação variaram de 2010 a 2016, publicados em revistas de alto impacto. O número amostral de pacientes variou de 20 a 161, com uma média de 90,1.

#### 3.1 Ingestão de probióticos e infecção incisional

Houve diferença significativa, apenas em um estudo, entre o grupo tratado com probiótico e controle quanto à infecção na incisão cirúrgica, conforme a figura 2. Os 4 artigos analisados para infecção incisional (Liu et al. 2013; Sadahiro et al. 2014; Aisu et al. 2015; Yang et al. 2016) apresentaram baixa heterogeneidade ( $I^2 = 25\%$ ,  $P = 0,2133$ ,  $DF = 9$ ).

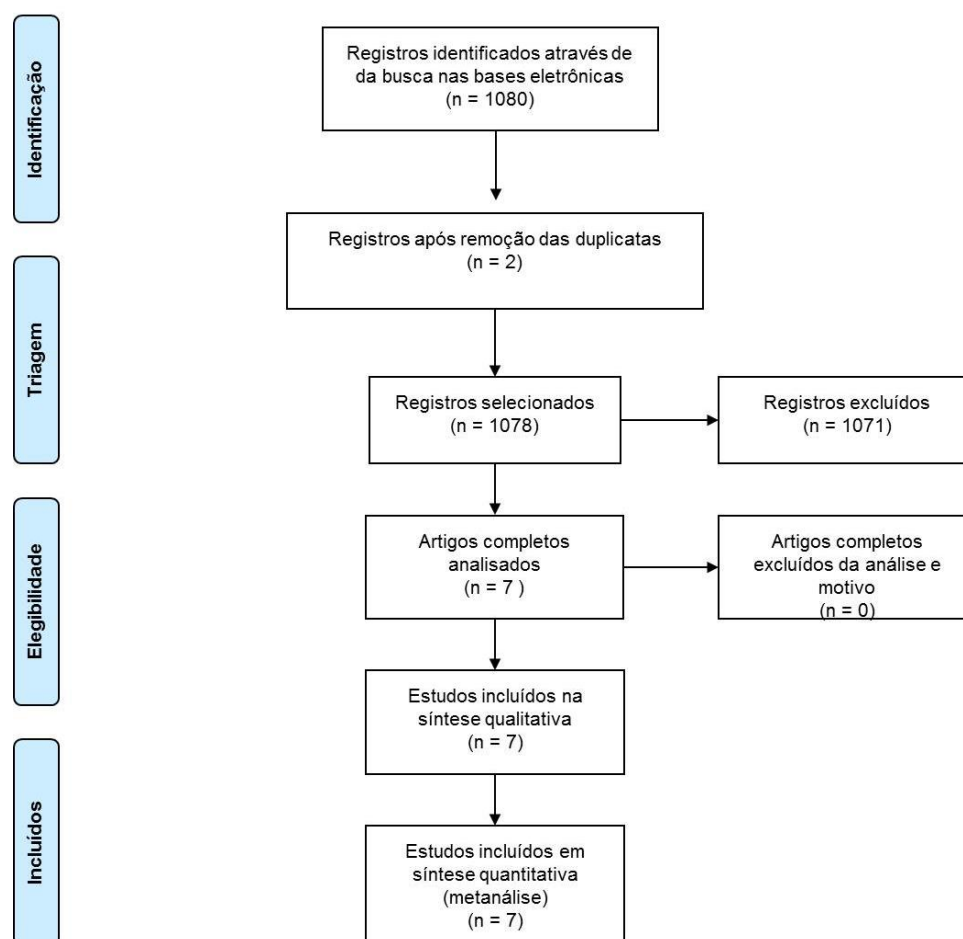
No estudo de Aisu et al. (2015) 5 de 70 pacientes (7,1%) foram positivos para a infecção incisional quando tratados com probióticos, em relação ao

grupo controle, onde 16 de 65 pacientes (24,7%) apresentaram infecção ( $P = 0,0081$ , 95% com limite de confiança 0,8371). Os demais estudos (Liu et al. 2013; Sadahiro et al., 2014; Yang et al. 2016) foram favoráveis ao placebo (OR = 0,6928,  $P = 0,1493$ , 95% CI 0,4207 – 1,1409).

Liu et al. (2013) verificaram que 6 de 66 pacientes (9%) dos pacientes que fizeram uso do probiótico desenvolveram infecção cirúrgica, para 8 de 68 pacientes (11,8%) do grupo controle. Sadahiro et al. (2014) ao utilizar o probiótico na terapia medicamentosa em 100 pacientes com CCR, obtiveram 18% de infecção. No estudo de Yang et al. (2016) que utilizaram 30 pacientes para análise, observaram que 3,3% do grupo probiótico e controle apresentaram infecção incisional.

### **3.2 Detecção de bactérias no sangue**

O índice entre os diferentes estudos estatísticos quanto à detecção de bactérias com alta patogenicidade no sangue foi de OR 0,4069 (95% CI 0,2661 – 0,6222,  $P < 0,0001$ ) e  $I^2 = 16,7\%$  ( $P = 0,2851$ ,  $DF = 10$ ). O *forest plot* desta revisão é mostrado na Figura 3. Para os resultados dos 6 artigos analisados nesta sessão 4 foram favoráveis para a intervenção (Gianotti et al. 2010; Liu et al. 2011; Liu et al. 2013; Yang et al. 2016) e 2 para o placebo (Sadahiro et al. 2014; Liu et al. 2015).



**Figura 1.** Diagrama de fluxo para a identificação e seleção de estudo (Adaptado de Mother et al. 2009)

Gianotti et al. (2010) ao realizar a intervenção medicamentosa com probióticos (Tabela 1), no período perioperatório, apresentaram em seus estudos 30% de bactérias patogênicas nos laudos sanguíneos e 60% para o grupo controle. Liu et al. (2011) utilizaram probióticos no tratamento de pacientes com CCR e obtiveram 14% e 30% de bactérias no sangue para os grupos probiótico e controle, respectivamente, sendo estatisticamente favorável à intervenção  $OR = 0,3798$  (95% CI 0,1395 – 1,0346,  $P = 0,0583$ ).

No estudo de Liu et al. (2013) os achados estatísticos foram significativos para os pacientes que passaram pela intervenção do probiótico  $OR = 0,2663$  (95% CI 0,08783 – 0,8074,  $P = 0,0194$ ). Sendo assim, 16% do grupo probiótico apresentaram bactérias no sangue em comparação a 30,6% do grupo controle. Com  $OR = 0,2593$  (95% CI 0,06231 – 1,0787,  $P = 0,0635$ ),

Yang et al. (2016) obtiveram apenas 10% de bactérias no sangue após administração de probióticos, enquanto que o grupo controle alcançou um valor de 30% de micro-organismos deletérios no sangue.

### 3.3 Complicação na infecção cirúrgica

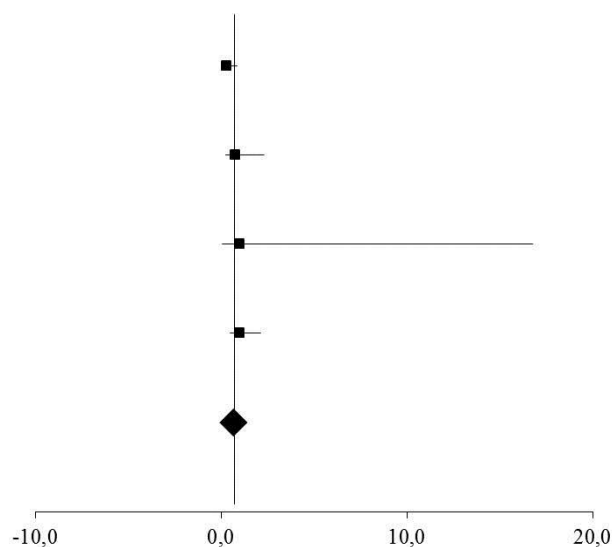
Para esta sessão foram analisados 7 artigos (Gianotti et al. 2010; Liu et al. 2011; Liu et al. 2013; Sadahiro et al. 2014; Liu et al. 2015; Aisu et al. 2015; Yang et al. 2016), no qual apenas 2 (Liu et al. 2013; Yang et al. 2016), após cruzamento dos dados, como mostra o *forest plot* na Figura 4, apresentaram resultados estatisticamente favoráveis à intervenção com o probiótico OR = 0,5388 (95% CI 0,4058 – 0,7154,  $P < 0,0001$ ) e,6  $I^2 = 28\%$  e 14,3% (DF = 25,  $P = 0,2338$ ).

No estudo de Liu et al. (2013) a administração do probiótico obtiveram OR = 0,1926 (95% CI 0,07941 – 0,4671,  $P = 0,0003$ ) e foi estatisticamente relevante para a intervenção, em comparação ao grupo controle que apresentou 88% de complicações na infecção cirúrgica. O estudo de Yang et al. (2016), também foi favorável à intervenção utilizando o probiótico, onde 10% dos pacientes tratados desenvolveram complicações na infecção cirúrgica, diferente do grupo controle que 30% dos pacientes evoluíram para o quadro infeccioso OR = 0,2593 (95% CI 0,06231 – 1,0787,  $P = 0,0635$ ).

## 4 DISCUSSÃO

He et al. (2013) verificaram em seu estudo que usar probiótico ou simbiótico no período perioperatório em pacientes submetidos a ressecção colorretal pode melhorar os resultados clínicos, entretanto, consideraram que uma melhor estratégia preventiva deveria ser avaliada em futuras metanálises para confirmação dos achados. Portanto, nosso trabalho apresenta uma revisão sistemática e a metanálise de estudos que examinaram o efeito profilático e terapêutico de probióticos em pacientes com câncer colorretal nos períodos pré e pós-operatórios em comparação a população controle. Visa elucidar sobre a estratégia preventiva a partir de modelos experimentais recentes, contribuindo para confirmar os dados obtidos.

| Estudo               | Controle/Probiótico<br>(Positivo) | Controle/Probiótico<br>(Outcome) | Controle/Probiótico<br>(Total) | Incidência<br>(95% IC)    |
|----------------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| Aisu et al. 2015     | 16/5                              | 49/65                            | 65/70                          | 0,2902 (0,1006 – 0,8371)  |
| Liu et al. 2013      | 8/6                               | 60/60                            | 68/66                          | 0,7500 (0,2454 – 2,2926)  |
| Yang et al. 2016     | 1/1                               | 29/29                            | 30/30                          | 1,0000 (0,0597 – 16,7642) |
| Sadahiro et al. 2014 | 17/18                             | 78/82                            | 95/100                         | 1,0072 (0,4845 – 2,0937)  |
| Total                | 42/30                             | 216/236                          | 258/266                        | 0,6538 (0,3951 – 1,0817)  |



**Figura 2.** “Forest plot” do efeito dos probióticos comparados ao grupo controle no tratamento pré e pós-operatório de acordo com o objetivo primário dos ensaios clínicos em pacientes com CCR para **infecção incisional**.

Um grande número de estudos mostram que os probióticos podem prevenir a iniciação do câncer ou o seu desenvolvimento através de alteração da composição microbiana intestinal, proteção do hospedeiro contra bactérias e fungos patogênicos, a produção de substâncias biológicas, como ácidos graxos de cadeia curta e ácido linoleico conjugado, inativação de compostos cancerígenos, melhoria da função de barreira intestinal, a modulação de respostas imunes, apoptose, efeitos anti-proliferativos e função antioxidante (Chen et al. 2012; Uccello et al. 2012; Faghfoori et al. 2015).

De acordo com Zhu et al. (2013) algumas linhagens de bactérias como *Lactobacillus acidophillus* e *Bifidobacterium longum* estão associadas com a inibição da indução carcinogênica e o desenvolvimento do CCR – o que

corroborar para os dados da metanálise – onde Liu et al. (2013) e Yang et al. (2016), obtiveram melhores resultados utilizando estes micro-organismos na intervenção terapêutica para pacientes com CCR. A administração perioperatória de probióticos reduz a resposta inflamatória, o que pode levar a uma redução na duração da estadia hospitalar. O desequilíbrio microbiano induzido por CCR e o estresse cirúrgico podem ser rapidamente melhorados pelo tratamento com o probiótico (Aisu et al. 2015).

Segundo Tiptiri-Kourpeti et al. (2016) há relatos de que várias cepas de *Lactobacillus* apresentam efeitos anti-proliferativos e estudos *in vivo* em animais indicam que os *Lactobacillus* podem aliviar o risco de certos tipos de câncer e exercer propriedades anti-cancerígenas. Efeitos anti-mutagênicos de *Bifidobacterium* aumentaram a utilização de tais cepas para a redução dos níveis de enzimas pró-carcinogênicas tóxicas de câncer colorretal. Os metabólitos microbianos, tais como propionatos e butiratos, são conhecidos por exercer um efeito antagonista, especialmente sobre a proliferação de células de câncer do cólon, indução de apoptose de células de carcinoma e linhagens de células transformadas em seres humanos (Sarkar e Mandal, 2016).

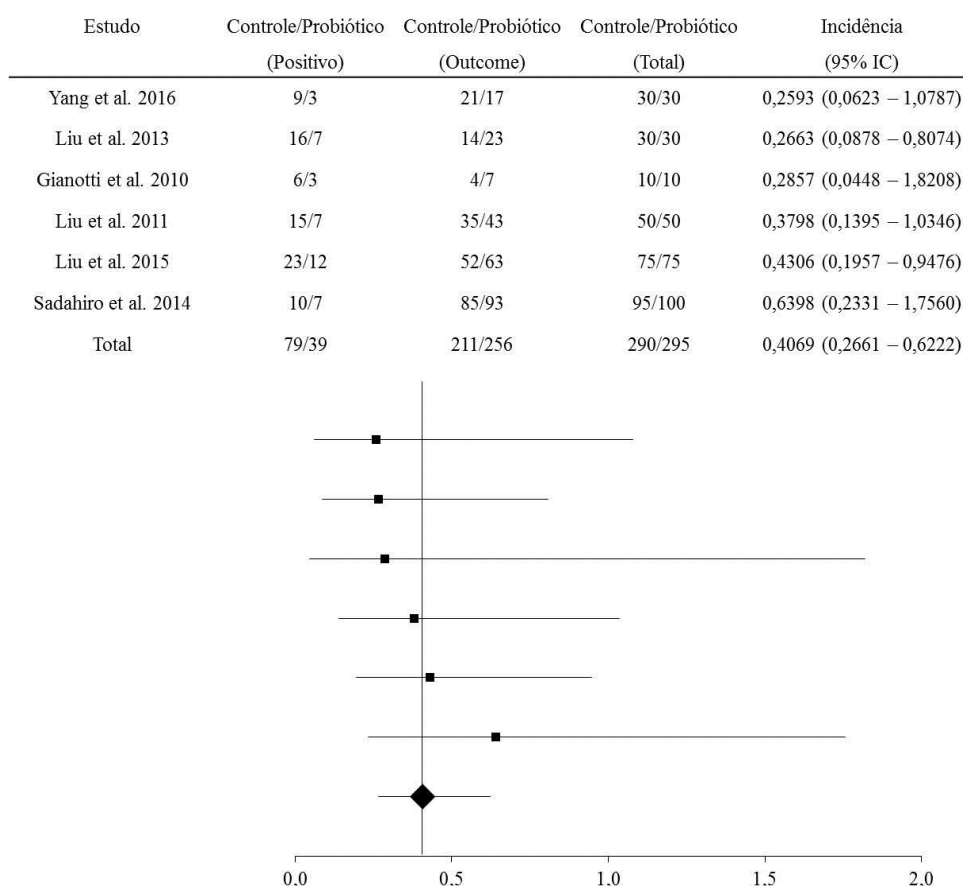
**Tabela 1.** Resumo das características dos estudos incluídos na revisão.

| Referência                  | Desenho do estudo                           | Idade   | Acompanhamento                                     | Tamanho da Amostra                                 | Micro-organismos                                                                                                                                                                                          | Observações                                                                                           |
|-----------------------------|---------------------------------------------|---------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Gianotti et al. 2010</b> | Randomizado, controlado e duplo-cego        | 18 – 80 | 3 dias pré-operatório / 12 dias pós-operatório     | 20:<br>10 grupo controle<br>10 grupo probióticos   | <i>Lactobacillus johsonii</i><br><i>Bifidobacterium longum</i><br>(2 x 10 <sup>9</sup> UFC/d)                                                                                                             | Placebo: maltodextrin                                                                                 |
| <b>Liu et al. 2011</b>      | Randomizado, Duplo-cego, placebo-controlado | 25 – 75 | 6 dias pré-operatório / 10 dias pós-operatório     | 100:<br>50 grupo controle<br>50 grupo probióticos  | <i>Lactobacillus plantarum</i><br>(≥ 10 <sup>11</sup> UFC/g)<br><i>Lactobacillus acidophilus</i><br>(≥ 7,0 x 10 <sup>10</sup> UFC/g)<br><i>Bifidobacterium longum</i><br>(≥ 5,0 x 10 <sup>10</sup> UFC/g) | 2g/dia de probiótico<br>(2,6 x 10 <sup>14</sup> UFC)<br>Placebo: Cápsulas e sachê 10g de maltodextrin |
| <b>Liu et al. 2013</b>      | Randomizado                                 | 25 – 75 | 6 dias pré-operatório / 10 dias pós-operatório     | 161:<br>80 grupo controle<br>81 grupo probióticos  | <i>Lactobacillus plantarum</i><br>(≥ 10 <sup>11</sup> UFC/g)<br><i>Lactobacillus acidophilus</i><br>(≥ 7,0 x 10 <sup>10</sup> UFC/g)<br><i>Bifidobacterium longum</i><br>(≥ 5,0 x 10 <sup>10</sup> UFC/g) | 2g/dia de probiótico<br>(2,6 x 10 <sup>14</sup> UFC)<br>Placebo: Cápsulas de maltodextrin diariamente |
| <b>Sadahiro et al. 2014</b> | Randomizado                                 | 20 – 80 | 7 dias pré-operatório / 5 a 10 dias pós-operatório | 195:<br>95 grupo controle<br>100 grupo probióticos | <i>Bifidobacterium bifidum</i><br>(10 bilhões de células viáveis para nove comprimidos)                                                                                                                   | -                                                                                                     |
| <b>Liu et al. 2015</b>      | Randomizado, duplo-cego                     | 25 – 75 | 6 dias pré-operatório / 10 dias pós-operatório     | 134:<br>68 grupo controle<br>66 grupo probióticos  | <i>Lactobacillus plantarum</i><br>(≥ 10 <sup>11</sup> UFC/g)<br><i>Lactobacillus acidophilus</i><br>(≥ 7,0 x 10 <sup>10</sup> UFC/g)<br><i>Bifidobacterium longum</i><br>(≥ 5,0 x 10 <sup>10</sup> UFC/g) | 2g/dia de probiótico<br>(2,6 x 10 <sup>14</sup> UFC)<br>Placebo: cápsulas de maltodextrin diariamente |
| <b>Aisu et al. 2015</b>     | -                                           | -       | Administração 3 a 15 dias antes da cirurgia        | 156:<br>81 grupo controle<br>75 grupo probióticos  | 2 mg de <i>Enterococcus faecalis</i> T110<br>10 mg de <i>Clostridium</i>                                                                                                                                  | 6 comprimidos de Bio-TREE® diariamente                                                                |

|                  |             |                                                                           |                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                    |
|------------------|-------------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|
| Yang et al. 2016 | Randomizado | 12 dias consecutivos:<br>5 dias pré-operatório / 7<br>dias pós-operatório | 60:<br>30 grupo controle<br>30 grupo probióticos | <i>butyricum</i> TO-A                                                                                                                                                                                                                                              | Placebo: maltodextrin e<br>sucrose |
|                  |             |                                                                           |                                                  | 10 mg de <i>Bacillus</i><br><i>mesentericus</i> TO-A<br><i>Bifidobacterium longum</i><br>( $\geq 1,0 \times 10^7$ UFC/g)<br><i>Enterococcus faecalis</i><br>( $\geq 1,0 \times 10^7$ UFC/g)<br><i>Lactobacillus acidophilus</i><br>( $\geq 1,0 \times 10^7$ UFC/g) |                                    |

Tabela 1. Continuação.

Sendo assim, para reduzir as complicações cirúrgicas Okazaki et al. (2013) administraram *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium breve* e obtiveram 12% de complicações cirúrgicas em relação à 36% do grupo controle. Tanaka et al. (2012) avaliaram o impacto da administração de  $1 \times 10^8$  UFC de *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium breve* no período perioperatório em pacientes com câncer esofágico e observaram que a incidência de infecção tende a ser menor no grupo de probióticos do que no grupo controle, 10% e 29,4%, respectivamente.



**Figura 3. Detecção de bactérias no sangue**, de acordo com a administração de probióticos no período perioperatório, comparados ao grupo controle com o objetivo primário dos ensaios clínicos em pacientes com CCR.

Nos estudos de Pitsouni et al (2009) foi relatado que o uso de probióticos e simbióticos em pacientes submetidos à cirurgia do CCR é uma medida clínica bastante promissora para a prevenção de complicações infecciosas pós-operatórias. Contudo, afigura-se que o resultado do tratamento depende do gênero de bactérias,

número de bactérias administradas e o número de bactérias probióticas viáveis que alcançam e colonizam o cólon (Hovart et al. 2010).

Infecções pós-operatórias ocorrem apesar da utilização de agressiva profilaxia perioperatória com antibióticos potentes, e a aplicação de nutrição parenteral em aproximadamente 30% dos pacientes submetidos à cirurgia abdominal, levando a prolongamento significativo de permanência no hospital e maiores custos (Rayes et al. 2002). Segundo Pitsouni et al. (2009) o tempo de permanência hospitalar e terapia antibiótica entre os pacientes que receberam probióticos/simbióticos foi significativamente menor. Isto é de grande importância, uma vez mais curtos regimes de antibióticos pode-se diminuir o risco de resistência antimicrobiana emergente. Além disso, uma estadia no hospital mais curta pode reduzir ainda mais o risco de infecções hospitalares e resultar em benefício financeiro. Entretanto, um estudo demonstrou que a terapia simbiótica pré-operatória mais pós-operatória foi mais eficaz do que apenas a utilização pós-operatória (Sugawara et al. 2006).

De acordo com Okasaki et al. (2003) fornecer apenas probióticos não é suficiente para melhorar a microbiota intestinal normal, mas o uso de simbióticos conduz a um efeito sinérgico sobre o seu crescimento e função. Os simbióticos têm sido sugeridos para reduzir e eliminar micro-organismos potencialmente patogênicos no período perioperatório, estimulando o crescimento da microbiota comensal, e, subsequentemente, aumentando os ácidos graxos de cadeia curta, que são conhecidos por estabilizar a barreira intestinal e do sistema imune local, o que também pode contribuir para uma redução na incidência de infecções cirúrgicas.

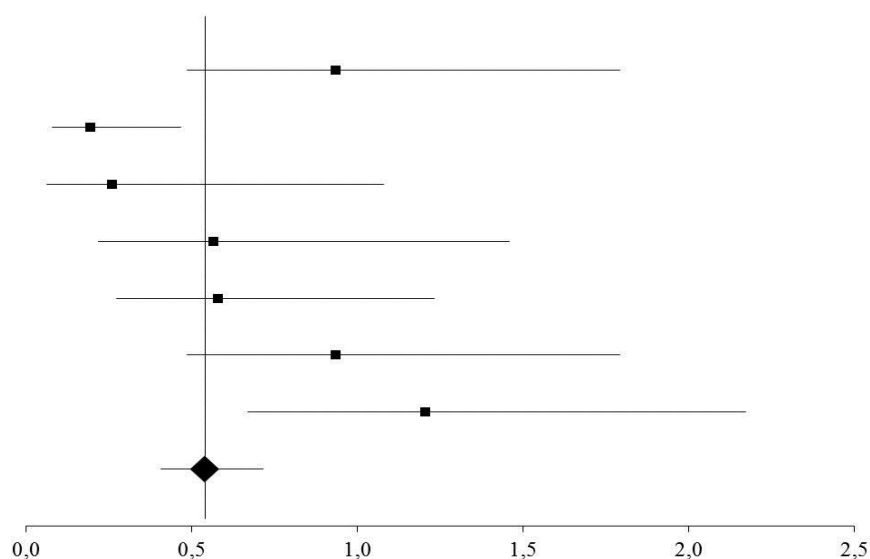
Para Yang et al. (2016) com curto prazo de acompanhamento, a administração de probióticos no período perioperatório influenciou significativamente a recuperação da função intestinal e essa melhoria pode ser de grande valor clínico na redução das complicações infecciosas, tais como bacteremia ou mesmo sepse de origem intestinal. Foi verificado que o uso do probiótico no perioperatório pode reduzir a taxa de septicemia pós-operatória e está associada com concentrações reduzidas da proteína zonulina em pacientes submetidos ao processo cirúrgico (Liu et al. 2013).

A zonulina é capaz de modular a barreira mucosa desmontando as junções intercelulares que caracterizam a fase precoce dos estados inflamatórios. Ela está envolvida na imunidade inata do intestino e, quando desregulada, parece

desempenhar um papel fundamental na patogênese de diferentes doenças (Russo et al. 2012). A zonulina aumenta seletivamente a permeabilidade intestinal, e sua liberação é induzida por certos micro-organismos intestinais, especialmente patógenos, indicando que a proteína poderia atuar como uma ligação mecânica entre as mudanças na microbiota intestinal e a função de barreira intestinal (Stenman et al. 2016).

A diminuição da zonulina circulante está associada a uma diminuição da relação lactulose/manitol, um indicador de permeabilidade intestinal, bem como menos complicações de infecção pós-operatória (Stenman et al. 2016). Concentrações desta proteína no pós-operatório pode ser um biomarcador precoce de septicemia. Liu et al. (2013) recomendam a ingestão oral pré-operatória de probióticos combinado com a continuidade do tratamento no pós-operatório em pacientes que precisam se submeter à cirurgia colorretal.

| Estudo               | Controle/Probiótico<br>(Positivo) | Controle/Probiótico<br>(Outcome) | Controle/Probiótico<br>(Total) | Incidência<br>(95% IC)   |
|----------------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| Gianotti et al. 2010 | 7/3                               | 3/7                              | 10/10                          | 0,9342 (0,4868 – 1,7927) |
| Liu et al. 2013      | 60/39                             | 8/27                             | 68/66                          | 0,1926 (0,0794 – 0,4671) |
| Yang et al. 2016     | 9/3                               | 21/27                            | 30/30                          | 0,2593 (0,0623 – 1,0787) |
| Liu et al. 2011      | 14/9                              | 36/41                            | 50/50                          | 0,5645 (0,2184 – 1,4589) |
| Aisu et al. 2015     | 23/14                             | 58/67                            | 81/81                          | 0,5788 (0,2719 – 1,2319) |
| Sadahiro et al. 2014 | 24/24                             | 71/76                            | 95/100                         | 0,9342 (0,4868 – 1,7927) |
| Liu et al. 2015      | 55/41                             | 20/34                            | 75/75                          | 1,2059 (0,6694 – 2,1722) |
| Total                | 192/133                           | 217/279                          | 409/412                        | 0,5388 (0,4058 – 0,7154) |



**Figura 4.** Efeito dos probióticos para minimizar **complicações na infecção** “Forest plot”, comparados ao grupo controle no tratamento pré e pós-operatório de acordo com o objetivo primário dos ensaios clínicos em pacientes com CCR.

## 5 CONCLUSÃO

Os estudos mostraram que a utilização de probióticos pode ser uma fonte promissora para a prevenção de infecções em pacientes que são submetidos à cirurgia de CCR. Foi evidenciado que a associação de mais de um micro-organismo como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* beneficiam o tratamento favorecendo a recuperação cirúrgica. Além disso, é possível concluir que a administração dos probióticos deve estar associada ao tratamento pré-operatório e pós-operatório para que os efeitos sejam mais significativos.

## 6 CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores não têm interesses conflitantes.

## 7 REFERÊNCIAS

- Addae, J. k.; Gani, F.; Fang, S. Y.; Wick, E. C.; Althumairi, A. A.; Efrom, J. E.; Canner, J. K.; Euhus, D. M.; Schneider, E. B. (2017). A comparison of trends in operative approach and postoperative outcomes for colorectal cancer surgery. **Journal of Surgical Research**. 208:111-120.
- Aisu, N.; Tanimura, S.; Yamashita, Y.; Yamashita, K.; Maki, K.; Yoshida, Y.; Sasaki, T.; Takeno, S. e Hoshino, S. (2015). Impact of perioperative probiotic treatment for surgical site infections in patients with colorectal cancer. **Experimental and Therapeutic Medicine**. 10:966-972.
- Altman, D.; Deeks, J. e Sackett, D. (1998). Odds ratios should be avoided when events are common. **BMJ** 317:1318.
- Backhed, F. e Sommer, F. (2013). The gut microbiota — masters of host development and physiology. **Nature**. 11:227-238.
- Baglioni C.; Nissen C.; Schweinoch A. e Riemann D. (2016). Polysomnographic Characteristics of Sleep in Stroke : A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS One** 1:1–23.

Braga, M.; Gianotti, L.; Gentilini, O.; Parisi, V.; Salis, C. e DiCarlo, V. (2001) Early postoperative enteral nutrition improves gut oxygenation and reduces costs compared with total parenteral nutrition. **Critical Care Medical**. 29:242-248.

Brasil. Ministério da Saúde. 2012. Diretrizes metodológicas: elaboração de revisão sistemática e metanálise de ensaios clínicos randomizados. Brasília: **Ministério da Saúde**.

Chen, C.; Lin, W.; King, M.; Shi, H.; Walker, W.; Lin, C.; Huang, C.; Lin, Y.; Jung, S. e Lin, T. (2012). Oral inoculation of probiotics *Lactobacillus acidophilus* NCFM suppresses tumour growth both in segmental orthotopic colon cancer and extra-intestinal tissue. **British Journal of Nutrition**. 107:1623-1634.

Desrouillères, K.; Millette, M.; Jamshidian, M.; Maherani, B.; Fortin, O. e Lacroix, M. (2015). Cancer preventive effects of a specific probiotic fermented milk containing *Lactobacillus acidophilus* CL1285 ,*L. casei* LBC80R and *L. rhamnosus* CLR2 on male F344 rats treated with 1,2-dimethylhydrazine. **Journal of Functional Foods**. v. 17, p. 816-827.

Euguchi, S.; Takatusuki, M.; Hidaka, M.; Soyama, A.; Ichikawa, T. e Kanematsu, T. (2011). Perioperative synbiotic treatment to prevent infectious complications in patients after elective living donor liver transplantation: a prospective randomized study. **The American Journal of Surgery**. 201:498-502.

Faghfoori, Z.; GArgari, B.; Gharamaleki, A.; Bagherpour, H. e Kousroushahi, A. (2015). Cellular and molecular mechanisms of probiotics effects on colorectal cancer. **Journal of Functional Foods**. 18:463-472.

Gianotti, L.; Morelli, L.; Galbiati, F.; Rocchetti, S.; Coppola, S.; Beneduce, A.; Gilardini, C.; Zonenschain, D.; Nespoli, A. e Braga, M. (2010). A randomized double-blind trial on perioperative administration of probiotics in colorectal cancer patients. **World Journal Gastroenterology**. 16:167-175.

He, D.; Wang, H.; Feng, J.; Zhang, M.; Zhou, Y. e Wu, X. 2013. Use of pro-/synbiotics as prophylaxis in patients undergoing colorectal resection for cancer: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**. 37:406-415.

Higgins, J. P. T.; Thompson, S. G.; Deeks, J. J. e Altman, D. G. 2003. Measuring inconsistency in meta-analyses. **BMJ**, 327: 557-60.

Horvat, M.; Krebs, B.; Potrc, S.; Ivanecz, A. e Kompan, L. (2010). Preoperative synbiotic bowel conditioning for elective colorectal surgery. **The Middle European Journal of Medicine**. 122:26-30.

Kanazawa, H.; Nagino, M.; Kamiya, S.; Komatsu, S.; Mayumi, T.; Takagi, K. et al. (2005) Synbiotics reduce postoperative infectious complications: a randomized controlled trial in biliary cancer patients undergoing hepatectomy. **Langenbecks Archieve Surgery**. 390:104-13

LeBlanc, A. e Perdigón, G. (2010). Probiotics in the defence and metabolic balance of the organism the application of probiotic fermented milks in cancer and intestinal inflammation. **Proceedings of the Nutrition Society**. 69:421-428.

Lee, J.; Chu, S.; Jeon, J.; Lee, M.; Park, J.; Lee, D.; Lee, J. e Kim, N. (2014). Effects of 12 weeks of probiotic supplementation on quality of life in colorectal cancer survivors: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Digestive and Liver Disease** . 46:1126-1132.

Liu, Z.; Huang, M.; Zhang, X.; Wang, L.; Huang, N.; Peng, H.; Lan, P.; Peng, J.; Yang, Z.; Yang X.; Liu, W.; Yang, J.; Qin, H. e Wang, J. (2013). The effects of perioperative probiotic treatment on serum zonulin concentration and subsequent postoperative infectious complications after colorectal cancer surgery: a double-center and double-blind randomized clinical trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 97:117-26.

Liu, Z.; Li, C.; Huang, M.; Tong, C.; Zhang, X.; Wang, L.; Peng, H.; Lan, P.; Zhang, P.; Huang, N.; Peng, J.; Wu, X.; Luo, Y.; Qin, H.; Kang, L. e Wang, J. (2015). Positive regulatory effects of perioperative probiotic treatment on postoperative liver complications after colorectal liver metastases surgery: a double-center and double-blind randomized clinical trial. **BMC Gastroenterology**. 15:34.

Liu, Z.; Quin, Z.; Yang, Y.; Xia, W.; Yang, J.; Jiang, Y.; Znahg, H.; Yang, Z.; Wang, Y. e Zheng, Q. (2011). Randomised clinical trial: the effects of perioperative probiotic treatment on barrier function and post-operative infectious complications in colorectal cancer surgery – a double-blind study. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**. 33:50-63.

Mother, D.; Liberati, A.; Tetzlaff, J. e Altman D. (2009). The PRISMA Group. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. **PLoS Med.** 151:264-9.

Okazaki, M.; Matsukuma, S.; Suto, R.; Miyazaki, K.; Hidaka, M.; Matsuo, M.; Noshima, S; Zempo, N.; Asahara, T. e Nomoto, K. (2013). Perioperative synbiotic therapy in elderly patients undergoing gastroenterological surgery: a prospective, randomized control trial. **Nutrition** 29: 1224-1230.

Pitsouni, E.; Alexiou, V.; Saridakis, V.; Peppas, G. e Falagas, M. (2009). Does the use of probiotics/synbiotics prevent postoperative infections in patients undergoing abdominal surgery? A meta-analysis of randomized controlled trials. **Europe Journal Clinical Pharmacology.** 65:561-70.

Rayes, N.; Seehofer, D.; Hansen, S.; Boucsein, K.; Muller, A.; Serke, S. et al. (2002) Early enteral supply of lactobacillus and fiber ver-sus selective bowel decontamination: a controlled trial in liver transplant recipients. **Transplantation.** 74:123-7.

Rodrigues, C. e Ziegelmann, P. (2010). Metanálise: um guia prático. **Revista HCPA.** 30: 435-446.

Russo, F.; Linsalata, M.; Clemente, C.; Chiloiro, M.; Orlando, A.; Marconi, E.; Chimienti, G.; Riezzo, G. (2012). Inulin-enriched pasta improves intestinal permeability and modifies the circulating levels of zonulin and glucagon-like peptide 2 in healthy young volunteers. **Nutrition Research.** 32:940-946.

Sarkar, M. e Mandal, S. (2016). Bifidobacteria-Insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action. **Microbiological Research.** 192:159-171.

Stenman, L.; Lehtinen, M. J.; Meland, N.; Christensen, J. E.; Yeung, N.; Saarinen, M. T.; Courtney, M.; Burcelin, R.; Lahdeaho, M.; Linros, J.; Apter, D.; Scheinin, M.; Smerud, H. K.; Riassanem, A.; Lahtinen, S. (2016). **EbioMedicine.** 13:190-200.

Sugawara, G.; Nagino, M.; Nishio, H.; Ebata, T.; Takagi, K.; Asahara, T.; et al. (2006). Perioperative synbiotic treatment to prevent post-operative infectious complications in biliary cancer surgery: a randomized controlled trial. **Ann Surg.** 244:706-14.

Tanaka, K.; Yano, M.; Motoori, M.; Kishi, K.; Miuashiro, I.; Ohue, M.; Ohigashi, H.;

Asahara, T.; Nomoto, K. e Ishikawa, O. (2012). Impact of perioperative administration of synbiotics in patients with esophageal cancer undergoing esophagectomy: A prospective randomized controlled trial. **Surgery**. 15:832-42.

Tiptiri-kourpeti, A.; Spyridopoulou, K. e Santarmaki, V. (2016). *Lactobacillus casei* exerts anti-Proliferative effects accompanied by apoptotic cell death and up-regulation of trail in colon carcinoma cells. **PlosOne**. 1-20.

Uccello, M.; Malaguarnera, G.; Basile, F.; D'agata, V.; Malaguarnera, M.; Bertino, G. et al. (2012). Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention. **BMC Surgery**. 12:S1: S35.

Yang, Y.; Xia, Y.; Chen, H.; Hong, L.; Feng, J.; Yang, J.; Yang, Z.; Shi, C.; Wu, W.; Gao, R.; Wei, Q.; Qin, H. e Ma, Y. (2016) The effect of perioperative probiotics treatment for colorectal cancer: short-term outcomes of a randomized controlled trial. **Oncotarget**. 7: 8432-8440.

Zhu, Q.; Gao, R.; Wu, W. e Qin, H. (2013). The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. Tumour Biology: **The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, 34:1285–1300.

## CAPÍTULO 3

Artigo a ser submetido ao periódico

*Food Microbiology*

Qualis A1

## **Caracterização da viabilidade probiótica de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanal produzido em Pernambuco - Brasil**

P. R. A. Calaça<sup>1,2</sup>, D. S. Santos<sup>1,2</sup>, M. S. F. Lima<sup>1,2,3</sup>, E. C. Silva<sup>1,2</sup>, R. P. Bezerra<sup>1,2</sup>,  
A. L. F. Porto<sup>1,2,3</sup> e M. T. H. Cavalcanti<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco – Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>2</sup> Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ), Universidade Federal Rural de Pernambuco – Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Brazil

### **RESUMO**

Devido à sua história importante de aplicação como fermentos, especialmente na indústria de alimentos, bactérias ácido lácticas têm sido intensamente estudadas como agentes bioprotetores. Muitos dos micro-organismos probióticos são bactérias ácido lácticas, contudo as mais estudadas e utilizadas são dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Os probióticos são micro-organismos vivos que conferem saúde promovendo benefícios para o hospedeiro, ao manter ou melhorar a microbiota intestinal. O objetivo deste estudo foi investigar a viabilidade probiótica de bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanal, sendo para isto utilizados os testes de sobrevivência das bactérias ácido lácticas a condições simuladas do trato gastrointestinal, atividade antagonista e antimicrobiana, resistência a antibióticos, adesão ao solvente e às células epiteliais. Das 87 bactérias analisadas 27 mantiveram-se viáveis após exposição a baixos valores de pH, e destas, 26 resistiram aos sais biliares. A seguir, foram selecionadas aleatoriamente, 12 bactérias as quais foram submetidas as demais análise de funcionalidade probiótica. Dentre as bactérias testadas, a bactéria 137<sub>v</sub> apresentou melhores resultados para todas as análises a que foi submetida. A substância inibidora produzida por ela inibiu importantes micro-organismos patogênicos, como *Klebsiella pneumoniae* ATCC 26665, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Manteve-se estável a alta temperatura e a diversos níveis de pH, bem como apresentou adesividade ao solvente e às células epiteliais. A bactéria 137<sub>v</sub> demonstrou ser uma promissora bactéria probiótica.

Palavras-chave: Bactérias ácido lácticas. Probióticos. Digestão *in vitro*. Adesão.

## 1 INTRODUÇÃO

As Bactérias Ácido Lácticas (BAL) representam o mais importante grupo de micro-organismos utilizados para produtos fermentados. Essas têm uma importância crucial em razão às suas características fisiológicas, como a utilização do substrato, capacidade metabólica e propriedades probióticas (Ozcelik, Kuley e Ozogul, 2016).

Devido à sua utilização antiga como fermentos, especialmente na indústria de alimentos, BALs têm sido intensamente estudadas como agentes bioprotetores (Peyer et al. 2016), pois, podem permitir o controle do crescimento de fungos e de outros micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes, e assim, melhorar a vida útil de muitos produtos fermentados e, por conseguinte, reduzir os riscos para a saúde (Dalié, Deschamps e Richard-Forget, 2010). Por esse motivo, as BAL apresentam-se como um grupo interessante quanto a sua eficácia antimicrobiana, que pode estar atrelada a ações de bacteriocinas – um grupo de biomoléculas que podem representar uma boa alternativa na substituição de agentes antimicrobianos nos alimentos, como por exemplo, os antibióticos. (Parada et al., 2007).

Muitos dos micro-organismos probióticos são BAL que incluem os gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus* e *Streptococcus*. No entanto, espécies não ácido lácticas como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Propionibacterium freudenreichii* também apresentam atividades probióticas, bem como as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* (Oliveira-Serqueira, Ribeiro e Gomes, 2008). Entretanto, as mais estudadas e utilizadas como probióticos são dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*; considera-se que tais espécies reúnem as condições mais adequadas para fazer face às necessidades fisiológicas do hospedeiro pelo que, por isso, poderão mais facilmente colonizar o intestino (Nogueira e Gonçalves, 2011).

Os probióticos são úteis para os seres humanos e animais, em muitos aspectos, tais como: prevenção de diarreia, benefícios contra a intolerância à lactose, podem participar da prevenção e tratamento da úlcera, estímulo à imunidade, tanto a nível intestinal como sistêmico, atividade antimicrobiana, prevenção de doenças infecciosas, redução da alergia, efeitos sobre a redução da incidência de câncer de cólon, retardo na progressão do câncer, entre outros (Masood et al., 2011).

Nos últimos anos, a crescente sensibilização do público para as questões de saúde relacionadas com a alimentação impulsionou a demanda por alimentos com efeitos distintos de promoção da saúde (Oliveira et al. 2014), entre eles os alimentos probióticos. Os probióticos são micro-organismos vivos que conferem saúde promovendo benefícios para o hospedeiro, através da manutenção e/ou melhora da microbiota intestinal. Para serem usados como probióticos, eles devem possuir algumas propriedades, tais como: a capacidade de aderir fortemente às células epiteliais no trato gastrointestinal de hospedeiros e sobreviver sob condições desfavoráveis, incluindo ambientes com baixos valores de pH e presença de sais biliares.

O objetivo deste estudo foi caracterizar bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho quanto ao potencial probiótico.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Bactérias ácido lácticas e condições de crescimento**

As Bactérias ácido lácticas utilizadas neste estudo foram provenientes de queijo de Coalho artesanal de Pernambuco, e armazenadas no banco de culturas lácticas no Laboratório de biotecnologia agroindustrial do Centro de Apoio à Pesquisas (CENAPESQ), da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Antes da utilização experimental, 97 culturas de BAL foram reativadas em Leite Desnatado Reconstituído (LDR) a 10% e em caldo deMan, Rogosa e Sharpe (MRS), respectivamente. Posteriormente, foi realizado teste de catalase (Speck, 1984) e coloração de Gram (Pelczar et al., 1981) para confirmação taxonômica e da caracterização.

### **2.2 Resistência ao valor de pH baixo**

Foi realizada de acordo com Argyri et al. (2012), com culturas após 18 horas de crescimento em caldo MRS, ajustada para  $10^8$  UFC/mL. A cultura foi centrifugada (10.000 xg, 5 minutos, 4°C), lavada duas vezes com tampão fosfato salino (PBS 1M) (pH 7,2). Logo após, foi ressuspensa em solução PBS com pH ajustado para 2,5, incubadas a 37°C por 0, 1 e 3 horas. A seguir, a resistência e a viabilidade das colônias foram analisadas a partir do crescimento delas em MRS ágar com

incubação à 37°C por 24 horas. O experimento foi realizado em duplicata. O número de células viáveis foi expresso em log UFC/mL<sup>-1</sup>.

### 2.3 Resistência à presença de sais de bile

Foi realizada de acordo com Argyri et al. (2012), com culturas após 18 horas de crescimento em caldo MRS, ajustada para 10<sup>8</sup> UFC/mL. A cultura foi centrifugada (10.000 xg, 5 minutos, 4°C), lavada duas vezes com tampão fosfato salino (PBS 1M) (pH 7,2), ressuspensas em solução PBS ajustado para pH 8,0, contendo 0,5% (peso/volume) de sais de bile (Himedia<sup>®</sup>), incubação a 37°C por 0, 2 e 4 horas. A resistência e a viabilidade das colônias foram analisadas pelo crescimento em MRS ágar à 37°C por 24h. O experimento foi realizado em duplicata. O número de células viáveis foi expresso em log UFC/mL<sup>-1</sup>.

### 2.4 Avaliação da atividade antagonista

Após testar a resistência ao pH e à presença de sais biliares, 12 bactérias ácido lácticas foram selecionadas aleatoriamente para determinação do efeito contra agentes contaminantes indicadores de origem alimentar ou não, incluindo *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pseudomonae* ATCC 26665, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Listeria innocua* ATCC 33090. As bactérias indicadoras testadas foram cultivadas em meio Brain Heart Infusion (BHI) (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) e incubadas a 37°C por 18 horas em condições aeróbias, ajustadas para uma concentração de 10<sup>7</sup> UFC/mL.

Para o cultivo das BAL foi utilizado o caldo MRS, incubando-se a 37 °C por 24h. Após o crescimento, 5µL de cada cultivo foram colocados sob a superfície de discos de papel esterilizados em uma placa de Petri contendo ágar MRS, e incubados a 37°C, durante 24 horas. A seguir, 3,5mL de ágar semissólido contendo as bactérias patogênicas recém-cultivadas em caldo BHI foram adicionados por cima do disco nas placas de Petri. As placas foram incubadas a 37°C, durante 48 horas, sob observação a cada 24 horas. As zonas de inibição em torno dos discos de papel foram registradas conforme as metodologias de Guedes Neto et al. (2005) e Thirabunyanon e Thongwittaya (2012).

## 2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi determinada utilizando sobrenadante do cultivo das BAL em caldo MRS, a 37°C em aerobiose por 24 horas. As alíquotas foram recolhidas e centrifugadas (10.000 xg, 10 minutos, 4 °C) para a obtenção do sobrenadante. Nestas alíquotas foram realizadas as determinações antimicrobianas por Concentração Mínima Inibitória (CMI) conforme Oliveira et al. (2009), com modificações para análise de bacteriocinas (Mayr-Harting et al. 1972).

As bactérias indicadoras utilizadas foram as mesmas descritas no item 2.4. Todas cultivadas em meio BHI e incubados a 37°C por 24 horas em condições aeróbias.

Os testes foram realizados em triplicata na microplaca de fundo chato com 96 poços, onde foi analisado o controle negativo (150 µL de meio estéril), o controle positivo (150 µL de meio estéril acrescido de 1 µL da bactéria indicadora, ajustada para uma concentração de  $10^7$  UFC/mL) e o sobrenadante do cultivo das BAL na presença da bactéria indicadora. Sendo assim, 150 µL do sobrenadante foram diluídos, conforme o método de Mayr-Harting et al. (1972), para analisar a CMI do sobrenadante frente aos patógenos, nas proporções de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 e 1:256. Após inóculo em placa, a cultura foi incubada a 37 °C por 24 horas, seguida de leitura sob 595 nm de Densidade Óptica (D.O.). As médias dos valores de D.O.<sub>595</sub> obtidas foram traçadas em função das concentrações iniciais do sobrenadante da BAL, após descontar a média dos valores de D.O.<sub>595</sub> do meio estéril. A CMI foi considerada como sendo a menor concentração de sobrenadante em que não houve crescimento significativo da bactéria indicadora, por comparação com o controle negativo. Sendo assim, a atividade foi definida como a recíproca da

diluição mais elevada mostrando uma inibição das bactérias indicadoras multiplicada por 100 para expressar os resultados como Unidades Arbitrárias em mililitro (UA/mL<sup>-1</sup>). Entretanto, para correlacionar a concentração de BAL, a equação segundo Castillo (2013) foi determinada com UA em relação à última diluição em que havia inibição, corrigida para 1 mL. A equação expressa o valor de UA/mL, onde (P) significa o volume depositado na microplaca, (D) o número de diluições e (n) o número da diluição que não apresentou inibição:

$$\text{Eq. (1): } \text{AU/mL} = D^n \times 1000/P$$

## 2.6 Caracterização de substância antimicrobiana produzida pelas BALs

### 2.6.1 Sensibilidade à protease

A natureza peptídica da substância antimicrobiana produzida pelas BAL neste estudo foi determinada através da sensibilidade à enzima pepsina, de acordo com Bromberg et al. (2006). A solução enzimática (0,2 mg/mL pepsina (Sigma-Aldrich®) em solução-tampão HCl 0,02 N) esterilizada por filtração (CHROMAFIL® PVDF 0.20 µm/25 mm) foi misturada aos sobrenadantes das BALs na proporção de 1:1 (v/v). A mistura obtida foi incubada a 37 °C por 1 hora, e depois por 5 minutos a 100°C. Em seguida, a atividade antimicrobiana das misturas foi determinada utilizando como bactérias indicadoras *Klebsiella pseudomonae* ATCC 26665, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057, *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Após inóculo as placas foram incubadas a 37 °C por 24h, para posterior avaliação.

### 2.6.2 Sensibilidade ao pH e temperatura

Foi determinada a estabilidade térmica ao pH nos sobrenadantes produzidos pelas BAL com atividade antimicrobiana. Os sobrenadantes foram ajustados a diferentes valores de pH (2,0, 4,0, 7,0, 9,0 e 11,0) e a seguir submetidos a 121 °C durante 10 minutos (Moreno et al. 2000; Bromberg et al. 2006). Os pHs foram ajustados a seus respectivos valores com soluções de NaOH e HCl 10N. Sobrenadantes de BAL livres de células ajustados ao pH 2,0 e 6,0 foram aquecidos num banho de ebulição. A atividade residual foi ensaiada a 10, 30 e 60 minutos pelo ensaio de diluição crítica (Mayr-Harting et al. 1972), com os controles apropriados.

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de Oliveira et al. (2009), utilizando como bactérias indicadoras *Klebsiella pseudomonae* ATCC 26665, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057, *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Os controles consistiram de amostra do sobrenadante sem alteração do pH e temperatura.

## 2.7 Teste de resistência a antibióticos

O teste de resistência a antibióticos foi realizado de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2003) utilizando a metodologia de disco-difusão. A concentração celular das BAL for ajustada para uma concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL. Os discos de antibióticos utilizados foram Rifampicina (RIF) 5 µg, Tetraciclina (TET) 30 µg, Penicilina (PEN) 10U, Ciprofloxacina (CIP) 5 µg, Estreptomicina (EST) 10 µg, Cefalexina (CEF) 30 µg, Ampicilina (AMP) 10 µg e

Gentamicina (GEN) 10 µg. As distâncias entre um disco e outro foi de aproximadamente 30mm, impedindo a superposição dos halos de inibição.

Após 24 horas de incubação, as placas foram examinadas a fim de verificar o crescimento. A leitura foi realizada com paquímetro. Os diâmetros dos halos de inibição foram analisados de acordo com os critérios de interpretação preconizados pelo CLSI (2003).

## 2.8 Adesão microbiana a solventes (MATS)

Um dos critérios para classificação de um micro-organismo como probiótico é sua aparente capacidade de adesão às células epiteliais do hospedeiro, que é realizada normalmente de forma temporária. Sendo assim, as BAL analisadas neste estudo foram testadas quanto a adesão intercelular em solvente descrito por Kos et al. (2003) como um experimento capaz de simular a capacidade de adesão celular *in vitro*.

As BAL foram inoculadas em caldo MRS, retiradas na fase estacionária com aproximadamente  $10^8$  UFC/mL e centrifugadas a 5.000 xg por 15 min. As células obtidas foram lavadas duas vezes com PBS 1M (7,2), e ressuspensas com KNO<sub>3</sub> (pH 6,2), e a absorbância da suspensão celular foi mensurada a 600 nm ( $A_0$ ). Em seguida, adicionou-se 1 mL do solvente xilol (Vetec Ltda.) para 3 mL da suspensão celular. Após 10 minutos de pré-incubação à temperatura ambiente, as duas fases foram removidas por agitação em vortex por 2 minutos. A fase aquosa foi removida depois de 20 minutos de incubação à temperatura ambiente e a absorbância de 600 nm ( $A_1$ ) foi mensurada. O cálculo da porcentagem da adesão da bactéria ao solvente foi:

$$\text{Eq. (2): MATS: } (1-A_1/A_0) \times 100$$

As BAL que apresentaram adesão ao solvente acima de 70% foram classificadas como alta, entre 50 e 70% classificadas como moderada, e abaixo de 50% foram classificadas como baixa hidrofobicidade. A alta hidrofobicidade tem sido sugerido como indicador para boa capacidade adesiva (Rosenberg, Gutnick e Rosenberg, 1980). Os resultados obtidos foram as médias das triplicatas.

## 2.9 Adesão de BAL às células epiteliais *in vitro*

A adesão das BAL as células epiteliais *in vitro* foi realizada em células obtidas a partir do intestino delgado de camundongos da linhagem Swiss albino de acordo com a metodologia descrita por Alwan et al. (1998). Onde, cortes de tecido intestinal com aproximadamente 7 cm foram retirados através de cirurgia, fendas foram abertas para a lavagem da parte interna das secções com PBS 1M (pH 7,2) frio, a seguir esses pedaços de tecido foram incubados a 37 °C em PBS 1M contendo EDTA 10 mM sob agitação (15 rpm – em média). Após 20 minutos de incubação, as secções foram lavadas novamente em PBS para remoção do EDTA. As células epiteliais foram desalojadas esfregando as amostras do intestino com um êmbolo de seringa estéril. O sobrenadante rico em célula epitelial foi drenado para outro tubo e lavado duas vezes com PBS. Os enterócitos recolhidos foram ressuspensos em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Sigma-Aldrich®) e 10% de glicerol. Em seguida, as células foram estocadas à -80°C até a sua utilização para análise da capacidade de adesão das BAL.

A metodologia de avaliação da capacidade adesiva das BALs às células epiteliais foi conforme Alwan et al. (1998) e Laheinen et al. (2010). Onde, 1 mL da cultura de BAL ( $1,0 \times 10^8$  UFC/mL) foi homogeneizada com 1 mL de células epiteliais ( $10^6$  células/mL), obtidas como descrito acima. Em seguida, foram incubadas por 60 minutos a 37°C. Após incubação, as células foram centrifugadas a 100 xg por 10 minutos; lavadas duas vezes para remoção de bactérias não aderidas e ressuspensas em 5 mL de PBS (pH 7,2). A seguir foram centrifugadas a 100 xg por 10 minutos com a finalidade de preparar as lâminas de microscópio utilizando 500 µL da suspensão. As lâminas foram secas à temperatura ambiente, sendo posteriormente coradas através da coloração de Gram para leitura em microscopia óptica com ampliação de 1000x, a fim de visualizar as bactérias aderidas às células epiteliais. A análise foi repetida três vezes.

## 3 RESULTADOS

Dos 97 isolados, 10 não apresentaram crescimento, todas as 87 amostras de BAL mostraram-se Gram-positivas, e negativas ao teste da catalase. As amostras variaram entre cocos, cocobacilos e bacilos.

### 3.1 Resistência a valores de pH baixo e à presença de sais biliares

A sobrevivência das BAL foi estudada simulando as condições do trato gastrointestinal quanto ao pH baixo e à presença de sais biliares, e os resultados estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

De acordo com a Tabela 1 podemos observar que o pH 2,5 influenciou na sobrevivência das BAL independentemente do tempo de exposição. Esse resultado era esperado, já que nesse pH existe naturalmente uma dificuldade da maioria das bactérias em se manter viáveis. Entretanto, apesar do pH tão adverso, foram encontradas: 1 BAL com crescimento maior que 8 log UFC/mL, 8 BAL com 3-6 log UFC/mL e 18 BAL que apresentaram 1-3 log UFC/mL de viabilidade na contagem após 3 horas de exposição. Sendo assim, podemos concluir que 27 mantiveram-se viáveis, com crescimento médio maior que 1 log UFC/mL, durante as 3 horas de exposição às condições ácidas que simulam o estômago.

**Tabela 1** Efeito do suco gástrico simulado em pH 2,5 na viabilidade de 87 BAL durante a incubação de 0, 1 e 3 horas.

| BAL           | Nº de cepas | Contagem final<br>(Log UFC/mL <sup>-1</sup> ) |     |     |     |    |    |     |     |     |    |    |     |     |     |    |
|---------------|-------------|-----------------------------------------------|-----|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|----|
|               |             | 0h                                            |     |     |     |    | 1h |     |     |     |    | 3h |     |     |     |    |
|               |             | >8                                            | 6-8 | 3-6 | 1-3 | <1 | >8 | 6-8 | 3-6 | 1-3 | <1 | >8 | 6-8 | 3-6 | 1-3 | <1 |
| Capoeiras (c) | 13          | 3                                             | -   | 1   | 2   | 8  | 2  | -   | -   | 4   | 7  | -  | -   | -   | 1   | 12 |
| Venturosa (v) | 63          | 29                                            | 2   | 11  | 10  | 11 | 4  | -   | 10  | 16  | 33 | -  | -   | 7   | 15  | 41 |
| Arcoverde (A) | 11          | 1                                             | -   | 9   | -   | 1  | 1  | -   | 3   | 4   | 3  | 1  | -   | 1   | 2   | 7  |

As BAL que sobreviveram ao pH 2,5 com crescimento maior que 1 log UFC/mL, foram utilizadas para a etapa seguinte com os sais biliares. Na Tabela 2, observamos que a viabilidade celular foi mantida por 26 BAL das 27 analisadas. Novamente, 1 BAL apresentou crescimento maior que 8 log UFC/mL, 17 BAL com contagem de células viáveis entre 6 – 8 log UFC/mL, e 4 BAL com 3 – 6 log UFC/mL, além de outras 4 BAL que apresentaram viabilidade menor que 1 log UFC/mL, todas com 4 horas de exposição aos sais biliares. Assim, podemos concluir que 21 BAL exibiram eficiência na sobrevivência as condições simuladas do intestino.

**Tabela 2.** Efeito simulado das condições do intestino em pH 8,0 ajustado com 0,5% de sais de bile sobre viabilidade de 27 BAL durante a incubação de 0, 2 e 4 horas.

| BAL           | Nº de cepas | Contagem final<br>(Log UFC/mL <sup>-1</sup> ) |     |     |     |    |    |     |     |     |    |    |     |     |     |    |
|---------------|-------------|-----------------------------------------------|-----|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|----|
|               |             | 0h                                            |     |     |     |    | 2h |     |     |     |    | 4h |     |     |     |    |
|               |             | >8                                            | 6-8 | 3-6 | 1-3 | <1 | >8 | 6-8 | 3-6 | 1-3 | <1 | >8 | 6-8 | 3-6 | 1-3 | <1 |
| Capoeiras (c) | 1           | -                                             | -   | -   | -   | -  | -  | -   | -   | -   | -  | -  | -   | -   | -   | -  |
| Venturosa (v) | 22          | -                                             | 13  | 8   | -   | 1  | -  | 17  | 3   | -   | 2  | 1  | 16  | 1   | -   | 4  |
| Arcoverde (A) | 4           | -                                             | 4   | -   | -   | -  | -  | 3   | 1   | -   | -  | -  | 1   | 3   | -   | -  |

### 3.2 Potencial antagônico

Dentre as BAL que apresentaram um crescimento entre 5 e > 8 log UFC/mL nas etapas anteriores foram selecionadas aleatoriamente 12, para analisar o efeito antagônico dessas bactérias frente a 7 micro-organismos indicadores. Os resultados apresentados na Tabela 3, mostram que 2 BAL foram efetivas nesse critério contra 6 dos micro-organismos utilizados, 5 BAL foram positivas contra 5 micro-organismos avaliados e 5 BAL frente a 4 micro-organismos testados. A menor atividade antagonista foi para *Listeria innocua* ATCC 33090, onde apenas duas BAL apresentaram halos médios de 17,00 e 12,05 mm cada. Todas as BAL alcançaram efeito antagônico para *Klebsiella pneumoniae* ATCC 26665. Os micro-organismos indicadores *Enterococcus faecalis* ATCC 6057 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633 foram inibidas por onze das doze BAL testadas.

**Tabela 3.** Média dos halos de inibição (mm) do teste de antagonismo *in vitro* de amostras de BAL isoladas de queijo de Coalho artesanal de Pernambuco, contra bactérias reveladoras.

| Bactérias Indicadoras                    | BAL              |                 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                 |                 |                 |                 |
|------------------------------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                                          | 125 <sub>v</sub> | 50 <sub>v</sub> | 137 <sub>v</sub> | 133 <sub>v</sub> | 127 <sub>v</sub> | 110 <sub>v</sub> | 111 <sub>v</sub> | 141 <sub>v</sub> | 24 <sub>A</sub> | 21 <sub>A</sub> | 28 <sub>v</sub> | 57 <sub>v</sub> |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922       | 19,75            | 0               | 18,25            | 17,50            | 0                | 0                | 26,75            | 18,00            | 0               | 20,25           | 19,25           | 18,75           |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 26665  | 17,25            | 17,75           | 18,25            | 17,50            | 18,00            | 18,75            | 21,25            | 21,25            | 18,00           | 20,00           | 18,25           | 17,25           |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 12,50            | 0               | 0                | 0                | 11,75            | 14,75            | 0                | 14,50            | 0               | 0               | 0               | 13,50           |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 6057   | 0                | 14,25           | 18,00            | 16,50            | 15,50            | 15,25            | 20,25            | 12,50            | 16,75           | 12,00           | 21,25           | 18,00           |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633       | 0                | 19,75           | 16,50            | 19,50            | 17,25            | 17,25            | 13,00            | 15,75            | 18,75           | 15,25           | 12,75           | 18,00           |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538   | 15,25            | 14,00           | 0                | 13,75            | 0                | 12,50            | 13,00            | 13,50            | 13,50           | 13,75           | 0               | 0               |
| <i>Listeria innocua</i>                  | 0                | 17,00           | 0                | 12,75            | 0                | 0                | 0                | 0                | 0               | 0               | 0               | 0               |

### 3.3 Atividade antimicrobiana

As mesmas BAL avaliadas quanto ao efeito antagônico foram analisadas para a atividade antimicrobiana por produção de substâncias liberadas no sobrenadante. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Atividade antimicrobiana do sobrenadante de BAL isoladas de queijo de Coalho artesanal em condições variadas determinadas pelo método de diluição crítica.

| Bactérias Indicadoras                    | *Bacteriocinas UA/mL <sup>-1</sup> |                 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                 |                 |                 |                 |
|------------------------------------------|------------------------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                                          | 125 <sub>v</sub>                   | 50 <sub>v</sub> | 137 <sub>v</sub> | 133 <sub>v</sub> | 127 <sub>v</sub> | 110 <sub>v</sub> | 111 <sub>v</sub> | 141 <sub>v</sub> | 24 <sub>A</sub> | 21 <sub>A</sub> | 28 <sub>v</sub> | 57 <sub>v</sub> |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922       | 27                                 | 27              | 27               | 27               | 53               | 27               | 27               | 27               | 27              | 27              | 27              | 27              |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 29665  | 107                                | 1.706           | 53               | 213              | 107              | 107              | 107              | 107              | 107             | 427             | 1.706           | 213             |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | 27                                 | 27              | 27               | 53               | 53               | 53               | 53               | 53               | 53              | 107             | 53              | 53              |
| <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 6057   | 107                                | 213             | 107              | 427              | 427              | 427              | 213              | 427              | 427             | 427             | 1.706           | 853             |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633       | 13                                 | 27              | 27               | 53               | 53               | 27               | 27               | 27               | 27              | 27              | 27              | 27              |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538   | 107                                | 213             | 853              | 213              | 53               | 53               | 213              | 213              | 107             | 107             | 107             | 107             |
| <i>Listeria innocua</i> ATCC 33090       | 27                                 | 27              | 3.413            | 53               | 53               | 53               | 53               | 53               | 53              | 53              | 3.413           | 53              |

\*Unidade arbitrária de bacteriocina por mililitro (UA/mL<sup>-1</sup>) = recíproca da maior diluição que apresentou inibição.

Podemos observar que a BAL denominada 28<sub>v</sub>, foi a mais efetiva, alcançando títulos de 1.706 UA/mL frente aos micro-organismos indicadores *Enterococcus faecalis* ATCC 6057 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 26665, além do maior título 3.413 UA/mL frente a *Listeria innocua* ATCC 33090. Além dela, a 137<sub>v</sub> também obteve o maior título de 3.413 UA/mL, frente ao mesmo micro-organismo indicador. As demais bactérias avaliadas produziram valores menores e variados. Verificou-se menor efeito antimicrobiano da substância produzida pela BAL 125<sub>v</sub> frente ao *B. subtilis* com 13 UA/mL. Em todos os casos, observou-se que os sobrenadantes foram eficazes na inibição das bactérias indicadoras.

### 3.4 Caracterização de substância antimicrobiana produzida pelas BALs

#### 3.4.1 Sensibilidade à protease

Os resultados obtidos estão na Tabela 5. Podemos observar que houve um decréscimo na atividade antimicrobiana dos sobrenadantes contra as bactérias indicadoras *Klebsiella pneumoniae* ATCC 26665, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633 após tratamento com a pepsina. Isto sugere a natureza peptídica da substância produzida pelas BAL e liberadas no sobrenadante da cultura.

**Tabela 5.** Inibição de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 26665, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pelo sobrenadante obtido através de cultivo de BAL, após tratamento realizado com enzima proteolítica para determinação da natureza do composto inibidor.

| Bactérias Indicadoras | *Atividade de Bacteriocina (UA/mL <sup>-1</sup> ) |                 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                 |                 |                 |                 |
|-----------------------|---------------------------------------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                       | 125 <sub>v</sub>                                  | 50 <sub>v</sub> | 137 <sub>v</sub> | 133 <sub>v</sub> | 127 <sub>v</sub> | 110 <sub>v</sub> | 111 <sub>v</sub> | 141 <sub>v</sub> | 24 <sub>A</sub> | 21 <sub>A</sub> | 28 <sub>v</sub> | 57 <sub>v</sub> |
| <i>K. pneumoniae</i>  | 27                                                | 13              | 13               | 13               | 27               | 13               | 13               | 13               | 27              | 27              | 13              | 13              |
| <i>E. faecalis</i>    | 53                                                | 13              | 53               | 13               | 53               | 27               | 53               | 53               | 27              | 53              | 27              | 53              |
| <i>B. subtilis</i>    | 13                                                | 13              | 13               | 0                | 13               | 13               | 0                | 0                | 13              | 13              | 0               | 0               |

\*Unidade arbitrária de bacteriocina por mililitro (UA/mL<sup>-1</sup>) = recíproca da maior diluição que apresentou inibição.

A atividade antimicrobiana frente ao *B. subtilis* foi menor em comparação a atividade sem a ação da enzima (13 UA/mL). O sobrenadante da BAL 127<sub>v</sub> apresentou decréscimo na sua atividade antimicrobiana de 27 UA/mL contra a bactéria indicadora *K. pneumoniae*. Para *B. subtilis* 7 BAL tiveram sua atividade antimicrobiana reduzida e 5 BAL não apresentaram atividade após serem submetidas ao tratamento com a enzima proteolítica. As atividades variaram de 53 a 0 UA/mL.

#### 3.4.2 Sensibilidade ao pH e a temperatura

Os sobrenadantes apresentaram diferentes sensibilidades para as variações de pH testadas, conforme mostra a Tabela 6. O sobrenadante da BAL 137<sub>v</sub> manteve-se estável do pH 2,0 até o pH 11,0, com valores de 107 a 27 UA/mL.

**Tabela 6.** Efeito do pH e tratamento térmico sobre na ação das bacteriocinas produzidas por bactérias ácido lácticas frente às bactérias indicadoras *Klebsiella pneumoniae* ATCC 26665, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

|                      | pH   | *Atividade de Bacteriocina (UA/mL <sup>-1</sup> ) |                 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                 |                 |                 |                 |
|----------------------|------|---------------------------------------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                      |      | 125 <sub>v</sub>                                  | 50 <sub>v</sub> | 137 <sub>v</sub> | 133 <sub>v</sub> | 127 <sub>v</sub> | 110 <sub>v</sub> | 111 <sub>v</sub> | 141 <sub>v</sub> | 24 <sub>A</sub> | 21 <sub>A</sub> | 28 <sub>v</sub> | 57 <sub>v</sub> |
| <i>K. pneumoniae</i> | 2,0  | 107                                               | 107             | 107              | 107              | 107              | 107              | 107              | 107              | 107             | 107             | 107             | 107             |
|                      | 4,0  | 27                                                | 27              | 27               | 27               | 27               | 53               | 27               | 27               | 27              | 27              | 27              | 27              |
|                      | 7,0  | 53                                                | 0               | 107              | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                | 0               | 0               | 0               | 0               |
|                      | 9,0  | 0                                                 | 0               | 107              | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                | 0               | 0               | 0               | 0               |
|                      | 11,0 | 0                                                 | 0               | 107              | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                | 0               | 0               | 0               | 0               |
| <i>E. faecalis</i>   | 2,0  | 107                                               | 107             | 107              | 53               | 107              | 107              | 107              | 107              | 27              | 107             | 107             | 107             |
|                      | 4,0  | 107                                               | 27              | 107              | 53               | 53               | 53               | 27               | 27               | 0               | 27              | 27              | 27              |
|                      | 7,0  | 0                                                 | 0               | 107              | 53               | 13               | 13               | 13               | 0                | 0               | 0               | 0               | 0               |
|                      | 9,0  | 13                                                | 0               | 107              | 53               | 0                | 0                | 0                | 0                | 0               | 0               | 0               | 0               |
|                      | 11,0 | 0                                                 | 0               | 107              | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                | 0               | 0               | 0               | 0               |
| <i>B. subtilis</i>   | 2,0  | 107                                               | 107             | 107              | 107              | 107              | 107              | 107              | 107              | 107             | 107             | 107             | 107             |
|                      | 4,0  | 107                                               | 53              | 107              | 53               | 53               | 53               | 53               | 27               | 27              | 27              | 27              | 27              |
|                      | 7,0  | 107                                               | 53              | 53               | 13               | 13               | 13               | 13               | 0                | 0               | 0               | 0               | 0               |
|                      | 9,0  | 53                                                | 53              | 107              | 0                | 0                | 13               | 13               | 0                | 0               | 0               | 0               | 0               |
|                      | 11,0 | 53                                                | 53              | 53               | 0                | 0                | 0                | 0                | 0                | 0               | 0               | 0               | 0               |

\*Unidade arbitrária de bacteriocina por mililitro (UA/mL<sup>-1</sup>) = recíproca da maior diluição que apresentou inibição.

A BAL 125<sub>v</sub> também obteve estabilidade aos diferentes pHs a que foi submetida variando de 107 a nenhuma UA/mL. Todos os sobrenadantes foram estáveis nos pHs 2,0 e 4,0. As BALs demonstraram maior sensibilidade pH 7,0, pH 9,0 e ao pH 11,0, quando submetidas à atividade antimicrobiana para *Klebsiella pneumoniae* ATCC 26665, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Quanto à resistência à temperatura todas as substâncias antimicrobianas mantiveram-se em atividade com 10 minutos de aquecimento quando testadas contra *Klebsiella pneumoniae* ATCC 26665. Após 30 minutos sob 100°C, apenas os sobrenadantes expostos ao pH 2,0 obtiveram atividade contra o mesmo patógeno, perdendo sua eficiência total depois de 60 minutos ao serem submetidas nesta

temperatura. Contra *Enterococcus faecalis* ATCC 6057 as substâncias antimicrobianas resistiram aos tempos testados apenas sob a condição do pH 2,0. Diferentemente ocorreu com a bactéria reveladora *Bacillus subtilis* ATCC 6633, onde todas foram estáveis a todas as temperaturas, apresentando, apenas, decréscimo de atividade quando expostas ao pH 6,0.

### 3.5 Avaliação de resistência a antibióticos

Em nosso estudo, as 12 BAL analisadas apresentaram sensibilidade para a maioria dos antibióticos testados de acordo com a Tabela 7.

**Tabela 7.** Diâmetro do halo da sensibilidade ou resistência a antibióticos de BAL.

| BAL              | Antibióticos          |              |            |             |              |              |              |              |
|------------------|-----------------------|--------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                  | Diâmetro do halo (mm) |              |            |             |              |              |              |              |
|                  | RIF<br>5 µg           | TET<br>30 µg | PEN<br>10U | CIP<br>5 µg | EST<br>10 µg | CEF<br>30 µg | AMP<br>10 µg | GEN<br>10 µg |
| 125 <sub>V</sub> | R                     | I            | S          | I           | R            | I            | S            | R            |
| 50 <sub>V</sub>  | S                     | S            | S          | S           | R            | S            | S            | S            |
| 137 <sub>V</sub> | I                     | I            | R          | I           | R            | S            | S            | R            |
| 133 <sub>V</sub> | I                     | I            | S          | S           | R            | S            | S            | R            |
| 127 <sub>V</sub> | S                     | S            | S          | S           | R            | S            | S            | R            |
| 110 <sub>V</sub> | S                     | S            | S          | S           | R            | S            | S            | R            |
| 111 <sub>V</sub> | S                     | S            | S          | I           | R            | S            | S            | R            |
| 141 <sub>V</sub> | S                     | S            | S          | S           | R            | S            | S            | R            |
| 24 <sub>A</sub>  | S                     | S            | S          | I           | R            | S            | S            | R            |
| 21 <sub>A</sub>  | S                     | S            | S          | S           | R            | S            | S            | R            |
| 28 <sub>A</sub>  | S                     | S            | S          | S           | R            | S            | S            | R            |
| 57 <sub>V</sub>  | S                     | S            | S          | S           | R            | S            | S            | R            |

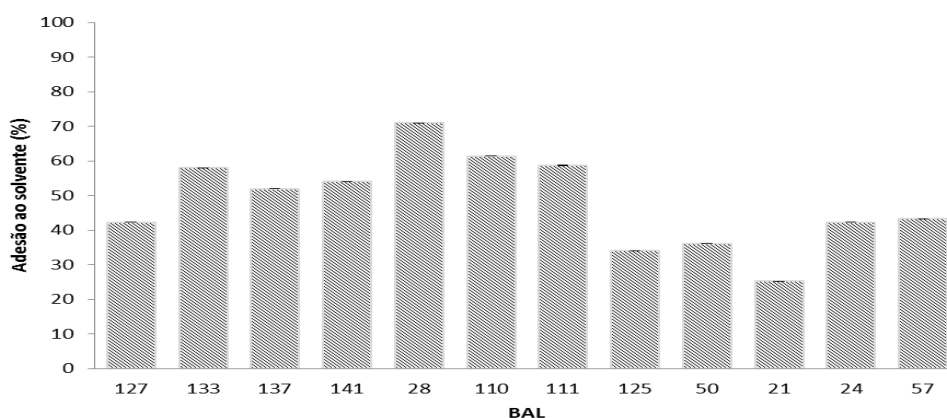
RIF, Rifampicina; TET, Tetraciclina; PEN, Penicilina; CIP, Ciprofloxacina; EST, Estreptomicina; CEF, Cefalexina; AMP, Ampicilina; GEN, Gentamicina. S=Sensível; I=Intermediário; R=Resistente.

Todas foram sensíveis para Ampicilina 10µg, Cefalexina 30µg e Penicilina 10U, com exceção das BAL 125<sub>V</sub> que apresentou-se intermediária ao efeito do Cefalexina 30µg e 137<sub>V</sub> que resistiu a ação do Penicilina 10U. 12 BAL mostraram-se resistentes ao antibiótico Estreptomicina 10µg. Apenas a 50<sub>V</sub> foi resistente à Gentamicina 10µg.

### 3.6 Adesão microbiana a solventes (MATS)

O método MATS foi utilizado para avaliar a propriedade de adesão das BAL isoladas à superfície celular. Os resultados estão apresentados na Figura 1. Podemos observar que as BAL testadas apresentaram de alta à baixa adesão. A BAL 28<sub>A</sub> apresentou mais de 70% de adesividade em comparação as demais. Das 12 BAL avaliadas, 5 apresentaram adesividade moderada, com valores entre 50% a 60%, enquanto que 6 mostraram baixa adesividade ao solvente.

A BAL 21<sub>A</sub> aderiu 25,18% ao solvente, revelando sua baixa adesividade.

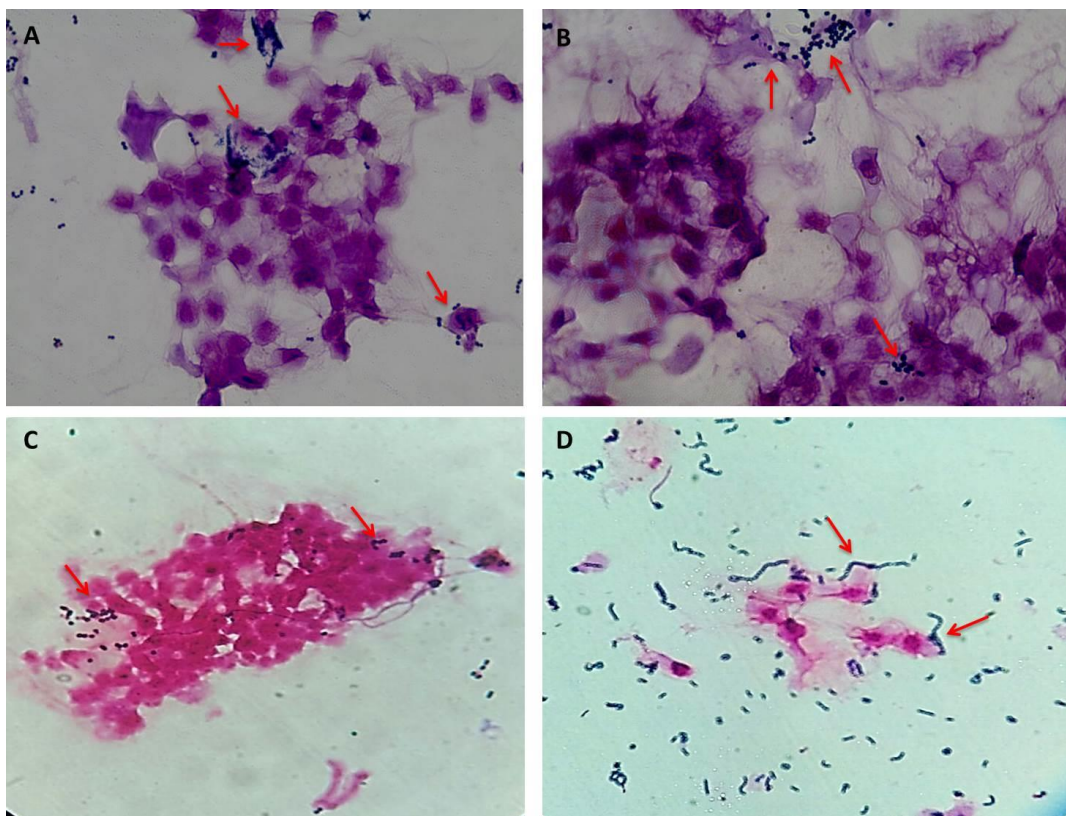


**Figura 1.** Média e desvio padrão dos resultados para adesão de BAL ao xilol. Simulação da adesividade intestinal.

### 3.7 Adesão de BAL às células epiteliais

De acordo com os resultados observados através de análises microscópicas como apresentados na Figura 2, as BAL 133<sub>V</sub> e 137<sub>V</sub> apresentaram aderência à superfície das células epiteliais. Outras BAL, como a 141<sub>V</sub>, 125<sub>V</sub>, 57<sub>V</sub> e 24<sub>A</sub> também apresentaram propriedades de adesão.

Tais resultados corroboram com a adesão ao solvente em que as BAL 133<sub>V</sub> e 137<sub>V</sub> obtiveram 57,95% e 51,95% de moderada adesividade, respectivamente. A BAL 57<sub>V</sub> apresentou 48,23% de adesão e a 24<sub>A</sub> aderiu 42,29%. Ambas com baixa adesividade, conforme a análise anterior (Item 3.6). Estes dados reafirmam os achados obtidos a partir da adesão às células epiteliais.



**Figura 2.** Análise microscópica da adesão *in vitro* das BAL 133<sub>v</sub> (A), 137<sub>v</sub> (B), 57<sub>v</sub> (C) e 24<sub>a</sub> (D) às células epiteliais extraídas do intestino delgado de camundongos da linhagem Swiss albino coradas com Gram. As setas indicam a BAL aderida à superfície das células.

## 4 DISCUSSÃO

A busca por micro-organismos com características probióticas vem sendo realizada há muito tempo. Em especial, as bactérias ácido lácticas, pois elas apresentam a capacidade de serem conservantes de alimentos, além da possibilidade como probióticas, assim teriam dupla aptidão. Neste trabalho foram adotados os critérios estipulados para probióticos de acordo com as diretrizes de seleção da comissão da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS) (FAO/WHO, 2002) com objetivo de selecionarmos bactérias ácido lácticas que possam ser usadas como probióticas para humanos ou animais.

A maioria das BAL que foram isoladas exibiu atividade antagonista contra micro-organismos indicadores. Outros autores em seus estudos observaram a habilidade das BAL na inibição de patógenos entéricos, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* (Thirabunyanon e Hongwittayakorn, 2013). Pressupomos que o efeito antagônico tenha sido expresso

por possíveis bacteriocinas produzidas pelas BAL - que têm a capacidade de inibir agentes patogênicos transmitidos pelos alimentos.

As substâncias com propriedades antimicrobianas produzidas pelas bactérias ácido lácticas apresentaram características de interesse, após a incubação por 24 horas. Estas foram ativas contra *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria innocua*, que segundo Bromberg et al. (2006) são bactérias patogênicas pouco afetadas por bacteriocinas. O fato de algumas BAL não terem apresentado atividade antagonista para todos os micro-organismos patogênicos utilizados neste trabalho, pode ser explicado pela necessidade de um período maior de incubação para que compostos antibióticos sejam liberados e um espectro maior de atividade antimicrobiana seja revelado (Pereira e Gomes, 2007).

As alterações do pH dos sobrenadantes obtidos das BAL afetou de modos distintos a sua atividade antimicrobiana. Avaiyarasi et al. (2016) verificaram que a bacteriocina produzida por *Lactobacillus sakei* GM3 era estável a valores de pH variados de 2,0 a 10,0. Entretanto, percebeu-se que a atividade antimicrobiana estava claramente afetada em pH 8,0 e 10,0. Com estes dados podemos inferir que em nossos sobrenadantes há presença de bacteriocinas, pois os achados corroboram com a literatura apresentada, onde as BAL obtiveram melhor ação em valores de pH de 2,0 e de 4,0. Em particular, a BAL 137<sub>v</sub> apresentou uma estabilidade na atividade antimicrobiana a uma grande faixa de pH (2,0 a 11,0), que segundo Todorov et al. (2013) este comportamento é indicativo de outras bacteriocinas na amostra.

A atividade antimicrobiana de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus sakei* e *Lactobacillus lactis* foram perdidas após tratamento enzimático com enzimas proteolíticas e lipolíticas indicando a sua natureza proteínica (Moreno et al. 2000; Pereira e Gómez, 2007; Avaiyarasi et al. 2016; Katharopoulos et al. 2016). O mesmo ocorreu com os sobrenadantes das BAL no presente estudo. De acordo com Bromberg et al. (2006) a perda da atividade antimicrobiana após um tratamento enzimático indica a sensibilidade dos compostos ativos secretados pela linhagem de bactérias lácticas.

Em relação à resistência aos antimicrobianos, sabe-se que esses são uma das principais ferramentas utilizadas pela indústria médica para combater patógenos (Thirabunyanon, Boonprasom e Niamsup, 2009). A maioria das BAL isoladas

mostrou-se sensível aos antibióticos testados, embora resistentes para Estreptomicina e Gentamicina. Argyri et al., (2012) sugerem um determinado cuidado ao fazer uso de bactérias probióticas resistentes aos antibióticos específicos, pois podem transferir resistência para agentes patogênicos intestinais.

Em contrapartida, a resistência aos antibióticos observada para as cepas de *Lactobacillus* no trabalho de Argyri et al. (2012) e os genes resistentes aos aminoglicosídeos de *Lactobacillus* presentes nos estudos de Coppola et al. (2005), Monteagudo-Mera et al. (2012) e Morrow et al. (2012) são cromossômicos e considerados intrínsecos ou de resistência natural – codificado cromossomicamente – não facilmente transferíveis para outras espécies. Portanto, é possível que as BAL apresentem resistências intrínsecas aos antibióticos aminoglicosídeos testados – o que não prejudicaria o hospedeiro ao fazer uso da mesma – sendo benéfica no sentido de minimizar os efeitos adversos que os antibióticos podem apresentar contra a microbiota intestinal.

A aplicação de probióticos como alimento funcional tem aumentado continuamente dando significado para a saúde humana a cada ano (Thirabunyanon, Boonprasom e Niamsup, 2009). Os ensaios de sobrevivência sob condições adversas do trato gastrointestinal têm o potencial para elucidar um possível comportamento bacteriano nessas condições (Maragkoudakis et al., 2006).

Aproximadamente 2,5 litros de suco gástrico e 1 litro de bile são secretados dentro do trato digestivo humano todos os dias. Portanto, é essencial que as bactérias tenham um sistema de proteção para suportar o baixo pH do estômago, ou seja, devem ser tolerantes ao pH 3 ou, pelo menos, tolerantes ao pH 4 – que é o pH da camada de muco gástrico (García et al. 2017) – e depois às enzimas digestivas e aos sais biliares no intestino delgado (Argyri et al., 2012), devendo chegar íntegras até o final do percurso.

As BAL avaliadas neste estudo apresentaram uma resistência adequada de acordo com a literatura entre 3 – 8 log UFC/mL (Das, Khowala e Biswas, 2016; Santos et al., 2016; Abushelaibi et al., 2017; Plessas et al., 2017). Tal comportamento são propriedades desejáveis em espécies bacterianas para serem consideradas como probióticos devido às condições de estresse encontradas no trato gastrointestinal. Com referencia aos microrganismos probióticos, as BAL mostraram-se viáveis para colonizar a região do estômago e intestino.

Além da resistência ao pH baixo, outro pré-requisito importante é a adesividade das BAL às células epiteliais do intestino para que ocorra uma colonização temporária de cepas probióticas no trato gastrointestinal – impedindo a sua eliminação imediata pelos movimentos peristálticos e proporcionando uma vantagem competitiva neste ecossistema (Kos et al., 2003). Entretanto, o conhecimento sobre os processos de adesão ao epitélio intestinal é escasso, apesar do desenvolvimento de vários métodos de reconhecimento das propriedades hidrofóbicas de micro-organismos (Krasowska e Sigler, 2014). Das cepas analisadas as BAL 28<sub>A</sub>, 110<sub>V</sub>, 111<sub>V</sub>, 133<sub>V</sub>, 137<sub>V</sub> e 141<sub>V</sub> obtiveram resultados satisfatório quanto à sua atividade adesiva, apresentando >50% de adesão ao solvente.

As BAL aderiram de forma variada às células epiteliais de intestino de camundongo. A adesão à mucosa intestinal com células *in vitro*, tem sido considerada uma ferramenta no rastreio de pré-requisitos para avaliar as propriedades adesivas de novas bactérias probióticas (Chen et al. 2014). *Lactobacillus* com mais de 15 células aderidas por célula epitelial foram consideradas positivas no estudo de Kumar e Kumar (2015). Não diferente, em nosso trabalho, as BAL demonstraram propriedades de aderência comparáveis às bem conhecidas bactérias probióticas. Portanto, tal efeito é uma importante característica que pode direcionar as BAL positivamente aos critérios de seleção para seu uso probiótico.

## 5 CONCLUSÃO

Em função dos resultados obtidos nesse estudo, a seguinte conclusão pode ser destacada em relação à BAL 137<sub>V</sub> isolada do queijo de coalho pernambucano – ela é promissora a pertencer ao grupo das bactérias probióticas.

## 6 REFERÊNCIAS

- Abushelaibi, A., Al-Mahadin, S., El-Tarabily, K., Shah, N. P. e Ayuash, M. (2017). Characterization of potential probiotic lactic acid bacteria isolated from camel milk. **Food Science and Technology**. 79:316-325.
- Ahmad, V., Khan, M. S., Jamal, Q. M. S., Alzohairy, M. A., Karaawi, M. A. A., Siddiqui, M. U. (2017). **International Journal of Antimicrobial Agents**. 49:1-11.

- Alwan, A., Deignan, T. O'Sullivan, M., Kelly, J. O'Farrelly, C. (1998). Quantitative assay of *Salmonella* adherence to intestinal epithelia cells: A new method for assessing novel intervention products. **Journal of Microbiological Methods**. 33:163-170.
- Antibiotic susceptibility of *L. rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. **Lait**. 85:193-204.
- Argyri, A. A.; Zoumpopoulou, G.; Karatzas, K. A. G. (2013). Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. **Food microbiology**. 33:282–91.
- Avaiyarasi, N. D., Ravindran, A. D., Venkatesh, P., Arul, V. (2016). In vitro selection, characterization and cytotoxic effect of bacteriocin of *Lactobacillus sakei* GM3 isolated from goat milk. **Food Control**. 69:124-133.
- Boonprasom P., Niamsup P. (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated. **Biotechnol. Lett.** 31:571-576.
- Boonprasom P., Niamsup P. (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated. **Biotechnol. Lett.** 31:571-576.
- Bromberg, R., Moreno, I., Delboni, R. R., Cintra, H. C. (2006). Características da bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae* CTC484 e seu efeito sobre *Listeria monocytogenes* em carne bovina. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 26:135-144.
- Castellano, P., González, C., Carduza, F., Vignolo, G. (2010). Protective action of *Lactobacillus curvatus* CRL705 on vacuum-packaged raw beef. Effect on sensory and structural characteristics. **Meat Science**, 85:394-401.
- Chen, P., Zhang, Q., Dang, H., Liu, X., Tian, F., Zhao, J., Chen, Y., Zhang, H., Chen, W. (2014). Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity. **Food Control**. 35:65-72.
- Clardy, J., Fischbach, M. A., Walsh, C.T. (2006) New antibiotics from bacterial natural products. **Nat Biotechnol**. 24:1541-50.
- Conway, P.L., Gorbach, S.L., Goldin, B.R., (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. **Journal Dairy Science**. 70:1-12.

- Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G., Sorrentino, E., (2005).
- Dalié, D. K. D.; Deschamps, A. M.; Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. **Food Control**. 21:370-380.
- Das, P., Khowala, S. e Biswas, S.(2016). *In vitro* probiotic characterization of *Lactobacillus casei* isolated from marine samples. **Food Science and Technology**. 73:383-390.
- FAO/WHO, (2002). Report of a Joint FAO/WHO expert consultation on guidelines for the evaluation of probiotics in food. **World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations**, London Ontario, Canada.
- Ghanbari, M., Jami, M., Kneifel, W., Domig, K. J., (2013). Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocins produced by lactobacilli isolated from Sturgeon fish. **Food Control**. 32:379-385.
- Guedes Neto, L. G.; Souza, M. R.; Nunes, A. C.; Nicoli, J. R. e Santos, W. L. M. (2005). Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Supl.** 2:245-250.
- Katharopoulos, E., Touloupi, K., Touraki, M. (2016). Monitoring of multiple bacteriocins through a developed dual extraction protocol and comparison of HPLC-DAD with turbidometry as their quantification system. **Journal of Microbiological**. 127:123-131.
- Kingcha, Y., Tosukhowong, A., Zendo, T., Roytrakul, S., Luxananil, P., Chareonpornsook, K., . Visessanguan, W. (2012). Anti-listeria activity of *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772 and application as starter culture for Nham, a traditional fermented pork sausage. **Food Control**, 25:190-196.
- Kos, B.; Suskovic, J.; Vukovic, S.; Simpraga, M.; Frece, J. e Matosic, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**. 94:981-987.
- Krasowska, A. e Sigler, K. (2014). How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. 4:1-7.

- Laheinen, T., Malinen, E., Koort, J. M. K., Mertaniemi-Hannus, U., Hankimo, T., Karikoski, N. Pakkanen, S., Laine, H., Sillanpaa, H., Soderholm, H., Palva, A. (2010). Probiotic properties of *Lactobacillus* isolates originating from porcine intestine and feces. **Anaerobe**. 16:293-300.
- Maragkoudakis, P. A.; Zoumpopoulou, G.; Miaris, C.; Kalantzopoulos, G.; Pot, B. e Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**. 16:189-199
- Masood, M. I.; Qadir, M. I.; Shirazi, J. H.; Khan, I. U. (2011). Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. **Critical Reviews in Microbiology**. 37: 91-98.
- Mayr-Harting, A., Hedges, A. J., Berkeley, R. C. W. (1972). Methods for studying bacteriocins. In: Norris, J. R., Ribbons, D. W. (ed.) **Methods in Microbiology**. New York, Academic Press Inc., v. 7A, p. 315-422, ISBN 0-12-521546-0.
- Monteagudo-Mera, A.; Rodríguez-Aparicio, L.; Rúa, J.; Martínez-Blanco, H.; Navasa, N.; García-Armesto, M. R.; Ferrero, M. A. (2012). In vitro evaluation of physiological probiotic properties of diferente lactic acid bactéria strains of dairy and human origin. **Journal of functional foods**. v. 4, p. 531-541.
- Moreno, I., Lerayer, A. L. S., Baldini, V. L. S., Leitão, M. F. F. (2000). Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. **Brazilian Journal of Microbiology**. 31:184-192.
- Morrow, L.E.; Gogineni, V.; Malesker, M.A. (2012). Probiotics in the intensive care unit. **Nutr. Clin. Pract.** 27:235-241.
- NCCLS (2003).Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard (8th ed.), Wayne, **PA: NCCLS document M2-A8**. NCCLS.
- Ng, S. C.; Hart, A. L.; Kamm, M. A.; Stagg, A. J.; Knigth, S. C. (2009). Mechanisms of action of probiotics: recent advances. **Inflamm Bowel Dis**. v. 15, n. 2, p. 300-310.
- Nigueira, J. C. e Gonçalves, M. C. R. (2011). Probióticos – Revisão da Literatura. **Ver. Bras. Ciências da Saúde**. 4:487-492.
- Oelschlaeger, T. A. (2010). Mechanisms of probiotic actions – A review. **International Journal of Medical Microbiology**. 300:57-62.

Oliveira, M. E. G.; Garcia, E. F.; Oliveira, C. E. V.; Gomes, A. M. P.; Pintado, M. M. E.; Madureira, A. R. M. F.; Conceição, M. L.; Queiroga, R. C. E. e Souza, E. L. (2014). Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. **Food Reaseasch International**. 64:241-247.

Oliveira, T. F., (2009). Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**. 16p.

Oliveira, T. F., (2009). Concentração Mínima Inibitória (CMI) de antibióticos para oito estirpes de bactérias diazotróficas da Coleção de Culturas da Embrapa Agrobiologia. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**. 16p.

Oliveira-Serqueira, T. C. G.; Ribeiro, C. M.; Gomes, M. I. F. V. (2008). Probiotics as potential biotherapeutic agentes targeting intestinal parasites. **Ciência Rural**, Santa Maria. 38:2670-2679.

Ozcelik, S.; Kuley, E. e Ozogul, F. (2016). Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. **Food Science and Technology**. 73:536-542.

Parada, J. L.; Caron, C. R.; Medeiros, A. B. P.; Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. **Braz. arch. biol. technol**. 50:512-542.

Pelczar, M. J., Reid, R., Chan, E. C. S. (1981). **Microbiologia**. São Paulo: Ed. Mcgraw. Hill do Brasil. 1072p.

Pereira, V. G. e Gómez, R. J. H. C. (2007). Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos. **Semina: Ciências Agrárias**. 28:229-240.

Peyer, L. C.; Axel, C.; Lynch, K. M.; Zannini, E.; Jacob, F. e Arendt, E. K. (2016). **Food Control**. 69:227-236.

Plessas, S., Nouska, C., Karapetsas, A., Kazakos, S., Alexopoulos, A., Mantzourani, I., Chondrou, P., Fournomiti, M., Galanis, A. e Bezirtzoglou, E. (2017). Isolation, characterization and evaluation of the probiotic potential of a novel *Lactobacillus* strain isolated from Feta-type cheese. **Food Chemistry**. 226:102-108.

- Pranckutė, R., Kaunietis, A., Kuisienė, N., Citavicius, D. J. (2016). Combining prebiotics with probiotic bacteria can enhance bacterial growth and secretion of bacteriocins. **International Journal of Biological Macromolecules** . 89:669–676.
- Rijkers, G. T.; Bengmark, S.; Enck, P.; Haller, D.; Herz, U.; Kaççiomaki, M.; Kudo, S.; Lenoir-Wijnkoop, I.; Mercenier, A.; Myllyluoma, E.; Rabot, S.; et al. (2010). Guidance for Substantiating the Evidence for Beneficial Effects of Probiotics: Current Status and Recommendations for Future Research. **The Journal of Nutrition**. 3:671S-676S.
- Rosenberg, M. e Kjelleberg, S. (1986). Hydrophobic interactions in bacterial adhesion. **Adv. Microb. Ecol.** 9:353–393.
- Rosenberg, M.; Gutnick, D. e Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons, a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**, 9:29–33.
- Santos, T. T., Ornellas, R. M., Arcucio, L. B., Oliveira, M. M., Nicoli, J. R., Dias, C. V. Uetanabaro, A. P. T. e Vinderola, G. (2016). Characterization of lactobacilli strains derived from cocoa fermentation in the south of Bahia for the development of probiotic cultures. **Food Science and Thecnology**. 73:259-266.
- Speck, M.L. (1984). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. **APHA**, 2.ed., Washington, DC. p.409.
- Stevens, K. A., Sheldon, B.W., Klapes, N. A., Klaenhammer, T.R., (2007) Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. **Appl Environ Microbiol**. 57:3613-15.
- Thirabunyanon, M. e Hongwittayakorn, P. (2013). Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria of Human Origin Induce Antiproliferation of Colon Cancer Cells via Synergic Actions in Adhesion to Cancer Cells and Short-Chain Fatty Acid Bioproduction. **Appl. Biochem. Biotechnol**. 169:511-525.
- Thirabunyanon, M.; Thongwittaya, N. (2012). Protection activity of a novel probiotic strain of *Bacillus subtilis* against *Salmonella Enteritidis* infection. **Research in Veterinary Science**. 93:74-81.
- Villena, J.; Vizoso-Pinto, M. G.; Rodriguez, V.; Salva, S.; Alvarez, S. e Kitazawa, H. (2013). Modulation of mucosal antiviral immuneresponse by immunobiotic lactic acid

bacteria – Part I: the intestinal mucosa. **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education.** 1805-1813.

Wook Lee, K.; Shim, J. M.; Park, S-K.; Heo, H-J.; Kim, H-J., Ham, K-S. e Kim, J. H. 2016. Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potentials from kimchi, traditional Korean fermented vegetable. **Food Scienc and Technology.** 71:130-137.

Woraprayote, W.; Malila, Y.; Sorapukdee, S.; Swetwathana, A.; Benjakil, S. e Viessanguan, W. (2016). Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. **Meat Science.** 120:118-132.

Xie, N.; Zhou, T.; Li, B. (2012). Kefir yeasts enhance probiotic potentials of *Lactobacillus paracasei* H9: The positive effects of coaggregation between the two strains. **Food Research International.** 45:394-401.

Yang, E.; Fan, L.; Jiang, Y.; Doucette, C.; Fillmore, S. (2012). Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. **AMB Express a Springer Open Journal.** 2:1-12.

You, J.; Dong, H.; Mann, E. R.; Knight, S. C. e Yaqoob, P. (2014). Probiotic modulation of dendritic cell function is influenced by ageing. **Immunobiology.** 219:138-148.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados obtidos neste estudo foram importantes para evidenciar a importância da BAL para saúde humana e animal como probiótico, sendo uma promissora quanto aos benefícios nutracêuticos. Este estudo fomenta a importância sobre a valorização do patrimônio imaterial do estado de Pernambuco: o queijo de Coalho, trazendo novas perspectivas sobre as pesquisas científicas no setor de laticínios, agregando valor econômico a região.

Com base nos dados experimentais, nas revisões sistemáticas e metanálise realizadas, futuros estudos serão encaminhados para elucidar questões sobre a atuação das BAL como probiótico e sua ação adjuvante na prevenção do câncer de cólon, trazendo para Pernambuco o reconhecimento de um produto tipicamente nordestino com grande potencial agregador ao bem-estar do consumidor.

## **ANEXO 1**

Aceite do primeiro artigo ao periódico:  
*Pesquisa Veterinária Brasileira*

**Decision Letter (PVB-4866.R1)**

12-Sep-2016

Dear Miss Calaça:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Podem as bactérias ácido lácticas probióticas apresentarem efeito antitumoral em modelo animal de câncer de cólon? Uma revisão sistemática da literatura" in its current form for publication in the Pesquisa Veterinária Brasileira.

Now that your manuscript has been accepted for publication, please proceed for payment in:

if you are are paying from inside Brazil:

[http://pvb.sct.embrapa.br/?submission\\_id=PVB-4866.R1&](http://pvb.sct.embrapa.br/?submission_id=PVB-4866.R1&)

21-Jun-2016

or

if you are paying from outside Brazil:

[http://pvb.sct.embrapa.br/?tp=1&submission\\_id=PVB-4866.R1&](http://pvb.sct.embrapa.br/?tp=1&submission_id=PVB-4866.R1&)

21-Jun-2016

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Pesquisa Veterinária Brasileira, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

Associate Editor, Pesquisa Veterinária Brasileira

[ambrosio-pvb@uol.com.br](mailto:ambrosio-pvb@uol.com.br), [ceambrosio@usp.br](mailto:ceambrosio@usp.br)

## **ANEXO 2**

Normas para submissão ao periódico  
*Journal Applied Microbiology*

## **Author Guidelines**

*Journal of Applied Microbiology* publishes high quality research and review papers on novel aspects of applied microbiology, including environmental, food, agricultural, medical, pharmaceutical, veterinary, soil, systematics, water and biodeterioration. Papers reporting work on all microorganisms, including viruses, are welcomed providing they demonstrate new findings of significance to the field as a whole.

In 2009, *Journal of Applied Microbiology* updated its Aims and Scope and will now publish only the top 25% of research.

## **ARTICLE TYPES**

### **Original Articles**

Original Articles comprise most of the Journal and should have as their aim the development of concepts as well as the recording of facts. The manuscript should be prepared for a wide readership and as far as possible should present novel results of a substantial programme of research.

### **Review Articles**

Review Articles will present a substantial survey with an adequate historical perspective of the literature on some facet of applied microbiology. We would prefer to see a distillation of early and present work within the field to show progress and explain the present interest and relevance. The manuscript should not be simply a review of past work or be concentrated largely on unpublished results.

## **EDITORIAL PROCESS**

New manuscripts sent to the Journal will be handled first by the Editorial Office who checks compliance with the guidelines to authors. The manuscript is assigned to a handling Editor by the Chief Editor, and goes through a rapid screening process at which stage a decision to reject or to go to full review is made. This step ensures a rapid rejection of unsuitable manuscripts for the journal. Manuscripts that go to full review are assigned a minimum of two reviewers. Following the return of two reports, the handling Editor provides a report to the Chief Editor, who takes the decision to

accept, revise or reject the manuscript. Revised manuscripts are directly handled by the Chief Editor who decides whether or not the manuscript should go back to the handling Editor for additional comments from the reviewers. Following the return of a report from the handling Editor and reviewers, the Chief Editor makes the decision to accept, further revise or reject the manuscript.

Authors may be advised that short papers not exceeding four published pages would be better placed in *Letters in Applied Microbiology*. Sequential publication of numbered papers will not be permitted.

## **EDITORIAL POLICY**

To ensure responsible publication practices, this Journal adheres to Wiley Blackwell's publication ethics policies, which include guidelines on handling suspected publication misconduct and complaints about the Journal. This Journal is a member of, and subscribes to the principles of, the Committee on Publication Ethics.

### **Authorship**

Qualification for authorship should comprise (1) substantial contribution to conception and design or the acquisition and analysis of data, (2) drafting or critically revising the manuscript, and (3) approval of the final submitted version. All authors must satisfy all three criteria, and all those who do satisfy this criteria must be included in the list of authors when the paper is submitted to the Journal. By submission of a manuscript to the Journal, all authors warrant that they have the authority to publish the material and that the paper, or one substantially the same, has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere. Submissions may be subject to testing for textual similarity to other published works via the CrossCheck software employed by the Journal.

### **Conflict of interest disclosure**

*Journal of Applied Microbiology* requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential

sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter to the Chief Editor, in the manuscript (in the Conflict of Interest section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

### **Ethics of experimentation**

The Journal will only accept manuscripts in which there is evidence of the ethical use of animals or harmful substances. The care and use of experimental animals must comply with all relevant local animal welfare laws, guidelines and policies, and a statement of such compliance should be provided upon submission. Where possible, alternative procedures that replace the use of animals, either partially or completely, for example *in vitro* biological systems, should be used. Where this is not possible, the minimum number of animals should be used and pain and suffering reduced, consistent with attaining the scientific objectives of the study. All reasonable steps must be taken to ensure the humane treatment of animals, so as to minimize discomfort, distress and pain. Animals in pain or moribund should be painlessly killed according to local euthanasia regulations. The Journal encourages corresponding authors of manuscripts involving animal research to refer to the ARRIVE guidelines before submission of a manuscript.

### **Potential threat to security**

The Journal expects that all authors will conform to the National Science Advisory Board for Biosecurity (NSABB) guidelines for Dual Use Life Sciences Research. Where a reviewer is concerned that an article might include information that could be a threat to security then the Editor will treat the article as possible DURC (dual use research of concern) and may consult a specialist reviewer. Their advice will be taken into account by the Editor in making any final decision on publication.

## **Biosecurity**

The Journal asks authors of papers related to Schedule 5 biological agents to inform the Editor at the time of manuscript submission if their study has the potential for both benevolent and malevolent application. This is often referred to as “dual use research of concern”. The National Science Advisory Board for Biosecurity (NSABB) guidelines state that a “dual use research of concern” can arise in relation to “research that, based on current understanding, can be reasonably anticipated to provide knowledge, products, or technologies that could be directly misapplied by others to pose a threat to public health and safety, agricultural crops and other plants, animals, the environment, or material”.

## **Antibiotic antimicrobial testing and microbial resistance**

A number of methods like disc diffusion, Etest, agar dilution, broth microdilution and broth macrodilution, are suitable for *in vitro* antimicrobial susceptibility testing. However, the test used must be performed in accordance with an internationally accepted procedure; for example tests published by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC), the Deutsches Institut für Normung e.V. (DIN) and the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Further guidance and interpretation of MIC 50 and MIC 90 values as well as guidance for the interpretation of multiresistance can be found in Schwarz *et al.* J. Antimicrobial Chemother 2010; 65: 601-604.

## **Data availability**

Data that is integral to the paper must be made available in such a way as to enable readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in the paper. Any restriction on the availability of this data must be disclosed at the time of submission. Data may be included as part of the main article where practical. We recommend that data for which public repositories are widely used, and are accessible to all, should be deposited in such a repository prior to publication. The appropriate linking details and identifier(s) should then be included in the publication and where possible the repository, to facilitate linking between the journal article and the data. If such a repository does not exist, data should be included as supporting

information to the published paper or authors should agree to make their data available upon reasonable request.

- Nucleotide sequence data should be deposited in the EMBL/GenBank/DDBJ Nucleotide Sequence Data Libraries and the accession number referenced in the manuscript text, e.g. “E. coli (GenBank accession no. EUXXXXXX.X)”. Sequence data should only be included if they are new (unpublished), complete (no unidentified nucleotides included) and if the sequence information itself provides important new biological insights of direct relevance to the question addressed in the manuscript. Generally sequences should not be submitted if the same gene has been reported in another species unless a comparison with related sequences contributes important new information.
- Presentation of nucleotide sequences should include clear indications of nucleotide numbers and points of interest, e.g. promoter sequences, ribosome binding sites, mutations, insertions, probe sequences, etc. In the case of comparisons, nucleotides which differ between the sequences should be readily visible to the reader, e.g. by the use of bold face, shading, boxing or by the use of a dash to represent identical nucleotides. The font size used in the manuscript should facilitate appropriate reduction of the figure.

## Copyright Transfer Agreement

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp)

## OnlineOpen

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

### **Referrals to the Open Access Journal *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition***

This journal works together with two of Wiley's open access journals, *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition* to enable rapid publication of good quality research that is unable to be accepted for publication by our journal. Authors may be offered the option of having the paper, along with any related peer reviews, automatically transferred for consideration by one of these two journals. *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition* are Wiley open access journals and article publication fees apply. For more information, please go to [www.microbiologyopen.com/info](http://www.microbiologyopen.com/info) and [www.foodscience-nutrition.com/info](http://www.foodscience-nutrition.com/info).

### **SUBMISSION**

Authors should submit their manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/appliedmicrobiology>. The main text of a manuscript must be submitted as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. For review purposes submitted papers (both original and revised articles) must

be formatted with continuous line numbering and double spaced text throughout. All original files that you upload will be available for the Editorial Office to access.

#### Cover letter

The cover letter should contain answers to the following two questions, which will help the Editors in determining whether your manuscript should be sent for full peer review (~50 words per answer):

1. How does this work fit the Aims and Scope of the Journal?
2. In what way is this work novel?

The cover letter should also disclose any potential sources of conflict of interest that Editors may consider relevant to their manuscript.

#### **Suggesting reviewers**

Authors are invited to suggest at least two reviewers. It is not appropriate for reviewers to be members or former members of the authors' organization(s), or to have been associated with them. Conversely, authors may identify 'non-preferred' reviewers or institutions that they would rather were not approached. Authors should give justification for choosing non-preferred reviewers or institutions in their cover letter. Authors are advised that handling Editors reserve the right to select reviewers of their choice.

### **MANUSCRIPT PREPARATION AND PRESENTATION**

Manuscripts should be drafted as concisely as possible. As space in the Journal is at a premium, the Editors always reserve the right to require authors to reduce the length of their manuscripts. Manuscripts will not be reviewed unless the English is of a publishable standard.

It is strongly recommended that you use the author submission checklist to help you to prepare your submission to the Journal.

The main text of the manuscript should be prepared as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. Text must be double-spaced, and the pages of the manuscript must be numbered consecutively.

The title page should show the title of the manuscript; the names of authors and place(s) where the work was done; an abbreviated running headline not exceeding 35 letters and spaces; and the complete contact details for the corresponding author.

Original Articles should contain the following sections in this order:

- **ABSTRACT:** A brief summary of about 150-200 words, should give the major findings of the investigation under the following four headings: Aims; Methods and Results; Conclusions; Significance and Impact of Study. A list of between five and eight keywords should be added;
- **INTRODUCTION:** A balance must be struck between the pure and applied aspects of the subject;
- **MATERIALS AND METHODS:** Ensure that the work can be repeated according to the details provided. By submission of a manuscript, the authors consent that biological material, including plasmids, viruses and microbial strains, unobtainable from national collections will be made available to members of the scientific community for non-commercial purposes subject to national and international regulations governing the supply of biological material. In the case of a new diagnostic PCR, you should consider the need for an internal amplification control (JAM 2004 96(2):221; available here).
- **RESULTS:** Well-prepared tables and figures must be a cardinal feature of the 'Results' section because they convey the major observations to readers who scan a paper. Information provided in tables and figures should not be repeated in the text, but focus attention on the importance of the principal findings of the study. In general, journal papers will contain between one and seven figures and tables;
- **DISCUSSION:** This must not recapitulate the results and authors must avoid the temptation of preparing a combined 'Results and Discussion' section;
- **ACKNOWLEDGEMENTS:** Contributors who do not qualify as authors should be acknowledged and their particular contribution described. All sources of funding for the work reported, for all the authors, must be acknowledged. Both the research funder and the grant number (if applicable) should be given for each source of funds;
- **CONFLICT OF INTEREST:** If no conflict of interest exists, then 'no conflict of interest declared' should appear within this section. Otherwise, authors should list all pertinent commercial and other relationships that may be perceived as a potential source of conflict of interest.
- **REFERENCES;**

- **SUPPORTING INFORMATION** (if applicable): Supporting Information can be a useful way for an author to include important but ancillary information with the online version of an article. Examples of Supporting Information include additional tables, data sets, figures, movie files, audio clips, 3D structures, and other related nonessential multimedia files. Supporting Information should be cited within the article text. The availability of supporting information should be indicated in the main manuscript by a section headed 'Supporting Information', under which should be appropriate legends for the material. It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format. For further information on recommended file types and requirements for submission, please visit: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppinfo.asp>

Review Article manuscripts must normally not exceed 32 pages (A4) including references, figures and tables. As references can make a heavy demand on the pages available to you, it is suggested that you select key references only. The headings in Review Articles are of the author's choice, but the manuscript should begin with a short SUMMARY of 150-200 words.

## References

The Harvard system should be used. Citation of references having three or more names should be cited in the text as Jones *et al.* (1992) at the first and subsequent times of quoting the reference. A series of references should be given in ascending date order (Green and Smith 1946; Jones *et al.* 1956). Names with the prefixes de, do van, von, etc. will be placed in alphabetical order of the first letter of the prefix, e.g. von Braun would appear under 'V'. Different publications having the same author(s) and year will be distinguished by, for example, 1992a, 1992b. Papers or other publications having no obvious author(s) should usually be cited as 'Anon.' with the year in the text and bibliography. Web sites should be quoted in the text with an access date. Abbreviate journal titles according to Index Medicus ([http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms\\_cond.html](http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html)). Personal communications should be cited in the text with initials and family name of all individuals.

The following is an example of order and style to be used in the manuscript:

Fricker, C.R. (1995) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. In Protozoan Parasites in Water ed. Betts, W.B., Casemore, D., Fricker, C.R., Smith, H.V. and Watkins, J. pp.91-96. London: The Royal Society of Chemistry.

Garner, J.S. and Favero, M.S. (1985) *Guidelines for Handwashing and Hospital Environment Control*. US Public Health Service, Centers for Disease Control HHS No. 99-117. Washington DC: Government Printing Office.

Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and Carter, M.J. (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* **39**, 127-135.

## Tables

Tables must be prepared in the same format as the manuscript text, and should ideally appear at the end of the main manuscript file. Tables must not include ruled vertical or horizontal lines with the exception of headers and a footer (see example). The use of explanatory footnotes is permissible and they should be marked by the following (shown in order of preference): \*, †, ‡, §, ¶, \*\*, †† etc. For an example of table style, [click here](#).

## Figures

Figures should be uploaded to the online submission site as separate files. Authors are advised that poor quality figures may delay the publication of their paper. Symbols or keys representing data series in graphs and charts must not be shown on the figure itself but be included in the legend. For an example of figure style, [click here](#).

Photographs must be of good quality and high contrast. The magnification must be indicated by adding a bar representing a stated length. Composite photographs can reduce the numbers that require publication. The Journal will not accept figures illustrating SDS-PAGE and agarose gels with multiple lanes, where lane order has been rearranged using digital imaging software. The figure should also show sufficient of the gel to reveal reference markers (e.g. the sample origin and a tracker dye, or a lane of molecular mass markers).

- Save line art such as charts, graphs and illustrations in EPS or PDF format. Most programs have a 'Save as...' or 'Export...' feature to allow you to do this

- Save photographic images in TIFF format. These should be at a resolution of at least 300 dpi at final size
- Save figures containing a combination of photographic images and text (eg annotated photographic images with text labels) as EPS or PDF. Any photographic images embedded within these should be at least 300 dpi
- Perform a visual check of the quality of the generated image. You should be able to zoom in to about 300% without the image becoming noticeably blurred or pixelated. If the image does appear pixelated at this zoom, then try going back to the original image and checking that it complies with the recommended format and settings
- Detailed information on the submission of electronic artwork can be found at: [http://media.wiley.com/assets/7323/92/electronic\\_artwork\\_guidelines.pdf](http://media.wiley.com/assets/7323/92/electronic_artwork_guidelines.pdf)

### **Colour figures**

Online-only colour in figures is free of charge, however it is essential in these cases that the figure legends apply equally well to both printed greyscale and online colour versions, and do not specifically refer to the colour. Alternatively you can opt to pay for colour in the print and online versions. If your paper is accepted and you have opted for printed colour, we will need a completed Colour Work Agreement Form. This form can be downloaded as a PDF from here and should be sent to the provided address on acceptance.

### **English usage, abbreviations and units**

Use 'z' spelling where possible, except analyse, dialyse, hydrolyse, etc.; sulfur, sulfate, etc. When using numbers in the text, one to nine should be written in full and 10 and above should be written as numerals. The Journal uses SI units: g l<sup>-1</sup> not g/l; d, h, min, s (time units) but week and year in full; mol l<sup>-1</sup> (not M or N); probability is P; centrifugation conditions relative to gravity (**g**). Please refer to the Biochemical Journal 'Instructions to Authors' [www.biochemj.org/bj/bji2a.htm](http://www.biochemj.org/bj/bji2a.htm).

Please click [here](#) for some examples of common abbreviations used in the Journal.

### **Microbial nomenclature**

The Latin binomial name of micro-organisms, plants and animals (other than farm animals) must be given at first mention in the text; thereafter the generic name will be

abbreviated in such a way that confusion is avoided when dealing with several genera all beginning with the same letter, viz. *Pseudomonas*, *Proteus*, *Pediococcus*, etc. (see list of abbreviations below). Subspecies are italicized (*Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis*); groups and types are printed in Roman and designated by capital letters or Arabic figures (e.g. *Staphylococcus aureus* group A). Common names will not have an initial capital letter nor will they be underlined in the manuscript, viz. pseudomonad, salmonellas. The specific name will be given in full in the captions to tables and figures. Major ranks are written in Roman with an initial capital (e.g. Enterobacteriaceae).

Please click [here](#) for a list of abbreviations currently in use for common generic names and for notes on referring to plant pathogenic bacteria.

### **Gnotobiotic animals**

The terminology for describing the environmental status of animals in gnotobiotic experiments has established itself by usage. *Germ-free* implies freedom from any detectable microorganisms or viruses and it is limited by the tests used to detect contaminants. *Conventional animals* have a full complement of associated microbes. *Open conventional animals* are housed in a standard animal house. *Isolator conventional animals* are maintained in isolators and associated with full flora. *Ex-germ-free* animals are those with an associated flora which have become conventional.

### **Statistics**

Tests must be presented clearly to allow a reader with access to the data to repeat them. Statistical tests used in the study should be clearly indicated in the Materials and Methods section. It is not necessary to describe every statistical test fully, as long as it is clear from the context what was done. In particular, null hypotheses should be clearly stated.

Authors are urged to give consideration to the assumptions underlying any statistical tests used and to assure the reader that the assumptions are at least plausible. Authors should be prepared to use nonparametric tests if the assumptions do not seem to hold.

**Footnotes**

Not permitted other than on the first page of a manuscript where they are used to show the author's change of address and the address for correspondence.

**Experimental hazards**

Chemical or microbiological hazards that may be involved in the experiments must be explained. Authors should provide a description of the relevant safety precautions adopted or cite an accepted 'Code of Practice'.

**English-language editing service**

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found [here](#). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

**AFTER ACCEPTANCE****Proofs**

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF file from this site and corrections made following the instructions sent with the proofs. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetter errors, may be charged separately.

**Early View**

*Journal of Applied Microbiology* is covered by Wiley Online Library's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given

a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

### **Offprints**

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Free access to the final PDF offprint of your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the Journal.

### **Note to NIH Grantees**

Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see [www.wiley.com/go/nihmandate](http://www.wiley.com/go/nihmandate).

### **Author material archive policy**

Please note that unless specifically requested, Wiley Blackwell will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Managing Editor or Production Editor.

### **Disclaimer**

Whilst every effort is made by the Publishers and Editorial Board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this Journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser

concerned. Accordingly, the Publishers and Editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any such inaccurate or misleading data, opinion or statement.

## **ANEXO 3**

Normas para submissão ao periódico  
*Food Microbiology*

**Types of article**

Original research papers for Food Microbiology should be written in English and normally not exceed 6000 words. Short research notes describing interesting but limited studies are welcome, but the same rigorous review process will be applied. Short research notes will not normally exceed 3500 words. Short reviews on matters of immediate interest and longer, definitive reviews will be published; authors should discuss proposed topics with the Editor before preparing a manuscript. Book reviews and letters to the editor are welcome.

**Questions regarding content of a proposed submission may be sent to the Chief Editor:**

M.L. Tortorello  
US Food and Drug Administration  
National Center for Food Safety and Technology  
6502 S. Archer Road  
Summit-Argo, IL 60501, USA  
Fax: +1(708) 728 4177  
E-mail: mlt@cfsan.fda.gov

**Submission checklist**

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

**Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

**All necessary files have been uploaded:****Manuscript:**

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

### **Further considerations**

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

### **Ethics in publishing**

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

### **Declaration of interest**

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. More information.

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent

publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.

### **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted

works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

#### Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

#### **Creative Commons Attribution (CC BY)**

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

#### **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)**

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is USD 3000, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

#### **Green open access**

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their

manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

### **Elsevier Publishing Campus**

The Elsevier Publishing Campus ([www.publishingcampus.com](http://www.publishingcampus.com)) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

### **Language (usage and editing services)**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

## **Additional information**

### **Nomenclature and Descriptions of Organisms**

The correct name of the organism must be used, conforming with international rules of nomenclature: synonyms may be added in brackets when the name is first mentioned. Names of bacteria must conform with the current Bacteriological Code of Botanical Nomenclature. The species name should be underlined in the typescript and written in full at first mention, but subsequently the name of the genus may be abbreviated, single letter abbreviations being used where they are not ambiguous. To facilitate further studies the journal supports the view that important strains should be deposited in a recognized culture collection.

### **Use of word processing software**

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Other than the cover page, every page of the manuscript, including the title page, references, tables etc. should be numbered; however, in the text no reference should be made to page numbers.

## **Article structure**

### **Subdivision - numbered sections**

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in

section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

### **Introduction**

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### **Material and methods**

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

### **Results**

Results should be clear and concise.

### **Discussion**

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### **Conclusions**

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### **Essential title page information**

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address

of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Abstract**

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not exceed 200 words.

### **Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

## Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

More information.

## Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

## Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

## Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### **Units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### **Nomenclature and units**

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry for further information.

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

### **Artwork**

#### **Electronic artwork**

##### **General points**

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.

- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

## **Formats**

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

## **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

## **Color artwork**

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive

information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

### **Figure captions**

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells. Appropriate indications of replication and variability should be included.

### **References**

#### **Citation in text**

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### **Reference links**

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and

indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

### **Web references**

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### **Data references**

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### **References in a special issue**

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

## Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/food-microbiology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

## Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

## Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;
3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

### **Examples:**

#### **Reference to a journal publication:**

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

#### **Reference to a book:**

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

#### **Reference to a chapter in an edited book:**

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

#### **Reference to a website:**

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

#### **Reference to a dataset:**

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

### **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the

video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

### **Data linking**

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that give them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

## **ARTICLE ENRICHMENTS**

### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### **Interactive Phylogenetic Trees**

You can enrich your online articles by providing phylogenetic tree data files (optional) in Newick or NeXML format, which will be visualized using the interactive tree viewer embedded within the online article. Using the viewer it will be possible to zoom into certain tree areas, change the tree layout, search within the tree, and collapse/expand tree nodes and branches. Submitted tree files will also be available for downloading from your online article on ScienceDirect. Each tree must be contained in an individual data file before being uploaded separately to the online submission system, via the 'phylogenetic tree data' submission category. Newick files must have the extension .new or .nwk (note that a semicolon is needed to end the tree). Please do not enclose comments in Newick files and also delete any artificial line breaks within the tree data because these will stop the tree from showing. For NeXML, the file extension should be .xml. Please do not enclose comments in the file. Tree data submitted with other file extensions will not be processed. Please make sure that you validate your Newick/NeXML files prior to submission. More information.

### **R code viewer**

You can enrich your online article by including R code and underlying data sets, which will be displayed in your article on ScienceDirect. All R code and data files should be submitted as part of a single ZIP file. This ensures the code and data files that depend on each other are stored and made available together. R code should be saved as a plain text ASCII file. In your manuscript, you can indicate where the material should appear in the article, by including a note such as "Insert file Rcode.ZIP here". When your article is published on ScienceDirect, readers will be able to interactively explore highlighted R code next to the article page. More information.

### **Interactive plots**

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. Full instructions.

### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

**Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.